

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**SUELLEN RODRIGUES MARTINS**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES ENDOTELIAIS E HEMOSTÁTICOS NO  
TRANSPLANTE RENAL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A EVOLUÇÃO DO  
ENXERTO**

**Belo Horizonte**

**2022**

**SUELLEN RODRIGUES MARTINS**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES ENDOTELIAIS E HEMOSTÁTICOS NO  
TRANSPLANTE RENAL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A EVOLUÇÃO DO  
ENXERTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Lucas Mota

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Nessralla Alpoim

**Belo Horizonte**

**2022**

M383a Martins, Suellen Rodrigues.  
Avaliação de marcadores endoteliais e hemostáticos no transplante renal e suas associações com a evolução do enxerto [recurso eletrônico] / Suellen Rodrigues Martins. – 2022.  
1 recurso eletrônico (110 f. : il.) : pdf

Orientadora: Ana Paula Lucas Mota.  
Coorientadora: Patrícia Nessralla Alpoim.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Rins – Transplante – Teses. 2. Biomarcadores – Teses. 3. Rejeição de enxertos – Teses. 4. Trombina – Teses. 5. Homocisteína – Teses. I. Mota, Ana Paula Lucas. II. Alpoim, Patrícia Nessralla. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 617.461



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

### FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação de marcadores endoteliais e hemostáticos no transplante renal e suas associações com a evolução do enxerto"

SUELLEN RODRIGUES MARTINS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e dois de fevereiro de dois mil e vinte e dois**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

**Claudia Natalia Ferreira**  
Colégio Técnico da UFMG

**Fabiola Paes Leme**  
UFMG

**Maria das Graças Carvalho**  
UFMG

**Kátia de Paula Farah**  
UFMG

**Patricia Nessralla Alpoim**  
UFMG

**Ana Paula Lucas Mota - Orientadora**  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2022.

Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGACT 1238657 SEI 23072.207171/2022-33 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Nessralla Alpoim, Professora do Magistério Superior**, em 22/02/2022, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Professora do Magistério Superior**, em 22/02/2022, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria das Graças Carvalho, Coordenador(a) de coordenação**, em 22/02/2022, às 18:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Natalia Ferreira, Chefe de setor**, em 23/02/2022, às 07:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Katia de Paula Farah, Coordenador(a)**, em 24/02/2022, às 22:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1238657 e o código CRC 44803CEF.

## **COLABORADORES**

- Professora Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Santa'Ana Dusse - Docente da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Dr. Fernando das Mêrces de Lucas Júnior – Médico Nefrologista do Hospital das Clínicas da UFMG
- Professora Dr<sup>a</sup>. Lara Carvalho Godoi – Docente do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC)
- Professora Dr<sup>a</sup>. Danyelle Romana Alves Rios – Docente do curso de Farmácia do Campus Centro Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João del-Rei.
- Professora Dra Rita Carolina Figueiredo Duarte - Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Laboratório de Hematologia da Universidade Federal de São João Del-Rei
- Ambulatório de Transplantes da Unidade Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG
- Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG
- Laboratório CTvacinas, BHtec

## **APOIO FINANCEIRO**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

*Dedico este trabalho a um pequeno cientista e pesquisador, que com toda a sua inteligência, senso crítico e o seu jeitinho observador, me inspira a cada dia. Este trabalho é para você, meu sobrinho e afilhado, Miguel Rodrigues Martins Paz. Te amo!*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço às minhas professoras doutoras, Ana Paula Lucas Mota, Luci Maria Sant'Ana Dusse e Patrícia Nessralla Alpoim. Obrigada por todo o apoio, por acreditar em mim, pelo carinho, amizade e exemplo. Hoje, como docente e pesquisadora, posso me orgulhar em dizer que sou um pouquinho de cada uma de vocês, seja em sala de aula ou na pesquisa.

Agradeço a todos os meus alunos por me motivarem e encherem meu coração de alegria com nossos encontros, sempre divertidos e enriquecedores. Eu aprendo tanto com vocês! Obrigada.

Aos pacientes transplantados renais que contribuíram voluntariamente com este estudo e a todos os doadores de órgãos, que com um ato de amor transformaram as vidas dessas pessoas. Sem eles este trabalho não seria possível.

Às amigas, Carolina Lima, Naiara Almeida, Sarah Coxir, Celma Parreiras, Ana Cristina e Thais Mesquita, que sempre estiveram ao meu lado, com muito apoio, carinho, descontração e companheirismo. Agradeço em especial à Lorraine Alves, Fernanda Gontijo, Tâmara Almeida, Alessandra Lovato, Aislander Junior, Sophia Fortes e Marta Gorgozinho. Vocês são essenciais!

Agradeço a todos os meus familiares que torcem por mim e vibram com cada objetivo alcançado. Em especial, às minhas avós, Herondina e Francisca; minha mãe, Terezinha; meu pai, Antônio (sempre presente em meu coração); meus irmãos Ricardo e Ronaldo; meu padrasto João; a minha cunhada Michelle; ao meu sobrinho Miguel e ao meu melhor amigo e companheiro, Bernardo. Obrigada por me apoiarem, incentivarem, auxiliarem no meu crescimento pessoal e profissional. Vocês são a minha base, amo vocês!

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e a todos os demais colaboradores.

Agradeço a Deus, por permitir e abençoar toda a minha vida.

*Gratidão!*

*“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”.*

*Paulo Freire*

# RESUMO GRÁFICO

Participação de 115 RTRs: Amostras biológicas: Plasma EDTA; Plasma PPP em citrato de sódio e soro. Armazenados a -80°C até a análise.

## Avaliação transversal

**Níveis de Creatinina**  
 C1 ≤ 1,4 mg/dL (n=66)  
 C2 > 1,4 mg/dL (n=49)

**Ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) CKD-EPI**  
 R1 ≥ 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> (n=52)  
 R2 < 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> (n=63)

**Tempo pós-transplante**  
 T1: 3 - 24 meses (n=23)  
 T2: 25 - 60 meses (n=25)  
 T3: 61 - 120 meses (n=32)  
 T4: > 120 meses (n=35)

**Correlações positivas:** o potencial endógeno de trombina (ETP) e pico (em LTH e HTF) versus triglicerídeos e tempo pós-transplante.

**Regressão linear:** o tempo pós-transplante foi um preditor independente da geração de trombina avaliado por ETP.

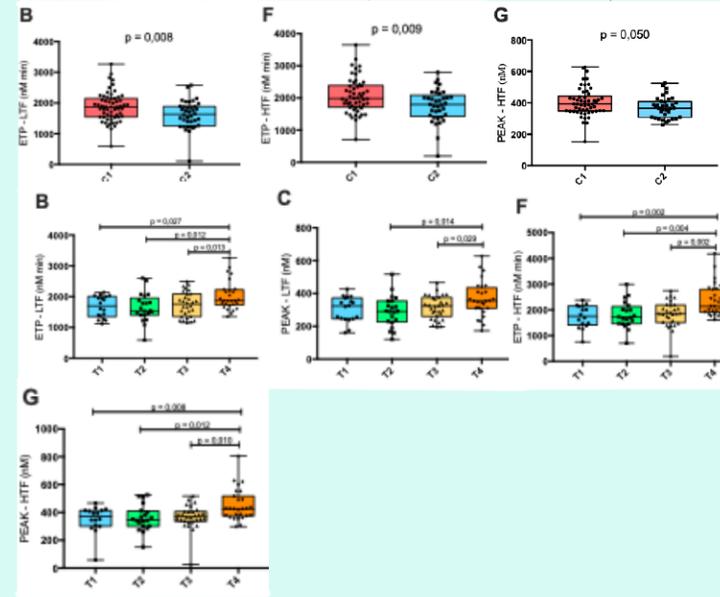
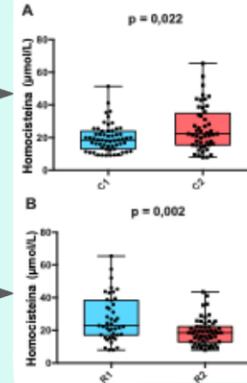
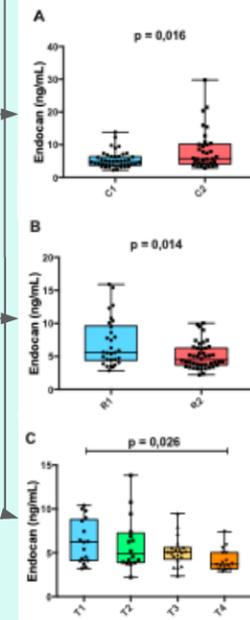
## Biomarcadores avaliados

**Endocan (80 RTR):** método ELISA

**\*Homocisteína (103 RTR):** método enzimático adaptado

**\*Atividade de ADAMTS13 (73 RTR):** método FRET

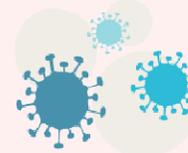
**\*Teste de Geração de Trombina (101 RTR):** método de CAT em baixa (LTF) e alta (HTF) concentração de fator tecidual. Parâmetros avaliados: Lagtime; ETP; Peak e Tpeak.



\*Valores não significativos não apresentados

## Avaliação longitudinal prospectiva

**Análise descritiva (110 RTR):** Consulta aos prontuários médicos durante um seguimento de 5 anos (60 meses) a contar da data de inclusão no estudo. Complicações mais frequentes: **infecções urinárias e respiratórias; rejeição ao enxerto e neoplasias.**



## Análises Kaplan Meier

•Ao avaliar a influência dos marcadores mensurados na fase transversal do estudo e sua associação com episódios de rejeição ao enxerto a longo prazo (60 meses), não foram observadas diferenças significativas.

**Conclusão:** O TGT, a avaliação dos níveis de endocan e homocisteína demonstraram ser ferramentas promissoras para a avaliação da função do enxerto após o transplante renal. Novos estudos poderão contribuir para a compreensão da relação dos marcadores avaliados e a função renal pós transplante.



## RESUMO

Mesmo após o transplante renal bem-sucedido, complicações podem ocorrer levando à perda do enxerto ou até mesmo à morte. Dentre as principais complicações associadas, podemos citar aquelas que cursam com a disfunção endotelial e alterações da hemostasia, ambas associadas à redução da sobrevida do enxerto. Assim, o objetivo geral foi avaliar os marcadores endoteliais (endocan, homocisteína) e hemostáticos (atividade de ADAMTS13 e geração de trombina) em pacientes receptores do transplante renal (RTR) e correlacioná-los com a evolução do enxerto. Foram incluídos 115 RTR, avaliados em delineamento transversal, distribuídos em subgrupos de acordo com a função de filtração renal [creatinina sérica (C1  $\leq$ 1,4 e C2  $>$ 1,4 mg/dL) e ritmo de filtração glomerular estimado – eRFG (R1  $\leq$ 60 e R2  $>$ 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) e com o tempo após o transplante [T1: 3 a 24; T2: 25 a 60; T3: 61 a 120 e T4: acima de 120 meses pós-transplante]. Uma análise longitudinal prospectiva também foi realizada por meio da avaliação de prontuários médicos por um período de seguimento de 5 anos. A endocan foi mensurada pelo método de ELISA. A avaliação dos níveis de homocisteína foi feita por ensaio enzimático-colorimétrico e a determinação da atividade de ADAMTS13 por transferência de energia de ressonância de fluorescência. O teste de geração de trombina (TGT) foi realizado pelo método CAT (*Calibrated Automated Thrombogram*) utilizando baixa (LTF) e alta (HTF) concentração do fator tissular. Níveis elevados de endocan e homocisteína foram observados entre os RTR com pior função de filtração renal (subgrupos C2 e R1), se comparados aos RTR com melhor função de filtração (subgrupos C1 e R2). Quanto ao tempo pós-transplante, os pacientes com transplante recente apresentaram níveis mais elevados de endocan (subgrupo T1) do que os demais RTR, o mesmo não sendo observado para Homocisteína. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos valores da atividade de ADAMTS13 entre os subgrupos. Menor geração de trombina foi observada entre os pacientes com pior função de filtração renal (subgrupo C2), se comparado aos RTR com função de filtração preservada (subgrupo C1). De acordo com o tempo pós-transplante, os pacientes com maior tempo pós-transplante (subgrupos T3 e T4) apresentaram níveis mais elevados de trombina se comparados aos RTR com menor tempo pós-transplante (subgrupos T1 e T2). Correlações positivas foram encontradas para o potencial endógeno de trombina (ETP) e pico (em LTH e HTF) *versus* triglicérides e tempo pós-transplante. Os modelos de regressão linear mostraram que o tempo pós-transplante foi um preditor independente da geração de trombina avaliado por ETP. A avaliação longitudinal prospectiva mostrou que dentre as complicações mais frequentes após 5 anos de seguimento foram: infecções urinárias e respiratórias; rejeição ao enxerto e neoplasias. Ao avaliar a influência dos marcadores mensurados na fase transversal do estudo e sua associação com episódios de rejeição ao enxerto a longo prazo, não foram observadas diferenças significativas. Finalmente, os dados analisados em conjunto permitem concluir que as dosagens da endocan, homocisteína e o teste de geração de trombina mostraram ser ferramentas promissoras para diagnosticar e monitorar alterações endoteliais e hemostáticas entre os pacientes transplantados renais ao longo do tempo. No entanto, novos estudos são necessários para melhor compreensão das possíveis associações entre tais marcadores e a ocorrência de rejeição a longo prazo.

Palavras-chave: transplante renal; biomarcadores; endocan; Homocisteína; ADAMTS13; teste de geração de trombina.

## ABSTRACT

Even after successful kidney transplantation, complications can occur leading to allograft loss or even death. Among the main associated complications, we can mention those occurring due to endothelial dysfunction and hemostasis alterations, both associated with reduced allograft survival. Thus, our objective was to evaluate endothelial (endocan, homocysteine) and hemostatic (ADAMTS13 activity and thrombin generation) markers in renal transplant recipients (RTR) and correlate them with allograft evolution. One hundred and fifteen RTRs were included, evaluated in a cross-sectional design, distributed into subgroups according to renal filtration function [creatinine levels (C1  $\leq$ 1.4 and C2  $>$ 1.4 mg/dL) and estimated glomerular filtration rate – eRFG ( R1  $\leq$ 60 and R2  $>$ 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>)] and with time after transplantation [T1: 3 to 24; T2: 25 to 60; T3: 61 to 120 and T4: over 120 months post-transplant ] A prospective longitudinal analysis was also performed through the evaluation of medical records for a follow-up period of 5 years. Endocan was measured by the ELISA method. The evaluation of homocysteine levels was performed by enzymatic-colorimetric assay and the determination of ADAMTS13 activity by fluorescence resonance energy transfer. Thrombin generation test (TGT) was performed by the CAT (Calibrated Automated Thrombogram) method using low (LTF) and high (HTF) concentrations of tissue factor. Higher levels of endocan and homocysteine were observed among RTR with worse renal filtration function (subgroups C2 and R1), compared to RTR with better filtration function (subgroups C1 and R2). As for post-transplant time, patients with recent transplantation had higher levels of endocan (T1 subgroup) than the other RTRs, the same not being observed for homocysteine, whose values did not differ in relation to this variable. No significant differences were observed for ADAMTS13 activity values between the subgroups. Lower thrombin generation was observed among patients with worse renal filtration function (C2 subgroup), compared to RTR with preserved filtration function (C1 subgroup). According to post-transplant time, patients with longer post-transplant time (T3 and T4 subgroups) had higher levels of thrombin compared to RTR with shorter post-transplant time (T1 and T2 subgroups). Positive correlations were found for endogenous thrombin potential (ETP) and peak (in LTH and HTF) versus triglycerides and post-transplant time. Linear regression models showed that post-transplant time was an independent predictor of thrombin generation assessed by ETP. The prospective longitudinal evaluation showed that among the most frequent complications after 5 years of follow-up were urinary and respiratory infections; allograft rejection and neoplasms. When evaluating the influence of the markers measured in the cross-sectional phase of the study and their association with long term allograft rejection episodes, no significant differences were observed. Finally, all the data analyzed together allow us to conclude that endocan, homocysteine and the thrombin generation test showed to be promising tools for diagnosing and monitoring endothelial and hemostatic changes among kidney transplant patients over time. Further studies are needed to better understand the possible associations between such markers and the occurrence of long-term rejection.

**Keywords:** kidney transplantation; biomarker; endocan; homocysteine; ADAMTS13; thrombin generation assay.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Hemostasia primária .....	26
<b>Figura 2</b> - Modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares .....	27
<b>Figura 3</b> - Representação da atividade de ADAMTS13 em condições fisiológicas e patológicas .....	29
<b>Figura 4</b> - Curva de geração de trombina e seus principais parâmetros.....	32
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da técnica de geração de trombina pelo método <i>Calibrated Automated Thrombogram</i> (CAT).....	43
<b>Figura 6</b> - Níveis de endocan em 80 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com a função de filtração renal, avaliada pelos níveis de creatinina e ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG), e tempo pós-transplante.....	50
<b>Figura 7</b> - Níveis de homocisteína em 105 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com a função de filtração renal, avaliada por meio da creatinina sérica e ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG), e tempo pós-transplante.....	51
<b>Figura 8</b> - Atividade de ADAMTS13 em 73 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com a função da filtração renal, avaliada por meio da creatinina sérica e ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG), e tempo pós-transplante.....	52
<b>Figura 9</b> - Curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com os níveis de creatinina.....	53
<b>Figura 10</b> - Parâmetros da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com os níveis de creatinina.....	53
<b>Figura 11</b> - Curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG).....	54
<b>Figura 12</b> - Parâmetros da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG).....	55
<b>Figura 13</b> - Parâmetros e curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós-transplante.....	56
<b>Figura 14</b> - Parâmetros e curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós-transplante.....	56
<b>Figura 15</b> - Curvas de Kaplan Meier para os episódios de rejeição ao enxerto de acordo com os níveis de marcadores endoteliais e hemostáticos.....	61
<b>Quadro 1</b> - Estratificação dos grupos para os biomarcadores endocan, homocisteína, atividade de ADAMTS13, ETP – LTF e ETP – HTF .....	47

<b>Tabela 1</b> - Caracterização clínica e demográfica dos pacientes transplantados renais.....	<b>49</b>
<b>Tabela 2</b> - Correlação de Spearman entre os marcadores avaliados nos pacientes transplantados renais.....	<b>57</b>
<b>Tabela 3</b> - Análise de regressão linear para os biomarcadores avaliados nos pacientes transplantados renais.....	<b>58</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTO	Associação Brasileira De Transplante De Órgãos
ADAMTS13	<i>A Disintegrin And Metalloprotease With Eight Thrombospondin-1-Like Member 13</i> , tradução (A Desintegrina Metalloprotease Com Domínio Trombospondina1)
AUC	Área sob a curva
C1	Grupo de receptores do transplante renal com creatinina menor ou igual à 1,4 mg/dl
C2	Grupo de receptores do transplante renal com creatinina maior à 1,4 mg/dl
CAT	<i>Calibrated Automated Thrombogram</i> , tradução (Trombograma Automatizado e Calibrado)
CBL	Cistationina Beta-Liase
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration</i> , tradução (Doença Renal Crônica – Colaboração Epidemiológica)
Cβs	Cistationina-B-Sintetase
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal De Minas Gerais
DCV	Doença Cardiovascular
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DRC	Doença Renal Crônica
DRCT	Doença Renal Crônica Terminal
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> , tradução (Ácido Tilenodiamino Tetra-Acético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Imune Assay</i> , tradução (Ensaio Imunoenzimático)
eRFG	Ritmo de Filtração Glomerular Estimado
ESM-1	<i>Endothelial Cell-Specific Molecule 1</i> , tradução (Molécula Celular Específica Endotelial 1)
ETP	Potencial Endógeno de Trombina
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> , tradução (Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência)
FT	Fator Tissular
FvW	Fator de von Willebrand
gmFvW	grandes multímeros do Fator de von Willebrand
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCY	Homocisteína
HDL	Lipoproteína De Alta Densidade
HHCY	Hiperhomocisteinemia
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , tradução (Antígeno Leucocitário Humano)
HTF	<i>High Tissue Factor</i> , tradução (Alta Concentração Do Fator Tecidual)
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> , tradução (molécula de adesão intercellular 1)

IL-6	Interleucina 6
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i> , tradução (Função Leucocitária Associado ao Antígeno 1)
Lp-A	Lipoproteína A
LTF	<i>Low Tissue Factor</i> , tradução (Baixa Concentração De Fator Tecidual)
MTHF	N-5-Metil-Tetraidrofolato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ODD	<i>Odds Ratio</i> , tradução (razão de probabilidade)
PCR	Proteína C Reativa
PDF	Produtos de Degradação de Fibrina
PEAK	pico máximo de concentração de trombina
Pgs	Proteoglicanas
PPGACT	Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
R1	grupo de receptores do transplante renal com ritmo de filtração glomerular estimado menor ou igual a 60 mg/min/1,73m <sup>2</sup>
R2	grupo de receptores do transplante renal com ritmo de filtração glomerular estimado maior a 60 mg/min/1,73m <sup>2</sup>
RTR	Receptores do Transplante Renal
SAH	S-Adenosil Homocisteína
SAM	S-Adenosilmetionina
SHUA	Síndrome Hemolítica Urêmica Atípica
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
T1	grupo de receptores do transplante renal com tempo pós-transplante entre 3 a 24 meses
T2	grupo de receptores do transplante renal com tempo pós-transplante entre 25 a 60 meses
T3	grupo de receptores do transplante renal com tempo pós-transplante entre 61 a 120 meses
T4	grupo de receptores do transplante renal com tempo pós-transplante maior que 120 meses
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGT	Teste de Geração de Trombina
TRR	Terapia de Reposição Renal
TTPEAK	<i>Time to Peak</i> , tradução (Tempo Para O Pico)
U-PA	Ativador do Plasminogênio Uroquinase
UFMG	Universidade Federal De Minas Gerais
usPCR	Proteína C Reativa Ultrassensível
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> , Tradução (Molécula De Adesão A Células Vasculares 1)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA .....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 O transplante renal .....	19
2.2 As células endoteliais vasculares .....	22
2.2.1 Marcadores da <i>disfunção endotelial</i> .....	22
2.2.1.1 <u>Endocan</u> .....	22
2.2.1.2 <u>Homocisteína</u> .....	24
2.3 Aspectos gerais da hemostasia.....	25
2.3.1 Marcadores da <i>hemostasia</i> .....	28
2.3.1.1 <u>A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin Type 1 motif (ADAMTS13)</u> .....	28
2.3.1.2 <u>Teste de geração de trombina</u> .....	30
3 OBJETIVOS .....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
3.2.1 <i>Avaliação transversal</i> .....	35
3.2.2 <i>Avaliação longitudinal prospectiva</i> .....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
4.1 Delineamento experimental e aspectos éticos .....	36
4.2 Avaliação transversal .....	37
4.2.1 <i>Casuística</i> .....	37
4.2.2 <i>Critérios de inclusão/exclusão</i> .....	39
4.2.3 <i>Amostras biológicas</i> .....	40
4.2.3.1 <u>Preparo das amostras biológicas</u> .....	40
4.2.4 <i>Métodos</i> .....	41
4.2.4.1 <u>Avaliação dos níveis plasmáticos da endocan</u> .....	41
4.2.4.2 <u>Avaliação dos níveis séricos de homocisteína</u> .....	41
4.2.4.3 <u>Avaliação da atividade plasmática da ADAMTS13</u> .....	42
4.2.4.4 <u>Avaliação da geração de trombina</u> .....	43
4.2.5 <i>Análise estatística</i> .....	44
4.3 Avaliação longitudinal prospectiva .....	45
4.3.1 <i>Análise de sobrevivência (análise tempo - desfecho) – curva de Kaplan Meier</i> .....	46
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Análise transversal.....	48
5.1.1 <i>Caracterização clínica e demográfica dos pacientes transplantados renais</i> .....	48
5.1.2 <i>Avaliação dos níveis plasmáticos da endocan</i> .....	50
5.1.3 <i>Avaliação dos níveis séricos de homocisteína</i> .....	52
5.1.4 <i>Avaliação da atividade plasmática da ADAMTS13</i> .....	49
5.1.5 <i>Avaliação da geração de trombina</i> .....	52
5.1.6 <i>Análise de correlação e regressão linear</i> .....	57
5.2 Análise longitudinal prospectiva .....	59
5.2.1 <i>Análise descritiva</i> .....	59
5.2.2 <i>Análise de sobrevivência (análise tempo-desfecho)</i> .....	60
6 DISCUSSÃO .....	62
6.1 Caracterização clínica e demográfica dos pacientes receptores do enxerto renal .....	62

<b>6.2 Avaliação transversal.....</b>	<b>63</b>
<b>6.2.1 Marcadores endoteliais: endocan e homocisteína .....</b>	<b>63</b>
<b>6.2.2 Marcadores da hemostasia: atividade de ADAMTS13 e teste de geração de trombina .....</b>	<b>67</b>
<b>6.3 Avaliação longitudinal prospectiva: Análise descritiva e de sobrevivência (tempo – desfecho).....</b>	<b>72</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido .....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE B – Ficha clínica: análise transversal .....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE C - Ficha clínica: análise longitudinal prospectiva.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE D – Tabela descritiva: análise longitudinal prospectiva .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS A – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, COEP (2015).....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO B – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, COEP (Atualizada em 2016).....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO C – Termo de responsabilidade: acesso a dados em formato eletrônico para fins de pesquisa.....</b>	<b>102</b>
<b>PRODUÇÕES .....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

Apesar de tantos avanços no campo dos transplantes de órgãos e tecidos, as causas que levam ao insucesso desta terapia são muitas (MALYSZKO et al., 2018). Vale ressaltar que mesmo após o transplante renal bem-sucedido, o paciente receptor do enxerto renal (RTR) ainda é caracterizado como portador da doença renal crônica e estes pacientes apresentam alto risco de ocorrência de eventos cardiovasculares, rejeição ao enxerto e morte (SESSO et al., 2016; POLI; ANTONUCCI; ZANAZZI, 2017; RANGASWAMI et al., 2019).

Neste cenário, podemos destacar a importância do endotélio vascular renal, uma vez que a preservação das suas funções basais favorece a boa funcionalidade do enxerto. As células endoteliais são consideradas o primeiro sítio alvo da resposta imune do receptor contra o aloenxerto, uma vez que compõem a parede vascular, configurando a primeira interface entre doador e receptor (CARDINAL; DIEUDÉ; HÉBERT; 2018). A presença da disfunção endotelial pode favorecer o agravamento da lesão renal e já foi associada ao desenvolvimento de muitas complicações entre os RTR, tais como exacerbação da hipertensão arterial sistêmica (HAS), Diabetes mellitus (DM), aterosclerose, eventos tromboembólicos e rejeição ao enxerto (TOUSOULIS et al., 2006; BARBOUR et al., 2012; CARDINAL; DIEUDÉ; HÉBERT, 2018; MALYSZKO et al., 2018; RANGASWAMI et al., 2019).

Sabe-se que a função renal preservada contribui para o equilíbrio da homeostasia e vice-versa. Diferentes eventos hipo e hipercoaguláveis podem surgir devido à gravidade do estágio da disfunção renal e tais complicações podem comprometer a sobrevivência do paciente transplantado e do enxerto renal, uma vez que distúrbios hemostáticos, muitas vezes, não são imediatamente corrigidos ou restaurados após o transplante renal (POLI; ANTONUCCI; ZANAZZI, 2017).

Nesse contexto, o monitoramento laboratorial da função endotelial e da homeostasia parece ser uma estratégia promissora no pós-transplante renal (SU et al., 2014; TOULON, 2016; CHO et al., 2017; MARTINS et al., 2019). São exemplos de biomarcadores: endocan, homocisteína, atividade da *disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like member 13* (ADAMTS13) e o teste de geração de trombina (LEE et al., 2012; REUKEN et al., 2015; CARDINAL; DIEUDÉ; HÉBERT, 2018; MALYSZKO et al., 2018; CAPELLI et al., 2019).

Níveis elevados de endocan foram associados à processos inflamatórios graves, neoplasias e HAS (BECHARD et al., 2001; SARRAZIN et al., 2010; DELEHEDDE et al., 2013; AZIMI, 2017; MALYSZKO et al., 2018). Já a elevação da homocisteína (HCY) foi associada ao desenvolvimento de doenças que cursam com elevado estresse oxidativo, disfunção endotelial e trombogênese (EINOLLAHI et al., 2011), sendo um fator de risco para as doenças cardiovasculares (DCV). A deficiência ou a baixa atividade da ADAMTS13 está associada à trombose da microvasculatura, obstrução do fluxo sanguíneo e dano a múltiplos órgãos. Cumpre ressaltar que, a redução da ADAMTS13 é considerada um marcador patognomônico de processos como a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), microangiopatia trombótica, síndrome hemolítica urêmica (SHU) e síndrome hemolítica urêmica atípica (SHUA) (PHAM et al., 2002; BARBOUR et al., 2012; WEBSTER, SCHNITZLER; 2014; BERGER, 2018; PLAUTZ et al., 2018; MANCINI et al., 2019; OH et al., 2019).

Novos ensaios para a avaliação da hemostasia vêm sendo propostos nas últimas décadas (HEMKER, 2002; TEN CATE, 2012) e o teste de geração de trombina (TGT) avaliado pelo método de *Calibrated Automated Thrombogram* (CAT) (Thrombinoscope BV®, Maastricht, Holanda) tem ganhado destaque, por apresentar grande sensibilidade na detecção de quadros hipo e hipercoaguláveis. Como um método de avaliação global do processo hemostático, é capaz de refletir toda a formação da trombina (MACFARLANE; BIGGS, 1953; HEMKER et al., 1986; HEMKER et al., 2002; JEONG et al., 2013; DUARTE et al., 2018).

Com base no exposto, objetivou-se avaliar os biomarcadores supracitados (endocan, HCY, atividade de ADAMTS13 e TGT) em RTR e investigar a associação destes com a evolução do enxerto. A escolha destes marcadores se baseou na relevância clínica, na experiência prévia do grupo de pesquisa e no ineditismo da avaliação conjunta para acompanhamento da evolução de pacientes transplantados renais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O transplante renal

O transplante renal é uma terapia de reposição renal (TRR) cirúrgica, quando um rim saudável, proveniente de um doador vivo ou falecido, é inserido na região pélvica do receptor portador da Doença Renal Crônica Terminal (DRCT). O transplante renal, quando bem-sucedido, possibilita ao receptor melhores condições de vida e uma independência de outras formas de TRR, como a diálise peritoneal e a hemodiálise, uma vez que o rim doado passará a exercer e/ou complementar as funções renais que os órgãos nativos não são mais capazes de manter (ABTO, 2009; MARTINS et al., 2019; GOMES et al., 2020).

A taxa de sobrevida após o transplante renal vem crescendo a cada ano e está acima de 97% para órgãos provenientes de doadores vivos e 92% para doadores falecidos, ambas as taxas para o primeiro ano pós-transplante (ABTO, 2020 b). Assim, esta TRR é considerada a alternativa com melhor custo-benefício ao paciente com DRCT (JUNG; LEE; KWON, 2012; MATOS et al., 2016; GOMES et al., 2020).

O primeiro transplante bem-sucedido ocorreu em Boston, Estados Unidos da América (1954), pelo cirurgião Joseph E. Murray, ganhador do Nobel de fisiologia e medicina em 1990. Desde então o número de transplantes cresceu de forma significativa e o Brasil representa o segundo país no mundo que mais realiza essa técnica, onde 95% de todos os transplantes realizados no país são financiados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (GOMES et al., 2020).

Desde o início da prática de notificação e registro dos transplantes realizados no Brasil pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), foram realizados 88.069 transplantes renais entre 1997 e junho de 2021, correspondendo a 68,3% de todos os 128.863 transplantes de órgãos sólidos realizados (ABTO, 2021).

Em dezembro de 2019 foi descoberto um novo coronavírus, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-COV-2) capaz de infectar células humanas, que se espalhou ao redor do mundo de forma rápida ocasionando

síndrome respiratória aguda e outras complicações, o que levou a Organização Mundial de Saúde a decretar a pandemia pelo SARS-COV-2, ou também chamada COVID-19 (*do inglês: coronavirus disease 2019*) (MARTINS; ALVES et al., 2021). O Brasil foi, e ainda é, um dos países mais afetados pela pandemia da COVID-19. Na área do transplante renal, uma redução significativa no número de cirurgias transplantadoras tem sido observada. No ano de 2019 (pré-pandemia) foram realizados 6.296 transplantes renais, em 2020 foram 4.821 transplantes renais e as estatísticas mais atuais mostram que no período de janeiro a setembro de 2021 foram realizados 3.304 transplantes renais, correspondendo a uma redução de 47,5% (ABTO, 2021).

Desde modo, a fila de espera para o transplante renal cresce a cada dia e tornam-se fundamentais as práticas clínicas e laboratoriais que possibilitem sucessos ainda maiores para o transplante renal, uma vez que várias são as causas que podem levar à perda do enxerto e à morte, tais como a rejeição ao órgão transplantado (ABTO, 2020).

A rejeição ao enxerto pode ser considerada a principal causa de insucesso do transplante renal, uma vez que os transplantes de órgãos e tecidos evoluem de forma invariável à episódios de rejeição, devido a resposta imune do receptor contra o tecido/órgão doado. As rejeições ao enxerto apresentam várias classificações, tais como aquelas baseadas no tempo do episódio [hiperaguda (ocorre durante o procedimento cirúrgico ou poucas horas após); aguda (pode ocorrer, geralmente, entre três e 90 dias após o transplante, associada à imunossupressão ineficiente) e crônica (também chamada de nefropatia crônica do enxerto ou rejeição a longo prazo, apresentando evolução lenta)] (KOO et al., 2015; LOUPY et al., 2020). O processo de rejeição crônica pode ser considerado a forma mais predominante e seus mecanismos fisiopatológicos são multifatoriais. Neste sentido, sabe-se que a disfunção endotelial, a presença de comorbidades e a terapia imunossupressora inadequadas são fatores influenciadores importantes (SIS et al., 2010; TIZO; MACEDO, 2015). A rejeição ao enxerto pode ainda ser classificada baseada em sua histopatologia (mediada por anticorpos/humoral e/ou células T) (KOO et al., 2015; LOUPY et al., 2020).

A resposta imunológica do receptor contra o enxerto renal configura a base fisiopatológica do processo de rejeição e tem o endotélio vascular renal como um importante sítio de reação entre receptor-doador. As células endoteliais

desempenham vários papéis importantes no processo inflamatório do enxerto. Atuam como células apresentadoras de antígeno de forma direta ou indireta às células T citotóxicas e, ao mesmo tempo, podem ser alvo da ação da resposta imune do receptor. O bom funcionamento das células endoteliais favorece, por consequência, o bom funcionamento do enxerto e contribui para a redução de quadros inflamatórios desfavoráveis (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015).

A exposição prolongada e repetida a agentes tóxicos, infecciosos ou pró-aterogênicos pode induzir à perda da integridade endotelial, com redução das suas funções basais (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015). A disfunção endotelial pode ser rápida ou progressiva, de modo temporário ou permanente, mas culmina de modo invariável no aumento do risco tromboembólico, DCV, elevação do quadro pró-inflamatório, redução da permeabilidade vascular e falhas no controle da coagulação, fatores que afetam a saúde do enxerto (HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015). A presença de quadros de hipercoagulabilidade propicia a substituição do tecido renal por tecido fibrótico, bem como a deposição de matriz extracelular, o que acelera o comprometimento renal (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015; MOTA *et al.*, 2015).

Dentre as complicações vasculares podemos destacar a ocorrência de episódios trombóticos, tais como a trombose da artéria renal e as microangiopatias trombóticas. A ocorrência destas complicações pode estar associada ao período pré-transplante, devido à uremia e microambiente pró-coagulante, mas também ao pós-transplante, relacionado à grande ativação das células endoteliais e a sobreposição de fatores que levam ao aumento da coagulação sanguínea (MENON, MURPHY; 2013; TIZO; MACEDO, 2015; LIM; KOHLI; BLOOM, 2016; CAPELLI *et al.*, 2019).

As manifestações trombóticas no enxerto renal são fatores associados às formas graves de rejeição ao enxerto (LOUPY *et al.*, 2020).

Diante do exposto, percebe-se que a monitorização clínica e laboratorial do RTR é de extrema importância, a fim de se garantir um diagnóstico preciso de possíveis complicações pós-transplante renal e evitar a perda do enxerto.

## **2.2 As células endoteliais vasculares**

O endotélio vascular constitui uma interface entre o subendotélio e a circulação sanguínea, considerado uma estrutura metabolicamente ativa com importantes papéis em todas as fases da hemostasia. Em seu estado quiescente, as células endoteliais regulam o tônus vascular e promovem um ambiente antitrombótico mediante a secreção de vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária, como o óxido nítrico e a prostaglandina I<sub>2</sub>, respectivamente, além da presença de fosfolípidos neutros, inibidores da coagulação (Trombomodulina, Proteína S e inibidor da via do fator tissular), secreção do ativador do plasminogênio uroquinase (u-PA) e do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) (HOFFBRAND; MOSS, 2013; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; CHENG et al., 2014).

Após uma lesão ao vaso sanguíneo, ocorre a exposição do colágeno subendotelial, o que contribui para a ativação das células endoteliais que irão modular as respostas pró-coagulantes, visando cessar o sangramento e servir como sítio para as reações em cascata (HOFFBRAND; MOSS, 2013; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). As células endoteliais controlam ainda a adesão plaquetária e de leucócitos, contribuem de forma importante para a angiogênese, por meio da modulação do crescimento do músculo liso, participam do processo fibrinolítico, do metabolismo de lipoproteínas e da apresentação de antígenos de histocompatibilidade, além de participarem de outras reações inflamatórias e hemostáticas (MOLINO et al., 2006; HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015; YAU; TEOH; VERMA, 2015).

### **2.2.1 Marcadores da disfunção endotelial**

#### **2.2.1.1 Endocan**

Anteriormente chamada de *endothelial cell-specific molecule 1* (ESM-1), a endocan é composta por uma cadeia de dermatan sulfato ligado à serina com um baixo peso molecular. Inicialmente, acreditava-se que apenas o tecido

pulmonar seria responsável por sua secreção, porém foi demonstrado que células endoteliais da pele, tecido adiposo, artérias coronarianas, bem como células renais também podem secretar endocan. Esta proteína pertence à família das proteoglicanas (PGs), amplamente encontradas nas matrizes extracelulares com função de suporte estrutural. No entanto, suas funções vão além das demais PGs (KALI; SHETTY, 2014).

Uma das principais funções da endocan está relacionada aos processos inflamatórios. Durante estes processos, os leucócitos são ativados e expressam ligantes de selectinas e integrinas de alta afinidade, como o *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1). Estas moléculas, ao interagirem com seus respectivos ligantes nas células endoteliais, iniciam a rolagem ao longo do leito vascular e diapedese para o local da infecção. A ligação do núcleo proteico da Endocan com o LFA-1, por exemplo, impede a interação desta molécula com o *Intercellular Adhesion Molecule 1 endotelial* (ICAM-1), seu ligante nas células endoteliais. Conseqüentemente, ocorrerá uma inibição da migração e direcionamento dos leucócitos durante processos infecciosos, o que pode prejudicar a resposta durante o processo inflamatório (BECHARD et al., 2001; KALI et al., 2014).

A superexpressão da endocan está relacionada à resposta a fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto tipo 2, mas também se deve à secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Por outro lado, na presença de Interferon- $\gamma$  e hiperinsulinemia ocorrerá uma baixa expressão da endocan (LEE et al., 2014; AZIMI, 2017).

A endocan ainda pode participar de interações moleculares diversas, como com moléculas da matriz extracelular, proteínas de superfície e intracelulares. Atua como mediadora solúvel relacionada com a regulação, diferenciação, migração e adesão celulares e processos de neovascularização (BALTA et al., 2014; KALI; SHETTY, 2014).

Estudos mostraram o envolvimento da endocan em processos inflamatórios, na cicatrização e gênese de tumores, bem como na sepse, HAS, Doença renal Crônica (DRC) e rejeição aos transplantes, com aumento dos seus níveis séricos em todas estas condições (SARRAZIN et al., 2010; DELEHEDDE et al., 2013; KALI; SHETTY, 2014; MALYSZKO et al., 2018).

### **2.2.1.2 Homocisteína**

A homocisteína (HCY) é um aminoácido contendo enxofre derivado exclusivamente da transmetilação de outro aminoácido, a metionina. O metabolismo da metionina ocorre no fígado dando origem a S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosil homocisteína (SAH) e HCY. Os primeiros relatos acerca da HCY se relacionaram com o desenvolvimento de deficiência mental em crianças com homocistinúria, doença de caráter autossômico recessivo vinculada à deficiência da enzima cistationina- $\beta$ -sintase (C $\beta$ S) (GERITSEN; WAISMAN, 1964; MUDD et al., 1964). A HCY foi considerada importante componente da patogenia da doença vascular, principalmente de grandes vasos (NEVES et al., 2004).

O metabolismo da HCY pode ocorrer em vias distintas favorecidas de acordo com o estado nutricional do indivíduo. Dietas ricas em proteínas favorecem o seu catabolismo pela enzima C $\beta$ S via transulfuração com a formação de cisteína. Para aqueles com dieta pobre em proteínas ou durante jejum prolongado, o metabolismo ocorre principalmente por via de remetilação, com formação de metionina (NEVES et al., 2004; KESHTELI et al., 2015).

A hiperhomocisteinemia (HHCY) pode estar relacionada à deficiência de um dos cofatores das enzimas das vias de metabolização tais como o ácido fólico, a vitamina B6 e a vitamina B12 (BATTISTELLI et al., 2006), além de deficiências das próprias enzimas pertencentes a estas vias de metabolização, configurando um erro inato do metabolismo (NEVES et al., 2004; KESHTELI et al., 2015).

A oxidação de HCY ocasiona uma superprodução de radicais livres de oxigênio, favorecendo a lesão endotelial e danos ao DNA. A HHCY também foi associada à manutenção de quadros inflamatórios por ativação de genes pró-inflamatórios devido à hipometilação do DNA. Estudos sugerem que a HCY pode provocar uma modulação da citotoxicidade mediada pelo TNF (FERRONI et al., 2009; CHIANG et al., 2014), o que favorece um quadro pró lesão endotelial. Assim, a HHCY tem sido considerada um marcador independente para doenças aterotrombóticas e do risco cardiovascular, bem como um marcador para a deficiência de vitamina B12 e fator de risco não tradicional para o infarto agudo do miocárdio (FORTI et al., 2016). A HHCY já foi relacionada também à carcinogênese e proliferação tumoral e essa associação ocorre devido aos níveis de folato reduzido, o que pode causar uma instabilidade

cromossômica e aumento de mutações e outras alterações genéticas (KEKU et al., 2002; BATTISTELLI et al., 2006).

A HHCY já foi intimamente relacionada à função renal por se correlacionar com os níveis de creatinina plasmática, e com o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) e por estar presente entre os pacientes com DRCT (VAN GULDENER et al., 2001; REFSUM et al., 1998). Entre os RTR, este perfil está associado também à perda do enxerto renal e morte (EINOLLAHI et al., 2011; MONFARED et al., 2016). No entanto, mais estudos são necessários para compreender se a HHCY pode ser considerada um fator de risco independente para a progressão da DRC, principalmente após o transplante renal (CAPELLI et al., 2019).

### **2.3 Aspectos gerais da hemostasia**

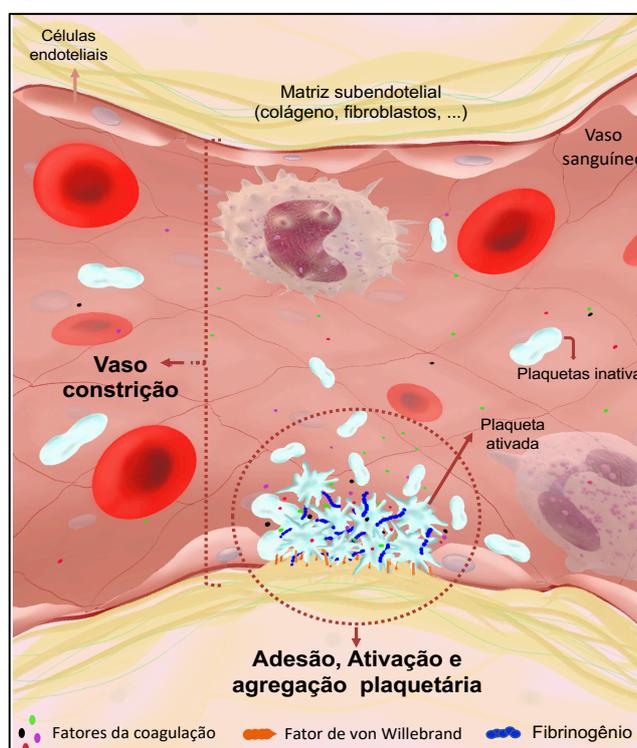
Em condições fisiológicas, a manutenção da fluidez do sangue é muito importante para garantir o adequado equilíbrio hemostático, sem a ocorrência de sangramentos ou eventos trombóticos. Denomina-se como hemostasia o grupo de processos responsáveis pela manutenção deste equilíbrio. Este fenômeno também pode ser compreendido como um equilíbrio entre os fatores anticoagulantes e pró-coagulantes. Tais fatores atuam em conjunto para manter o fluxo sanguíneo constante dentro do compartimento vascular e/ou promovendo a formação de coágulos restritos ao local de produção, após a lesão do vaso. A hemostasia auxilia também no reparo tecidual local, com o objetivo de manter a integridade vascular, essencial para um bom equilíbrio hemostático (SMITH; TRAVERS; MORRISSEY; 2015; BONAR; LIPPI; FAVALORO, 2017; O'DONNELL et al., 2019).

Os principais componentes da hemostasia são o endotélio vascular, as plaquetas, os fatores pró-coagulantes, anticoagulantes, fibrinolíticos e anti-fibrinolíticos (COLVIN et al., 2004; ZAGO, PASQUINI; 2013). Para fins didáticos, a hemostasia pode ser dividida em três fases: hemostasia primária; secundária (coagulação) e terciária (fibrinólise) (COLVIN et al., 2004; O'DONNELL et al., 2019).

A fase inicial da hemostasia (hemostasia primária) se inicia logo após a lesão vascular e ativação das células endoteliais. Essa fase pode ser caracterizada pelo predomínio de eventos locais que induzem à vasoconstrição, reduzindo o fluxo sanguíneo e favorecendo a interação com as plaquetas circulantes. Simultaneamente,

ocorre vasodilatação da rede periférica, com o objetivo de redistribuir o fluxo sanguíneo local. Todo este processo promove um edema intersticial com a formação de tamponamento natural, favorecendo a hemostasia (CAGNOLATI et al., 2017). Com a perda da integridade vascular, ocorre a exposição do fator de von Willebrand (FvW) que serve como âncora para a adesão [que ocorre pela interação entre FvW e a glicoproteína plaquetária Ib (Gplb)], ativação e agregação plaquetárias (CAGNOLATI et al., 2017). A **FIGURA 1** ilustra resumidamente a hemostasia primária.

**Figura 1 - Hemostasia primária**



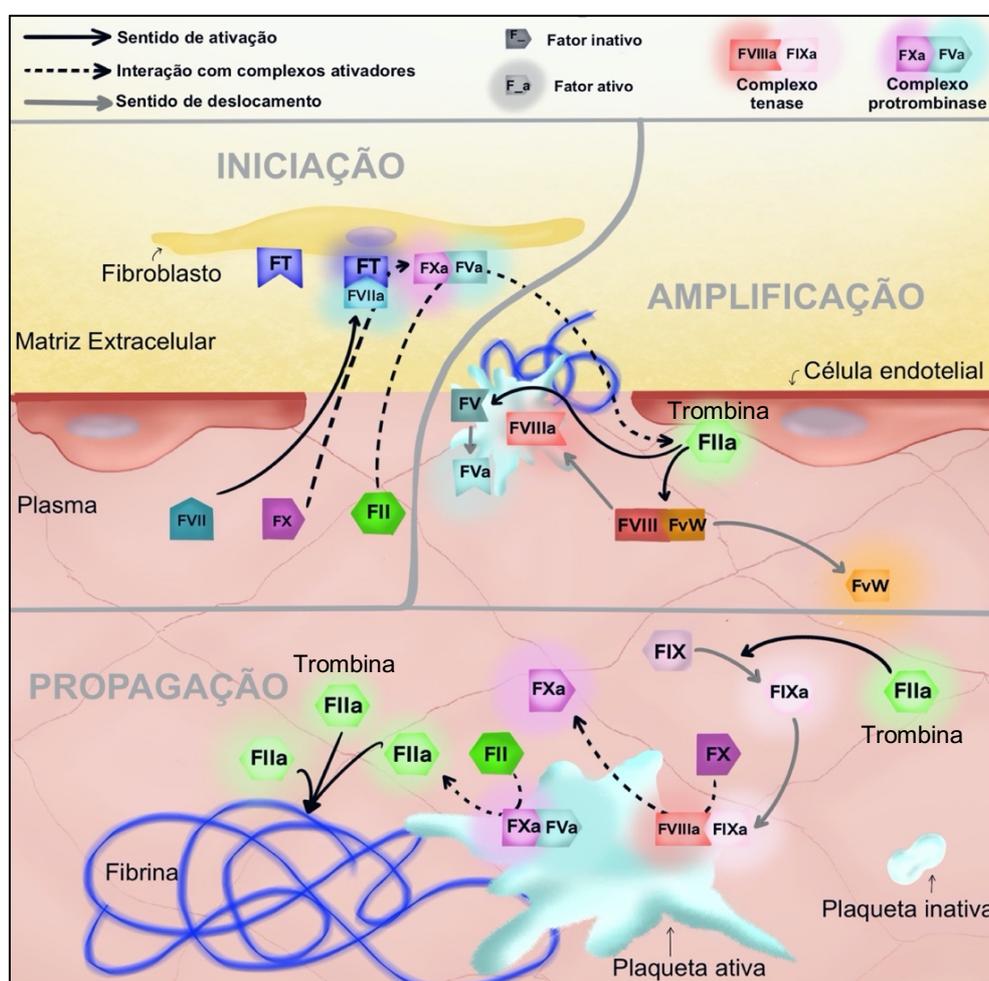
**Legenda:** Ilustração representativa dos eventos centrais da hemostasia primária, vasoconstrição e formação do tampão plaquetário após adesão, ativação e agregação plaquetárias na matriz extracelular exposta no local da lesão endotelial. **Fonte - produzida pela autora (2020).**

A coagulação sanguínea (hemostasia secundária) irá transformar o tampão primário solúvel, originado pela hemostasia primária, em um tampão insolúvel e resistente, ao converter o fibrinogênio em fibrina, através da ação enzimática da trombina, após uma complexa rede de ativação, interação de proteínas plasmáticas, superfícies celulares e íons (BONAR; LIPPI; FAVALORO, 2017; CAGNOLATI et al., 2017).

Em 2006, Hoffman & Monroe, propuseram um modelo para a cascata da coagulação baseado em superfícies celulares. Neste modelo, diferentes células

participam do controle da hemostasia *in vivo*, desempenhando papéis específicos; seja por favorecer a coagulação ou limitando o processo ao local da lesão, a fim de evitar eventos trombóticos disseminados. Pela perspectiva atualizada, a hemostasia secundária ocorre em três fases distintas, concomitantemente e de forma contínua, denominadas iniciação, amplificação e propagação (O'DONNELL, 2019). A **FIGURA 2** ilustra resumidamente o modelo da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares.

**Figura 2 - Modelo da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares**



**Legenda:** Representação do modelo da "cascata" de coagulação baseada em superfícies celulares, destacando suas fases: iniciação, amplificação e propagação, culminando na formação de trombina (IIa) e consequentemente a conversão de fibrinogênio em fibrina. **Fonte: Produzida pela autora (2020).**

Após o restabelecimento do endotélio lesado, o sistema fibrinolítico (hemostasia terciária) ganha destaque no processo de remoção e lise do coágulo de fibrina mediado pela plasmina. De modo geral, a fibrinólise tem início quando

o plasminogênio é incorporado ao coágulo de fibrina em formação, devido à sua afinidade pelos resíduos de lisinas da molécula de fibrina. O plasminogênio é convertido em plasmina pela ação dos ativadores t-PA ou u-PA, (MUKHOPADHYAY et al., 2019). A degradação da fibrina resulta na formação de produtos de degradação de fibrina (PDF) (ZAGO, PASQUINI, 2013; MUKHOPADHYAY et al., 2019). A ação de cada molécula de plasmina culmina na liberação dos fragmentos E e em duas moléculas do fragmento D que são liberadas como dímeros ligados de forma covalente (Dímero-D), sendo estes muitos usados na avaliação laboratorial da hemostasia e no monitoramento de eventos trombóticos, como tromboembolismo venoso profundo e infarto do miocárdio (MUKHOPADHYAY et al., 2019).

### **2.3.1 Marcadores da hemostasia**

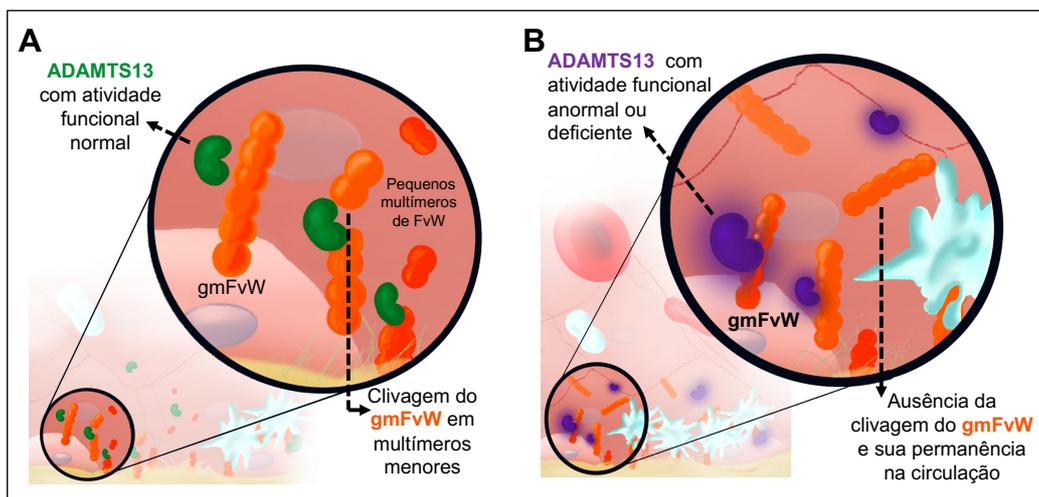
#### **2.3.1.1 Disintegrin and metalloprotease with thrombospondin Type 1 motif (ADAMTS13)**

A ADAMTS13 foi identificada pela primeira vez em 2001 e sua descoberta trouxe um grande avanço para a compreensão dos mecanismos de clivagem do FvW (FENG et al., 2016; PLAUTZ et al., 2018). A ADAMTS13 é sintetizada principalmente pelas células hepáticas e secretada para o plasma em sua forma ativa. Outras células podem secretar uma pequena porção de ADAMTS13, como megacariócitos, células epiteliais tubulares renais, células endoteliais glomerulares e podócitos glomerulares (SHANG et al., 2006; WANG et al., 2015; FENG et al., 2016;).

A função da ADAMTS13 está relacionada à clivagem de grandes multímeros do FvW (gmFvW) secretados pelas células endoteliais após lesão celular, aderidos ao colágeno exposto. O FvW pode alterar sua conformação em globular ou estendida, dependendo do *stress* de cisalhamento provocado pela vasculatura. A clivagem promovida pela ADAMTS13 só ocorre se o FvW se encontrar em sua conformação estendida entre a tirosina da posição 1605 e a metionina da posição 1606 no interior do seu domínio A2, impedindo a

permanência dos gmFvW, transformando-os em multímeros menores (PLAUTZ et al., 2018), como representado na **FIGURA 3**.

**Figura 3 - Representação da atividade de ADAMTS13 em condições fisiológicas e patológicas**



**Legenda:** A: Atividade de ADAMTS13 em condições fisiológicas, papel de clivagem dos grandes multímeros do fator de von Willebrand (gmFvW) em multímeros menores. B: Atividade de ADAMTS13 em condições patológicas, redução ou ausência da atividade de clivagem dos gmFvW, o que favorece a sua permanência na circulação sanguínea. **Fonte:** produzida pela autora (2020).

Ainda não estão completamente descritos os mecanismos de ação da ADAMTS13, se são apenas locais ou podem ser sistêmicos, configurando uma área de pesquisa em crescente foco (XU et al., 2017; PLAUTZ et al., 2018). A ausência ou deficiência da ADAMTS13 pode ocorrer devido a mutações gênicas (KIM et al., 2015) ou por ação de autoanticorpos inibidores da ADAMTS13 (BENEVIDES et al., 2015). Em um ambiente de alto estresse de cisalhamento, a permanência dos gmFvW pode favorecer a ocorrência de distúrbios microcirculatórios, devido ao seu alto poder trombogênico (FENG et al., 2016).

O ensaio de determinação da atividade enzimática de ADAMTS13 quantifica sua capacidade para clivar um substrato recombinante de gmFvW. O seu uso tem sido empregado como ferramenta para auxiliar no diagnóstico de PTT. Existem ainda os ensaios que se baseiam na quantificação do antígeno de ADAMTS13 e anticorpos específicos contra a proteína, baseados no método de imunoenensaio enzimático (ELISA, *do inglês*: enzyme-linked immunosorbent assay) (PLAUTZ et al., 2018).

Estudos demonstraram que a ADAMTS13 não regula apenas a trombogênese, mas também desempenha um papel em processos inflamatórios, angiogênicos e de degradação da matriz extracelular. Assim, pode ser considerada uma promissora ferramenta para o diagnóstico de doenças hepáticas, neoplasias e com caráter inflamatório, como a DRC e para o monitoramento pós transplante renal (IKEDA et al., 2011; LEE et al., 2012; REUKEN et al., 2015).

### **2.3.1.2 Teste de geração de trombina**

A hemostasia é finamente controlada e umas das principais proteínas que compõe este processo de regulação é a trombina, por participar de vias pró-coagulantes, anticoagulantes, fibrinolíticas e antifibrinolíticas (BRUMMEL et al., 2002; RODGERS et al., 2014). Um dos papéis centrais da trombina é evidenciado por sua ação na formação de um coágulo estável de fibrina (HEMKER, 2002), além de interagir com a trombosmodulina, participando da anticoagulação natural (WORLBERG; CAMPBELL, 2008; PARAJULI et al., 2016).

Devido seu importante papel na hemostasia, várias técnicas foram criadas para quantificar a trombina gerada *in vitro*, com o intuito de fornecer informações úteis sobre o processo hemostático em diferentes distúrbios (JEONG et al., 2013), uma vez que doenças associadas às alterações do sistema hemostático estão presentes em mais da metade de todas as doenças incapacitantes e/ou letais (HEMKER, 2002; TEM CATE, 2012).

O TGT avaliado pelo método de CAT (Thrombinoscope BV®, Maastricht, Holanda) mostrou-se sensível para detectar estados de hipo e hipercoagulabilidade, pois reflete toda a formação de trombina em um tempo pré-determinado de 60 minutos após a adição do FT, fosfolípidos e de um substrato fluorescente contendo cálcio, com consequente ativação da coagulação no plasma (HEMKER, 1986; HEMKER, 2002).

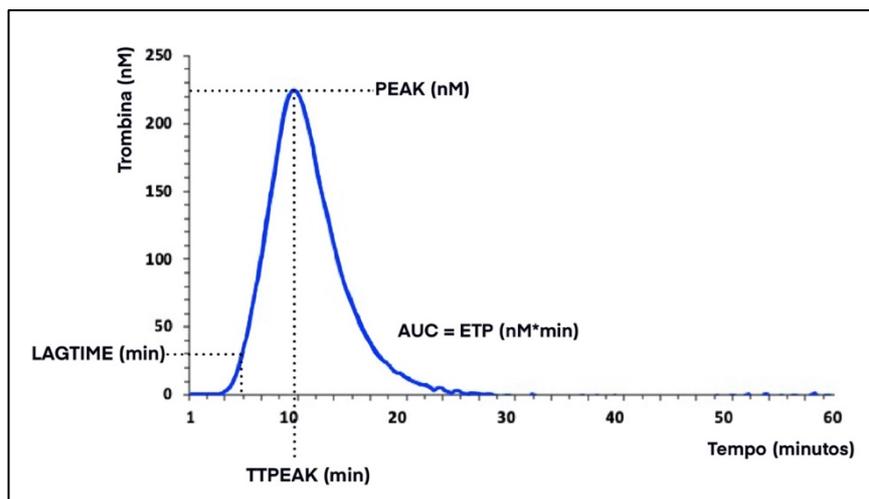
Após a adição dos reagentes para desencadear a geração de trombina, os dados obtidos pelo equipamento são utilizados para obtenção de uma curva de geração de trombina, chamada de trombograma. Conforme revisado por Wan et al (2021) e Depasse et al. (2021), todo o curso da conversão da protrombina

em trombina e sua inativação ao longo do tempo, por meio dos componentes da anticoagulação natural, é mostrado no trombograma. Este é tipicamente caracterizado pelos seguintes parâmetros:

- **Lagtime** (tradução: tempo de latência): representa o tempo necessário para início da coagulação, medido do tempo zero (adição dos fatores iniciadores, como o FT) até a formação do coágulo de fibrina. Corresponde ao tempo de coagulação de testes convencionais. É expresso em minutos (min);
- **Endogenous Thrombin Potential (ETP)** (tradução: potencial endógeno de trombina): representa a área sob a curva (AUC), indicando a quantidade total de trombina gerada no sistema *ex vivo* resultante do equilíbrio entre as forças procoagulantes e anticoagulantes, após a adição de fatores iniciadores à amostra. É expresso em nM/min;
- **Peak** (tradução: pico): concentração máxima de trombina. É expresso em nM;
- **Time to peak (TTPEAK)** (tradução: tempo para o pico): tempo necessário para atingir a concentração máxima de trombina gerada. É expresso em min;
- **Start tail** (tradução: início da cauda): corresponde ao tempo de finalização da geração de trombina. É expresso em min;
- **Velocity index** (tradução: índice de velocidade): indica a inclinação da geração de trombina entre o tempo de latência e o tempo para atingir o pico, e corresponde à primeira derivação desta parte da curva; O índice de velocidade pode ser obtido dividindo o valor do pico pela diferença entre o tempo para alcançar o pico e o tempo de latência.

A **FIGURA 4** representa um exemplo de curva de geração de trombina obtida e seus principais parâmetros.

**Figura 4 – Curva de geração de trombina e seus principais parâmetros**



Fonte: Produzida pela autora (2020).

Do ponto de vista experimental, o TGT é bastante versátil possibilitando uma gama de ensaios distintos por meio de adaptações das concentrações de reagentes e tipos diferentes de amostras. Por exemplo, pode-se utilizar amostras de plasma pobre em plaquetas (PPP) ou plasma rico em plaquetas (PRP) proporcionando interpretações distintas (HEMKER, 2002; TEN CATE, 2012).

A geração de trombina diminuída em PPP está associada a deficiências de um ou mais fatores da coagulação (HEMKER, 2002), e ao uso de anticoagulantes (DUARTE et al., 2018). Em PRP, as deficiências plaquetárias (congenitas ou adquiridas) e o uso de medicamentos antiagregantes plaquetários são causas de baixa geração de trombina. A geração de trombina elevada, detectada em amostras de PPP, apresenta maior relevância clínica se comparada aos testes convencionais, por estar relacionada a trombofilias congênitas e adquiridas, tais como deficiência de antitrombina, hiperprotrombinemia, deficiências de proteína C ou S e ao uso de contraceptivos orais (HEMKER, 2000). A utilização de PPP possibilita a vantagem da realização de medições em amostras armazenadas e congeladas, sem sofrer efeitos adicionais de ciclos de congelamento e descongelamento (TEN CATE, 2012).

Outra adaptação para análise da geração de trombina está relacionada às concentrações de FT, o qual pode ser utilizado em alta concentração ou em baixa concentração. O emprego de diferentes concentrações do FT tem a finalidade de mimetizar as condições de avaliação baseadas nas antigas vias intrínseca e extrínseca. No entanto, é importante ressaltar que a geração de trombina é muito

influenciada pela composição e concentração dos reagentes, principalmente do fator (FT) e/ou fosfolípidos, sendo responsável pelas maiores variações interlaboratoriais (DEPASSE et al., 2021). Conforme revisado por esses autores, diferentes concentrações de FT permitem que o TGT seja mais sensível em reações envolvendo via intrínseca ou extrínseca. Em suma, reagentes contendo muito baixas concentrações de FT e fosfolípidos são adequados para detectar hipocoagulabilidade, como deficiência de fator VIII ou IX, bem como para monitorar a terapia hemostática em pacientes hemofílicos. Já reagentes com alta concentração de FT, mas com muito baixa concentração de fosfolípidos, são capazes de revelar correlação dos resultados de geração de trombina com eventos trombóticos em pacientes com várias condições tais como trombose venosa recorrente, presença de câncer e fator V Leiden, além de fatores de risco exógenos como tabagismo e uso de contraceptivos. Por outro lado, reagentes com altas concentrações de FT e fosfolípidos são adequados para determinar o status hemostático de pacientes em uso de terapia anticoagulante, seja varfarina ou anticoagulantes de ação direta (DEPASSE et al., 2021).

Em consonância com a versatilidade apresentada pelo TGT, em função de ser um sistema aberto, modificações e ou acréscimos de reagentes podem ser feitos de acordo com o propósito do experimento. Assim, por exemplo, é possível investigar a capacidade procoagulante de micropartículas circulantes (MPs), substituindo o FT por MPs. Também pode-se investigar o mecanismo de anticoagulação natural acrescentando proteína C ativada (PCa) (NIJZIEL et al., 2003) ou trombomodulina à reação (YOUNGWON et al., 2013). Mais recentemente, TGT tem sido utilizado também para avaliar a geração de trombina em pacientes sob terapia de reposição sem fator, utilizando emicizumab. No caso, o TGT foi realizado utilizando ativador da via de contato contendo reagentes desencadeantes, mais especificamente FXIa ou ácido elágico (OGIWARA et al., 2020).

Diante do exposto acima, podemos destacar o seu uso em potencial do TGT para o monitoramento de esquemas terapêuticos com anticoagulação e rastreio para distúrbios trombóticos e/ou hemorrágicos adquiridos ou congênitos (BERNTORP; SALVAGNO, 2008, DUARTE et al., 2018). Além disso, o TGT é considerado o único teste sensível para detecção de hipercoagulabilidade em amostras de plasma (HEMKER, 2002; MANNUCI, 2002). Mais especificamente,

o uso clínico do TGT inclui estados de hipo e hipercoagulabilidade. Nos casos de distúrbios hemorrágicos, o TGT tem sido utilizado para estudos envolvendo doenças hereditárias e adquiridas e, dentre as hereditárias, destacam-se a hemofilia e doença de von Willebrand. Cabe ressaltar aqui também o papel do TGT na predição de sangramento em cirurgias cardíacas. Quanto ao uso do TGT nos distúrbios trombóticos, a determinação do risco de trombose venosa e a predição de risco de sua recorrência (inclusive na síndrome antifosfolípídica), são algumas de suas aplicações, além de apresentar utilidade também em casos de aterotrombose, AVC, predição de trombose após cirurgia cardíaca em neonatos, ECMO, trombose associada com câncer e recorrência de câncer, conforme revisado por Binder et al. (2021). Além do mais, o TGT tem tido aplicação em ciência básica, em pesquisa não clínica e controle de qualidade de produtos farmacêuticos (DEPASSE et al., 2021). Com o advento da pandemia (COVID-19), TGT sido utilizado por muitos investigadores na tentativa de entender melhor a fisiopatologia da doença com vista a melhorar o manejo do paciente e desfechos. Como trata-se de uma doença recente, porém com envolvimento do sistema hemostático, mais estudos são necessários para acumular evidência sobre o papel do TGT nessa doença (BINDER et al., 2021).

Diante do exposto acima e considerando a importância clínica das células endoteliais e da hemostasia na DRC e no pós-transplante renal, esforços devem ser envidados para a sua avaliação laboratorial adequada visando diagnosticar mais precisamente distúrbios relacionados, além de contribuir para a avaliação prognóstica e adequação terapêutica. É importante ressaltar que não foram encontrados estudos que avaliam o papel do TGT pelo método CAT no transplante renal, reforçando a relevância deste estudo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar marcadores endoteliais e hemostáticos (endocan, homocisteína, atividade de ADAMST13 e geração de trombina) em pacientes transplantados renais e relacioná-los à evolução do enxerto.

#### **3.2 Objetivos específicos**

##### ***3.2.1 Avaliação transversal***

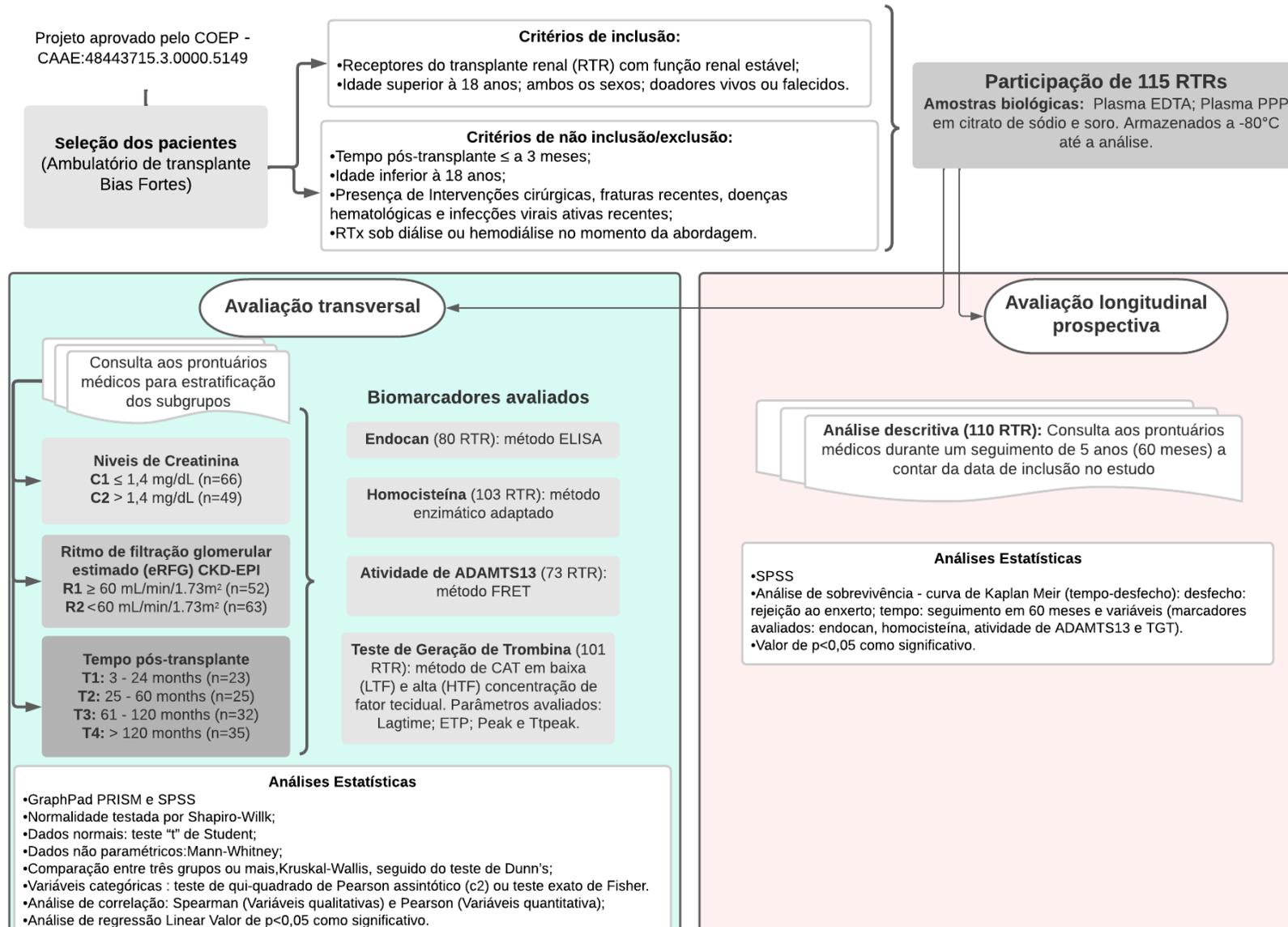
- Avaliar os níveis plasmáticos da endocan e séricos de homocisteína com intuito de investigar a associação entre os biomarcadores endoteliais e função de filtração renal e tempo pós-transplante;
- Avaliar a geração de trombina e determinar a atividade enzimática da ADAMTS13 afim de verificar a associação de alterações hemostáticas com a função de filtração renal e o tempo pós-transplante.

##### ***3.2.2 Avaliação longitudinal prospectiva***

- Analisar os prontuários médicos dos participantes do estudo avaliando os desfechos de rejeição ao enxerto renal e outras intercorrências clínicas relevantes.
- Avaliar de forma prospectiva os marcadores mensurados (endocan, homocisteína, atividade de ADAMST13 e geração de trombina) e os episódios de rejeição ao enxerto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental e aspectos éticos



O comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP) aprovou o presente trabalho sob o número CAAE – 48443715.3.0000.5149 **(ANEXO A e B)**, sendo o título do projeto base “Avaliação de marcadores genéticos, inflamatórios e hemostáticos em pacientes transplantados renais”.

A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) **(APÊNDICE A)** foi obtido de todos os participantes após o devido esclarecimento dos objetivos propostos pela pesquisa, enfatizando a participação voluntária, gratuita e a livre decisão de interromperem a participação no estudo. Após a assinatura do TCLE, foi realizada a coleta sanguínea. Uma ficha clínica padronizada **(APÊNDICE B e C)** foi formulada e preenchida para cada integrante do estudo, com base em seus dados clínicos e laboratoriais relevantes, obtidos de seus prontuários médicos para produção do banco de dados.

O presente estudo é composto por duas fases de análise, sendo uma transversal (fase laboratorial, dosagem dos biomarcadores) e uma fase longitudinal prospectiva (análise aos prontuários clínicos).

Foram selecionados para este estudo, o total de **115 RTR** em controle ambulatorial no Setor de Transplantes da Unidade Bias Fortes, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A seleção dos participantes foi sequencial ao atendimento e as amostras biológicas de sangue venoso foram coletadas sem a necessidade de jejum prévio. A seleção dos participantes foi realizada no período de agosto de 2015 a dezembro de 2016.

## **4.2 Avaliação transversal**

### **4.2.1 Casuística**

Para a análise transversal, os prontuários clínicos foram consultados para a obtenção de variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais dos participantes do estudo, tais como: sexo, idade, tipo de doador, tempo pós-transplante, causa primária da DRC, presença de comorbidades, dosagem de creatinina, terapia imunossupressora, bem como uso de outros medicamentos. Estes parâmetros foram utilizados para compor o banco de dados e os diferentes subgrupos do estudo e, posteriormente, para estudo da relação entre os dados obtidos e os marcadores laboratoriais investigados.

Os RTR foram alocados em diferentes subgrupos de acordo com os níveis de creatinina sérica:

- **C1:  $\leq 1,4\text{mg/dL}$  (n= 66);**
- **C2:  $> 1,4 \text{ mg/dL}$  (n= 49).**

O Ritmo de Filtração Glomerular estimado (eRFG) foi calculado pela fórmula proposta pelo *Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) (LEVEY et al., 2009) com a utilização da calculadora disponibilizada no site da Sociedade Brasileira de Nefrologia, por meio da página web:

<https://www.sbn.org.br/profissional/utilidades/calculadoras-nefrologicas/>.

A equação CKD-EPI pode ser representada pela seguinte fórmula:

$$\text{eRFG} = 141 \times \min(\text{Cre}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Cre}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0,993^{\text{idade}} \times 1,018^{[\text{se mulher}]} \times 1,159^{[\text{se negro}]}$$

Onde:

**Cre:** é creatinina sérica;

**$\kappa$ :** é 0,7 para mulheres e 0,9 para homens;

**$\alpha$ :** é -0,329 para mulheres e -0,411 para homens;

**min:** indica o mínimo de Cre/  $\kappa$  ou 1;

**max:** indica o máximo de Cre /  $\kappa$  ou 1.

Os valores de eRFG obtidos foram utilizados para estratificar os participantes do estudo, sendo os subgrupos descritos a seguir:

- **R1:  $\leq 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$  (n= 52);**
- **R2:  $> 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$  (n= 63).**

Adicionalmente, os participantes do presente estudo foram avaliados de acordo com o tempo pós-transplante, alocados em quatro subgrupos, sendo eles:

- **T1: 3 a 24 meses (n= 23);**
- **T2: 25 a 60 meses (n= 25);**

- **T3: 61 a 120 meses (n= 32);**
- **T4: acima de 120 meses pós-transplante (n= 35).**

A categorização dos subgrupos foi baseada na vivência clínica ambulatorial pós-transplante dos colaboradores nefrologistas e em estudos publicados previamente (SAMAAN et al., 2011; JUNG et al., 2012; LEVIN et al., 2013; ALVES et al., 2015; MOTA et al., 2017; MARTINS et al., 2019; ALVES et al., 2020).

#### **4.2.2 Critérios de inclusão/exclusão**

Foram incluídos no estudo RTR com função renal estável, idade superior a 18 anos e em uso do mesmo protocolo de imunossupressão (um inibidor de calcineurina; um anti-proliferativo ou um inibidor da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e um corticosteróide, e de acordo com as diretrizes para o transplante renal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A função renal estável foi definida como ausência por três meses ou mais dos sinais de rejeição ao aloenxerto, tais como: indicações para o uso de diálise após a primeira semana pós-transplante; sensação de queimação e/ou dor durante a micção; volume urinário diminuído (oligúria com menos de 0,5 mL/kg por hora por mais de 6h); urina com sangue ou odor fétido; inchaço no local da cirurgia ou em outro local (pálpebras, mãos ou pés); febre; diarreia; falta de ar; ganho de peso excessivo em pouco tempo; aumento absoluto nos níveis de creatinina para  $\geq 0,3$  mg/dL dos valores basais em 48h (MOTA et al., 2015; ABTO, 2019).

Instabilidades clínicas como disfunção aguda do enxerto e rejeição ao enxerto são as complicações mais comuns nos primeiros três meses após o transplante e esse período pode sofrer forte influência da fase pré-transplante e da intervenção cirúrgica (ABTO, 2019). Portanto, pacientes com três meses ou menos de tempo pós-transplante não foram incluídos na pesquisa. Critérios de exclusão adicionais foram fraturas recentes e outras cirurgias, presença de coagulopatias no momento da coleta, doenças trombóticas, infecção aguda e tratamento dialítico durante o ato da inclusão no estudo ou nos últimos três meses.

### **4.2.3 Amostras biológicas**

As amostras biológicas utilizadas foram os plasmas colhidos em anticoagulante citrato de sódio 0,109 mol/L (VACUETTE®, GREINER BIO-ONE BRASIL, São Paulo, Brasil) e anticoagulante K3 – ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) 1,8mg/mL (VACUETTE®, GREINER BIO-ONE BRASIL, São Paulo, Brasil) e amostras de soro obtidas em tubos contendo ativador de coágulo (VACUETTE®, GREINER BIO-ONE BRASIL, São Paulo, Brasil). Todas as amostras foram coletadas por meio do sistema a vácuo para coleta de sangue periférico, obtidas de todos os integrantes do estudo e devidamente identificadas. As amostras foram colhidas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG no mesmo momento da coleta sanguínea destinada ao controle periódico pós-transplante renal. Após a coleta, as amostras foram devidamente acondicionadas e transportadas em caixas térmicas refrigeradas até o momento de seu preparo, não ultrapassando o tempo máximo de 2 horas até a centrifugação.

#### **4.2.3.1 Preparo das amostras biológicas**

As amostras colhidas em tubo com anticoagulante citrato de sódio foram centrifugadas em velocidade de 3.500 rpm, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C (Jouan® modelo BR4i) para obtenção das amostras de PPP.

Para as amostras colhidas em tubos com anticoagulante EDTA, a centrifugação foi realizada a 2.500 rpm, por 20 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C (Jouan® modelo BR4i) para obtenção de amostras de plasma.

Para a obtenção do soro, após a completa coagulação das amostras no tubo, as mesmas foram centrifugadas a 2500 rpm, por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (Jouan® modelo BR4i).

Foram feitas alíquotas de 500 µL em triplicata para os três tipos de amostras obtidas (plasma colhido em EDTA ou citrato de sódio e soro), e posteriormente, armazenadas em microtubos de polipropileno atóxico de centrifugação (Axygen®), devidamente identificados e armazenados em freezer vertical a -80°C (Jouan® modelo VX380) até o momento do uso. Cada alíquota de plasma ou soro foi descongelada apenas uma única vez para a realização dos ensaios propostos.

#### **4.2.4 Métodos**

##### **4.2.4.1 Avaliação dos níveis plasmáticos da endocan**

Os níveis plasmáticos da endocan foram determinados pelo método de ELISA de captura em 80 amostras de plasma em EDTA. Foi utilizado o kit diagnóstico Lunginnov® ENDOCAN ELISA (Lunginnov®, Lille, França) seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, os poços das microplacas, contendo anticorpo primário específico, foram incubados com 100µL de amostras diluídas 1:4, à temperatura ambiente por uma hora. Após este tempo, lavagens sucessivas com tampão PBS foram realizadas. Em seguida, os anticorpos marcados com a enzima de revelação (peroxidase) foram adicionados e, após incubação, novos passos de lavagens foram realizados. A revelação dos antígenos capturados foi realizada através da reação enzimática da peroxidase com o substrato TMB (3, 3', 3, 5' - tetrametilbenzidina), gerando um produto colorido. Essa reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a leitura das placas foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas (VersaMax Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES, EUA), na Faculdade de Farmácia da UFMG.

Uma curva padrão foi construída para interpolação das absorbâncias das amostras para obtenção das concentrações de endocan, que logo em seguida foram multiplicadas pelo fator de diluição utilizado (quatro vezes). Os valores médios relatados pelo fabricante para uma pequena população de indivíduos saudáveis foram de  $1,0 \pm 0,33$  ng/mL, com um limite de detecção entre 0,3 ng/mL a 10,0 ng/mL.

##### **4.2.4.2 Avaliação dos níveis séricos de homocisteína**

Foram determinados os níveis séricos de HCY de 103 RTR com o emprego do ensaio enzimático Homocysteine Enzymatic Assay RX SERIES - RANDOX (RANDOX Laboratories Ltd, Crumlin, Reino Unido), adaptando as condições recomendadas pelo fabricante à nossa realidade laboratorial. O fundamento da técnica se baseia na redução da HCY oxidase em HCY livre. A reação catalisada por CBS transforma o produto da interação entre HCY livre e serina em cistationina, que será decomposta

em homocisteína, piruvato e amônia por ação da cistationina beta-liase (CBL). O piruvato é então convertido em lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A taxa de conversão de NADH em NAD + é diretamente proporcional à concentração de HCY. De forma resumida, 80 µL de soro foi adicionado a 200µL de Reagente 1 [NADH, LDH, serina, Trizma base, *trizma hydrochloride*, Azida de sódio - (primeira leitura)] e após 80 segundos foi adicionado 20 µL de Reagente 2 (CBS, CBL e Azida de sódio). Foi realizada uma adaptação para as leituras cinéticas em comprimento de onda a 340 nm em leitora de microplacas Multiskan GO (Thermo scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) no laboratório CT vacinas, no Centro Tecnológico BHtec da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. O método utilizado se baseia na utilização de dois calibradores (nível zero e nível um) (RANDOX Laboratories Ltd, Crumlin, Reino Unido) para leitura linear.

Uma curva padrão foi construída para interpolação das absorbâncias das amostras para obtenção das concentrações de HCY. Os valores médios relatados pelo fabricante para indivíduos saudáveis foram de 5 – 20 µmol/L, sendo linear até 47,9 µmol/L e com sensibilidade de detecção a partir de 1,74 µmol/L.

#### **4.2.4.3 Avaliação da atividade plasmática da ADAMTS13**

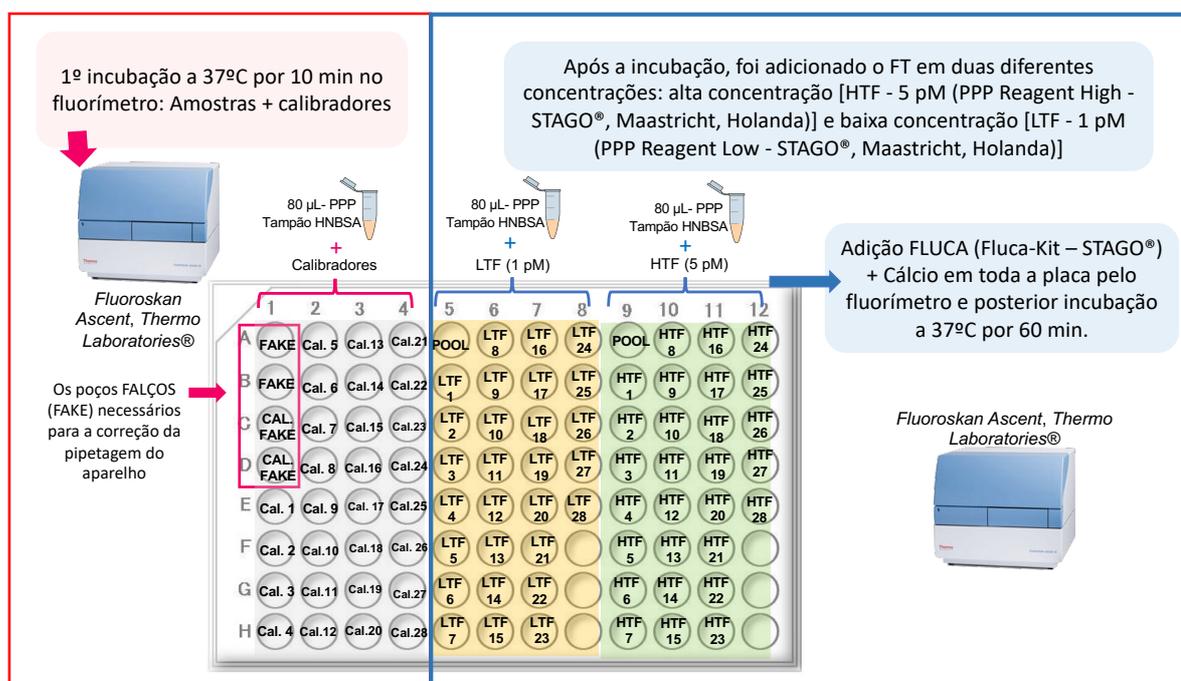
O ensaio ACTIFLUOR™ ADAMTS13 Activity (Sekisui diagnostics, Stamford – Estados Unidos da América) foi utilizado para determinar a atividade enzimática da ADAMTS13 de 73 RTR, em amostras de PPP, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. O ensaio se baseia na metodologia de *Fluorescence resonance energy transfer*, (FRET). Resumidamente, o ensaio permite mensurar a atividade da ADAMTS13 do plasma a ser testado através da ação de clivagem proteolítica entre os resíduos de tirosina e metionina de um substrato de gmFvW acoplado ao fluorocromo ALEXA-86. A clivagem desacopla o fluorocromo, o que permite a liberação do sinal fluorescente. O aumento da fluorescência ao longo do tempo ( $V_{max}$ ) é monitorado a 37°C em espectrofluorímetro (*Fluoroskan Ascent*, Thermo Laboratories, Massachusetts, Estados Unidos da América), sendo proporcional à atividade da ADAMTS13 no plasma. Ao final da leitura, uma curva foi construída interpolando os valores de  $V_{max}$  na curva padrão, construída com a utilização de

plasma normal com concentração conhecida de ADAMTS13. O fabricante não fornece valor de referência, no entanto cita a existência de um intervalo esperado para indivíduos saudáveis, média de 666 ng/dL ( $\pm 135$  ng/dL), obtido a partir de um estudo com 234 indivíduos. O ensaio foi realizado no Laboratório de Hematologia da Universidade Federal de São João del-Rei, campus Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais.

#### 4.2.4.4 Avaliação da geração da trombina

A geração de trombina foi mensurada em 101 amostras de PPP, com o emprego do método de CAT (Thrombinoscope BV®, Maastricht, Holanda) previamente padronizado por Duarte et al. (2017). A análise foi realizada no Laboratório Multiusuários da Faculdade de Farmácia da UFMG. A **FIGURA 5** representa de forma resumida, os passos práticos da execução da técnica de geração de trombina.

**Figura 5 - Representação esquemática da técnica de geração de trombina pelo método *calibrated automated thrombogram* (CAT)**



**Legenda:** Em uma placa de 96 poços foram adicionados 80µL de amostras de PPP (descongeladas em banho-maria a 37°C) juntamente com 5 µL de tampão composto por Hepes 20 mM, NaCl 140 mM e albumina de soro bovino (BSA) a 5 g/L (HNBSA). Em poços distintos, colocar 80µL de amostras de PPP juntamente com 20 µL do calibrador (*Thrombin Calibrator* - STAGO®, Maastricht, Holanda), e 5

$\mu\text{L}$  de HNBSA. Em seguida, incubar a placa a  $37^\circ\text{C}$  por 10 minutos em fluorímetro (*Fluoroskan Ascent*, Thermo Laboratories, Massachusetts, Estados Unidos da América). Após a incubação, foram adicionados aos poços contendo apenas as amostras de PPP,  $20\ \mu\text{L}$  de FT em duas diferentes concentrações, com o intuito de mimetizar as condições avaliadas nas antigas vias extrínseca e intrínseca, sendo alta concentração do fator tissular [HTF -  $5\ \mu\text{M}$  (*PPP Reagent High* - STAGO®, Maastricht, Holanda)] e baixa concentração [LTF -  $1\ \mu\text{M}$  (*PPP Reagent Low* - STAGO®, Maastricht, Holanda)], respectivamente. Em seguida,  $20\ \mu\text{L}$  de substrato fluorescente contendo o cálcio (*Fluca-Kit* – STAGO®, Maastricht, Holanda) foram adicionados pelo *dispenser* do fluorímetro em todos os poços da placa, a qual foi imediatamente incubada no equipamento procedendo-se a uma leitura por um período de 60 minutos. **Fonte: Produzida pela autora (2020).**

A geração de trombina é diretamente proporcional à clivagem do substrato fluorescente durante o tempo pré-definido de leitura, proporcionando a construção de uma curva de tempo (minutos) *versus* concentração de trombina gerada (nM) com a utilização do *software Thrombinoscope®* (STAGO®, Maastricht, Holanda), que também foi utilizado para o cálculo dos seguintes parâmetros de geração de trombina: LAGTIME; ETP; TTPEAK e PEAK. Os parâmetros citados foram avaliados em ambas as concentrações de FT testados (HTF e LTF). Os valores de referência e o limite de detecção não são fornecidos pelo fabricante.

#### **4.2.5 Análise estatística**

A normalidade dos dados foi testada pelo método *Shapiro-Willk*. A comparação entre dois grupos foi realizada utilizando-se o teste “t” de *Student* para as variáveis contínuas e paramétricas e para as variáveis não-paramétricas utilizou-se o teste *Mann-Whitney*. A comparação das medianas entre 3 grupos ou mais foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós teste de *Dunn’s*. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado de Pearson assintótico ou teste exato de Fisher.

A investigação de correlações entre os parâmetros avaliados foi realizada pelo método de Pearson para variáveis quantitativas e *Spearman* para variáveis qualitativas. As variáveis incluídas na análise foram: idade; sexo, tipo de doador; tempo pós-transplante; presença de dislipidemia, atividade de ADAMTS13; níveis de ETP-LTF, ETP-HTF, endocan, homocisteína, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL, hemoglobina; contagem de plaquetas e valor de eRFG. A interpretação do coeficiente de correlação foi baseada no estudo de MUKAKA (2012), no qual correlações ( $r$ ) entre 0,00 a 0,30 (0,00 a -0,30) foram consideradas desprezíveis; 0,30

a 0,50 (-0,30 a -0,50) fracas; 0,50 a 0,70 (-0,50 a -0,70) moderadas; 0,70 a 0,90 (-0,70 a -0,90) fortes; 0,90 a 1,00 (-0,90 a -1,00) muito fortes.

Análises de regressão linear univariada e multivariada foram realizadas para avaliar o grau de associação entre as variáveis independentes (idade; sexo, tipo de doador; tempo pós-transplante; presença de dislipidemia, creatinina, valor de eRFG, colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL, hemoglobina, global de leucócitos, e contagem de plaquetas) e os níveis dos biomarcadores avaliados (endocan, homocisteína, atividade de ADAMTS13 e geração de trombina). As variáveis não-paramétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil (IQ) e as variáveis paramétricas como média e desvio-padrão (SD). As análises estatísticas foram realizadas com a utilização dos programas SPSS (versão 23.0) e GraphPad PRISM (versão 7.0) e foram consideradas como diferenças significativas valores de  $p \leq 0,050$ .

### 4.3 Avaliação longitudinal prospectiva

Com o intuito de avaliar a presença de episódios de rejeição ao enxerto ao longo do tempo entre os participantes do estudo e sua associação com os marcadores laboratoriais de interesse (geração de trombina, atividade de ADAMTS13, endocan e homocisteína), foram realizadas consultas aos prontuários clínicos. Esta análise possibilitou também a avaliação da frequência de ocorrências de outros desfechos de relevância, como presença de infecções, neoplasias e eventos cardiovasculares.

A avaliação dos prontuários físicos foi realizada no Ambulatório Bias Fortes, do Hospital das Clínicas da UFMG, entre os meses de julho de 2020 a janeiro de 2022, após renovação do Termo de Responsabilidade: Acesso a dados em formato eletrônico para fins de pesquisa (**ANEXO C**). A consulta aos registros médicos foi possível para **110 RTR**. O tempo de seguimento estipulado foi de 5 anos (60 meses) a partir da data de inclusão no estudo, sendo esta coincidente com a data de coleta das amostras biológicas. Os anos consultados foram compreendidos entre agosto de 2016 a dezembro de 2021. Uma ficha clínica (**APÊNDICE C**) foi utilizada para registro em papel das informações clínicas e laboratoriais dos participantes ao longo do seguimento para posterior análise descritiva e de sobrevivência (análise tempo – desfecho).

As variáveis clínicas e laboratoriais extraídas dos prontuários físicos foram: episódios de rejeição, tipo de rejeição, perda do enxerto, realização de novo transplante, presença de comorbidades/doenças (neoplasias, infecções, distúrbios gastrointestinais, doenças crônicas), medicamentos em uso e óbito. Dentre as variáveis laboratoriais tivemos a creatinina sérica, ureia, dosagem de hemoglobina, global de leucócitos, contagem de plaquetas, colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL. As análises foram realizadas anualmente, com data de obtenção dos dados o mais próximo possível do mês de inclusão no presente estudo, para que pudessem refletir este acompanhamento anual.

#### ***4.3.1 Análise de sobrevivência (análise tempo - desfecho) – curva de Kaplan Meier***

A análise de sobrevivência, também chamada como análise de tempo-desfecho, foi utilizada para estimar a curva de sobrevivência, no caso a ocorrência de rejeição ao enxerto (evento dependente) em relação ao tempo de seguimento, em comparação aos níveis dos marcadores mensurados na avaliação transversal. A análise fornece a fração de RTR que não apresentou o desfecho rejeição ao longo do tempo e que não foi “censurado”, termo usado para a interrupção do seguimento.

Foi considerado um evento “censurado” quando a interrupção ao seguimento do estudo ocorreu antes dos 60 meses, não sendo associada à rejeição ao enxerto, tais como: óbito por causas não renais, abandono do acompanhamento pós-transplante, ausências de informações nos prontuários médicos e a não obtenção dos dados atuais dos pacientes em acompanhamento no setor de nefrologia. É importante ressaltar que o desfecho rejeição ao enxerto foi considerado um evento de saída do estudo, ou seja, evento único que ao ocorrer interrompe o seguimento/acompanhamento do paciente antes do final do estudo (60 meses).

Foi utilizado o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier, onde o tempo de seguimento foi de 60 meses, o evento “desfecho” considerado foi a ocorrência da rejeição ao enxerto e como fatores de observação, cada biomarcador [endocan, homocisteína, atividade de ADAMTS13 e geração de trombina (parâmetros da curva: ETP-LTF e ETP-HTF)] foi categorizado em dois grupos, tendo como ponto de corte o valor da mediana para o marcador. Como podemos observar no **QUADRO 1**. As

curvas obtidas pela análise de Kaplan-Meier foram comparadas entre si por meio do teste de *log rank*, com valor de  $p=0,050$ , como nível de significância.

**Quadro 1 - Estratificação dos grupos para os biomarcadores endocan, homocisteína, atividade de ADAMTS13, ETP – LTF e ETP – HTF**

Parâmetro (n)	GRUPOS	
	Inferior à mediana (n)	Superior à mediana (n)
<b>Endocan (77)</b>	Menor que 5,05ng/mL (38)	Maior ou igual a 5,05 ng/mL (39)
<b>Homocisteína (98)</b>	Menor que 19,95 $\mu$ mol/L (46)	Maior ou igual a 19,95 $\mu$ mol/L (52)
<b>Ativ. de ADAMTS13 (68)</b>	Menor que 663,8ng/mL (33)	Maior ou igual a 663,8 ng/mL (35)
<b>ETP – LTF (96)</b>	Menor que 1802,00nM.min (47)	Maior ou igual a 1802,00nM.min (49)
<b>ETP – HTF (87)</b>	Menor que 1965,00nM.min (42)	Maior ou igual a 1965,00nM.min (45)

**Legenda:** Os valores de mediana de cada parâmetro foi utilizado como ponto de corte para a estratificação dos grupos. ETP – LTF: potencial endógeno de trombina em baixa concentração de fator tissular; ETP – HTF: potencial endógeno de trombina em alta concentração de fator tissular.

**Fonte:** produzida pela autora.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise transversal

#### ***5.1.1 Caracterização clínica e demográfica dos pacientes transplantados renais***

O presente estudo transversal contou com a participação de **115 RTR**, sendo 66 do sexo masculino (57,4%) e 49 do sexo feminino (42,6%). A mediana para a idade foi de 43,93 anos (idade mínima = 18 anos e máxima = 78 anos). O doador falecido foi mais frequente (64,3%). A mediana para o tempo pós-transplante foi de 76 meses (variando entre 4 a 335 meses). Na **TABELA 1** estão representadas as demais características clínicas e demográficas da população estudada.

**Tabela 1 – Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes transplantados renais**

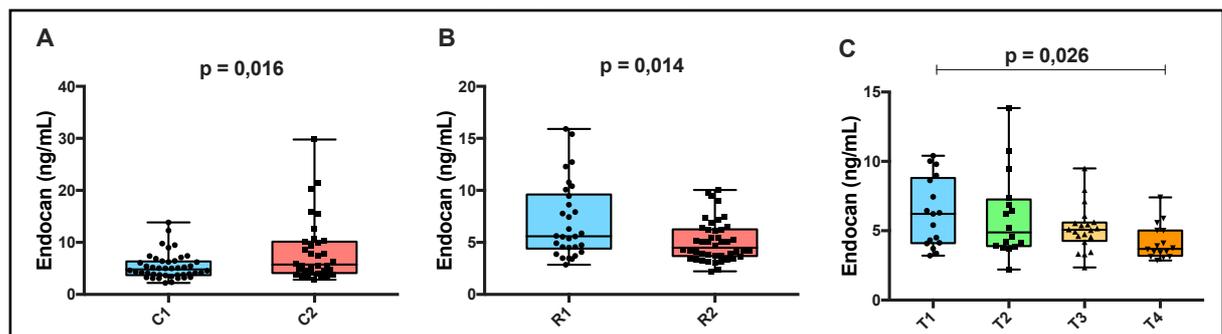
Parâmetros	C1 (n=66)	C2 (n=49)	R1 (n=52)	R2 (n=63)	T1 (n=23)	T2 (n=25)	T3 (n=32)	T4 (n=35)	Total (n=115)
<b>Idade [anos (SD)]</b>	<b>42,3 (14,2)</b>	<b>46,5 (14,1)</b>	<b>47,5 (13,6)</b>	<b>41,3 (14,2)</b>	<b>42,2 (15,9)</b>	<b>40,3 (14,4)</b>	<b>45,6 (12,58)</b>	<b>46,0 (14,7)</b>	<b>43,93 (14,34)</b>
Sexo [n (%)]									
Masculino	34 (51,5)	32 (65,3)	30 (57,7)	36 (57,1)	15 (65,2)	13 (52,0)	19 (59,4)	19 (54,3)	66 (57,4)
Feminino	32 (48,5)	17 (34,7)	22 (42,3)	27 (42,8)	8 (34,8)	12 (48,0)	13 (40,6)	16 (46,0)	49 (42,6)
Doença base da DRC [n (%)]									
Glomerulosclerose	15 (22,7)	15 (30,6)	15 (28,8)	15 (23,8)	4 (17,4)	7 (28,0)	10 (31,2)	9 (25,7%)	30 (26,0)
Nefrosclerose hipertensiva	15 (22,7)	10 (20,4)	13 (25,0)	12 (19,0)	4 (17,4)	6 (24,0)	2 (6,2)	13 (37,1%)	25 (21,7)
Nefropatia diabética	6 (9,1)	2 (4,0)	2 (3,8)	6 (9,5)	2 (8,7)	2 (8,0)	4 (12,5)	0 (0,0%)	8 (6,9)
Outras causas†	19 (34,7)	6 (12,2)	8 (15,4)	17 (27,0)	7 (30,4)	4 (16,0)	7 (21,9)	7 (20,0%)	25 (21,7)
Etiologias desconhecidas	10 (15,1)	11 (22,4)	9 (17,3)	12 (19,0)	5 (21,7)	6 (24,0)	7 (21,9)	3 (8,6%)	21 (18,3)
Não informado	1 (1,5)	5 (10,2)	5 (9,6)	1 (1,6)	1 (4,3)	0 (0,0)	2 (6,2)	3 (8,6%)	6 (5,2)
Tempo pós-transplante [meses (IQ)]	76,0 (94,8)	72 (138)	74 (139)	78 (81)	12 (11)	45 (19)	85 (29)	180 (202)	76 (99,6)
Idade do enxerto [meses (IQ)]	504 (260)	613 (160)	613 (166)	480 (263)	295 (381)	523 (88)	601 (203)	610 (298)	535,5 (252,7)
Tipo de doador [n (%)]									
Falecido	45 (68,2)	29 (59,2)	30 (57,7)	44 (69,8)	18 (78,3)	14 (56,0)	24 (75,0)	18 (51,4)	74 (64,3)
Vivo	21 (31,8)	20 (40,8)	22 (42,3)	19 (30,1)	5 (21,7)	11 (44,0)	8 (25,0)	17 (48,6)	41 (35,6)
Terapia imunossupressora [n (%)]									
Tacrolimus	46 (69,7)	27 (55,1)	26 (50,0)	47 (74,6)	18 (78,3)	22 (88,0)	17 (53,1)	16 (46,0)	73 (63,5)
Ciclosporina	11 (16,7)	11 (22,4)	15 (28,8)	7 (11,1)	2 (8,7)	2 (8,0)	3 (9,4)	15 (42,8)	22 (19,1)
Rapamicina	9 (13,6)	11 (22,4)	11 (21,1)	9 (14,3)	3 (13,0)	1 (4,0)	12 (37,0)	4 (11,4)	20 (17,4)
Dados clínicos e laboratoriais									
Glicose [mg/dL (SD)]	95,26 (22,61)	102,64 (45,70)	102,65 (43,21)	94,70 (23,11)	92,88 (14,56)	95,45 (16,82)	96,48 (23,48)	103,66 (50,96)	98,09 (33,53)
Colesterol total [mg/dL (SD)]	184,30(36,54)	188,030 (39,40)	189,42 (33,52)	182,97 (40,37)	183,83 (48,92)	175,021 (34,96)	199,0 (39,22)	180,52 (28,04)	185,12 (37,19)
Triglicéridios [mg/dL (SD)]	152,55 (70,52)	166,61 (67,50)	161,00 (64,41)	155,56 (74,03)	168,50 (62,54)	143,16 (71,38)	161,33 (79,26)	160,33 (64,37)	157,90 (60,66)
Colesterol HDL [mg/dL (SD)]	51,91 (14,46)	48,56 (14,23)	49,02 (13,49)	51,92 (15,10)	51,27 (11,21)	46,44 (9,12)	56,13 (16,32)	48,12 (16,15)	50,60 (14,42)
Colesterol não-HDL [mg/dL (SD)]	133,10 (34,45)	142,11 (36,90)	139,66 (34,70)	133,75 (36,16)	139,40 (47,04)	128,58(37,53)	142,27 (36,23)	133,12 (26,91)	135,68 (35,11)
Creatinina [mg/dL (IQ)]	1,07 (0,31)	1,92 (0,93)	1,84 (1,01)	1,07 (0,32)	1,43 (0,82)	1,23 (0,92)	1,29 (0,56)	1,24 (0,84)	1,28 (0,71)
eRFG [mL/min/1,73m <sup>2</sup> (SD)]	85,1 (27,44)	40,80 (16,04)	40,04 (16,14)	87,88 (24,81)	69,15 (44,93)	65,61 (32,16)	70,89 (24,01)	61,36 (29,79)	66,38 (31,96)
Hemoglobina [mg/dL (IQ)]	14,50 (3)	12,85 (4)	12,56 (2,37)	14,32 (1,85)	15,80 (3)	12,80 (3)	14,40 (3)	12,75 (2)	14,14 (4,08)
Hematócrito [%](IQ)]	42,45 (9)	39,40 (11)	38,74 (7,89)	43,42 (5,91)	45,80 (10)	38,0 (8)	44,10 (9)	39,15 (9)	40,26 (8,21)
Plaquetas [µL (SD)]	233425,25 (65560,03)	202348,83 (60367,87)	210666,26 (67456,72)	227948,94 (62484,60)	216500 (60158,85)	223360,0 (57053,0)	210313,44 (66997,4)	231896,47 (650285,20)	220842,47 (650085,03)

**Legenda:** C1: níveis de creatinina menor ou igual a 1,4 mg/dL; C2: níveis de creatinina maior a 1,4 mg/dL; R1: ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) menor ou igual a 60 mg/min/1,73m<sup>2</sup>; R2: ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) maior que 60 mg/min/1,73m<sup>2</sup>; T1: tempo pós-transplante entre 3 a 24 meses; T2: tempo pós-transplante entre 25 a 60 meses; T3: tempo pós-transplante entre 61 a 120 meses e T4: tempo pós-transplante maior que 120 meses. † Outras causas de doença de base: Rins policísticos, Lúpus eritematoso sistêmico, Atresia renal congênita, Síndrome Hemolítica Urêmica, Síndrome de Fanconi, esquistossomose, mielomeningocele, glomerulonefrite, microangiopatia trombótica e hidronefrose. Os dados paramétricos estão apresentados como média e desvio padrão - SD (Pearson). Dados de frequência (%) foram analisados pelo teste  $\tau$  ou pelo teste exato de Fisher. IMC: índice de massa corporal; DRC: doença renal crônica. **Fonte: produzida pela autora (2022).**

### 5.1.2 Avaliação dos níveis plasmáticos da endocan

Foram avaliados os níveis plasmáticos da endocan em **80** RTR, sendo a mediana (IQ) de 5,05 ng/mL (3,59) para a população total. A comparação da mediana entre os grupos possibilitou observar que os RTR com função renal reduzida, avaliados pelos níveis de creatinina e eRFG, grupos C2 [5,75 ng/mL (6,03)] e R1 [5,88 ng/mL (6,06)] respectivamente, apresentaram maior concentração plasmática da endocan, em comparação com os RTR com melhor função de filtração renal, grupos C1 [4,81 ng/mL (2,31) e R2 4,62 ng/mL (10,16)], com valores de  $p \leq 0,02$ , como representado na **FIGURA 6 (A e B)**. Ao avaliar os níveis da endocan em relação ao tempo pós-transplante, níveis mais baixos da endocan foram encontrados entre os RTR com maiores tempos pós-transplante (grupo T4) em relação aos transplantados mais recentes (grupo T1) [T1= 6,25 ng/mL (5,07); T2= 4,88 ng/mL (3,36); T3= 5,09 ng/mL (1,48) e T4= 3,99 ng/mL (3,60), com valor de  $p=0,026$ . A **FIGURA 6 C** mostra as comparações entre as medianas (IQ) da endocan nos grupos estudados.

**Figura 6 - Níveis de endocan em 80 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com a função de filtração renal, avaliada pelos níveis de creatinina e ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG), e tempo pós-transplante**



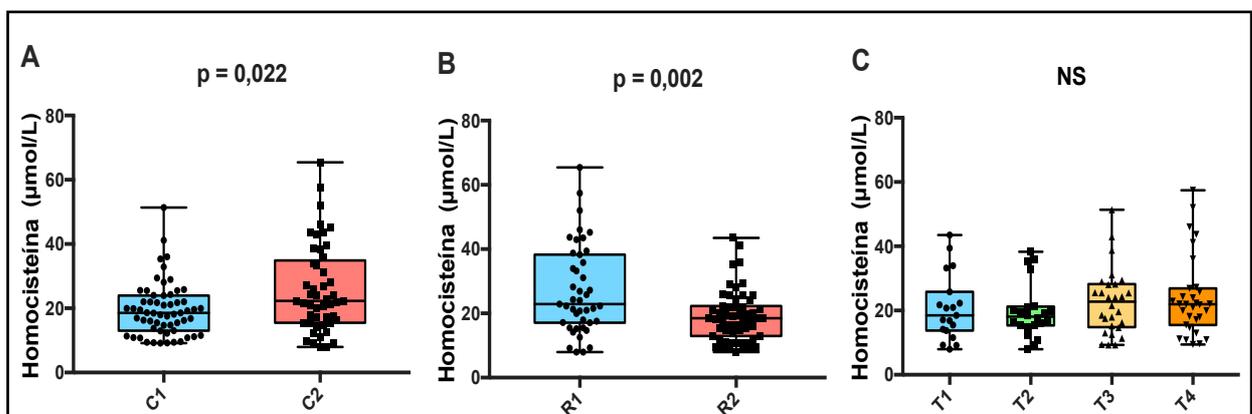
**Legenda:** A: grupos baseados nos níveis de creatinina sérica [C1:  $\leq 1,4$ mg/dL (n=46) e C2:  $> 1,4$  mg/dL (n=34)]; B: grupos baseados no ritmo de filtração glomerular estimado - eRFG [R1:  $\leq 60$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>

(n= 34) e R2: > 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (n= 46)]; C: Grupos baseados no tempo pós-transplante [T1: 1 a 24 meses (n = 20), T2: 25 a 60 meses (n = 16), T3: 61 a 120 meses (n= 22) e T4: acima de 120 meses pós-transplante (n= 21)]. NS: não significativo; valor de p ≤ 0,050 como significativo. **Fonte: produzida pela autora (2022).**

### 5.1.3 Avaliação dos níveis séricos de Homocisteína

Foram avaliados os níveis séricos de HCY em 105 RTR, sendo 19,95 µmol/L (11,96) o valor da mediana (IQ) para a população total. Níveis aumentados de HCY foram observados entre os RTR com prejuízo da função renal de filtração, avaliada por meio da creatinina sérica, grupos C2 [22,33 µmol/L (18,35)] e do eRFG, grupo R1 [22,87 µmol/L (21,23)], em comparação àqueles com função renal preservada, grupo C1 [18,59 µmol/L (10,95)] e grupo R2 [18,59 µmol/L (11,18)], com valores de p≤0,02, como representado na **FIGURA 7 (A e B)**. Não houve diferenças significativas em relação aos grupos distribuídos de acordo com o tempo pós-transplante. Por outro lado, observa-se uma elevação de homocisteína com o passar do tempo [T1 = 18,52 µmol/L (12,10); T2 = 18,66 µmol/L (5,78); T3 = 22,8 µmol/L (13,36) e T4 = 21,99 µmol/L (11,35)], porém, não significativo.

**Figura 7 - Níveis de homocisteína em 105 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com a função de filtração renal, avaliada por meio da creatinina sérica e ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG), e tempo pós-transplante**

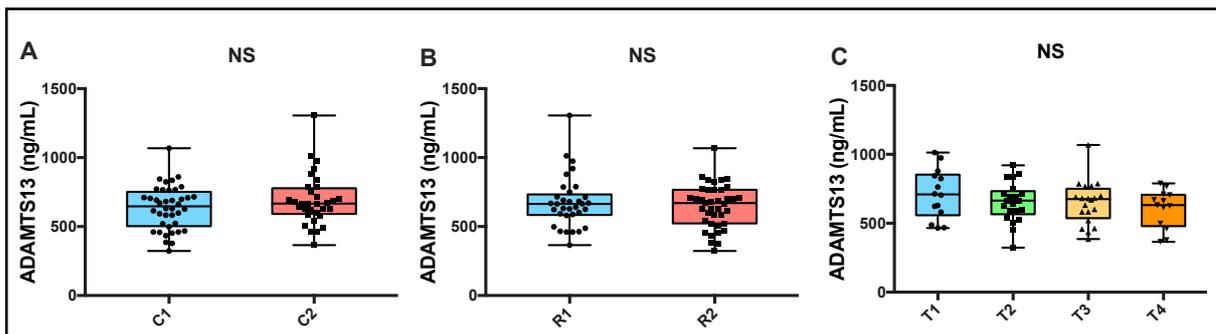


**Legenda:** A: grupos baseados nos níveis de creatinina sérica [C1: ≤1,4mg/dL (n = 60) e C2: >1,4 mg/dL (n = 43)]; B: grupos baseados no ritmo de filtração glomerular estimado - eRFG [R1: ≤ 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (n= 46) e R2: > 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (n= 57)]; C: grupos baseados no tempo pós-transplante [T1: 1 a 24 meses (n = 21), T2: 25 a 60 meses (n = 23), T3: 61 a 120 meses (n= 26) e T4: acima de 120 meses pós-transplante (n= 31)]. NS: não significativo; Valor de referência para HCY: 5 - 20 µmol/L; Valor de p ≤ 0,050 como significativo. **Fonte: produzida pela autora (2022).**

### 5.1.4 Avaliação da atividade plasmática da ADAMTS13

A atividade de ADAMTS13 plasmática foi avaliada em 73 RTR, sendo 663,80 (198,9) o valor da mediana (IQ) para a população total. Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas (IQ) de atividade de ADAMTS13 entre os grupos avaliados, conforme **FIGURA 8** [C1 = 646,40 ng/mL (247,4); C2 = 666,60 ng/mL (186,5); R1 = 663,80 ng/mL (149,1); R2 = 670,30 ng/mL (244,2); T1= 709,10 ng/mL (295,5); T2 = 663,8 ng/mL (168,1); T3 = 680,5 ng/mL (218,0) e T4 = ng/mL 632,2 (227,7)].

**Figura 8 - Atividade de ADAMTS13 em 73 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com a função de filtração renal, avaliada por meio da creatinina sérica e ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG), e tempo pós-transplante**



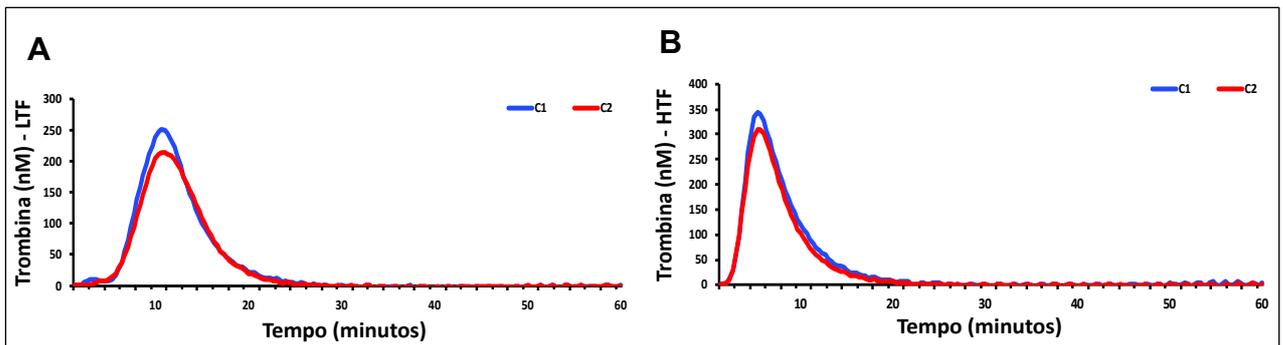
**Legenda:** A: grupos baseados nos níveis de creatinina sérica [C1:  $\leq 1,4$  mg/dL (n = 60) e C2:  $> 1,4$  mg/dL (n = 43)]; B: grupos baseados no ritmo de filtração glomerular estimado - eRFG [R1:  $\leq 60$  mL/min/1,73m<sup>2</sup> (n= 46) e R2:  $> 60$  mL/min/1,73m<sup>2</sup> (n= 57)]; C: grupos baseados no tempo pós-transplante [T1: 1 a 24 meses (n = 21), T2: 25 a 60 meses (n = 23), T3: 61 a 120 meses (n= 26) e T4: acima de 120 meses pós-transplante (n= 31)]. NS: não significativo; Valor de  $p \leq 0,050$  como significativo. **Fonte:** produzida pela autora (2022).

### 5.1.5 Avaliação da geração de trombina

As comparações entre os níveis medianos de trombina gerada entre os grupos, estratificados de acordo com a função de filtração renal (níveis de creatinina e eRFG) demonstraram uma maior geração de trombina, mensurada pelo parâmetro ETP, em ambas as concentrações de FT (LTF e HTF) entre os RTR com menores níveis de creatinina (grupo C1) em comparação aqueles com maiores níveis de creatinina sérica (grupo C2), com valores de  $p \leq 0,05$  para todas as análises. Não foram observadas

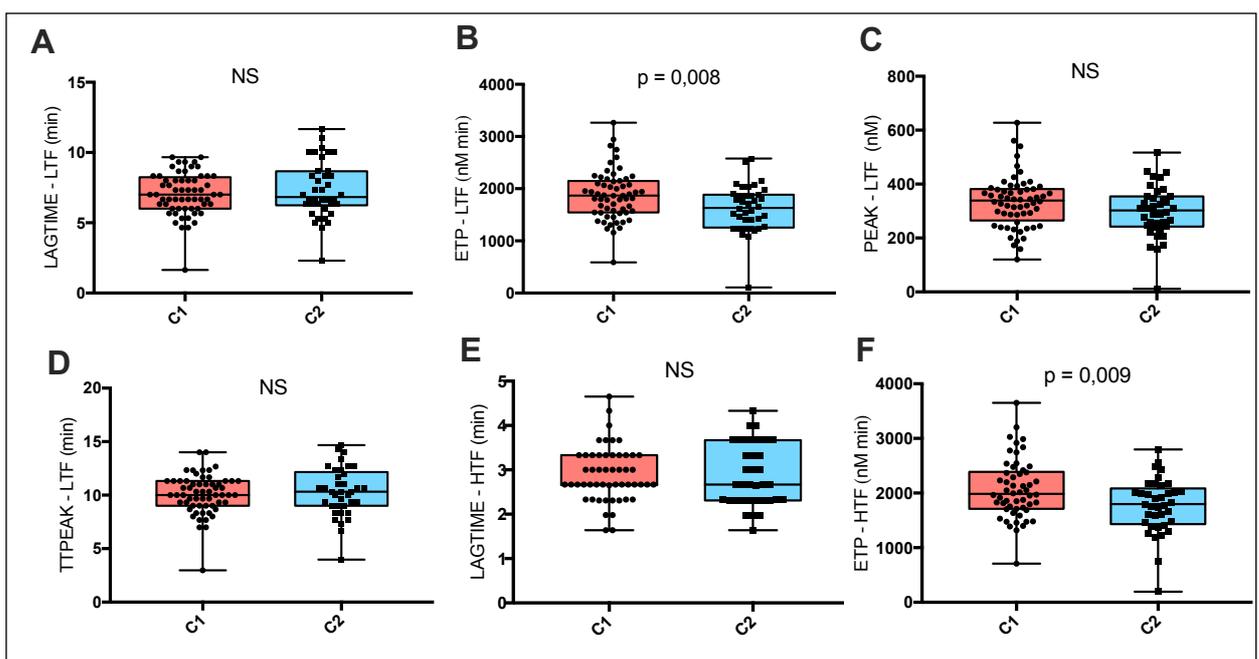
diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros LAGTIME e TTPEAK em ambas as concentrações de FT. As **FIGURAS 9 e 10** representam graficamente a curva de geração de trombina obtida para ambas as concentrações de FT e as comparações dos valores medianos (IQ) dos parâmetros de geração de trombina entre os grupos avaliados, de acordo com os níveis de creatinina (C1e C2).

**Figura 9 - Curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com os níveis de creatinina**

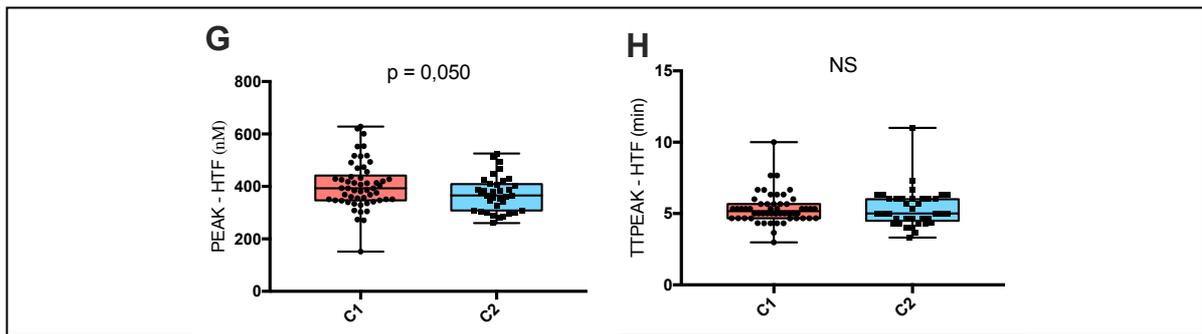


**Legenda:** A e B: grupos baseados em níveis de creatinina (C1:  $\leq 1.4$  mg/dL e C2:  $>1.4$  mg/dL) avaliados em (A) baixa concentração de fator tissular (*Low Tissue Factor – LTF*) e (B) alta concentração de fator tissular (*High Tissue Factor – HTF*). **Fonte:** produzida pela autora (2022).

**Figura 10 - Parâmetros da geração de trombina em 101 pacientes transplantado renais distribuídos em grupos de acordo com os níveis de creatinina**



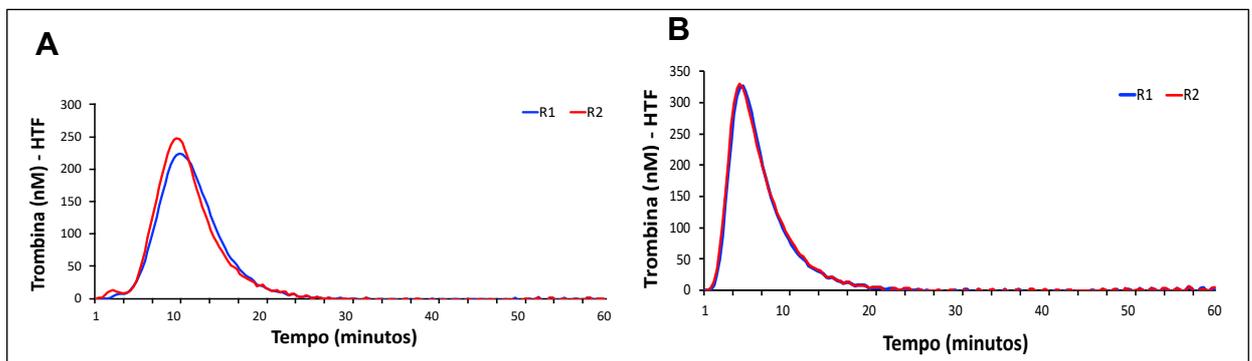
\continua



**Legenda:** Grupos baseados em níveis de creatinina (C1:  $\leq 1.4$  mg/dL e C2:  $>1.4$  mg/dL) avaliados em baixa concentração de fator tissular (*Low Tissue Factor* – LTF) e alta concentração de fator tissular (*High Tissue Factor* – HTF). A, B, C e D: LAGTIME, ETP, PEAK e TTPEAK, respectivamente, em baixa concentração de fator tissular (LTF). E, F, G e H: LAGTIME, ETP, PEAK e TTPEAK, respectivamente, em alta concentração de fator tissular (HTF). LAGTIME (tempo para início da geração de trombina); ETP (Potencial endógeno de trombina); PEAK (concentração máxima de trombina); TTPEAK (tempo para atingir a concentração máxima de trombina). C1: níveis de creatinina sérica  $< 1,4$  mg/dL; C2: níveis de creatinina sérica  $\geq 1,4$  mg/dL; NS: não significativo; valor de  $p \leq 0,050$  como significativo. **Fonte:** produzida pela autora (2022).

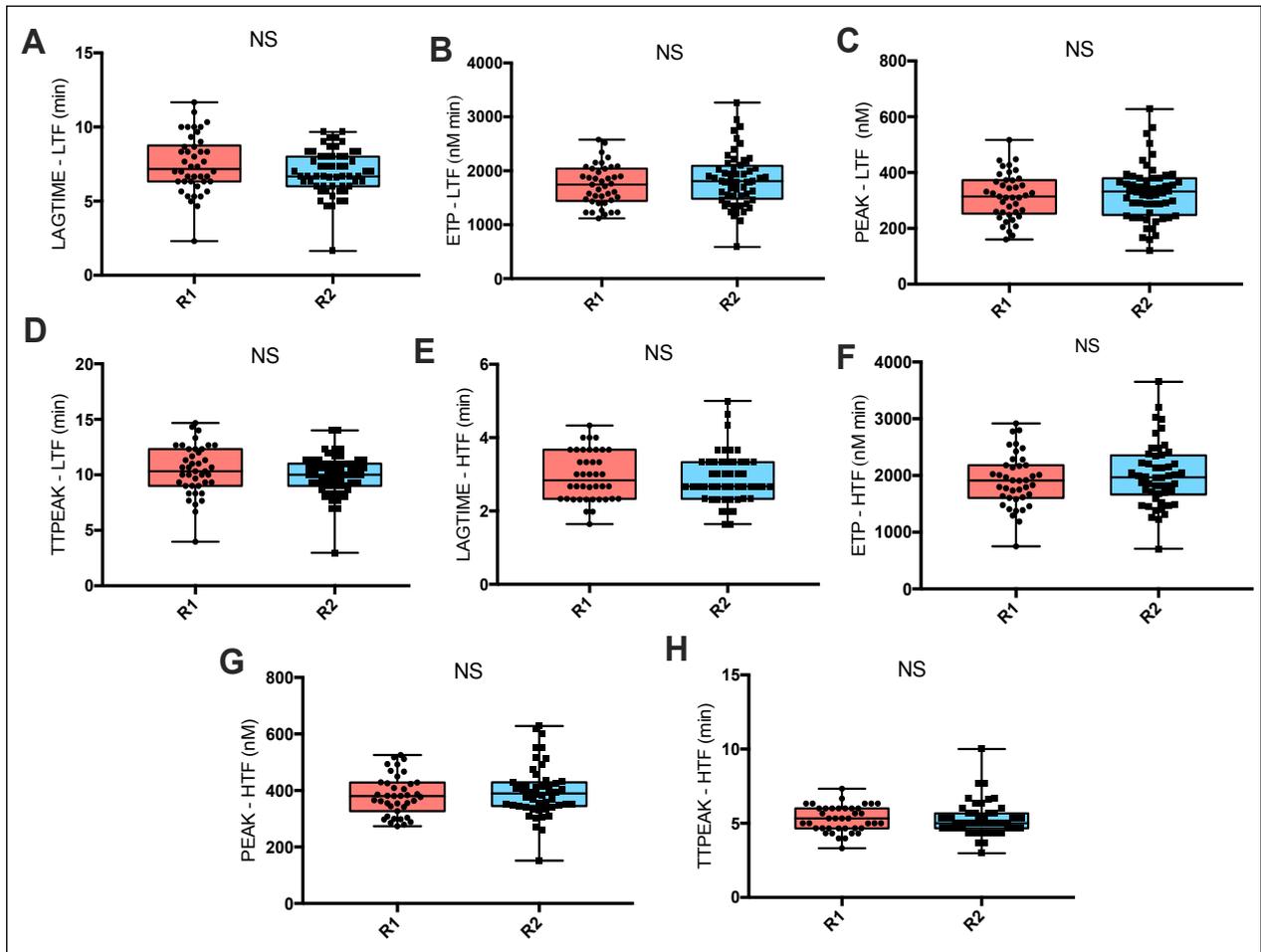
Não houve diferenças significativas entre os parâmetros da geração de trombina nos grupos estratificados de acordo com eRFG. As **Figuras 11 e 12** representam graficamente a curva de geração de trombina obtida para ambas as concentrações de FT e as comparações dos valores medianos (IQ) dos parâmetros de geração de trombina entre os grupos avaliados de acordo com o eRFG (R1 e R2).

**Figura 11 - Curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG)**



**Legenda:** A e B: grupos baseados no ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) (R1  $\leq 60$  mL/min/1,73m<sup>2</sup> e R2  $> 60$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>) avaliados em (A) baixa concentração de fator tissular (*Low Tissue Factor* – LTF) e (B) alta concentração de fator tissular (*High Tissue Factor* – HTF). **Fonte:** produzida pela autora (2022).

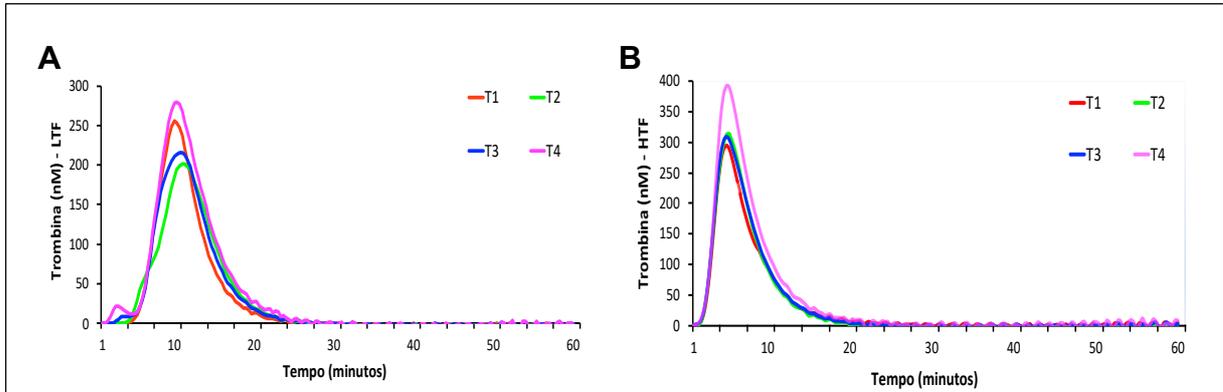
**Figura 12 - Parâmetros da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG)**



**Legenda:** Grupos baseados no ritmo de filtração glomerular estimado (R1:  $\leq 60$  mg/min/1,73m<sup>2</sup> e R2 > 60 mg/min/1,73m<sup>2</sup>) avaliados em baixa concentração de fator tissular (Low Tissue Factor – LTF) e alta concentração de fator tissular (High Tissue Factor – HTF). A, B, C e D: LAGTIME, ETP, PEAK e TTPEAK, respectivamente, em LTF. E, F, G e H: LAGTIME, ETP, PEAK e TTPEAK, respectivamente, em HTF. LAGTIME (tempo para início da geração de trombina); ETP (Potencial endógeno de trombina); PEAK (concentração máxima de trombina); TTPEAK (tempo para atingir a concentração máxima de trombina). R1: ritmo de filtração glomerular estimado  $\leq 60$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>; R2: ritmo de filtração glomerular estimado > 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>; NS: não significativo; valor de  $p \leq 0,050$  como significativo. **Fonte: produzida pela autora (2022).**

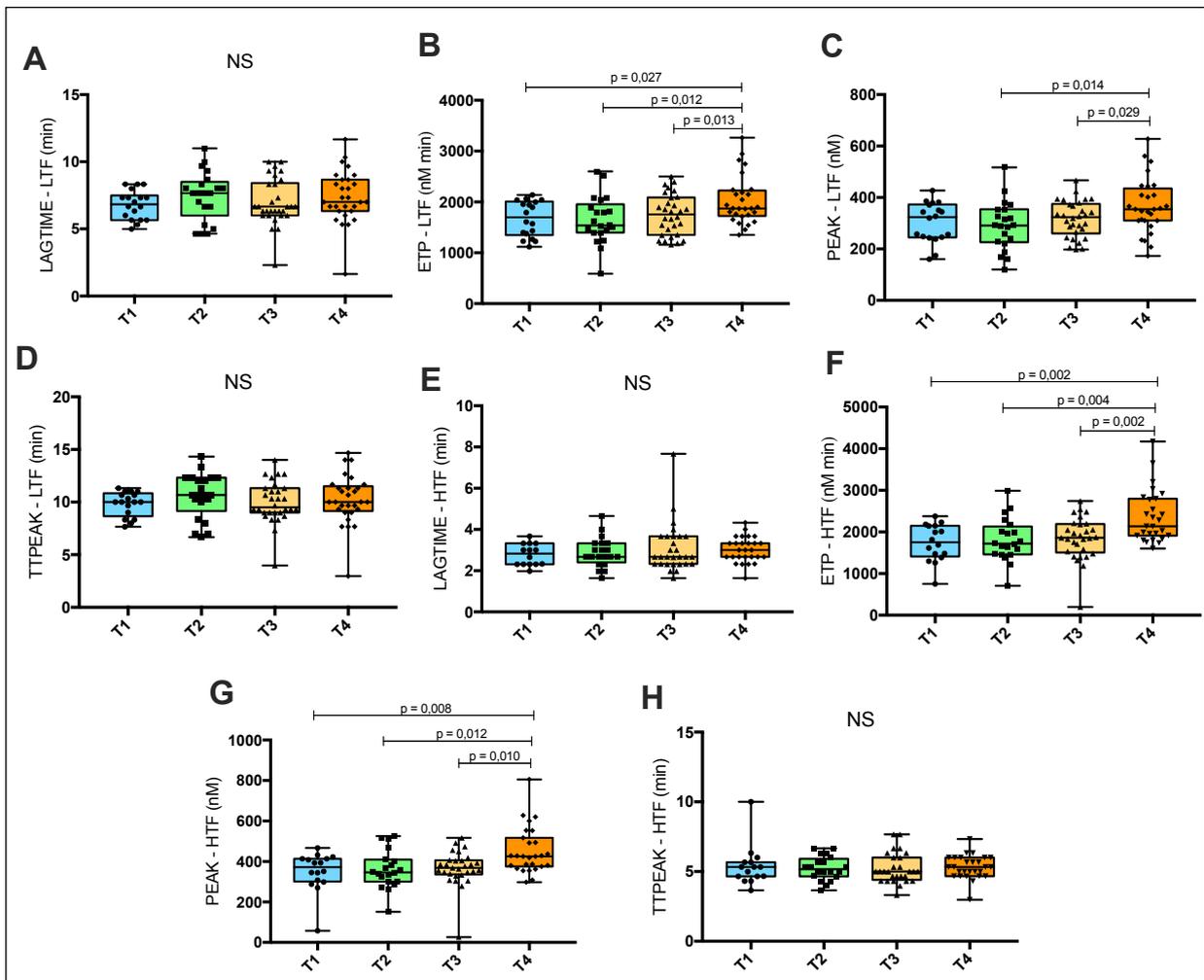
Em ambos os modelos realizados com diferentes concentrações de FT, foi observada maior geração de trombina (valores maiores de ETP e peak) entre os grupos com maiores tempos pós-transplante (T3 e T4) em comparação com os grupos com tempos pós-transplante recentes (T1 e T2), sendo todos os valores de  $p < 0,05$ . Nas **Figuras 13 e 14** estão representadas a curva de geração de trombina obtida para ambas as concentrações de FT e as comparações dos valores medianos (IQ) dos parâmetros de geração de trombina entre os grupos avaliados de acordo com o tempo pós-transplante (T1, T2, T3 e T4).

**Figura 13 - Parâmetros e curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós-transplante**



**Legenda:** A e B: grupos baseados no tempo pós-transplante (T1: 3 – 24 meses; T2: 25-60 meses; T3: 61-120 meses e T4: > 120 meses) avaliados em baixa concentração de fator tissular (*Low Tissue Factor* – LTF) e alta concentração de fator tissular (*High Tissue Factor* – HTF), respectivamente. **Fonte:** produzida pela autora (2022).

**Figura 14 - Parâmetros e curva da geração de trombina em 101 pacientes transplantados renais distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós-transplante**



**Legendas:** grupos baseados no tempo pós-transplante (T1: 3 – 24 meses; T2: 25-60 meses; T3: 61-120 meses e T4: > 120 meses) avaliados em baixa concentração de fator tissular (*Low Tissue Factor* – LTF) e alta concentração de fator tissular (*High Tissue Factor* – HTF). A, B, C e D: LAGTIME, ETP, PEAK e TTPEAK, respectivamente, em LTF. E, F, G e H: LAGTIME, ETP, PEAK e TTPEAK, respectivamente, em HTF. LAGTIME (tempo para início da geração de trombina); ETP (Potencial endógeno de trombina); PEAK (concentração máxima de trombina); TTPEAK (tempo para atingir a concentração máxima de trombina). T1: tempo pós-transplante entre 3 – 24 meses; T2: tempo pós-transplante entre 25-60 meses; T3: tempo pós-transplante entre 61-120 meses e T4: tempo pós-transplante > 120 meses; NS: não significativo; valor de  $p \leq 0,050$  como significativo. **Fonte: produzida pela autora (2022).**

### 5.1.6 Análise de correlação e regressão linear

As principais correlações encontradas no presente estudo estão representadas na **TABELA 2**. No entanto, podemos observar que todas as correlações encontradas foram fracas, como a correlação entre PEAK HTF vs triglicerídeos ( $r=0,469$ ;  $p= 0,000$ ) (MUKAKA, 2012).

**Tabela 2 - Correlação de Spearman entre os marcadores avaliados nos pacientes transplantados renais**

Parâmetros	Pacientes transplantados renais	
	r	*p
Endocan vs creatinina	0,315	0,005
Endocan vs eRFG	-0,317	0,005
ETP HTF vs tempo pós-transplante	0,312	0,003
ETP HTF vs triglicerídeos	0,322	0,007
ETP LTF vs tempo pós-transplante	0,304	0,002
Homocisteína vs triglicerídeos	0,374	0,001
PEAK HTF vs tempo pós-transplante	0,306	0,003
PEAK HTF vs triglicerídeos	0,469	0,000
PEAK LTF vs triglicerídeos	0,362	0,002

Legenda: eRFG: ritmo de filtração glomerular estimado; ETP: potencial endógeno de trombina; PEAK: concentração máxima de trombina; LTF: baixa concentração e fator tissular; HTF: alta concentração de fator tissular;  $p < 0,050$  como significativo. **Fonte: produzida pela autora (2022).**

A análise de regressão linear foi realizada para investigar a associação entre as variáveis clínicas e os níveis dos biomarcadores investigados. Através das análises de regressão linear foi possível observar que o tempo pós-transplante foi considerado uma variável independente para o aumento da geração de trombina avaliada pelo parâmetro ETP em ambas as concentrações de fator tissular [LTF: ODD = 0,25 (IC95% -0,02 – 3,77),  $p= 0,050$ ] e [HTF: ODD = 0,26 (IC95% 0,08 – 3,95),  $p= 0,040$ ].

A contagem de plaquetas, colesterol não-HDL e triglicerídeos também apresentam associação com a geração de trombina, porém apenas para os modelos univariados ( $p < 0,20$ ).

O modelo multivariado para a endocan (variável dependente) mostrou que o fator idade [ODD= 0,245 (IC95% 0,013 – 0,185),  $p = 0,025$ ] pode ser considerado como um fator influenciador para a elevação dos níveis da endocan.

Entre as variáveis clínicas e laboratoriais avaliadas, apenas os níveis de triglicerídeos apresentaram influência independente para a elevação de HCY no plasma [ODD = 0,375 (IC95% 0,028 – 0,103),  $p = 0,001$ ].

Não foram observadas associações significativas para o biomarcador ADAMTS13 na análise de regressão linear multivariada. A descrição dos modelos obtidos através da análise de regressão linear para os parâmetros avaliados se encontram na **TABELA 3**.

**Tabela 3 - Análise de regressão linear para os biomarcadores avaliados nos pacientes transplantados renais**

Variáveis dependentes		Variáveis independentes	ODD	IC 95%		p*
ETP – LTF	Modelo univariado ( $p \leq 0,200$ )	Tempo pós-transplante	0,36	1,32	4,14	<b>0,000</b>
		Hemoglobina	-0,14	-41,66	7,27	<b>0,160</b>
		Plaquetas	0,23	0,00	0,00	<b>0,020</b>
		Colesterol total	0,15	-1,16	5,57	<b>0,190</b>
		Triglicerídeos	0,20	-0,179	2,95	<b>0,080</b>
		Colesterol não-HDL	2,94	-0,714	-6,60	<b>0,110</b>
	Modelo multivariado ( $p \leq 0,050$ )	Tempo pós-transplante	0,25	-0,02	3,77	<b>0,050</b>
ETP - HTF	Modelo univariado ( $p \leq 0,200$ )	Tempo pós-transplante	0,38	1,55	4,78	<b>0,00</b>
		Plaquetas	0,16	-0,00	0,00	<b>0,15</b>
		Triglicerídeos	0,23	-0,04	3,92	<b>0,05</b>
	Modelo multivariado ( $p \leq 0,050$ )	Tempo pós-transplante	0,26	0,08	3,95	<b>0,041</b>
		Plaquetas	0,10	-0,00	0,00	0,402
Endocan	Modelo univariado ( $p \leq 0,200$ )	Triglicerídeos	0,20	-0,37	3,53	0,110
		eRFG	-0,295	-0,070	- 0,010	<b>0,009</b>
		Creatinina	0,432	1,135	3,235	<b>0,000</b>
		Tempo pós-transplante	0,005	-0,015	0,015	<b>0,044</b>
	Modelo multivariado ( $p \leq 0,050$ )	Úrèia	0,471	0,046	0,137	<b>0,000</b>
		Idade	0,245	0,013	0,185	<b>0,025</b>
Homocisteína	Modelo univariado ( $p \leq 0,200$ )	eRFG	-0,242	-0,154	-0,017	<b>0,014</b>
		creatinina	0,234	0,519	5,344	<b>0,018</b>
		Tempo pós-transplante	0,168	-0,005	0,062	<b>0,093</b>
		Colesterol não-HDL	0,238	0,001	0,147	<b>0,047</b>
		Triglicerídeos	0,343	0,021	0,097	<b>0,003</b>
		Plaquetas	0,157	0,000	0,000	<b>0,132</b>
	Modelo multivariado ( $p \leq 0,050$ )	Triglicerídeos	0,375	0,028	0,103	0,001
ADAMTS13	Modelo univariado ( $p \leq 0,200$ )	Idade	-0,213	-5,927	0,285	<b>0,074</b>
		Tempo pós-transplante	-0,224	-1,390	0,035	<b>0,062</b>
		Doador Falecido	-0,184	-137,580	17,120	<b>0,125</b>
		Colesterol total	0,189	-0,479	2,244	<b>0,199</b>
		Plaquetas	0,237	0,000	0,001	<b>0,060</b>
	Modelo multivariado ( $p \leq 0,050$ )	NS	NS	NS	NS	NS

**Legenda:** ETP: potencial endógeno de trombina; LTF: baixa concentração e fator tissular; HTF: alta concentração de fator tissular; IC: intervalo de confiança; ODD: *odds ratio*;  $p \leq 0,200$  e  $p \leq 0,050$  como significativos; NS: não significativo. **Fonte:** produzida pela autora.

## 5.2 Análise longitudinal prospectiva

### 5.2.1 Análise descritiva

A partir da data de inclusão no estudo, os pacientes transplantados renais foram acompanhados ao longo de 5 anos, por meio da consulta aos registros médicos. Foi possível a avaliação dos registros médicos de **110 RTR**. Seis prontuários estavam indisponíveis para consulta. É importante ressaltar que não foram possíveis as análises anuais para todos os participantes, o que gerou uma variação no número de participantes avaliados por ano de seguimento. Desta forma foram avaliados 81 RTR no primeiro ano, 86 no segundo ano, 84 no terceiro ano, 72 no quarto ano e 72 no quinto ano de seguimento. A variação no número de RTR avaliados durante os anos pode ser justificada por fatores como: a inconstância nos acompanhamentos clínicos ambulatoriais, uma vez que muitos pacientes não residem na região metropolitana de Belo Horizonte; má aderência ao tratamento e a atual situação pandêmica da COVID-19, que impossibilitou a presencialidade para a maioria dos atendimentos de retorno ambulatorial.

As principais complicações observadas dentre os participantes do estudo foram: Infecções (50); rejeição ao enxerto (31), neoplasias (18), doenças cardiovasculares (15) e distúrbios gastrointestinais (14). Três óbitos foram confirmados. Dois deles foram associados a causas extra renais (choque séptico pulmonar relacionado à infecção pelo SARS-COV-2 e choque séptico devido a complicações de câncer urotelial da bexiga), para um RTR não foi possível a obtenção da causa do óbito.

A rejeição celular foi a mais frequente (11), seguida da rejeição humoral (8). Para seis RTR não foi possível a identificação do tipo de rejeição por não conter dados sobre biópsia do enxerto renal ou outra descrição médica. Dez RTR perderam o enxerto renal e foram encaminhados para o setor de pré-transplante do HC ou para outra unidade de transplante renal. Destes, apenas um realizou a cirurgia de retransplante em 2018, porém o paciente perdeu o enxerto novamente em 2019.

Entre as neoplasias, o câncer de colo de útero (8), o carcinoma de pele não melanoma (4) e a miomatose uterina (4) foram os mais comuns.

As infecções mais comuns foram as respiratórias (21) e Infecção do trato urinário (13). A infecção por SARS-COV-2 foi a mais frequente (13) nos anos de 2020 e 2021. Todos estes pacientes que testaram positivo realizaram a testagem para a COVID-19 pelo método de RT-PCR. Dentre eles, apenas um apresentou complicações graves relacionadas à COVID-19 e foi à óbito.

A trombose venosa profunda (TVP) foi a complicação cardiovascular mais frequente, acometendo cinco RTR.

Não houveram diferenças significativas entre os anos para os dados laboratoriais analisados. Uma tabela descritiva foi elaborada contendo todos os achados clínicos e laboratoriais observados durante o seguimento e os principais dados laboratoriais (**APÊNDICE D**).

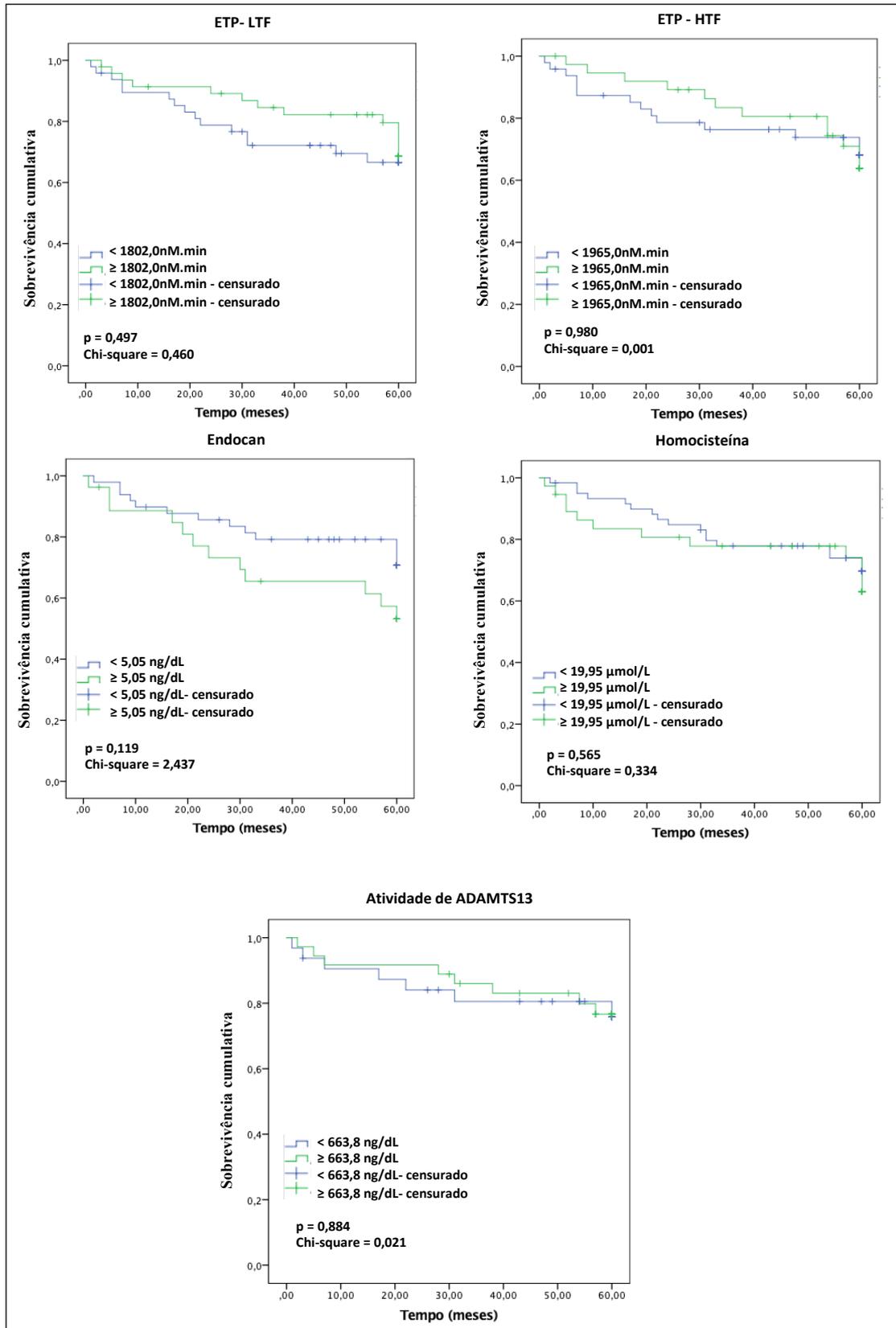
Com intuito de verificar se os marcadores hemostáticos e endoteliais avaliados no estudo transversal poderiam ter alguma influência sobre os eventos de rejeição ao enxerto, foi realizada a comparação das frequências de RTR com e sem rejeição para verificar se existia diferença entre os RTR que tinham maiores níveis e/ou alterações dos marcadores estudados.

### **5.2.2 Análise de sobrevivência (análise tempo-desfecho)**

Uma curva de Kaplan Meier foi construída para observação dos episódios de rejeição ao enxerto ao longo de 60 meses e sua associação com valores medianos dos biomarcadores avaliados na fase transversal (**FIGURA 15**).

Não houveram diferenças significativas entre as curvas de segundo o parâmetro ETP-LTF da geração de trombina ( $< 1802,00\text{nM}\cdot\text{min}$  e  $\geq 1802,00\text{nM}\cdot\text{min}$ ); ETP-HTF ( $< 1965,00\text{nM}\cdot\text{min}$  e  $\geq 1965,00\text{nM}\cdot\text{min}$ ); a atividade de ADAMTS13 ( $< 663,8\text{ng/mL}$  e  $\geq 663,8\text{ng/mL}$ ); os níveis plasmáticos da endocan ( $< 5,05\text{ng/mL}$  e  $\geq 5,05\text{ng/mL}$ ) e os níveis plasmáticos de homocisteína ( $< 19,95\mu\text{mol/L}$  e  $\leq 19,95\mu\text{mol/L}$ ).

**Figura 15 – Curvas de Kaplan Meier para os episódios de rejeição ao enxerto de acordo com os níveis de marcadores endoteliais e hemostáticos**



**Legenda:** ETP: potencial endógeno de trombina; LTF: baixa concentração e fator tissular; HTF: alta concentração de fator tissular. **Fonte:** produzida pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização clínica e demográfica dos pacientes receptores do enxerto renal

No presente estudo, não houve diferenças significativas entre os subgrupos para as variáveis presentes na **TABELA 1** (valor de p não informado na tabela). No entanto, apesar da ausência de significância, foi possível observar, por meio dos dados totais, maior prevalência de homens [66 (57,4%)], doadores falecidos [74 (64,3%)] e o uso do imunossupressor tacrolimus [73 (63,5%)] entre os RTR.

Estudos mostraram que, para o ano de 2014, a prevalência para o sexo masculino em diálise no Brasil foi de 58,0% e esses números se mantiveram mesmo após a realização do transplante renal (ABTO, 2016, 2017; SESSO et al., 2016). O predomínio do sexo masculino entre os receptores do enxerto renal é visto não apenas no Brasil, mas em outros países. Estudos mostraram que o sexo masculino está mais associado ao declínio da função renal, se comparado ao feminino, devido a características intrínsecas masculinas como tamanho do rim, influências hormonais, massa muscular e níveis de creatinina e maior incidência de fatores de risco clássicos como tabagismo, dislipidemia, obesidade e síndrome metabólica (ISEKI, 2008; SILBIGER; NEUGARTEN, 2008; COBO et al., 2016).

Desde o início da contabilização dos transplantes de órgãos sólidos no Brasil, a modalidade cirúrgica com doadores falecidos é a mais frequente, isso se dá devido a campanhas do Ministério da Saúde para a promoção da captação de órgãos e pelas comissões intra-hospitalares de captação e doação de órgãos (ABTO 2020, 2021). Mesmo sabendo que existem vantagens relacionadas à qualidade do enxerto proveniente do doador vivo sobre aqueles de doadores falecidos, a expectativa é de aumento na captação de órgãos provenientes de doadores falecidos. Além disso, espera-se algum risco para o doador vivo, variando de mínimos a altos, tanto a curto, médio quanto a longo prazo (ABTO, 2019).

Vários são os fatores que influenciam a sobrevida do receptor e do enxerto após o transplante renal, como o tipo de doador, a idade do receptor e do enxerto, a compatibilidade entre antígenos leucocitários humanos (HLA), o tipo de terapia imunossupressora, a doença de base pré-transplante, a presença de comorbidades e os hábitos de vida (KDIGO, 2003; ABTO, 2009; SESSO et al., 2016; MARTINS et al.,

2019). A escolha dos parâmetros apresentados na tabela de caracterização clínica e laboratorial (**TABELA 1**) se justificou devido à relevância já descrita. A não inclusão de algumas informações sobre hábitos de vida, como tabagismo, prática de exercícios físicos e ingestão de bebidas alcoólicas ocorreu devido aos dados incompletos nos registros médicos avaliados e/ou à ausência de autorrelato no momento de inclusão no estudo.

## **6.2 Avaliação transversal**

### **6.2.1 Marcadores endoteliais: endocan e homocisteína**

Ao avaliarmos os níveis plasmáticos de endocan, foram observadas concentrações elevadas entre os RTR com redução da função de filtração (altos níveis de creatinina e redução da taxa de filtração glomerular) e aqueles com o tempo pós-transplante mais recente.

Níveis elevados de endocan já foram associados a diversas condições clínicas, como neoplasias, desordens inflamatórias, sepse, HAS, DRC e rejeição ao enxerto (SCHERPEREEL et al., 2006; LI et al., 2012; AFSAR et al., 2014; KAO et al., 2014), sendo considerado um valioso biomarcador para o prognóstico destas alterações. Outros estudos corroboram com os nossos achados ao observarem a elevação dos níveis de endocan com a redução da função renal. O estudo de Yilmaz e colaboradores (2014), por exemplo, avaliou os níveis de endocan entre pacientes com DRC e observaram correlação negativa entre endocan e o eRFG. Os autores afirmaram ainda que os níveis de endocan se correlacionaram de forma independente com o aumento da mortalidade por todas as causas e com os eventos cardiovasculares entre os pacientes com DRC avaliados.

Em 2012, o estudo de Li e colaboradores foi o primeiro a defender o emprego da avaliação dos níveis de endocan na prática clínica, como um potencial biomarcador da disfunção do enxerto renal e da rejeição aguda. Uma vez que o endocan reflete a lesão sofrida pelas células endoteliais glomerulares do enxerto renal, sendo a origem da elevação da endocan plasmática, sua dosagem laboratorial seria de fato útil como um biomarcador com alta sensibilidade e especificidade após o transplante renal.

Além destes, outros estudos reforçaram a associação de altos níveis de endocan com a redução da função renal (LEE et al., 2014; SU et al., 2014; SOUZA et al., 2016; BAO et al., 2018; Mc MILLAN et al., 2018; RAPIS et al. 2018). Malyszko e colaboradores (2018) avaliaram os níveis dos marcadores da disfunção endotelial (endocan, FvW, *Intercellular Adhesion Molecule 1* - ICAM, *vascular cell adhesion molecule 1* - VCAM) e marcadores inflamatórios (Proteína C reativa ultrasensível – usPCR e IL-6) de acordo com a função renal entre pacientes transplantados renais. Os níveis de endocan neste estudo se correlacionaram negativamente com o eRFG e o tempo pós-transplante e positivamente com os níveis de creatinina, IL-6, FvW e usPCR. Os autores concluíram ainda que existe um potencial papel do endocan como biomarcador pós-transplante renal devido à sua correlação com a redução da função do enxerto e inflamação. Estas poderiam estar associadas ao dano endotelial inicial dos processos de rejeição, à presença de infecção/ inflamação e à hipertensão.

É importante salientar que outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa avaliam, paralelamente, biomarcadores inflamatórios neste mesmo grupo de pacientes, o que nos permitirá uma avaliação completa e conjunta no futuro.

Com o avançar do tempo pós-transplante espera-se o agravamento da disfunção endotelial, devido a ação de múltiplos fatores, tais como o próprio envelhecimento do enxerto e do receptor, o uso prolongado de imunossupressores e outras drogas e a presença de comorbidades (SOUZA et al., 2016).

Não há relatos na literatura que discutam a relação endocan *versus* tempo pós-transplante, o que reforça a importância dos achados no presente estudo e a necessidade de outras pesquisas envolvendo a endocan no pós-transplante renal. Desta forma, sugerimos a hipótese de que a elevação da endocan entre os RTR com transplante renal mais recente esteja relacionada à disfunção endotelial promovida tanto pelo ato cirúrgico como pela terapia imunossupressora de indução e/ou de manutenção instaladas neste período.

Os primeiros anos pós-transplante necessitam de uma terapia imunossupressora mais intensa devido à exacerbação da resposta inflamatória contra os aloantígenos, o que promove lesão/ativação das células endoteliais e grande reparação tecidual, podendo configurar uma progressiva substituição do tecido renal por tecido fibroso, presente na disfunção e rejeição ao enxerto (SU et al., 2014).

Em condições fisiológicas a endocan é dificilmente filtrada pelos glomérulos renais devido ao seu peso molecular (50KDa) e sua carga negativa, sendo pouco ou

não encontrada na urina de voluntários saudáveis (LEE et al., 2016). Assim, sua detecção na urina pode se correlacionar ao dano glomerular renal, como na nefropatia por IgA avaliada por LEE e colaboradores (2016), os quais demonstraram altos níveis de endocan tanto no plasma como na urina dos pacientes com DRC. Assim, a elevação dos níveis de endocan pode estar relacionada tanto ao aumento da sua secreção, devido à lesão endotelial, quanto à redução do clearance renal. Pesquisas relacionadas aos mecanismos de depuração de endocan por via renal ainda são escassos e configuram uma perspectiva de estudo, o que poderá contribuir para o esclarecimento do seu real papel como biomarcador da lesão glomerular na DRC e no pós-transplante renal (FREITAS et al., 2013).

No presente estudo, a HHCY foi observada entre os pacientes com redução da função renal, avaliada por meio da creatinina plasmática e do eRFG. A relação entre HCY e a função renal vem sendo foco de pesquisas ao longo das últimas décadas e vários estudos corroboram com os nossos achados (BOSTON et al., 1995; VAN GULDENER et al., 2001; PIOVESAN et al., 2007; FARSETTI et al., 2010; EINOLLAHI et al., 2011; HAMATANI et al., 2013; KANG et al., 2015; PERNA; INGROSSO, 2015; MONFARED et al., 2016; SCOTT et al., 2017; HUANG et al., 2019; KAYA et al., 2019; VAL et al., 2019).

Os estudos de Fella et al. (2003) e Einollahi et al. (2011) demonstram a inversa correlação entre HHCY e eRFG, com níveis 2 a 3 vezes maiores se comparado ao grupo de indivíduos saudáveis. O parênquima renal é considerado um importante sítio para o metabolismo da HCY (BOSTON et al., 1995). A HHCY ocasiona estresse oxidativo e promove um estado de vasoconstrição, por antagonizar a ação do óxido nítrico, por meio da formação de S-nitroso homocisteína, favorecendo a disfunção endotelial e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. A HHCY pode ainda estimular diretamente a síntese de colágeno, reduzindo a elasticidade vascular e provocando o aumento da proliferação de células do músculo liso, o que culminaria em múltiplas interações com fatores pró-coagulantes, plaquetas e lipídeos circulantes, com papel importante no desenvolvimento da aterosclerose (STAMLER et al., 1993; SEN et al., 2010; LI et al., 2002).

As lesões provocadas nas células endoteliais devido à elevação dos níveis de HCY compartilham dos mesmos mecanismos celulares patológicos presentes na DRC, capazes de promover danos cardiovasculares. Assim, a HHCY pode contribuir para o agravamento da lesão renal, bem como para o seu aparecimento. No entanto,

não podemos deixar de destacar que a baixa depuração renal pode levar ao acúmulo de HCY no plasma, resultando na elevação dos seus níveis circulantes (CIANCIOLO et al., 2017; CAPELLI et al., 2019).

Em relação às análises envolvendo os grupos estratificados de acordo com o tempo pós-transplante, nenhuma diferença significativa foi encontrada ao avaliar os níveis de HCY. No entanto, a análise de regressão linear mostrou que o tempo pós-transplante apresenta um grau de associação com os níveis deste aminoácido, porém apenas para o modelo univariado. Não há relatos na literatura que discutam esses achados. Sabe-se que no pós-transplante as combinações de vários fatores desencadeiam respostas imunológicas, estado pró-trombótico e perturbação do metabolismo que elevam o risco cardiovascular (CIANCIOLO et al., 2017). Tais fatores poderiam influenciar os níveis de HCY, mas a real influência do tempo pós-transplante nos níveis de HCY merece ser foco de estudos futuros.

No presente estudo, níveis de HCY se correlacionaram positivamente com o colesterol não-HDL e os triglicerídeos, porém com fraca intensidade. Com o emprego da análise de regressão linear múltipla, para confirmar o efeito das variáveis clínicas sobre os níveis de HCY, foi possível verificar que apenas os triglicerídeos possuem associação independente para a sua elevação.

A relação entre HCY e dislipidemia já foi relatada em outros estudos (PIOVESAN et al., 2007; SAOJI et al., 2018). Ambos são considerados como fatores preditores para o surgimento de eventos cardiovasculares e para o desequilíbrio mineral e ósseo, por desencadearem uma resposta inflamatória, disfunção endotelial e perda óssea por elevação da atividade de osteoclastos (SAOJI et al., 2018).

Em nosso grupo de pesquisa, a avaliação de biomarcadores do metabolismo mineral e ósseo associados a estes outros investigados no presente estudo também se encontra em andamento.

A hipertrigliceridemia é considerada um fator independente para a ocorrência de eventos coronarianos, sendo um achado comum entre os RTR (SAOJI et al., 2018). Similarmente aos nossos achados, Piovesan e colaboradores (2007) relataram que os RTR com HHCY apresentavam elevados níveis de triglicerídeos e estes demonstraram ainda uma tendência à elevação do colesterol LDL. Em seu modelo de regressão linear múltipla, estes pesquisadores observaram que o colesterol total e a função do enxerto, avaliada através do eRFG, foram fatores preditores para a elevação da HCY.

Em concordância com o estudo de Piovesan e colaboradores (2007), Einollahi e colaboradores (2011) concluíram que a função renal tem um papel mais significativo para a predição de HHCY.

### **6.2.2 Marcadores da hemostasia: atividade de ADAMTS13 e teste de geração de trombina**

O equilíbrio hemostático é essencial para um bom funcionamento do enxerto renal após o transplante e a presença de fatores pró-trombóticos pode induzir a formação de microtrombos e ocasionar lesões por isquemia/reperfusão em múltiplos órgãos, principalmente rins e cérebro (BARBOUR et al., 2012).

Em estudo prévio publicado pela autora do presente trabalho foi avaliado a relação dos níveis de FvW com a função renal, no mesmo grupo de pacientes incluídos no presente estudo. Foi observado que a redução da função renal cursa com elevados níveis de FvW (MARTINS et al., 2019). Uma possível hipótese para a elevação de FvW estava relacionada à ausência ou baixa atividade da enzima ADAMTS13 entre os RTR com pior função renal e, desta forma, esta avaliação foi incluída no trabalho posterior. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas para os resultados de atividade de ADAMTS13 entre os grupos de RTR avaliados no presente estudo. Apenas foram observadas correlações fracas entre ADAMTS13 e contagem de plaquetas (correlação positiva) e ADAMTS13 e idade dos pacientes (correlação negativa). Para os ensaios de regressão linear múltipla, nenhum modelo associativo foi significativo para a avaliação de ADAMTS13.

O emprego da ADAMTS13 como um possível biomarcador após o transplante renal vem sendo avaliado pelo nosso grupo de estudo há algum tempo e, similarmente, não foram observadas diferenças significativas para os níveis de ADAMTS13 (antígeno) em 159 pacientes transplantados renais avaliados por Mota e colaboradores (2015).

Mesmo com resultados não associados com a função renal após o transplante, o papel da ADAMTS13 ainda merece atenção, vista a sua relevância em processos patológicos que favorecem e podem causar a rejeição ao enxerto renal, como a microangiopatia trombótica, PTT, SHU e SHUA (PHAM et al., 2002; BARBOUR et al., 2012; WEBSTER, SCHNITZLER; 2014; BERGER, 2018; PLAUTZ et al., 2018;

MANCINI et al., 2019; OH et al., 2019). Além disso, existem outros estudos com associações positivas entre os níveis de ADAMTS13 e a redução da função renal, uma vez que a presença de ADAMTS13 já foi detectada na urina de pacientes com lesão renal tubular, não sendo encontrada em pacientes saudáveis (ZHENG et al., 2001; MALYSZKI et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2013).

O estudo de Rios e colaboradores (2011), ao avaliar níveis de ADAMTS13 em quatro pacientes com DRCT pré e pós-transplante renal, observou maiores níveis da enzima na fase pré-transplante com redução significativa após o transplante renal e os autores defenderam a hipótese de que os rins apresentam um papel importante, tanto na síntese quanto no metabolismo da ADAMTS13. Fatores limitantes do presente estudo podem ter contribuído para a ausência de associação deste biomarcador à função renal avaliada.

Um outro fator intrínseco relativo à elevação do risco pró-trombótico está relacionado ao sistema ABO dos grupos sanguíneos. Os portadores do fenótipo não-O (grupos A, B e AB) podem apresentar maior risco de desenvolvimento dos eventos pró-coagulantes em relação àqueles com fenótipo O (grupo O). Já foi relatado que a proteólise do FvW entre os grupos não-O ocorre de maneira mais lenta se comparada a de portadores do grupo O. Além disso, a presença do fenótipo Bombay (falso O) pode estar associada a baixos níveis e atividade de ADAMTS13, devido ao aumento da sua susceptibilidade à proteólise (TURNER et al., 2006; RIOS et al., 2012A). Devido à relevância clínica desta associação, a avaliação dos níveis de FvW, a atividade de ADAMTS13 e sua relação com a geração de trombina no pós-transplante renal, em função da classificação ABO, configura uma perspectiva de estudo.

Sabe-se que a ADAMTS13 pode ser sintetizada por múltiplas células, tais como hepatócitos, células endoteliais, plaquetas e células glomerulares, tubulares e epiteliais renais (TURNER et al., 2006; MANEA et al., 2009). No presente estudo foi observada uma correlação positiva entre a atividade de ADAMTS13 e a contagem de plaquetas, o que pode ser justificado devido à relação direta com a sua produção por esses fragmentos celulares. Observamos também correlação negativa entre a atividade da ADAMTS13 e a idade dos pacientes. A comparação da atividade da ADAMTS13 em grupos de RTR de acordo com o tempo pós-transplante não apresentou dados significativos, porém podemos observar uma tendência nos resultados encontrados, onde os RTR com maior tempo pós-transplante (grupo T4) apresentaram menor atividade de ADAMTS13 que os RTR recentes (grupo T1).

O envelhecimento está associado à redução de múltiplas funções teciduais, comprometimento da elasticidade vascular e maior produção de radicais livres, o que pode agravar a disfunção endotelial, principalmente quando associado a comorbidades como dislipidemia, DM e HAS (UNGVARI et al., 2020). Deste modo, o envelhecimento pode ocasionar a redução da expressão gênica da ADAMTS13 e consequentemente, redução da sua atividade plasmática. Com o passar do tempo pós-transplante, o envelhecimento do receptor e do enxerto pode afetar os níveis circulantes de ADAMTS13, como visto em nossa análise de regressão linear simples. Entretanto, os nossos dados acerca do papel da idade e do tempo pós-transplante sobre os níveis de ADAMTS13 foram modelos fracos, sendo necessários estudos mais robustos para melhor compreensão desta relação.

A avaliação laboratorial da ADAMTS13 permanece como objetivo de estudo em nosso grupo de pesquisa e sua nova avaliação ocorrerá em uma população distinta de RTR, com mensuração tanto dos níveis proteicos (antígeno de ADAMTS13), bem como da avaliação da atividade enzimática e expressão gênica.

A avaliação da geração de trombina pelo método de CAT mostrou que os RTR do grupo C2 (pior função renal) apresentaram níveis mais baixos de trombina gerada (menor valor de ETP e PEAK) em comparação ao grupo C1, em ambas as concentrações de FT (LTF e HTF). No entanto, não foram observadas diferenças para os parâmetros da curva de geração de trombina entre os grupos estratificados de acordo com o eRFG (R1 e R2).

A ocorrência de eventos hemorrágicos em pacientes com DRC tem origem multifatorial. Alterações intrínsecas da coagulação, associadas à fisiopatologia da doença renal e ao uso frequente de terapia anticoagulante e/ou antiagregante plaquetária podem ser causas frequentes destes eventos hipocoaguláveis. Estes distúrbios podem permanecer, mesmo após o transplante renal bem-sucedido (GANGJI et al., 2006; PAVORD; MYERS, 2011; LUTZ et al., 2014; PARAJULI et al., 2016; POLI, D; ANTONUCCI, E; ZANAZZI, M, 2017; GACKLER et al., 2019). Dentre os participantes avaliados pelo TGT (101), apenas 12 (11,8%) utilizavam terapia anticoagulante complementar e 7 (6,93%) destes faziam parte do grupo C2.

A presença de trombocitopenia e anemia também podem favorecer a ocorrência de complicações hemorrágicas nos pacientes com redução da função renal (GANGJI et al., 2006; PAVORD; MYERS, 2011; POLI, D; ANTONUCCI, E; ZANAZZI, M, 2017). É importante ressaltar que o grupo C2 apresentou tais alterações (dados

não significativos) se comparado aos RTR com melhor função de filtração renal (grupo C1), o que pode ter influenciado nos menores valores de trombina gerada neste grupo.

Sabe-se que a redução da filtração renal cursa com a elevação de creatinina e ureia plasmática e tais elevações já foram associadas a ocorrência de disfunções plaquetárias, tais como a adesão prejudicada ao subendotélio, alteração na formação da rede estrutural, além de redução na secreção granular. A redução da função renal com uremia pode promover, ainda, a elevação dos níveis de NO e prostaciclina, importantes inibidores da ativação plaquetária (PAVORD; MYERS, 2011; GANGJI et al., 2006).

Já foi descrito também que a redução do hematócrito provoca uma alteração na circulação plaquetária, tornando-a mais direcionada ao centro do lúmen vascular. Isto pode prejudicar a interação das plaquetas com o subendotélio vascular. Além disso, a agregação plaquetária pode ser prejudicada em consequência da menor disponibilidade de ADP e tromboxano A2 produzidos pelas hemácias. Níveis elevados de NO também podem ser encontrados em quadros anêmicos, devido ao importante papel das hemoglobinas como depuradoras do NO, intensificando a inibição da ativação plaquetária (ZUPAN et al., 2003; GANGJI et al., 2006; PAVORD; MYERS, 2011).

Além dos eventos hemorrágicos, os pacientes com DRC, principalmente os RTR, também podem apresentar elevado risco de ocorrência de episódios trombóticos, principalmente devido ao aumento dos níveis de biomarcadores pró-inflamatórios, à disfunção endotelial, terapia imunossupressora e comorbidades ao longo do tempo (GANGJI et al., 2006; PAVORD; MYERS, 2011; LUTZ et al., 2014; POLI, D; ANTONUCCI, E; ZANAZZI, M, 2017; PARAJULI et al., 2016; GACKLER et al., 2019). Desta forma, os pacientes com DRC apresentam um risco de desenvolverem eventos tanto hipocoaguláveis quanto hipercoaguláveis, sinalizando um fator complicador para o manejo de terapias hemostáticas profiláticas nessa população.

A exacerbação da disfunção endotelial eleva os níveis plasmáticos de fatores da coagulação, como fator tecidual e XII, além de outros fatores procoagulantes. Mesmo com a implementação de protocolos imunossupressores, o estado pró-inflamatório parece ser contínuo e se correlaciona com a ativação endotelial e a liberação concomitante de componentes endoteliais, como o FvW, PAI-1, altos níveis de fibrinogênio, fator plaquetário 4 (PF4), proteína C reativa (PCR) e interleucina 6 (IL-

6), que contribuem para o estado hipercoagulável e a permanência do coágulo de fibrina (IRISH et al., 1997; SEGARRA et al., 2001; KAZORY et al., 2004; MAŁYSZKO et al., 2004; PAVORD; MYERS, 2011; NIEUWENHUIJS-MOEKE et al., 2018). A avaliação de marcadores pró-inflamatórios e sua relação com o perfil hemostático dos RTR avaliados pelo TGT configura uma perspectiva de estudo.

No presente estudo, os RTR com maior tempo pós-transplante tinham maiores níveis de trombina em comparação aos RTR com tempo recente de transplantação, sinalizando que um perfil hipercoagulável pode estar associado ao envelhecimento do aloenxerto renal. As análises de correlação e regressão reforçam essa suposição, uma vez que foram observadas correlações positivas entre tempo pós-transplante *versus* ETP, bem como o seu papel na associação para elevação dos níveis de trombina avaliados por meio do ensaio de regressão linear múltipla.

A presença de DCV afeta diretamente a sobrevida dos pacientes e do enxerto a longo prazo (RANGASWAMI et al., 2019). Hipertensão e diabetes são as principais comorbidades entre os RTR no Brasil e, muitas vezes, configuram-se como doenças de base da DRC (SESSO et al., 2016). No presente estudo, 70% dos RTR apresentavam pelo menos uma dessas comorbidades e foram distribuídos igualmente entre os grupos, de acordo com o tempo. Por outro lado, a dislipidemia foi mais prevalente entre os RTR com maior tempo pós-transplante, o que pode ter contribuído para o potencial perfil pró-trombótico nestes pacientes.

A HAS, o DM e a dislipidemia favorecem a intensificação da disfunção endotelial e *shear stress*, causando uma maior liberação de moléculas de adesão (P-selectina e E-selectina) e liberação de micropartículas endoteliais, favorecendo ainda mais um quadro pró-trombótico (PAVORD; MYERS, 2011).

A dislipidemia está associada ainda à progressão da lesão renal, acelerando processos que contribuem para a glomerulosclerose (RAHMAN et al., 2014) e para o risco de complicações trombóticas quase quatro vezes maior do que entre indivíduos normolipêmicos (GARCIA RASO et al., 2014). Principalmente quando esta dislipidemia está associada à elevação de lipoproteína a (Lp-a), por favorecer a permanência do coágulo, devido a sua competição por sítios semelhantes com o plasminogênio (ANGLÉS-CANO et al., 2001).

O declínio das propriedades antitrombóticas das células endoteliais vasculares pode estar associado à diminuição dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) (WOODWARD et al., 1997) e aos níveis mais elevados de lipoproteína de baixa

densidade (LDL). Estas alterações lipídicas afetam diretamente a função do enxerto renal, além de promoverem o agravamento da disfunção endotelial e a progressão da aterosclerose. Tais distúrbios lipídicos podem ocasionar o acúmulo de depósitos intraglomerulares de lipoproteínas que, ao sofrerem oxidação, ativam vias inflamatórias locais com consequente elevação da expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Isto pode favorecer a migração leucocitária intraglomerular, produzindo alterações no parênquima glomerular, alterações em células mesangiais e endoteliais vasculares renais (OMRAN; AL-DADAH; DELLSPERGER, 2013; PERES, BETTIN; 2015).

O desenvolvimento de um quadro pró-inflamatório devido às dislipidemias intensificam a ativação plaquetária local e a expressão de FT nas células endoteliais lesadas, além de inibir o inibidor da via do fator tissular, promovendo a sustentação de um perfil hipercoagulável (MALYSZKO et al., 2003; SOFI et al., 2007).

No presente estudo, as análises de correlação e regressão linear também reforçam essa suposição, uma vez que foram observadas correlações positivas entre triglicerídeos, colesterol total, colesterol não-HDL *versus* ETP; embora sejam associações fracas. Dentro deste contexto, a presença de comorbidades e a influência das terapias farmacológicas no perfil hemostático dos RTR configuram uma perspectiva de estudo.

O estado de hipercoagulabilidade no paciente pós-transplante renal pode ainda ocorrer de modo localizado, restrito apenas aos vasos sanguíneos do aloenxerto renal (TORRY et al., 1994; PAVORD; MYERS, 2011). A biópsia do aloenxerto em pacientes com declínio da função renal, apresentou níveis locais reduzidos de antitrombina, trombomodulina e do t-PA, indicando um perfil protrombótico restrito (WANG et al., 1994). Deste modo, avaliações dos resultados de biópsias do aloenxerto renal, associados ao TGT poderiam contribuir para a melhor elucidação dos diferentes perfis hemostáticos que os RTR podem apresentar e constituem uma perspectiva de estudo.

### **6.3 Avaliação longitudinal prospectiva: Análise descritiva e de sobrevivência (tempo – desfecho)**

Por meio da consulta aos prontuários médicos, os RTR foram avaliados por um período de 5 anos. Como visto na tabela presente no **APÊNDICE D**, as complicações mais frequentes foram infecções, rejeição ao enxerto, neoplasias, eventos cardiovasculares e gastrointestinais. Nossos dados corroboram com aqueles encontrados na literatura (TIZO; MACEDO, 2015; HOLLYER; ISON, 2018).

O aparecimento de complicações após o transplante renal pode estar associado a influências de fatores pré-transplante, como a fisiopatologia da doença de base, o estado pró-inflamatório intenso, a polifarmácia, a disfunção endotelial e o tratamento dialítico. Entre os principais fatores influenciadores após o transplante, estão o próprio ato cirúrgico, alterações anatômicas do sistema urogenital e uso dos medicamentos imunossupressores, que são essenciais para a manutenção do enxerto, porém, seu uso prolongado pode causar ou favorecer o surgimento de complicações, como infecções oportunistas, distúrbios gastrointestinais e neoplasias (MENON, MURPHY; 2013; TIZO; MACEDO, 2015; LIM; KOHLI; BLOOM, 2017;),

Segundo Hollyer e Ison (2018), dentre as complicações mais frequentes, as infecções do trato urinário (ITU) são as mais comuns, podendo ser a bacteriúria assintomática ou sintomática. A progressão da ITU pode evoluir para sepse, rejeição celular aguda, disfunção crônica, perda do enxerto e morte. Os autores ainda relataram que a prevalência deste tipo de infecção é muito variada, podendo ser de 7% a 80% entre os RTR. Dois estudos realizados com coorte de RTR brasileiros entre 2000 a 2001 (DANTAS et al., 2006) e 2010 (CAMARGO et al., 2014), mostraram altas taxas de ITU, sendo 45% e 34% respectivamente.

O estudo de Saad e colaboradores (2020), ao avaliar 375 RTR em coorte retrospectiva, mostrou que as infecções do tipo ITU foram as mais frequentes, seguidas por infecções pelo citomegalovírus (CMV). Estes dados corroboram, em parte, com corrente estudo, uma vez que apenas um episódio de infecção por CMV foi relatado. É importante salientar que o tratamento profilático para CMV pode ser empregado e/ou pode haver subnotificação dos casos nos prontuários avaliados.

Outras infecções comuns entre os RTR são as infecções respiratórias. Os fatores que podem contribuir para a ocorrência deste tipo de infecção são, segundo Zeyneloglu (2015), presença de comorbidades como a DM e a redução da função renal, necessidade de transfusão, tempo de diálise pré-transplante, infecções latentes remotas do receptor e/ou doador e exposições nosocomiais recentes. Neste contexto, não podemos deixar de destacar a influência da pandemia do SARS-COV-2 e a sua

prevalência entre os RTR. No presente estudo 13 RTR foram diagnosticados com COVID-19, sendo que um foi a óbito devido à choque séptico pulmonar. Pacientes imunossuprimidos são considerados pacientes de risco para o agravamento da COVID-19 e RTR hospitalizados, devido à infecção por SARS-COV-2, apresentam altas taxas de mortalidade, variando entre 20 e 30% (MARTINS; ALVES et al., 2021).

O estudo de Zhu e colaboradores (2020) avaliou 10 RTR com pneumonia por SARS-COV-2 e 10 RTR com pneumonia não associada ao SARS-COV-2 (grupo controle). Eles observaram que os RTR com COVID-19 tiveram mais complicações, se comparados aos RTR do grupo controle e um RTR desenvolveu rejeição aguda e evoluiu para óbito, devido à insuficiência respiratória progressiva. Assim, estratégias terapêuticas para a contenção da infecção e das complicações geradas por ela são um desafio nesta população. Uma avaliação descritiva mais robusta sobre a influência da COVID-19 nestes RTR é mais uma perspectiva de estudo do nosso grupo de trabalho.

É importante ressaltar que a pandemia da COVID-19 também impactou diretamente na consulta aos registros médicos, uma vez que, por medidas de restrições e distanciamento social, os RTR tiveram alterações em seus protocolos de atendimento e realização de exames laboratoriais. Durante os anos de 2020 e 2021, muitos RTR foram acompanhados por consultas virtuais, o que gerou lacunas nos registros médicos físicos.

Os RTR apresentam maior risco de ocorrência de neoplasias, se comparados à população geral e estas podem ser associadas como uma das principais causas de óbito nesta população (MANICKAVASAGAR; THURASINGHAM, 2020). Manickavasagar e Thuraisingham (2020) relataram que este fato se dá pela ação dos imunossupressores, que afetam diretamente as funções das células T, imunovigilância, controle imunológico das infecções virais oncogênicas e falhas no controle e reparação do DNA, principalmente associado ao uso de agentes como ciclosporina e azatioprina. Grandes coortes mostraram que os RTR apresentam duas a quatro vezes mais risco de câncer, se comparados à população geral. Os tipos mais frequentes descritos foram sarcoma de Kaposi, câncer de pele não melanocítico e melanocítico, colorretal, mama, cervical e linfomas (CHAPMAN et al., 2013; ZHANG et al., 2014; LIM et al., 2019). Estes dados refletem a necessidade de um diagnóstico precoce para alterações neoplásicas, a busca por novos esquemas imunossupressores com menos efeitos adversos, além do rastreamento de outros fatores

de risco para a ocorrência de neoplasias, como obesidade, exposição solar sem foto proteção, sedentarismo e tabagismo.

Os eventos cardiovasculares são considerados as principais causas de morte com o enxerto funcionando entre os RTR. No presente estudo 15 RTR apresentaram complicações cardiovasculares. O estudo de Karaçaglar e colaboradores (2020) relatou a incidência de eventos cardiovasculares no pós-transplante na ordem de 64,2 % em uma coorte de 56 RTR, onde 3 pacientes foram a óbito por complicações relacionadas. A presença de sintomas e ou sinais clínicos associados a DCV requer atenção no pós transplante, a fim de identificar precocemente o risco e evitar desfechos desfavoráveis.

A rejeição ao enxerto ocorreu em 31 RTR no presente estudo (28,2% dos 110 avaliados), sendo a rejeição celular a mais comum entre os tipos avaliados. A ocorrência de episódios de rejeição é um fato invariável e extremamente indesejável entre os transplantados, uma vez que muitos podem perder o enxerto renal e retornar para a fila de transplante. O estudo de Burton e colaboradores (2019), avaliou 22.730 RTR, onde 5.389 (23,7%) apresentaram episódios de rejeição em um tempo médio de seguimento de 5 anos. Apesar da grande diferença existente entre o “n” amostral neste estudo e no nosso, podemos afirmar que existe semelhança nos achados proporcionais em ambos os casos.

O estudo de El-Zoghby e colaboradores (2008) avaliou 1.317 RTR em uma coorte retrospectiva, com seguimento médio de 50 meses. Eles observaram que 329,2 pacientes perderam o enxerto neste período e 38,2 destes por rejeição ao enxerto. As causas das rejeições foram doenças glomerulares (36,6%); fibrose intersticial/atrofia tubular (30,7%); rejeição aguda (11,8%) e causas inclassificáveis (4,6%).

Ao realizar a análise tempo–desfecho entre os 110 RTR do presente estudo, para avaliação da rejeição ao enxerto ao longo dos 5 anos de seguimento *versus* a associação dos níveis dos biomarcadores avaliados transversalmente, não foram encontrados resultados significativos. Estes dados mostram que a presença de alterações nos marcadores endoteliais e hemostáticos previamente dosados não apresentaram impacto na ocorrência da rejeição, durante o tempo de seguimento avaliado. Outras análises de sobrevivência (tempo – desfecho) foram realizadas para investigar a influência do tipo de doador, presença de rejeição prévia, tempo pós-transplante e tempo de diálise na ocorrência do desfecho avaliado e não foram encontradas diferenças significativas.

Não há relatos na literatura que discutam a avaliação dos marcadores endocan, homocisteína, atividade de ADAMTS13 e geração de trombina com a incidência de episódios de rejeição ao enxerto a longo prazo. No entanto, como discutido anteriormente, estudos mostraram associações entre os níveis de endocan, HCY e ADAMTS13 e a redução da função renal (ZHENG et al., 2001; MALYSZKI et al., 2006; EINOLLAHI et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2013; LEE et al., 2014; SU et al., 2014; MALYSZKO et al., 2018; Mc MILLAN et al., 2018) e a perda do enxerto (LI et al., 2012).

A impossibilidade de uma nova dosagem dos marcadores ao final do seguimento pode ter contribuído para a ausência de associações entre os níveis dos marcadores e desfecho final de rejeição. Desta forma, novos estudos são encorajados neste grupo de pacientes transplantados renais.

## 7 CONCLUSÕES

Após avaliação dos resultados obtidos e discussões realizadas, foi possível concluir que os pacientes com redução da função renal pós-transplante apresentaram pior função endotelial, avaliada pelos marcadores endocan e homocisteína, sendo estes marcadores considerados ferramentas úteis para a avaliação pós-transplante.

Estes mesmos pacientes (subgrupo C2) apresentaram um estado hipocoagulável associado à menor geração de trombina, mostrando que distúrbios hemorrágicos parecem ter maior impacto na população estudada. Esta associação merece ser melhor investigada, principalmente pela ausência de relação com o ritmo de filtração glomerular.

Já o tempo pós-transplante e a hipertrigliceridemia foram associados a um perfil hipercoagulável, sinalizado pelo encontro de uma maior geração de trombina ao longo do tempo, podendo o TGT ser potencial preditor de distúrbios hemostáticos protrombóticos. A hipertrigliceridemia foi considerada preditora para a elevação da homocisteína, o que reflete a importância do controle e monitoramento das dislipidemias em transplantados renais.

O monitoramento laboratorial e clínico pós-transplante é essencial, não apenas para se evitar a perda do enxerto, mas para o diagnóstico precoce de complicações comuns entre os RTR como infecções, neoplasias, distúrbios cardiovasculares e rejeição ao enxerto.

Finalmente, todos os dados analisados em conjunto permitem concluir que as dosagens da endocan, homocisteína e o teste de geração de trombina mostraram ser ferramentas promissoras para diagnosticar e monitorar alterações endoteliais e hemostáticas entre os pacientes transplantados renais ao longo do tempo. No entanto, novos estudos são necessários para melhor compreensão das possíveis associações entre tais marcadores e a ocorrência de rejeição a longo prazo.

## **8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

As principais limitações do estudo são: o desenho transversal para a dosagem dos marcadores laboratoriais, a heterogeneidade da população do estudo, o tamanho (n) limitado e a variação amostral entre as análises dos estudo e, principalmente, a alta frequência de informações não disponíveis ou não informadas nos prontuários clínicos, dificultando algumas análises de interesse. Cumpre salientar que o contexto de pandemia da COVID-19 também foi um fator limitante do presente estudo, pois interferiu negativamente tanto na coleta de dados como nas atividades laboratoriais.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes** [S.l.: s.n.] 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2008-2015). **Registro Brasileiro de Transplantes**, v. 4, n. 1, p. 81, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2009-2016). **Registro Brasileiro de Transplantes** [S.l: s.n.]. RBT, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS – ABTO. **Manuais de Transplantes – Período pós-transplante**. 2019. [Citado 14 maio 2020.] Disponível em URL: [http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/manual\\_do\\_transplantado/manual\\_transplante\\_pos.pdf](http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/manual_do_transplantado/manual_transplante_pos.pdf)

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2012-2019). Ano XXV No 4 [S.l: s.n.]. **Registro Brasileiro de Transplantes**, 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes: Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: JANEIRO / SETEMBRO - 2021. Ano XXVII No 3 [S.l: s.n.]. **Registro Brasileiro de Transplantes**, 2021.

AFSAR, B. *et al.* Endocan: a new molecule playing a role in the development of hypertension and chronic kidney disease? **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 16, n.12, p.914-916, 2014.

ALVES, L. V. *et al.* Creatinine and cytokines plasma levels related to HLA compatibility in kidney transplant patients. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 5, p. 303–309, 2015.

ALVES, L. V. *et al.* TNF, IL-6, and IL-10 cytokines levels and their polymorphisms in renal function and time after transplantation. **Immunol Res.** v. 68, n. 5, p. 246-254, 2020.

ANGLÉS-CANO, E. *et al.* Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein (a). **Annals of New York Academy of Sciences.** v. 936, n. 1, p. 261–75, 2001.

AZIMI A. Could "calprotectin" and "endocan" serve as "Troponin of Nephrologists"? **Medical Hypotheses.** v. 99, p. 29-34, 2017.

BALTA, S. *et al.* Endocan - a novel inflammatory indicator in newly diagnosed patients with hypertension a pilot study. **Angiology**, v. 65, n. 9, p. 773–777, 2014.

BAO, Y. *et al.* Serum endocan and circadian heart rate variability in non-dialysis stage 5 chronic kidney disease patients. **International Urology Nephrology**, v. 50, n. 11, p. 2061–2066, 2018.

BARBOUR, T. *et al.* Thrombotic microangiopathy and associated renal disorders. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 7, p. 2673–2685, 2012.

BATTISTELLI, S. *et al.* Total plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with colorectal carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 38, p.6128-6132, 2006.

BECHARD, D. *et al.* Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3099-3106, 2001.

BELLOMO, R. *et al.* Acute renal failure – Definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The second international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI) group. **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. 204-212, 2004.

BENEVIDES, T. C. *et al.* Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura due to antibody-mediated ADAMTS13 deficiency precipitated by a localized Castleman's disease: a case report. **Platelets**, v. 26, n. 3, p. 263–266, 2015.

BERGER, B. E. Atypical hemolytic uremic syndrome: a syndrome in need of clarity. **Clinical Kidney Journal**, v. 12, n. 3, p. 338-347, 2018.

BERNTORP, E.; SALVAGNO, G. L. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. **Seminars in Thrombosis Hemostasis**, v. 34, n. 7, p. 670-682, 2008.

BINDER, N.B. *et al.* Clinical use of thrombin generation assays. **J Thromb Haemost.** v.19, n. 12, p. 2918-2929, 2021.

BONAR, R. A.; LIPPI, G.; FAVALORO, E. J. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. **Methods in Molecular Biology**, p. 3-27, 2017.

BOSTON, A. *et al.* Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. **Atherosclerosis**, v. 116, n. 1, p.116:159, 1995.

BRUMMEL, K.E. *et al.* Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 148-152, 2002.

BURTON H, *et al.* Causes of renal allograft failure in the UK: trends in UK Renal Registry and National Health Service Blood and Transplant data from 2000 to 2013. **Nephrol Dial Transplant.** v. 34, n.2, p. 355-364. 2019.

CAGNOLATI, D. *et al.* **Hemostasia e Distúrbios da Coagulação.** 2017. Disponível em:[https://sites.usp.br/dcdrp/wp-content/uploads/sites/273/2017/05/hemostasia\\_revisado.pdf](https://sites.usp.br/dcdrp/wp-content/uploads/sites/273/2017/05/hemostasia_revisado.pdf). Acesso em: 21 set. 2019.

- CAMARGO, L. F *et al.* Urinary tract infection in renal transplant recipients: Incidence, risk factors, and impact on graft function. **Transplant Proc.** v.46, p.1757-1759, 2014.
- CAPELLI, I. *et al.* Folic Acid and Vitamin B12 Administration in CKD, Why Not? **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 1-20, 2019.
- CARDINAL, H.; DIEUDÉ, M.; HÉBERT, M. J. Endothelial Dysfunction in Kidney Transplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, maio 2018.
- CHAPMAN, J.R. *et al.* Cancer in the transplant recipient. **Cold Spring Harb Perspect Med** v. 3, n.a015677. 2013.
- CHENG, H.; HARRIS, R. C. Renal Endothelial Dysfunction in Diabetic Nephropathy. **Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 22–33, 2014.
- CHIANG, F. F. *et al.* High homocysteine is associated with increased risk of colorectal cancer independently of oxidative stress and antioxidant capacities. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 1054-1060, 2014.
- CHO, J. *et al.* Coagulation profile in patients with chronic kidney disease before and after kidney transplantation: A retrospective cohort study. **Clinical Transplantation**, v. 31, n. 9, 2017.
- CIANCIOLO, G. *et al.* Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression: Which Comes First? **Cardiorenal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 255–266, 2017.
- COBO, G. *et al.* Sex and gender differences in chronic kidney disease: progression to end-stage renal disease and haemodialysis. **Clinical science**, v. 130, n. 14, p.1147–63, 2016.
- COLVIN, B.T. Physiology of haemostasis. **Vox Sanguinis**, v. 87, n. 1, p. 43-46, 2004.
- DANTAS, S.R. *et al.* Nosocomial infections in renal transplant patients: Risk factors and treatment implications associated with urinary tract and surgical site infections. **J Hosp Infect.** v.63, p.117-123. 2006.
- DELEHEDDE, M. *et al.* Endocan in cancers: a lesson from a circulating dermatan sulfate proteoglycan. **International Journal of Cell Biology**, p. 1-11, 2013.
- DEPASSE, F. *et al.* Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. **J Thromb Haemost.** v.19, n. 12, p. 2907-2917, 2021.
- DUARTE, R. C. F *et al.* Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 39, n. 3, p. 259-265, 2017.
- DUARTE, R. C. F *et al.* Standardization and evaluation of the performance of the thrombin generation test under hypo- and hypercoagulability conditions. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, n. 3, p. 244-252, 2018.

DURSUN, I.; YEL, S.; UNSUR, E. Dynamics of circulating microparticles in chronic kidney disease and transplantation: Is it really reliable marker? **World Journal of Transplantation**, v. 5, n. 4, p. 267–75, 2015.

EINOLLAHI, B. *et al.* Hyperhomocysteinemia After Kidney Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 43, n. 2, p. 586–587, 2011.

EL-ZOGHBY, Z.M. *et al.* Identifying specific causes of kidney allograft loss. **Am J Transplant.** v. 9, n.3, p. 527-35, 2008.

FARSETTI, S. *et al.* Lower Homocysteine Levels in Renal Transplant Recipients Treated with Everolimus: A Possible Link With A Decreased Cardiovascular Risk? **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 4, p. 1381–1382, 2011.

FELLAH, H. *et al.* Hyperhomocysteinemia and end-stage renal disease: determinants and association with cardiovascular disease in Tunisian patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 5, p. 675-680, 2003.

FENG, Y. *et al.* ADAMTS13: more than a regulator of thrombosis. **International Journal Hematology**, v. 104, n. 5, p. 534-539, 2016.

FERRONI, P. *et al.* Determinants of homocysteine levels in colorectal and breast cancer patients. **Anticancer Research**, v. 29, n. 10, p. 4131–4138, 2009.

FORTI, P. *et al.* Homocysteinemia and early outcome of acute ischemic stroke in elderly patients. **Brain and Behavior**, v. 6, n. 5, p. 1-8, 2016.

FREITAS, C. *et al.* Identification of a 14kDa endocan fragment generated by cathepsin G, a novel circulating biomarker in patients with sepsis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 78-79, p. 45–51, 2013.

GACKLER, A. *et al.* Evaluation of hemostasis in patients with end-stage renal disease. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1-13, 2019.

GANGJI, A. S. *et al.* Bleeding in patients with renal insufficiency: a practical guide to clinical management. **Thrombosis Research**, v.118, n. 3, p. 423-428, 2006.

GARCIA RASO, A. *et al.* Association between venous thrombosis and dyslipidemia. **Medicina Clinica**, v. 143 n. 1, p. 1-5, 2014.

GERITSEN, N. T.; WAISMAN, H. A. Homocystinuria, an error in the metabolism of methionine. **Pediatrics**, n. 33, p. 423-20, 1964.

GOMES, R. M. *et al.* Effectiveness of Maintenance Immunosuppression Therapies in a Matched-Pair Analysis Cohort of 16 Years of Renal Transplant in the Brazilian National Health System. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 6, p. 1-15, 2020.

HAMATANI, R. *et al.* Plasma homocysteine and folate levels and dietary folate intake in adolescents and young adults who underwent kidney transplantation during childhood. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 18, n. 1, p. 151–156, 2014.

HEISS, C.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; KELM, M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 14, p. 1230–42, 2015.

HEMKER, H. C.; WILLEMS, G. M.; BÉGUIN, S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 56, n. 1, p. 9-17, 1986.

HEMKER, H. C.; BÉGUIN, S. Phenotyping the clotting system. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 84, n. 5, p. 747-751, 2000.

HEMKER, H. *et al.* The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 32, n. 5-6, p. 249-253, 2002.

HOFFBRAND, A. V. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOLLYER, I., & ISON, M. G. The challenge of urinary tract infections in renal transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**. v. 20, n. 2, e12828, 2018.

HUANG, Y. C. *et al.* Plasma Homocysteine and Glutathione Are Independently Associated with Estimated Glomerular Filtration Rates in Patients with Renal Transplants. **Transplantation Proceedings**, v. 51, n. 8, p. 2667-2670, 2019.

IKEDA, H. *et al.* Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 10, p. 2204-2211, 2011.

IRISH, A. B.; GREEN, F. R. Environmental and genetic determinants of the hypercoagulable state and cardiovascular disease in renal transplant recipients. **Nephrology Dialysis, Transplantation**, v. 12, n. 1, p. 167-173, 1997.

ISEKI, K. Gender differences in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 74, n. 4, p. 415–417, 2008.

JEONG, C. J. *et al.* Plasma haemostatic potential of haemodialysis patients assessed by thrombin generation assay: Hypercoagulability in patients with vascular access thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 132, n. 5, p. 604-609, 2013.

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. **Journal of the Korean Surgical Society**, v. 83, n. 2, p. 69–74, 2012.

KALI A, SHETTY K. S. Endocan: a novel circulating proteoglycan. **Indian Journal Pharmacology**, v. 46, n. 6, p. 579-583, 2014.

KANG, A. *et al.* Interventions for lowering plasma homocysteine levels in kidney transplant recipients. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 5, n. 3, p. 1-27, 2015.

KAO, S. J. *et al.* Plasma endothelial cell- specific molecule-1 (ESM-1) in management of community-acquired pneumonia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, p. 445-451, 2014.

KARAÇAĞLAR E. *et al.* Incidence of Cardiovascular Events After Renal Transplantation. **Exp Clin Transplant**. v.18, n.1, p. 70-72. 2020.

KAYA, B. *et al.* Evaluation of the Relationship Between Homocysteine, Parathormone, Vitamin D3, and Bone Mineral Densitometry in Recipients of Kidney Transplant. **Transplantation Proceedings**, v. 51, n. 7, p. 2324-2329, 2019.

KAZORY, A.; DUCLOUX, D. Acquired hypercoagulable state in renal transplant recipients. **Thrombosis Haemostasis**, v. 91, n. 4, p. 646-654, 2004.

KIDNEY DISEASE IMPROVING GLOBAL OUTCOMES - KDIGO, Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int**, (Suppl 3), p. 1–150, 2003.

KIM, H.Y. *et al.* Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw–Schulman syndrome) caused by novel ADAMTS13 mutations. **Br J Haematol**. 2015. doi:10.1111/bjh.13564.

KEKU, T *et al.* 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 11, p. 1611–1621. 2002.

KENICHI, O. *et al.* A modified thrombin generation assay to evaluate the plasma coagulation potential in the presence of emicizumab, the bispecific antibody to factors IXa/X. **Int J Hematol**. v. 112, n. 5, p. 621-630, 2020.

KESHTELI, A. H.; BARACOS, V. E.; MADSEN, K. L. Hyperhomocysteinemia as a potential contributor of colorectal cancer development in inflammatory bowel diseases: a review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1081-1090, 2015.

KOO, E. H. *et al.* The impact of early and late acute rejection on graft survival in renal transplantation. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 34, n. 3, p. 160–164, 2015.

LEE, M. *et al.* ADAMTS13 promotes angiogenesis and modulates VEGF-induced angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 84, n. 2, p. 109-115, 2012.

LEE, H. G.; CHOI, H. Y. BAE, J. S. Endocan as a potential diagnostic or prognostic biomarker for chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 86, n. 6, p. 1079-1081, 2014.

LEVEY, A. S. *et al.* A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604-612, 2009.

LEVIN A. al. Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int Suppl**. v. 3, p.1–150. 2013.

LI, H. *et al.* Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis? **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1037-1043, 2002.

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

LI S. *et al.* Detection on dynamic changes of endothelial cell specific molecule-1 in acute rejection after renal transplantation. **Urology**. v.80. 2012.

LIM WH. *et al.* Assessment of kidney transplant suitability for patients with prior cancers: is it time for a rethink? **Transpl Int**. v. 32, p.1223–40. 2019.

LOUPY, A. *et al.* The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. **American Journal of transplantation**, v. 20, n. 9, p. 2318-2331, 2020.

LUTZ, J. *et al.* Haemostasis in chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 29, n. 1, p. 29-40, 2014.

MACFARLANE, R. G.; BIGGS, R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. **Journal of Clinical Pathology**, v. 6, n. 1, p. 3-8, 1953.

MALYSZKI, J. S. *et al.* “Markers of endothelial damage in patients on hemodialysis and hemodiafiltration”. **Journal of Nephrology**, v. 19, n. 2, p. 150–154, 2006.

MALYSZKO, J. *et al.* Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Kidney Transplant Recipient with Dyslipidemia. **Transplantation Proceedings**, v. 35, p. 2219-2221, 2003.

MAŁYSZKO, J. *et al.* Endothelial cell injury markers in chronic renal failure on conservative treatment and continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 27, p. 71-77, 2004.

MALYSZKO, J.; KOC-ZORAWSKA, E.; MALYSZKO, J. S. Endocan concentration in kidney transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 50, n. 6, 1798-1801, 2018.

MANCINI, I. *et al.* Clinical and Laboratory Features of Patients with Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Fourteen Years of the Milan TTP Registry. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 119, n. 5, 695-704, 2019.

MANEA, M. *et al.* Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells. **Pediatric Nephrology**, v. 25, n. 1, p. 87-69, 2009.

MANICKAVASAGAR R, THURAISSINGHAM R. Post renal-transplant malignancy surveillance. **Clin Med (Lond)**. v. 20, n. 2, p.142-145. 2020.

MANNUCI, P. M. The measurement of multi-factorial Thrombophilia. **Thrombosis & Haemostasis**, v. 88, n. 1, p. 1-2, 2002.

MARTINS, S.R; ALVES, L.V. *et al.* COVID-19 in renal-transplanted recipients: a narrative review. **JBT J Bras Transpl**. V. 24, n. 2, p. 1-80, 2021.

MARTINS, S. R. *et al.* Cell-derived microparticles and von Willebrand factor in Brazilian renal transplant recipients. **Nephrology**, doi:10.1111/nep.13657 2019.

MATOS, F. S. *et al.* Preemptive transplantation in asymptomatic chronic kidney disease patient - case report. **Revista Científica da FMC**, v. 11, 2016.

Mc MILLAN, R *et al.* Biomarkers of Endothelial, Renal, and Platelet Dysfunction in Stage 5 Chronic Kidney Disease Hemodialysis Patients With Heart Failure. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, p. 235–240, 2018.

MENON, M. C; MURPHY, B. Maintenance immunosuppression in renal transplantation. **Curr Opin Pharmacol**. v. 13, n. 4, p. 662-671, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Imunossupressão em Transplante Renal. **PORTARIA CONJUNTA Nº 1, DE 05 DE JANEIRO DE 2021**. Acesso em 02 de janeiro de 2022, disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Protocolos/20210113\\_PCDT\\_Imunossupressao\\_Transpl\\_ante-Renal.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/20210113_PCDT_Imunossupressao_Transpl_ante-Renal.pdf)

MOLINO, D *et al.* Coagulation disorders in uremia. **Semin Nephrol**, v. 26, p. 46–51, 2006.

MONFARED *et al.* The association between atorvastatin administration and plasma total homocysteine levels in renal transplant recipients. **Journal of nephropathology**, v. 5, n. 3, p. 98–104, 2016.

MOTA, A. P. L. *et al.* Hemostatic Parameters according to Renal Function and Time after Transplantation in Brazilian Renal Transplanted Patients. **Disease markers**, v. 2015, p. 472750, 2015.

MOTA, A.P.L. *et al.* Regulatory and pro-inflammatory cytokines in brazilian living-related renal transplant recipients according to creatinine plasma levels. **Nephrology (Carlton)**. v. 23, p. 867–75. 2017.

MUDD, S. H. *et al.* Homocystinuria: an enzymatic defect. **Science**, n. 143, p. 1443-5, 1964.

MUKHOPADHYAY, S *et al.* Fibrinolysis and Inflammation in Venous Thrombus Resolution. **Front Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1348, 2019.

MUKAKA M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Med J**. v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012.

NEVES, L *et al.* Homocisteína, **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 5, p. 311-20, 2004

NAM, Y. *et al.* Coagulation Proteins Influencing Global Coagulation Assays in Cirrhosis: Hypercoagulability in Cirrhosis Assessed by Thrombomodulin-Induced Thrombin Generation Assay. **BioMed Research International**. v. 2013, Article ID 856754, 2013

NIEUWENHUIJS-MOEKE *et al.* Preemptively and nonpreemptively transplanted patients show a comparable hypercoagulable state prior to kidney transplantation compared to living kidney donors. **PLoS One**, v. 13, e0200537, 2018.

NIJZIEL, M.R. *et al.* Acquired resistance to activated protein C in breast cancer patients. **Br J Haematol**. v. 120, p. 117-122. 2003.

O'DONNELL, J. S *et al.* Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. **British Journal of Haematology**. v. 186, n. 1, p. 24-36, 2019.

OH, J *et al.* Prognostic utility of ADAMTS13 activity for the atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) and comparison of complement serology between aHUS and thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood Res**. v.54, n. 3, p. 218-228, 2019;

OMRAN, J; AL-DADAH, A; DELLSPERGER, K.C. Dyslipidemia in patients with chronic and end-stage kidney disease. **Cardiorenal Med**. v. 3, n. 3, p. 165-77, 2013.

PARAJULI, S *et al.* Hypercoagulability in Kidney Transplant Recipients. **Transplantation**. v. 100, p. 719-26, 2016.

PAVORD, S; MYERS, B. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease. **Blood Rev**. v. 25, p. 271–278, 2011.

PERES, L. A. B; BETTIN, T. E. Dislipidemia em pacientes com doença renal crônica  
Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease. **Rev Soc Bras Clin Med**. v. 13, n. 1, p. 10-3, 2015

PERNA, A. F; INGROSSO, D. Atherosclerosis determinants in renal disease: how much is homocysteine involved? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, n. 6, p. 860–863, 2015.

PHAM, P. T. *et al.* Inhibitors of ADAMTS13: a potential factor in the cause of thrombotic microangiopathy in a renal allograft recipient. **Transplantation**, v. 74, n. 8, p. 1077–1080, 2002.

PIOVESAN, F. *et al.* Homocysteine levels in renal transplant recipients with and without hypercholesterolemia. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n.154, p. 170, 2007.

PLAUTZ, W.E. *et al.* ADAMTS13: origins, applications, and prospects. **Transfusion**, v. 58, p. 2453-2462, 2018.

POLI, D; ANTONUCCI, E; ZANAZZI, M. Hemostatic Complications in Renal Transplantation. **Semin Thromb Hemost**, v. 43, p. 742-749, 2017.

RAHMAN, M. *et al.* Relation of serum lipids and lipoproteins with progression of CKD: The CRIC study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*, v. 9, p. 1190–1198, 2014.

RANGASWAMI, J. *et al.* Cardiovascular disease in the kidney transplant recipient: epidemiology, diagnosis and management strategies. *Nephrol Dial Transplant*, v. 34, p. 760–773, 2019.

RAPIS, V. *et al.* Levels of Endocan, Angiopoietin-2, and Hypoxia-Inducible Factor-1a in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and Different Levels of Renal Function. *Am J Nephrol*, v. 47, p. 231-238, 2018.

REFSUM, H. *et al.* Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics. *Eur J Pediatr*. v.157, Suppl 2, S45–S49, 1998.

REUKEN, P. A. *et al.* Imbalance of von Willebrand factor and its cleaving protease ADAMTS13 during systemic inflammation superimposed on advanced cirrhosis. *Liver Int.* v. 35, n. 1, p. 37–45, 2015.

RIOS, D. R. A. *et al.* ADAMTS13 and Von Willebrand factor assessment before and after kidney transplantation. *Clinica Chimica Acta*, v. 412, n. 23-24, p. 2353–2354, 2011.

RIOS, D. R. A. *et al.* Relationship between ABO blood groups and von Willebrand factor, ADAMTS13 and factor VIII in patients undergoing hemodialysis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 33, n. 4, p. 416–421, 2012 A.

RIOS, D. R. A. *et al.* ADAMTS13 and Von Willebrand factor in patients undergoing hemodialysis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 34, n. 1, p. 73–78, 2012 B

RODGERS, S. E. *et al.* Evaluation of pre-analytical variables in a commercial thrombin generation assay. *Thromb Res*, v. 134, p. 160–4, 2014.

RODRIGUES, F. B. *et al.* *Incidence and mortality of acute kidney injury after myocardial infarction: A comparison between KDIGO and RIFLE criteria.* *PLoS One*, v. 8, e69998, 2013.

SAAD, E.J. *et al.* Infections in the first year after renal transplant. *Medicina (B Aires)*. v.80, n. 6, p.611-621, 2020.

SAMAAN, F. *et al.* Prevalence and progression of chronic kidney disease after renal transplantation. *Transplant Proc.* v. 43: p. 2587–91. 2011.

SAOJI, R. *et al.* Association of high-density lipoprotein, triglycerides, and homocysteine with bone mineral density in young Indian tribal women. *Arch Osteoporos*, v.13, p. 108, 2018.

SARRAZIN, S. *et al.* Endocan as a biomarker of endothelial dysfunction in cancer. *J Cancer Sci Ther*, v. 2, n. 2, p. 47–52, 2010.

SCHERPEREEL, A *et al.* 2014; Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, Cavestri B, Tscopoulos A, Gentina T, et al. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. **Crit Care Med.** v. 34, p. 532-7, 2006.

SCOTT, T. *et al.* B-Vitamin Therapy for Kidney Transplant Recipients Lowers Homocysteine and Improves Selective Cognitive Outcomes in the Randomized FAVORIT Ancillary Cognitive Trial. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 4, n. 3, p. 174–182. 2017.

SEGARRA, A. *et al.* Circulating levels of plasminogen activator inhibitor type-1, tissue plasminogen activator, and thrombomodulin in hemodialysis patients: biochemical correlations and role as independent predictors of coronary artery stenosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, p. 1255–1263, 2001.

SEN, U. *et al.* 2010; Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. **Cell Biochem Biophys**, v. 57, p. 49–58, 2010.

SESSO, R. C. *et al.* Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 1, p. 54–61, 2016.

SHANG D. *et al.* 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**. v. 108, n. 7, p. 2207–15. 2006.

SILBINGER S, NEUGARTEN J: Gender and human chronic renal disease. **Gend Med**, v. 5, p. S3–S10, 2008.

SIS, B. *et al.* Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. **Am J Transplant**, v. 10, n. 3, p. 464–471. 2010.

SMITH; TRAVERS; MORRISSEY. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 50, n. 4, p. 326–336, 2015.

SOFI, F. *et al.* Lipoprotein (a) and venous thromboembolism in adults: A meta-analysis. **Am J Med**, v. 120, p. 728–33, 2007.

SOUZA L. V. *et al.* Serum Endocan Levels Associated with Hypertension and Loss of Renal Function in Pediatric Patients after Two Years from Renal Transplant. **International journal of nephrology**, 2180765, 2016.

STAMLER, J. S. *et al.*: Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **J Clin Invest**, v. 91, p. 308–318, 1993.

SU, Y. H. *et al.* Serum Endocan correlated with stage of chronic kidney disease and deterioration in renal transplant recipients. **Transplantation proceedings**. Elsevier, p. 323–7, 2014.

TAKAHASHI, N. *et al.* Behavior of ADAMTS13 and von Willebrand factor levels in patients after living donor liver transplantation, **Thrombosis Research**, v. 131, n. 3, p. 225–229, 2013.

TEM CATE *et al.* Thrombin generation in patients after acute deep-vein thrombosis. **Thromb Haemost**, v. 100, n.2, p. 240–5, 2008.

TIZO, J. M; MACEDO, A. C. Principais complicações e feitos colaterais pós-transplante renal. **uning**, v. 24, n.1, p.62-70, 2015.

TORRY, R. J. *et al.* Natural anticoagulant and fibrinolytic pathways in renal allograft failure. **Transplantation**, v. 58, p. 926–31, 1994.

TOULON, P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. **Int J Lab Hematol**. v. 38, Suppl 1, p. 66-77, 2016.

TOUSOULIS, *et al.* Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. **Heart**, v. 92, v. 4, p. 441–444, 2006.

TURNER, N. *et al.* Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. **J Thromb Haemost**, v. 4, p. 1396–1404, 2006.

UNGVARI, Z. *et al.* Mechanisms of Vascular Aging, A Geroscience Perspective: JACC Focus Seminar. **J Am Coll Cardiol**. v. 75, n. 8, p. 931-941. 2020.

VAN GULDENER, C; STAM, F; STEHOUWER, CD. Homocysteine metabolism in renal failure. **Kidney Int**. v. 59, Suppl 78, p. S234–S237. 2001.

WANG, Y. *et al.* Gene expression of plasminogen activator inhibitor 1 in transplant kidneys complicated by renal vein thrombosis: a combined study by in-situ hybridization and immunohisto-chemistry. **Nephrol Dial Transplant**, v. 9, p. 296–303, 1994.

WANG, A. *et al.* The expression of ADAMTS13 in human microvascular endothelial cells. **Blood Coagul Fibrinolysis**. v. 11, n. 11, 2015.

WEBSTER, K; SCHNITZLER, E. Hemolytic uremic syndrome. **Handb Clin Neurol**, v. 120, p. 1113-1123, 2014

WOODWARD *et al.* Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: The Third Glasgow MONICA Survey. II. Relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. **Br J Haematol**, v. 97, p. 785–97, 1997.

WORLBERG, A. S; CAMPBELL, R. A. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfus Apher Sci**, v. 38, p. 15–23, 2008.

XU, H *et al.* ADAMTS13 controls vascular remodeling by modifying VWF reactivity during stroke recovery. **Blood**, v. 130, n. 1, p. 11–22. 2017.

YAU, J. W.; TEOH, H.; VERMA, S. Endothelial cell control of thrombosis. **BMC cardiovascular disorders**, v. 15, p. 130, 2015.

VAL, M. L. *et al.* Cardiovascular risk in children and adolescents with end stage renal disease. **Clinics**, v. 74, p. 1-7, 2019.

YILMAZ MI, *et al.* Plasma endocan levels associate with inflammation, vascular abnormalities, cardiovascular events, and survival in chronic kidney disease. **Kidney Int.** v. 86, p. 1213-20, 2014.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013.

ZEYNELOĞLU, P. Respiratory complications after solid-organ transplantation. **Exp Clin Transplant.** v.13, n. 2, p.115-25, 2015.

ZHANG, J. Epidemiology of post-transplant malignancy in Chinese renal transplant recipients: a single-center experience and literature review. **Med Oncol.** v. 31, n. 7, p. 32. 2014.

ZHENG, X. L. *et al.* Structure of von willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura, **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, no. 44, p. 41059–41063, 2001.

ZHU, L. *et al.* Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Immunosuppressed Renal Transplant Recipients: A Summary of 10 Confirmed Cases in Wuhan, China. **Eur Urol.** v.77, n. 6, p. 748-754. 2020.

ZUPAN, I. P *et al.* Utility of in-vitro closure time test for evaluating platelet-related primary hemostasis in dialysis patients. **Am J Kidney Dis.** v. 42, p.746–51, 2003.

## APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

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

**Título do Projeto: Avaliação de marcadores inflamatórios/ hemostáticos e polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em pacientes transplantados renais**

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

Você está sendo convidado a participar como voluntário(a) de uma pesquisa científica intitulada como: "Avaliação de marcadores inflamatórios/ hemostáticos e polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em pacientes transplantados renais", que está descrita a seguir:

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

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

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

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

Nome: \_\_\_\_\_ Gênero: \_\_\_\_\_  
 Identidade: \_\_\_\_\_ Órgão Expedidor: \_\_\_\_\_  
 Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Médico: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ Tempo de Tx: \_\_\_\_\_

2. Objetivo da pesquisa:

Investigar micropartículas celulares, marcadores hemostáticos e polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em pacientes submetidos ao transplante de rim, sem sinais clínicos de rejeição, distribuídos em subgrupos de acordo com os níveis plasmáticos de creatinina e o eRFG.

3. Descrição detalhada e explicação dos procedimentos realizados:

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

Descrição dos desconfortos e riscos da pesquisa:

**Risco Mínimo**     Risco Baixo     Risco Médio     Risco Alto

4. Descrição dos benefícios da pesquisa:

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

5. Despesas, compensações e indenizações:

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

6. Direito de confidencialidade:

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

7. Acesso aos resultados da pesquisa:

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

8. Liberdade de retirada do consentimento:

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

9. Acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa:

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

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

10. Acesso à instituição responsável pela pesquisa:

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

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

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Fui informado verbalmente e por escrito sobre os dados dessa pesquisa e minhas dúvidas com relação a minha participação foram satisfatoriamente respondidas.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, os desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos pesquisadores e à instituição de ensino.

Tive tempo suficiente para decidir sobre minha participação e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a mesma, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

A minha assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dará autorização aos pesquisadores, ao patrocinador do estudo e ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais de utilizarem os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha identidade.

Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

**Voluntário**

---

Pesquisador Responsável

## APÊNDICE B – Ficha clínica: análise transversal

<b>Ficha Clínica</b>			
"AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS, INFLAMATÓRIOS E HEMOSTÁTICOS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS"			
Número de ID do participante: _____ Data da coleta: ____\____\____ Prontuário: _____			
<b>1. Identificação:</b>			
Nome: _____ DN: ____\____\____ Sexo: _____			
Naturalidade: _____ Endereço: _____			
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Tel: _____			
Etnia: _____ Médico: _____ Outras Infos: _____			
<b>2. Dados Clínicos:</b>			
a) Peso (Kg): _____ Altura (m) _____ IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) _____ b) Diálise\Tempo: _____			
c) Doença base: _____ d) Comorbidades: _____			
e) Data do Tx renal: ____\____\____ f) Doador (tipo\idade\sexo) : ____\____\____			
g) Imunossupressores: _____			
h) Outros medicamentos: _____			
i) Tabagismo? _____ j) Consumo de bebida álcool.? _____			
k) Prática de exercício físico? _____ l) Tipo sanguíneo: _____ m) História familiar de DRC: _____			
n) PA: ____\____ o) Rejeição prévia\data\indução: _____			
<b>Dados Laboratoriais - Data: ____\____\____</b>			
Hemograma	Ionograma	Bioquímica	Bioquímica
Hm\Ht\Hb: \ \	Na\k: \	Creat: \	BD\ BT: \
GL: \	Mg\P\Cl: \ \	Uréia: \	Nível Med____: \
Seg\Bast: \	Ca\Cai: \	Ác. úrico: \	Albumina: \
Baso\Eos: \	<b>Urina</b>	HbA1c: \	Globina: \
Linf\Mono: \	DU\pH: \	Glico JJ: \	LDH: \
Plaq: \	Micro\Prot: \	TGOVAST: \	Colest T: \
VCM\HCM: \	Prot. 24h: \	TGPVALT: \	HDL\LDL: \
PTTA: c: \ p: \	Alb\Creat: \	FAL\GGT: \	VLDL\ TGL: \
RNI\TP: \ c: \ p: \	Sedimentos: \	CK T: \	Outros: \
Outros: \	Outros: \	Outros: \	Outros: \
Imuno (Receptor)		Imuno (Doador)	
<b>HLA A:</b> \	<b>B:</b> \	<b>HLA A:</b> \	<b>B:</b> \
<b>DR:</b> \	\	<b>DR:</b> \	\
PRA PRÉ (data): \	\	Prova Cruzada: \	GS: \
PRA PÓS (data): \	\	Outros: \	\
Biópsia: \	\	Infecções pós-Tx: \	\
Outros: \	\	\	\

## APÊNDICE C - Ficha clínica: análise longitudinal prospectiva

### Ficha Clínica

" AVALIAÇÃO DE MARCADORES HEMOSTÁTICOS E ENDOTELIAIS NO TRANSPLANTE RENAL: ASSOCIAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA DO ENXERTO "

Número de ID do participante: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_ \ \_\_\_\_ \ \_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

#### 1. Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_ \ \_\_\_\_ \ \_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_ Médico: \_\_\_\_\_ Outras Infos: \_\_\_\_\_

2. Dados Clínicos: a) Peso (Kg): \_\_\_\_\_ Altura (m) \_\_\_\_\_ IMC (Kg/m<sup>2</sup>) \_\_\_\_\_ b) Diálise\Tempo: \_\_\_\_\_ c) Doença base: \_\_\_\_\_ d) Comorbidades: \_\_\_\_\_ e) Data do Tx renal: \_\_\_\_ \ \_\_\_\_ \ \_\_\_\_ f) Doador (tipolidade\sexo) : \_\_\_\_\_ ) Imunossupressores: \_\_\_\_\_

Tabgismo? \_\_\_\_\_ Consumo de bebida álcool.? \_\_\_\_\_ k) exercício físico? \_\_\_\_\_ \_l) Tipo sanguíneo: \_\_\_\_\_ n) Rejeição pré-  
via\data\ indução: \_\_\_\_\_

	2016	2017	2018	2019	2020	2021
UREIA						
CREATININA						
AC URICO						
EAS						
P/C URO						
TGO / TGP						
FA/GGT						
GLI / HBA1C						
HM / HT/HB						
PLT						
GL						
S/BASO/EOS						
L/M						
RNI / PT / PTTA						
DDIMERO						
CT / LDL						
HDL / TG						
VLDL						
PTH						
Na /K/Mg/P						
Ca						

### APÊNDICE D – Tabela descritiva: análise longitudinal prospectiva

Parâmetros	Ano 1 (n=81)	Ano 2 (n=86)	Ano 3 (n=84)	Ano 4 (n=72)	Ano 5 (n=72)	Total (n=110)
<b>Rejeição ao enxerto</b>						<b>31</b>
Rejeição Humoral	1	3	2	0	2	8
Rejeição sem especificação	1	2	2	1	0	6
Rejeição Celular (FIAT)	3	1	1	2	4	11
Rejeição Celular e Humoral	0	0	0	0	1	1
NCE	1	1	2	0	1	5
<b>Perda do enxerto renal</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>10</b>
<b>Retransplante</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Óbito</b>						<b>3</b>
Choque séptico – câncer de bexiga	0	0	0	1	0	1
COVID-19 (choque séptico pulmonar e IRA)	0	0	0	1	0	1
Sem informações	0	0	0	0	1	1
<b>Doença Cardiovascular</b>						<b>15</b>
Arritmia cardíaca não especificada	0	1	0	0	0	1
Angina estável	0	0	0	1	0	1
Aterosclerose	0	0	1	2	0	2
TVP	1	1	1	0	2	5
Isquemia Miocárdica Transitória	0	1	0	0	0	1
IAM	0	1	0	0	0	1
AVE	0	0	0	1	0	1
estenose de artéria renal do enxerto	0	0	2	0	0	2
hematoma perienxerto	0	0	0	1	0	1
<b>Neoplasias</b>						<b>18</b>
Carcinoma de pele não melanoma	2	0	1	1	0	4
Câncer urotelial de alto grau da bexiga.	0	1	0	0	0	1
Carcinoma de colo uterino	0	2	2	3	1	8
Carcinoma ductal in situ (mama)	1	0	0	0	0	1
Hiperplasia Prostática Benigna	0	1	0	0	0	1
Miomatose Uterina	0	0	0	1	3	4
<b>Transtorno depressivos</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<b>Dist. Gastrointestinal</b>						<b>14</b>
Diarreia	3	2	2	0	2	9
Diverticulite	0	0	0	0	1	1
Refluxo	0	0	1	0	0	1
esteatose hepática	0	0	1	0	0	1
Pancreatite Aguda	0	0	2	0	0	2
<b>Infecções [n (%)]</b>						<b>50</b>
ITU	2	3	2	2	4	13
Pielonefrite	0	0	2	0	0	2
COVID-19	nd	nd	nd	5	8	13
Síndrome gripal/respiratório	0	2	4	1	0	7
BK vírus	1	0	0	0	0	1
CMV	1	0	0	0	1	2
Dengue	0	0	0	1	0	1
Sepse (causa não relatada)	1	0	0	0	0	1
Sepse (pancreatite medicamentosa)	0	0	0	1	0	1
Tuberculose	1	0	0	0	0	1
Verminoses	0	0	1	0	0	1
Candidíase vaginal	1	0	0	0	0	1
Úlcera vulvar	0	1	0	0	0	1

Micobateria Invasiva Óssea	0	0	0	1	0	1
Herpes zoster	0	1	0	0	0	1
Hepatite C	0	0	1	1	0	2
Hepatite B	0	0	0	0	1	1
<b>Distúrbios Hematológicos</b>						5
Anemia	0	0	0	1	1	2
Policitemia	1	0	0	0	0	1
Plaquetopenia secundária MMF	0	0	0	1	0	1
Síndrome Hemolítica Urêmica	0	0	0	1	0	1
<b>Diabetes Mellitus</b>	0	0	0	1	0	1
<b>Pré-eclâmpsia</b>	0	0	1	0	0	1
<b>Dados laboratoriais</b>						
Creatinina [mg/dL (IQ)]	1,22 (0,61)	1,26 (0,72)	1,23 (0,7)	1,31 (0,9)	1,14 (0,6)	ns
eRFG [mL/min/1,73m <sup>2</sup> (SD)]	69,56 (28,83)	60,74 (26,14)	62,96 (30,51)	57,77 (27,38)	52,75 (31,96)	ns
Glicose [mg/dL (SD)]	105,47 (60,54)	104,73 (46,0)	105,96 (41,76)	109,00 (47,11)	99,0 (35,18)	ns
Colesterol total [mg/dL (SD)]	182,69 (35,17)	187,02 (41,83)	176,31 (41,49)	195,2 (57,83)	190,80 (40,85)	ns
Triglicerídeos [mg/dL (SD)]	147,89 (63,71)	179,14 (232,2)	151,36 (63,4)	179,4 (117,2)	176,3 (85,84)	ns
Colesterol HDL [mg/dL (SD)]	54,39 (16,33)	53,29 (17,69)	52,56 (16,46)	51,44 (13,60)	61,76 (44,12)	ns
Hemoglobina [mg/dL (SD)]	13,57 (3,09)	13,45 (2,0)	13,03 (2,78)	13,7 (3,00)	13,45 (2,03)	ns
Hematócrito [% (SD)]	48,21 (4,67)	47,27 (53,1)	39,46 (7,2)	39,70 (7,22)	40,46 (6,55)	ns
Plaquetas [ $\mu$ L (SD)]	233.200 (64090)	233.643 (73099)	233.075 (77374)	229178 (69541)	229040 (65555)	ns
<b>Sem Dados Clínicos</b>	<b>29</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>38</b>	<b>38</b>	nd

**Legenda:** IFTA: fibrose intersticial, atrofia tubular; NCE: nefropatia crônica do enxerto; COVID-19: *Coronavirus Disease – 2019*; IRA: insuficiência renal aguda; TVP: trombose venosa profunda; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVE: acidente vascular encefálico; ITU: infecção do trato urinário; BK: BK poliomavírus; CMV: citomegalovírus; MMF: micofenolato de mofetila; eRFG: ritmo de filtração glomerular estimado. nd: não se aplica; ns: não significativo.

**Fonte:** produzida pela autora.

**ANEXOS A – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, COEP (2015)**



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

**Projeto: CAAE – 48473415.0.0000.5149**

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

**DECISÃO**

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

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

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

**ANEXO B – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, COEP (Atualizada em 2016).**



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

Projeto: CAAE – 48443715.3.0000.5149

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

### DECISÃO

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

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

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

Profa. Dra. Vivian Resende  
Coordenadora do COEP-UFMG

**ANEXO C – Termo de responsabilidade: acesso a dados em formato eletrônico para fins de pesquisa**

 <b>Universidade Federal de Minas Gerais</b> <b>Hospital das Clínicas</b>		
<b>TERMO DE RESPONSABILIDADE: ACESSO À DADOS CLÍNICOS EM FORMATO ELETRÔNICO PARA FINS DE PESQUISA</b> Política de Segurança em Tecnologia da Informação na Saúde <b>(Perfil de Acesso: Pesquisador)</b>		
Nome do projeto de pesquisa: <u>Avaliação de marcadores genéticos, inflamatórios e hemostáticos no transplante Renal</u>		
Nome do coordenador do projeto de pesquisa e vínculo institucional: <u>Dra. Ana Paula Lucas Mota (Professora Magistério Superior)</u>		
Registro na Plataforma Brasil: C.A.A.E <u>48443715.3.1001.5149</u>		
Duração da pesquisa data de início: <u>01 / 09 / 2015</u> data de término: <u>- / - / -</u> <u>Vigente; Sem data</u>		
Modalidade de acesso aos dados clínicos: <input type="checkbox"/> Consulta-prontuário dentro dos Sistemas de PEP do Hospital das Clínicas da UFMG <input checked="" type="checkbox"/> Consulta-prontuário dentro dos Sistemas de PEP do Hospital das Clínicas da UFMG e adicionalmente registros de papel no arquivo SAME <input type="checkbox"/> Base de dados clínica, anonimizada. Neste caso identificar o nome do sistema e o período de coleta de dados constantes no projeto autorizado pelo CEP UFMG <input type="checkbox"/> Base de dados clínica identificada. Neste caso identificar o nome do sistema e o período de coleta de dados constantes no projeto autorizado pelo CEP UFMG <input type="checkbox"/> Outra modalidade (especificar):		
Identificação da equipe de pesquisa que terá acesso aos sistemas eletrônicos, quando for o caso: Pesquisador 1 (nome e vínculo): <u>Suellem Rodrigues Martins (Doutoranda)</u> Pesquisador 2 (nome e vínculo): <u>Lorraine Vieira Alves (Doutoranda)</u> Pesquisador 3 (nome e vínculo): <u>Sophia Laís Araújo Fortes (Mestranda)</u> Pesquisador 4 (nome e vínculo): <u>Victor Hugo Ferreira (Iniciação Científica)</u>		
Eu, <u>Ana Paula Lucas Mota</u> , <u>2373001</u> SIABE: <u>2373001</u> CPF: <u>03852916-45</u> declaro ter conhecimento de que as informações constantes no prontuário clínico pertencem ao paciente, estão sob a guarda do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, e são de caráter sigiloso. Eu concordo em tomar todas as precauções para assegurar a Confidencialidade, Integridade e Disponibilidade de qualquer informação, seja ela interna ou externa, que tenha sido confiada a mim pela no exercício de minha atuação como pesquisador. Assumo o compromisso de utilizar os dados apenas para os fins previstos no projeto de pesquisa supracitado, já aprovado		



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas

EBSERH

pelo CEP UFMG e pela Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG. Assumo o compromisso de não repassar os dados para quaisquer outros que não os membros da equipe de pesquisa sob minha coordenação. Estou ciente de que o acesso, a cópia ou a divulgação indevida dos dados constantes no prontuário do paciente constitui infração grave ou crime, em conformidade com a resolução CFM nº 1605/2000 (do Conselho Federal de Medicina); artigo 154 do Código Penal; artigos 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 85 do Código de Ética Médica; artigo 5º, inciso X, da Constituição Federal.

Estou ciente de que embora a lei n.º 12.527/11, - Lei de Acesso à Informação, tenha sido criada com a finalidade de garantir o acesso às informações, em seu capítulo IV seção V, restringe o acesso às informações sigilosas, somente às pessoas que necessitem conhecê-las como médicos, profissionais e estudantes da área da saúde, e delega a quem as usou, a obrigação do sigilo e a responsabilidade por seu uso indevido.

Belo Horizonte, 17 de junho de 2021.

*abusta*

Assinatura e carimbo profissional  
(Pesquisador Responsável)

Observações e especificidades do projeto de pesquisa (se for o caso):

Ciência da Gerência de Ensino e Pesquisa

Belo Horizonte, 23 de junho de 2021.

*Fabiana Inoue Kakehasi*

Assinatura do Gerente de Ensino e Pesquisa  
Prof.ª Fabiana Inoue Kakehasi  
Insc. 219738 CFM 30769  
PT - SEL 342 de 20/05/19  
HC-UFMG/EBSERH

## PRODUÇÕES

### I. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

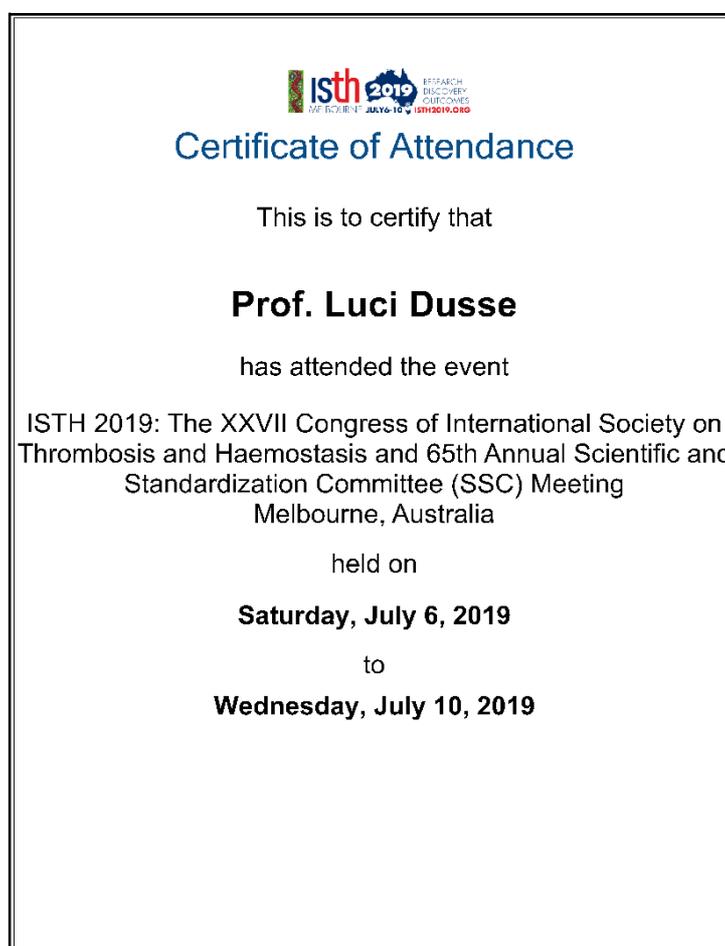
#### **XXVII Biennial Congress and 65rd Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**

Local: Melbourne, Austrália

Data: 08 a 13 de julho de 2019

Apresentação de pôster

- ◆ PB674: ENDOCAN AND HOMOCYSTEINE LEVELS IN BRAZILIAN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS
  
- ◆ PB1269: THROMBIN GENERATION TEST IN BRAZILIAN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS





## ENDOCAN AND HOMOCYSTEINE LEVELS IN BRAZILIAN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

PB1164

S. MARTINS<sup>1</sup>, L. ALVES<sup>1</sup>, C. CARDOSO<sup>1</sup>, F.D.M. LUCAS JUNIOR<sup>2</sup>, L. GODOI<sup>3</sup>, L. DUSSE<sup>1</sup>, P. ALPOIM<sup>1</sup> and A.P. MOTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Brazil.  
<sup>2</sup>Federal University of Minas Gerais, Brazil, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Brazil.  
<sup>3</sup>Technical College of the Federal University of Minas Gerais (COLTEC), Brazil.



Contact Information: correiosuellen@gmail.com

### INTRODUCTION

Although the success of Kidney Transplantation, the recipients still showed a high risk of adverse outcomes such as endothelial dysfunction and cardiovascular events. Endocan and Homocysteine are new markers for these events, could be potential models to evaluated post-transplant. Endocan plays a role in cell adhesion and inflammatory disorders. Homocysteine exerts its pathogenic action on the main processes involved in progression of vascular damage.

### AIM

Our aim was to investigate the relationship between Endocan and Homocysteine levels with evolution of allograft in renal transplant recipients (RTR).

### METHOD

In cross-sectional study, a total of 100 RTR were allocated in groups according to creatinine levels (C1≤1.5 and C2>1.5mg/dL); eGFR (R1≤60; R2>60mL/min/1,73m<sup>2</sup>); time post-transplantation (T1≤60; T2=61 to 119; T3≥120 months) and Donor type (Living or Deceased). Endocan plasma levels and Serum Homocysteine levels were measured by ELISA methods. All Data are presented as median and interquartile range, calculated by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test (Graphpad PRISMA 7.0 version and IBM-SPSS 23.0 version), P< 0.05 was significant.

### RESULTS

Higher levels of endocan and homocysteine were found in RTR with worst renal filtration function (C2 and R1 groups) in relation to the others (Figure 1A, 1B, 1C and 1D). There was no difference among time post-transplantation and donor type groups (Figure 1E, F, G and H).

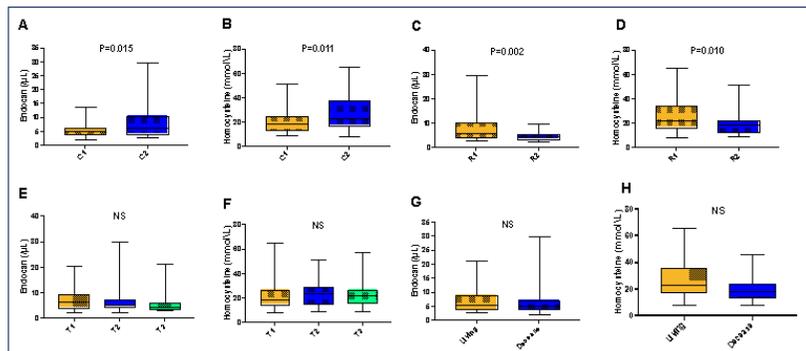


Figure 1- Endocan and Homocysteine levels in Brazilian Renal Transplantation Recipients. A and B: Creatinine levels; C and D: eGFR MDRD; E and F: Time post-transplant; G and H: Donor Type. P<0.05 was significant.

### CONCLUSIONS

Endocan and homocysteine levels were promising indicators of cardiovascular and cardiorenal risk in RTR, with association to renal function. Donor type and time post-transplantation showed no influence in mechanism of rising levels of endocan and homocysteine. However, further studies are needed to investigate the role of these biomarkers as a tool after transplantation.

### REFERENCES

- Malyszko J et al. Endocan concentration in kidney transplant recipients. Transplantation Proceedings, 2018; 2- 123.
- Sandesh Parajuli, MBBS et al. Hypercoagulability in Kidney Transplant Recipients. Transplantation, 2016; 100: 749-726.

### ACKNOWLEDGEMENTS



## THROMBIN GENERATION TEST IN BRAZILIAN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

PB1269

S. MARTINS<sup>1</sup>, L. ALVES<sup>1</sup>, C. CARDOSO<sup>1</sup>, F.D.M. LUCAS JUNIOR<sup>2</sup>, R.C. DUARTE<sup>1</sup>, M.D.G. CARVALHO<sup>1</sup>, L. DUSSE<sup>1</sup>, P. ALPOIM<sup>1</sup> and A.P. MOTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Brazil.  
<sup>2</sup>Federal University of Minas Gerais, Brazil, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Brazil.



Contact Information: correiosuellen@gmail.com

### INTRODUCTION

Thrombin Generation test, based in Calibrated Automated Thrombogram (CAT), is an approach in assessment bleeding or thrombosis risk. Once measure the thrombin formed in 60 minutes, resulted of pro and anticoagulant protein actions. Hypertension, endothelial injury, dyslipidemia, atherosclerosis and cardiovascular events are common adverse outcomes in Brazilian Renal Transplanted Recipients (RTR), which can lead to allograft rejection and death from all causes.

### AIM

Our aim was to investigate hemostatic profile measured by thrombin generation test of RTR in accordance to time post-transplantation and allograft function.

### METHOD

In cross-sectional study, we enrolled 100 RTR allocated in groups according to time post-transplantation (T1≤60; T2=61 to 119 and T3≥120 months) and eGFR (R1≤60 and R2>60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, calculated by MDRD equation). Informed consent was obtained from all participants and this study was approved by local Ethics Committee. Thrombin Generation test was performed by CAT method (Thrombinoscope BV®). All Data are presented as median and interquartile range, calculated by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test (Graphpad PRISMA 7.0 version and IBM-SPSS 23.0 version), P< 0.05 was significant.

### RESULTS

It was observed higher values of ETP and Peak parameters among RTR with greater time post-transplantation, signaling a greater thrombin generation suggesting a hypercoagulable state. Regarding graft function, there were no differences between groups for the thrombin generation parameters (Figure 1).

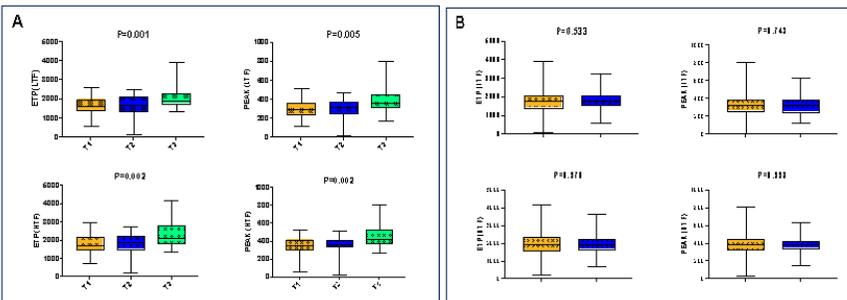


Figure 1- Figures 1. Endogenous thrombin potential (ETP) and peak in Low to factor (LTF) and High to factor (HTF) in RTR. A: time post-RT (T1≤60; T2=61 to 119 and T3≥120 months); B: RTR allocated in groups according estimated glomerular filtration rate (eGFR) (R1≤60 vs R2>60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, calculated by MDRD equation). All Data are presented as median and interquartile range, calculated by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test. P<0.05 was significant.

### CONCLUSIONS

The thrombin generation proved to be a promising test for evaluating the hemostatic profile between Brazilian RTR. It may be a useful tool for long-term cardiovascular risk assessment. Further studies are needed to better understand these parameters.

### REFERENCES

- BROPHY, D.; MARTIN, E. J.; GERR, T. W. B.; BEST, A. M.; PAUL, K.; CARR, I.R. Thrombin generation time: a novel parameter for monitoring enoxaparin therapy in patients with end-stage renal disease. J Thromb Haemost. 2006; 4(2):372-6.
- Hemler et al. Calibrated Automated Thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol Haemost. Thromb, 2003; 33(1):4-15.

### ACKNOWLEDGEMENTS



## ABTO 2019

Local: Campinas, São Paulo - Brasil

Data: 16 a 19 de outubro de 2019

Apresentação oral

- ◆ OR12429: Avaliação de biomarcadores da disfunção endotelial e sua associação com a função do enxerto em pacientes receptores do transplante renal.
- ◆ OR12432: Teste de geração de trombina para avaliação de pacientes receptores do transplante renal.

Apresentação de pôster

- ◆ PO314-17: Níveis de endocan e homocisteína em pacientes receptores do transplante renal

ID: 12434

**NÍVEIS DE ENDOCAN E HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL**

MARTINS, S R<sup>1</sup>; ALVES, LV<sup>1</sup>; CARDOSO, C N<sup>1</sup>; LUCAS-JUNIOR, F M<sup>2</sup>; GODOI, L C<sup>3</sup>; DUSSE, L M S<sup>1</sup>; ALPOIM, P N<sup>1</sup>; MOTA, A P L<sup>1</sup>

1. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.  
2. Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.  
3. Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC)

UFMG  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

\*Correspondente: corralesuellen@gmail.com

**INTRODUÇÃO**

O endocan é um marcador com papel na adesão celular e distúrbios inflamatórios. A homocisteína, derivada da metionina hepática, acarreta dano vascular. Assim, endocan e homocisteína são considerados novos marcadores da disfunção endotelial<sup>1</sup>. Neste contexto, objetivou-se investigar a relação entre os níveis de endocan e homocisteína com a evolução do enxerto em receptores de transplante renal (RTRs), visto que a integridade do endotélio vascular está associada com a melhor sobrevida dos RTRs<sup>1,2</sup>.

**MATERIAL E MÉTODO**

Cem (100) RTRs foram alocados em grupos de acordo com os níveis de creatinina (C1≤ 1,5 e C2> 1,5mg/dL), eRFG (R1≤ 60 e R2> 60mL/min/1,73m<sup>2</sup>) e tempo pós-transplante (T1≤ 60; T2= 61-119; T3≥ 120 meses). Os níveis de endocan foram mensurados pelo método de ELISA e homocisteína por turbidimetria. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (IQ) e a comparação entre os grupos, realizada pelos testes Mann-Whitney ou Kruskal-wallis (Graphpad PRISM, versão 7.0 e IBNS SPSS, versão 23.0). O valor de p≤0,050 foi considerado significativo.

**RESULTADOS**

Os RTRs com pior função renal apresentaram níveis elevados de endocan [C1= 4,9mg/dL (IQ=2,5); C2= 6,1mg/dL (IQ=6,4) e R1= 5,8mL/min/1,73m<sup>2</sup> (IQ=5,8); R2= 4,5mL/min/1,73m<sup>2</sup> (IQ=2,1)] e homocisteína [C1= 18,7mg/dL (IQ=11,2); C2= 22,7mg/dL (IQ=20,0) e R1= 22,3mL/min/1,73m<sup>2</sup> (IQ=17,2); R2= 18,6mL/min/1,73m<sup>2</sup> (IQ=9,3)] p<0,01 para todas as comparações. Não houve diferença para as análises em relação ao tempo pós-transplante.

**DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

Mesmo com o transplante renal bem sucedido, os RTRs ainda apresentam alto risco de complicações, tais como disfunção endotelial e eventos cardiovasculares<sup>1,3</sup>. O declínio da função renal cursa com um estado de ativação das células endoteliais vasculares e estado pró-inflamatório, favoráveis a estas complicações<sup>1,4</sup>. A elevação dos marcadores avaliados demonstrou que a falha renal pode estar associada com a disfunção endotelial. Estes achados, até o momento, nos pareceu mais relevante que a clássica associação com o tempo pós-transplante. Pode-se concluir que os níveis de endocan e homocisteína são ferramentas promissoras para o monitoramento de RTR.

**REFERENCIAS**

1. Maheshkumar et al., Endocan concentration in kidney transplant recipients, Transplantation Proceedings, 2018, 2, 123.
2. Sandesh Parajuli, NGBS et al., Hypercoagulability in Kidney Transplant Recipients, Transplantation, 2016,100, 718-726.
3. Mota AP et al. Hemostatic Parameters according to Renal Function and Time after Transplantation in Brazilian Renal Transplanted Patients. Dis. Markers 2015, 2015: 472750.
4. Martins SR et al., Cell-derived microparticles and von Willebrand factor in Brazilian renal transplant recipients. Nephrology 2019, 10, 1111,http.13657.

**Figura 1: Níveis de Endocan e Homocisteína em grupos de RTRs. AB: níveis de creatinina (C1≤ e C2> 1,5mg/dL); eRFG (R1≤ e R2> 60mL/min/1,73m<sup>2</sup>); E: Tempo pós-transplante.**

**PALAVRAS CHAVE**  
Transplante renal, Disfunção endotelial, Biomarcadores.

**SUPORTE**

UFMG, CNPQ, FAPESP, FAPEMIG, PPGACT



**XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES 2019 CAMPINAS**  
 Royal Palm Hall  
 16 - 19 de Outubro  
 XVIII Congresso Luso Brasileiro de Transplantes  
 XV Encontro de Enfermagem em Transplantes  
 Fórum de Histocompatibilidade da ABH  
**ABTO2019 | Inovação e Integração**



## Certificado

CERTIFICAMOS que o trabalho

**Avaliação de biomarcadores da disfunção endotelial e sua associação com a função do enxerto em pacientes receptores do transplante renal**

foi apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Transplantes, realizado no Royal Palm Hall, Campinas - SP, de 17 a 19 de outubro de 2019, como Tema Livre ORAL.

**Autores:** Suellen Rodrigues Martins, Lorraine Vieira Alves, Carolina Neres Cardoso, Rita Carolina Figueiredo Duarte, Fernando Mercês Lucas-Junior, Luci Maria Santana Dusse, Patrícia Nessleralla Alpoim, Ana Paula Lucas Mota

**Instituição:** UFMG - Minas Gerais - Brasil

Campinas, 19 de outubro de 2019

Paulo Manuel Pêgo Fernandes  
Presidente da ABTO

Marilda Mazzali  
Presidente do Congresso

Ilka de Fátima S. F. Boin  
Presidente da Comissão Científica



**XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES 2019 CAMPINAS**  
 Royal Palm Hall  
 16 - 19 de Outubro  
 XVIII Congresso Luso Brasileiro de Transplantes  
 XV Encontro de Enfermagem em Transplantes  
 Fórum de Histocompatibilidade da ABH  
**ABTO2019 | Inovação e Integração**



## Certificado

CERTIFICAMOS que o trabalho

**Teste de geração de trombina para avaliação de pacientes receptores do transplante renal**

foi apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Transplantes, realizado no Royal Palm Hall, Campinas - SP, de 17 a 19 de outubro de 2019, como Tema Livre ORAL.

**Autores:** Suellen Rodrigues Martins, Lorraine Vieira Alves, Carolina Neres Cardoso, Fernando Mercês Lucas-Junior, Rita Carolina Figueiredo Duarte, Maria Graças Carvalho, Luci Maria Santana Dusse, Patrícia Nessleralla Alpoim, Ana Paula Lucas Mota

**Instituição:** UFMG - Minas Gerais - Brasil

Campinas, 19 de outubro de 2019

Paulo Manuel Pêgo Fernandes  
Presidente da ABTO

Marilda Mazzali  
Presidente do Congresso

Ilka de Fátima S. F. Boin  
Presidente da Comissão Científica



**XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES 2019 CAMPINAS**  
 Royal Palm Hall  
 16 - 19 de Outubro  
 XVIII Congresso Luso Brasileiro de Transplantes  
 XV Encontro de Enfermagem em Transplantes  
 Fórum de Histocompatibilidade da ABH  
**ABTO2019 | Inovação e Integração**



## Certificado

CERTIFICAMOS que o trabalho

**Níveis de endocan e homocisteína em pacientes receptores do transplante renal**

foi apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Transplantes, realizado no Royal Palm Hall, Campinas - SP, de 17 a 19 de outubro de 2019, como Tema Livre POSTER.

**Autores:** Suellen Rodrigues Martins, Lorraine Vieira Alves, Carolina Neres Cardoso, Fernando Mercês Lucas-Junior, Lara C. Godói, Luci Maria Santana Dusse, Patrícia Nessleralla Alpoim, Ana Paula Lucas Mota

**Instituição:** Universidade Federal de Minas Gerais - Minas Gerais - Brasil

**Instituição:** Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais - Minas Gerais - Brasil

Campinas, 19 de outubro de 2019

Paulo Manuel Pêgo Fernandes  
Presidente da ABTO

Marilda Mazzali  
Presidente do Congresso

Ilka de Fátima S. F. Boin  
Presidente da Comissão Científica

## CONGRESSO MULTIPROFISSIONAL DA SANTA CASA

Local: Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil

Data: 21 a 24 de outubro de 2019

### Apresentação de pôster

- ◆ Avaliação dos níveis de Endocan e Homocisteína em pacientes receptores do transplante renal.
- ◆ Teste de geração de trombina para a avaliação de pacientes receptores do transplante renal.



## ARTIGOS PUBLICADOS

- MARTINS, S. R et al. Cell-derived microparticles and von Willebrand factor in Brazilian renal transplant recipients. **Nephrology**, doi:10.1111/nep.13657 2019

## NEPHROLOGY



*Nephrology* (2019)

Original Article

### **Cell-derived microparticles and von Willebrand factor in Brazilian renal transplant recipients**

SUELLEN R MARTINS,<sup>1</sup> LORRAINE V ALVES,<sup>1</sup> CAROLINA N CARDOSO,<sup>1</sup> LETÍCIA G SILVA,<sup>1</sup> FERNANDA FC NUNES,<sup>1</sup> FERNANDO DAS M DE LUCAS JÚNIOR,<sup>2</sup> ANA CS SILVA,<sup>3</sup> LUCI MS DUSSE,<sup>1</sup> PATRÍCIA N ALPOIM<sup>1</sup> and ANA PL MOTA<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Departament of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Department of <sup>2</sup>Surgery, Faculty of Medicine, and <sup>3</sup>Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

- MARTINS, SR; ALVES LV et al. COVID-19 in renal-transplanted recipients: a narrative review. **JBT J Bras Transpl.** V. 24, n. 2, p. 1-80, 2021.

## **COVID-19 IN RENAL-TRANSPLANTED RECIPIENTS: A NARRATIVE REVIEW**

### ***Covid-19 em pacientes transplantados renais: uma revisão narrativa***

*Suellen Rodrigues Martins\*<sup>a</sup>, Lorraine Vieira Alves\*<sup>a</sup>, Marta Lamounier Moura Vargas Corgozinho<sup>a</sup>;  
Jenner Karlisson Pimenta dos Reis<sup>b</sup>, Bruno Eduardo Fernandes Mota<sup>a</sup>, Kátia de Paula Farah<sup>c</sup>,  
Karina Braga Gomes<sup>a</sup>, Luci Maria Santana Dusse<sup>a</sup>, Patricia Nessralla Alpoim<sup>a</sup>, Ana Paula Lucas Mota<sup>a</sup>*