

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

SUELLEN RODRIGUES MARTINS

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E A SUA ASSOCIAÇÃO COM A
EVOLUÇÃO DO ENXERTO EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL**

Belo Horizonte - MG

2017

SUELLEN RODRIGUES MARTINS

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E A SUA ASSOCIAÇÃO COM A
EVOLUÇÃO DO ENXERTO EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL**

Dissertação 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 Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Lucas Mota - UFMG

Coorientadoras:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Nessralla Alpoim - UFMG

Prof^a. Dr^a. Luci Maria Sant'Ana Dusse - UFMG

Belo Horizonte-MG

2017

Colaboradores

- Dr. Fernando Lucas das Mêrces Júnior – Médico Nefrologista do Hospital das Clínicas da UFMG
- Dr. (a) Fernanda Freire Campos Nunes – Pós-doutoranda do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas 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 Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG
- Laboratório de Nefrologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFMG
- Ambulatório de transplantes da Unidade Bias Fortes do Hospital das Clínicas da UFMG
- Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG

Apoio Financeiro

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Dedico este trabalho à minha mãe, Terezinha, aos meus irmãos, Ricardo e Ronaldo, por todo o apoio e amor infinito. E em especial, ao Bernardo Calab, por sempre acreditar em mim e por dividir comigo todos os momentos da minha vida. Amo vocês! Obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu infinito amor. Por me guiar e amparar em todos os momentos e por ser tão generoso ao colocar em minha vida, pessoas iluminadas e especiais, como as minhas orientadora e coorientadoras, pessoas estas que guardarei eternamente em meu coração, devido ao imenso comprometimento e carinho, tornando essa trajetória mais leve e cheia de alegria.

Agradeço à professora Ana Paula Lucas Mota, hoje minha orientadora, que desde a graduação foi meu maior exemplo de docência, carisma, humildade e competência. Obrigada pelo incentivo à pesquisa, por sua dedicação, confiança e amizade.

À minha coorientadora, professora Patrícia Nessralla Alpoim, por sua imensa colaboração, desde o delineamento do projeto às análises genéticas, pela confiança e parceira em outros projetos, pelo carinho, amizade e comprometimento. Que doou seu tempo precioso dessa nova profissão que é ser mãe.

À minha coorientadora, professora Luci Maria Sant'Ana Dusse, por ter me "adotado cientificamente", pelo imenso carinho, por numerosas dicas e extensa experiência transmitida a mim ao longo desses anos e pela maravilhosa e bem-humorada companhia no congresso em Berlim.

Às equipes colaboradoras do Hospital Bias Fortes e da Faculdade de Medicina por permitirem a realização deste estudo em meio a rotina do ambulatório de transplantes e por disponibilizarem um ambiente para coleta e preparo das amostras.

Aos funcionários do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG que auxiliaram na coleta e atendimento aos participantes do estudo.

Aos receptores do transplante renal que contribuíram voluntariamente com este estudo. Sem eles este trabalho não seria possível.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo auxílio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Em especial, aos professores Adriano Sabino, Ieda Silva, Maria das Graças Carvalho, Tânia Guimarães e Vicente Toledo por todo apoio, carinho e atenção ao me auxiliarem em diversas questões e por compartilharem momentos únicos decorridos nessa jornada.

Às colaboradoras, professora Karina Borges por ceder o laboratório de bioquímica, me auxiliar no projeto e nas análises estatísticas; e Dra. Fernanda Freire pelo apoio e auxílio nas análises de citometria de fluxo e produção de resumos.

Às colegas, Alessandra Lovato, Aline da Paz, Laura Lara, Lorena Caixeta, Isabela Rodrigues, Kathryn Fontana, Rita Duarte e Tâmara Almeida pela amizade, carinho, por todo auxílio e apoio na pesquisa e por todas as maravilhosas risadas compartilhadas. Agradeço em especial à Fernanda Gontijo por ser minha terceira coorientadora, além da imensa amizade e à Carolina Neris e Lorraine Alves por dividirem comigo cada etapa deste projeto. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo.

Agradeço a todos os meus familiares que torcem por mim e vibram com cada objetivo alcançado. Em especial, à minha tia Alice Rodrigues, por me apoiar, incentivar e auxiliar em meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada!

“A estrada segue sempre em frente
Deixando a porta onde começa
Agora distante a estrada continua
E eu devo segui-la, se eu puder

Conquistando-a com meus pés ávidos
Até que ela se junte a um grande caminho
Onde muitas trilhas e tarefas se encontram
E para onde depois? Não sei dizer. ”

J.R.R. Tolkien - "A Sociedade do Anel"

RESUMO

O transplante renal é considerado o tratamento de escolha para pacientes com doença renal crônica em estágio terminal. O processo de rejeição é uma das principais causas de perda do enxerto, principalmente a longo prazo e pode afetar a integridade e a função das células endoteliais. A associação existente entre o transplante renal e a função endotelial pode ser avaliada por meio de biomarcadores como as micropartículas celulares (MPs), o Fator de von Willebrand (FvW) e os polimorfismos no gene da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS). O objetivo deste estudo foi investigar a relação de micropartículas endoteliais (EMP) e plaquetárias (PMP), do fator de von Willebrand (FvW) e dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da eNOS com a função do aloenxerto, o tempo pós-transplante e a presença de história prévia de rejeição em receptores do transplante renal. Foram avaliados 178 pacientes distribuídos em grupos de acordo com níveis de creatinina sérica; ritmo de filtração glomerular estimado - eRFG, tempo pós-transplante e a presença de história prévia de rejeição ao enxerto. Quanto ao número total de MPs, foi observado maior número de PMPs entre os pacientes com melhor função de filtração renal e, na avaliação de acordo com o tamanho, foi observado um predomínio de PMPs e EMPs de menor tamanho ($\leq 0,7\mu\text{m}$) entre os receptores com melhor função de filtração renal. Pacientes transplantados recentes apresentaram um predomínio de PMPs e EMPs de maior tamanho ($> 0,7\mu\text{m}$) em comparação àqueles pacientes com maior tempo pós-transplante. Elevados níveis de FvW foram observados entre os receptores com níveis intermediários de creatinina e entre aqueles com história prévia de rejeição. A análise de carreadores alélicos revelou menor frequência do carreador b do polimorfismo VNTR b/a entre os receptores com pior função de filtração renal e uma maior frequência do haplótipo T-C-b foi observada entre os pacientes com melhor função de filtração renal. Os resultados encontrados para as frequências alélicas, genotípicas, modelos de carreadores alélicos e análise de haplótipos dos polimorfismos estudados de acordo com a história de rejeição não mostraram diferenças entre os grupos. Correlações negativas foram observadas entre o tempo pós-transplante e as PMPs e EMPs; entre os níveis de creatinina e as contagens de plaquetas, entre os níveis de creatinina e as MPs totais; entre o eRFG e o FvW. Por outro lado, as contagens de plaquetas correlacionaram-se positivamente com o eRFG, com os níveis de PMPs e com os níveis de EMPs. Assim, tendo em vista as análises realizadas, conclui-se que o declínio da função do aloenxerto renal pode ser caracterizado por variados perfis de PMPs e EMPs e por níveis aumentados do FvW. Em contrapartida, a presença do alelo b do polimorfismo VNTR b/a foi relacionado com melhores níveis de creatinina, sendo considerado um potencial biomarcador no transplante renal.

Palavras-chave: Transplante renal; Micropartículas endoteliais; Micropartículas plaquetárias; Fator de von Willebrand; Polimorfismos no gene da sintase endotelial do óxido nítrico.

ABSTRACT

Renal transplantation is considered the treatment of choice for patients with end-stage renal disease. The rejection process is one of the main causes of graft loss, especially in the long term and can affect the integrity and the function of endothelial cells. The association between renal transplantation and endothelial function can be evaluated using biomarkers such as cell microparticles (MPs), von Willebrand Factor (vWF) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms. The aim of this study was to investigate the relation of endothelial (EMP) and platelet microparticles (PMP), von Willebrand factor (vWF) and G894T, T-786C and VNTR b/a polymorphisms in the eNOS gene with allograft function, post-transplantation time and presence of previous history of rejection in renal transplant recipients. A total of 178 patients were evaluated, distributed into groups according to creatinine plasma levels, estimated glomerular filtration rate – eRFG, post-transplantation time and presence of previous history of allograft rejection. Regarding the total number of MPs, higher levels of PMPs were observed among patients with better renal filtration function and in the assessment according to diameter, levels of PMPs and EMPs of smaller size ($\leq 0.7 \mu\text{m}$) were also increased in recipients with better renal filtration function. Recipients with shorter post-transplantation time had a predominance of PMPs and EMPs of larger size ($>0.7\mu\text{m}$) compared to patients with longer post-transplant time. Higher levels of vWF were observed among the recipients with intermediate creatinine levels and those with a previous history of rejection. The analysis of allelic carriers revealed lower frequency of carrier b of the VNTR b/a polymorphism in receptors with the worst renal filtration function and a higher frequency of the T-C-b haplotype was observed among patients with better renal filtration function. The results found for allelic and genotypic frequencies, allelic carrier models and haplotype analysis of the studied polymorphisms according to rejection history showed no differences between groups. Negative correlations were observed between post-transplantation time and PMPs and EMPs; between creatinine levels and platelet counts, and with total MPs; between the eRFG and the FvW. On the other hand, platelet counts positively correlated with eRFG, PMPs and EMPs levels. Thus, according to the analyses performed, it is concluded that the decline of renal allograft function may be characterized by varying profiles of PMPs and EMPs and by increased levels of vWF. In contrast, the presence of the b allele of the VNTR b/a polymorphism was related to better creatinine levels, being considered a potential biomarker in renal transplantation.

Keywords: Renal Transplantation; Endothelial Microparticles; Platelets Microparticles; von Willebrand factor; endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

1 Esquema representativo do transplante renal	23
2 Quadro “O milagre dos santos Cosme e Damião” por mestre Stettener, séc. XVI	24
3 Representação esquemática do processo de formação das vesículas extracelulares e as diferenças do diâmetro entre elas.	40
4 Representação do processo de formação das micropartículas celulares (MPs).	41
5 Representação esquemática do processo de clivagem dos gmFvWs pela ADAMTS13.....	44
6 Representação esquemática do processo de formação do óxido nítrico (NO) nas células endoteliais.....	48
7 Estratégia de análise para a quantificação das micropartículas (MPs).	61
8 Estratégia de análise por tamanho das micropartículas (MPs).....	62
9 Gel de poliacrilamida contendo fragmentos obtidos após realização da PCR (VNTR b\la) e digestão com endonucleases de restrição (G894T e T-786C).	66
10 Comparação entre os níveis de micropartículas totais (MPs), micropartículas plaquetárias (PMPs) e micropartículas endoteliais (EMPs) nos diferentes grupos estratificados de acordo com os níveis de creatinina sérica (C1<1,4mg/dL; C2: 1,4 e 2,0mg/dL e C3: >2,0mg/dL).....	71
11 Comparação entre os níveis de micropartículas totais (MPs), micropartículas plaquetárias (PMPs) e micropartículas endoteliais (EMPs) nos diferentes grupos estratificados de acordo com o tempo pós-transplante (T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses e T4: acima 120 meses pós-transplante).....	73
12 Comparação entre os níveis plasmáticos do fator de von Willebrand (FvW) nos diferentes grupos de RTx.	75

LISTA DE TABELAS

1 Caracterização clínica e demográfica dos integrantes do estudo	68
2 Comparação dos níveis e tamanhos das micropartículas de acordo com o ritmo de filtração glomerular	72
3 Comparação dos níveis e tamanhos das micropartículas de acordo com a história de rejeição prévia.....	74
4 Comparação dos níveis do Fator de von Willebrand em receptores do transplante renal.....	75
5 Distribuição e comparação das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com os níveis séricos de creatinina	76
6 Distribuição genotípica referente aos carreadores alélicos dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com os níveis séricos de creatinina.....	77
7 Frequências haplotípica dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da sintase do óxido nítrico endotelial nos grupos estratificados de acordo com os níveis de creatinina sérica.	78
8 Distribuição e comparação das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição.....	78
9 Frequências genóticas referentes aos carreadores alélicos dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição	79
10 Frequências haplotípicas dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da sintase do óxido nítrico endotelial nos grupos com e sem história de rejeição ao enxerto	80
11 Análise de correlação entre os parâmetros avaliados nos receptores do transplante renal.	80

LISTA DE QUADROS

1	Números absolutos de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil entre janeiro de 2007 e março de 2017	27
2	Principais contraindicações absolutas e relativas para o transplante renal	29
3	Resumo dos critérios para classificação das categorias Banff em vigor	34
4	Descrição das etapas empregadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) para a genotipagem dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da sintase do óxido nítrico endotelial.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ADAMTS13	<i>A desintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like member 13</i>
ADMA	L-Arginina Dimetil Assimétrica
APC	<i>Allophycocyanin</i> , tradução (aloficocianina)
ARA	Antagonistas dos Receptores da Angiotensina
ATP	<i>Adenosine Tri-Phosphate</i> , tradução (Adenosina trifosfato)
CAAE	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
CD41a	<i>Cluster of Differentiation forty one a</i> , tradução (grupamento de diferenciação quarenta e um a)
CD51	<i>Cluster of Differentiation fifty one</i> , tradução (grupamento de diferenciação cinquenta e um)
CD154	<i>Cluster of Differentiation one hundred fifty four</i> , tradução (grupamento de diferenciação cento e cinquenta e quatro)
CIHDOTT's	Comissões Intra-Hospitalares de Doação de Órgão e Tecidos para Transplantes
CNCDO	Centrais de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos
CMV	Citomegalovírus
CsA	Ciclosporina
DEPE	Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão
DM	Diabetes Mellitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , tradução (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i> , tradução (Desoxinucleótido Trifosfato)
DRC	Doença Renal Crônica
DRCT	Doença Renal Crônica Terminal
DCV	Doença Cardiovascular
ECA	Enzima Conversora de Angiotensinogênio
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , tradução (ácido tilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immune Assay</i> , tradução (Ensaio Imunoenzimático)
EMPs	<i>Endothelial Microparticles</i> , tradução (micropartículas endoteliais)
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> , tradução (sintase do óxido nítrico endotelial)
eRFG	Ritmo de Filtração Glomerular estimado
EUA	Estados Unidos da América
FIAT	Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> , tradução (Isotiocianato de fluoresceína)
FSC	<i>Forward Scatter</i>

FT	Fator Tissular
FvW	Fator de von Willebrand
GMPc	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> , tradução (monofosfato cíclico de guanosina)
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HD	Hemodiálise
HLA	Human Leukocyte Antigen, tradução (antígeno leucocitário humano)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , tradução (vírus da imunodeficiência humana)
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> , tradução (sintase do óxido nítrico induzido)
RNAi	<i>Ribonucleic acid interference</i> , tradução (ácido ribonucleico de interferência)
ITU	Infecção do Trato Urinário
IQ	Intervalo interquartil
gmFvW	grandes multímeros do Fator de von Willebrand
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MHC	Major Histocompatibility Complex, tradução (complexo principal de histocompatibilidade)
MMF	Micofenolato mofetil
MPs	Micropartículas celulares
ND	Não Determinado
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i> , tradução (sintase do óxido nítrico neuronal)
NO	<i>Nitric Oxide</i> , tradução (óxido nítrico)
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> , tradução (sintases do óxido nítrico)
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tradução (tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , tradução (Reação em Cadeia de Polimerase)
PDN	Prednisona
PE	Peroxidase
pmp	por milhão de população
PMP	<i>Platelets Microparticles</i> , tradução (micropartícula plaquetária)
PLP	Plasma Livre de Plaquetas
PPGACT	Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
q.s.p.	quantidade suficiente para
RA	Rejeição Aguda
Rapa	Rapamicinas

RC	Rejeição Crônica
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , tradução (polimorfismo de fragmentos de restrição)
RH	Rejeição Hiperaguda
RNA _m	<i>messenger Ribonucleic acid</i> , tradução (ácido ribonucleico mensageiro)
RTx	Receptores do Transplante renal
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SD	Desvio-padrão
Shear-stress	Pressão de hemodinâmica de cisalhamento do sangue
SNP	<i>Single-nucleotide Polymorphism</i> , tradução (polimorfismos de nucleotídeo único)
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
SSC	<i>Side Scatter</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TAC	Tacrolimus
TCR	<i>T cell receptor</i> , tradução (receptor de Célula T)
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TM	Trombomodulina solúvel
TRR	Terapia de Reposição Renal
Tx	Transplante renal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i> , tradução (repetição em tandem de número variável)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1 Transplante renal	22
2.1.1 História dos transplantes.....	23
2.1.2 O transplante renal no Brasil.....	26
2.1.3 Classificação dos potenciais doadores e receptores	29
2.2 Aspectos gerais do sistema imunológico no transplante renal	32
2.2.1 Rejeição ao Enxerto	33
2.2.1.1 Rejeição hiperaguda	34
2.2.1.2 Rejeição aguda	35
2.2.1.3 Rejeição crônica.....	36
2.3 Endotélio vascular	37
2.4 Micropartículas celulares.....	38
2.4.1 A formação das micropartículas.....	39
2.4.2 Micropartículas derivadas das plaquetas e células endoteliais.....	42
2.5 Fator de von Willebrand	43
2.6 Óxido Nítrico.....	45
2.6.1 Sintase do Óxido Nítrico endotelial e seus principais polimorfismos	47
2.7 A disfunção endotelial no transplante renal	51
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1 Delineamento experimental e aspectos éticos.....	54
4.2 Casuística.....	55
4.2.1 Critérios de inclusão.....	57
4.2.2 Critérios de exclusão\ Não inclusão	57
4.3 Amostras biológicas	58

4.3.1 Preparo das amostras biológicas	58
4.4 Métodos.....	59
4.4.1 Isolamento das micropartículas e análise por citometria de fluxo	59
4.4.1.1 Purificação das Micropartículas	59
4.4.1.2 Quantificação e fenotipagem das micropartículas	59
4.4.2 Determinação dos níveis plasmáticos do Fator de von Willebrand	62
4.4.4 Análise molecular dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial ...	63
4.4.4.1 Extração do DNA.....	63
4.4.4.2 Reação em cadeia da polimerase e Polimorfismo de fragmentos de restrição	63
4.5 Produção do banco de dados	66
4.6 Análise estatística	67
5 RESULTADOS	68
5.1 Caracterização clínica e demográfica dos receptores do enxerto renal	68
5.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de micropartículas endoteliais e plaquetárias	70
5.3 Avaliação dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand.....	74
5.4 Determinação e comparação das frequências dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da sintase do óxido nítrico endotelial	76
5.5 Análise de correlação entre os parâmetros avaliados	80
6 DISCUSSÃO	82
6.1 Caracterização clínica e demográfica dos receptores do enxerto renal	82
6.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de micropartículas endoteliais e plaquetárias	88
6.3 Avaliação dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand.....	92
6.4 Determinação e comparação das frequências dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da sintase do óxido nítrico endotelial	95
7 CONCLUSÕES	99
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	100
9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A busca por uma terapia de reposição de órgão está presente desde os tempos antigos, com relatos datados por volta de 348 d.C. A partir do início do século XX, os transplantes de órgão em humanos foram se tornando cada vez mais possíveis. Entretanto, apenas meio século após os primeiros estudos envolvendo os transplantes, foi alcançado o tão sonhado sucesso da terapia. O transplante renal foi o pioneiro, e sua história foi importante para a evolução dos procedimentos cirúrgicos e demais técnicas envolvendo a reposição de órgãos e tecidos (KROTH, 2015; PEREIRA, 2004).

O transplante renal é o tratamento de escolha para pacientes com doença renal crônica em estágio avançado ou terminal (DRCT), dos quais inúmeros são dependentes das terapias dialíticas para manutenção da vida. Tem como objetivo proporcionar melhorias na qualidade de vida e maior sobrevida para estes pacientes. Mesmo assim, os receptores do transplante renal (RTx) ainda apresentam elevado risco de complicações cardiovasculares, em parte devido ao efeito dos próprios imunossupressores. Embora o número de receptores com aloenxerto funcional tenha aumentado significativamente, o processo de rejeição ainda é uma das principais causas de perda do enxerto renal (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015; MOTA *et al.*, 2015).

O Brasil é um dos principais países que realizam transplantes no mundo, além de dispor do maior programa de assistência pública gratuito para realização de transplantes de órgãos sólidos e tecidos. No ano de 2016 foram realizados, no total, 5.512 transplantes renais, correspondendo a 24,6% do número de órgãos sólidos transplantados no país. Entretanto este número está longe de ser o ideal (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO, 2017a).

O número de pacientes em lista de espera para a realização do transplante renal aumentou em relação a 2015. Em março de 2017 o número era de 20.965 pacientes, cerca de 30-35% da prevalência em diálise. Este aumento pode proporcionar uma elevação do risco de mortalidade em fila. Diante de todos esses fatores, tem-se cada vez mais uma maior necessidade de aprimorar os aspectos relacionados tanto à doação de órgãos, quanto às terapias de manutenção. Além de melhores métodos de diagnóstico dos eventos de rejeição e de outras comorbidades que culminam de forma invariável com a perda do enxerto renal (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO, 2016, 2017a).

O endotélio vascular tem um importante papel no processo de rejeição, sendo considerado a primeira interface entre doador e receptor no pós-transplante renal. A sua integridade é essencial para uma boa funcionalidade do enxerto. O endotélio apresenta inúmeras funções no organismo, tais como regular o tônus vascular, garantir um estado vascular antitrombótico e secretar importantes mediadores como o Óxido Nítrico (NO) e o Fator de von Willebrand (FvW) (AL-MASSARANI *et al.*, 2008; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A disfunção endotelial, definida como perda rápida ou progressiva das funções das células endoteliais vasculares, pode se manifestar como alterações temporárias ou permanentes, sendo considerada um evento chave para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. É sabido que alguns polimorfismos do gene da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) vem sendo considerados como fatores predisponentes para a disfunção endotelial, principalmente polimorfismos relacionados à redução dos níveis sintetizados de NO, tais como, -894T e -786C (AL-MASSARANI *et al.*, 2008).

As principais metodologias utilizadas na prática clínica para o diagnóstico da rejeição ao enxerto e monitoramento da função renal são a dosagem da creatinina sérica e a análise da biópsia do enxerto. Infelizmente ambas apresentam desvantagens. A creatinina sérica é um marcador não-específico para o diagnóstico de disfunção do aloenxerto e a biópsia, considerada a metodologia padrão ouro, é um procedimento invasivo e de alto custo. Assim, torna-se bastante oportuno avaliar novos biomarcadores sanguíneos não-invasivos e associá-los à função renal, a fim de determinar precocemente eventos favoráveis à rejeição do aloenxerto em RTx (AL-MASSARANI *et al.*, 2008; DURSUN; YEL; UNSUR, 2015).

As micropartículas celulares (MPs) vêm sendo estudadas como potenciais biomarcadores no transplante renal. São caracterizadas como pequenas vesículas, de origem celular, formadas a partir da membrana plasmática da célula progenitora, após processos de ativação celular ou apoptose. Apresentam inúmeras funções que podem ser mediadas por interação com receptores de membrana específicos do tipo celular que as originou e com células alvo próximas ou não do seu local de formação. As MPs podem também interagir com células alvo através da fusão membranar, liberando seu conteúdo vesicular no interior daquelas; Estão constantemente presentes na circulação sanguínea e em outros líquidos corporais e podem, assim, estar implicadas na regulação de órgãos e tecidos remotos (SHANTSILA *et al.*, 2014).

Diversos estudos demonstraram a presença de níveis mais elevados de MPs circulantes em pacientes com doença cardiovascular e síndrome urêmica. As micropartículas endoteliais (EMP) e plaquetárias (PMP) podem induzir ou aumentar a disfunção vascular pré-existente, devido sua capacidade em prejudicar a liberação de NO das células endoteliais em pacientes com DRCT. A avaliação dos níveis das EMP e PMP pode fornecer informações úteis sobre o papel do endotélio vascular no processo de rejeição do aloenxerto renal, além de fornecer uma nova metodologia para definir ou adaptar um esquema terapêutico pós-transplante (AMABILE *et al.*, 2005; DURSUN; YEL; UNSUR, 2015; HORN *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2015).

Outro biomarcador que vem sendo considerado um potencial marcador para a disfunção endotelial é o FvW. Apresenta um papel crucial para a manutenção da hemostasia. Níveis plasmáticos elevados de FvW estão associados aos processos trombóticos e ateroscleróticos, bem como com a redução da função do endotélio (ALPOIM *et al.*, 2011; XIANG; HWA, 2016).

No presente estudo, os seguintes marcadores foram selecionados para avaliação dos RTx: EMP, PMP, FvW e polimorfismos da eNOS (VNTR b/a, G894T e T-786C). A seleção foi baseada na análise da importância biológica de tais marcadores, na disponibilidade comercial para a realização dos ensaios e na escassez de estudos sobre MPs no transplante renal, especialmente no Brasil. A avaliação de EMP e PMP, correlacionando-as com os demais biomarcadores (FvW e os polimorfismos da eNOS) é, portanto, um estudo inédito nos RTx. Deste modo, este estudo se justifica plenamente, contribuindo para a definição de novas ferramentas para o monitoramento e com valor prognóstico no pós-transplante renal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transplante Renal

O transplante é um procedimento cirúrgico que consiste na reposição de um órgão ou tecido de uma pessoa doente (receptor), por outro órgão ou tecido saudável, proveniente de um doador (falecido ou vivo), que será relocado no receptor carente de sua função. O órgão ou tecido a ser transplantado também pode ser chamado de enxerto. Em consideração a origem do enxerto e seu receptor, os transplantes podem ser denominados como:

- ◆ **Autólogo ou auto-enxerto:** Doador e receptor são a mesma pessoa, comum em transplantes de tecidos;
- ◆ **Singênico ou isoenxerto:** Originado de indivíduos geneticamente idênticos. Transplantes singênicos apresentam baixo ou ausente risco de rejeição;
- ◆ **Alogênico ou aloenxerto:** Enxerto de origem geneticamente distinta, porém da mesma espécie do receptor. Grande maioria dos transplantes realizados;
- ◆ **Xenogênicos ou xenoenxerto:** Doador e receptor são de espécies distintas. Um exemplo de xenotransplante é a substituição de válvulas cardíacas doentes de humanos por válvulas saudáveis de origem suína (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

O transplante deve ser mantido e monitorado por diversos esquemas terapêuticos, que visam a não recusa do órgão pelo receptor, denominada por rejeição do enxerto (ABBAS; LICHTMAN, 2007). O transplante renal é o tratamento de escolha para os pacientes com Doença Renal Crônica Terminal (DRCT), no qual o rim saudável doado é transplantado na fossa ilíaca do receptor. Os rins nativos permanecem em sua posição natural, a menos que seja necessário sua remoção (nefrectomia). O rim doado passará agora a exercer e complementar as funções renais (**Figura 1**). É considerada a forma mais eficaz de Terapia de Reposição Renal (TRR) por proporcionar um aumento na sobrevida do paciente a longo prazo, e uma melhor qualidade de vida se comparado às outras formas de TRR (diálise peritoneal, hemodiálise e hemofiltração) (JUNG; LEE; KWON, 2012; MATOS *et al.*, 2016).

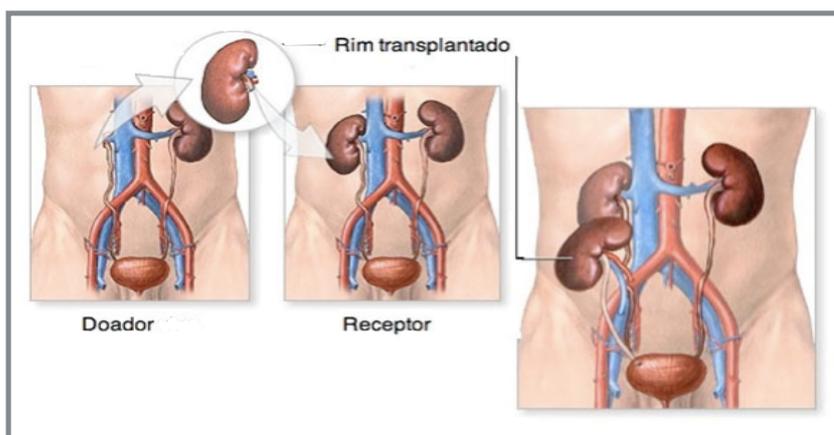


Figura 1- Esquema representativo do transplante renal.
Fonte: Adaptado de SBN, 2009.

2.1.1 História dos transplantes

A história dos transplantes se inicia desde os tempos mais remotos, povoando o imaginário das pessoas, fundada em crenças religiosas e relatos míticos. A história do transplante renal acompanha a evolução dos transplantes como um todo, por ser o pioneiro e mais bem estudado dentre os demais. Um dos primeiros relatos, datado por volta de 348 d.C., conta a história de dois irmãos gêmeos e médicos que teriam transplantado a perna de um soldado etíope recém-falecido em um sacristão idoso que havia perdido sua perna naquele mesmo dia. O sacristão recuperou-se e voltou a caminhar. Os médicos foram perseguidos, julgados e executados por Diocleciano por atenderem a população de forma gratuita e benevolente. Tornaram-se mártires e santos. Hoje são conhecidos como os santos São Cosme e Damião, padroeiros dos médicos cirurgiões e farmacêuticos (**Figura 2**) (KROTH, 2015; PEREIRA, 2004).

Na primeira década do século XX, grandes cientistas impulsionaram as pesquisas experimentais e a aplicação clínica dos transplantes de órgãos. Em 1902, o cirurgião Emerich Ullmann concretizou o primeiro bem-sucedido transplante de órgãos experimental na Escola de Medicina de Viena, onde ele realizou um autotransplante de rim canino para os vasos do pescoço do cão, sendo observado débito urinário resultante (PEREIRA, 2004).

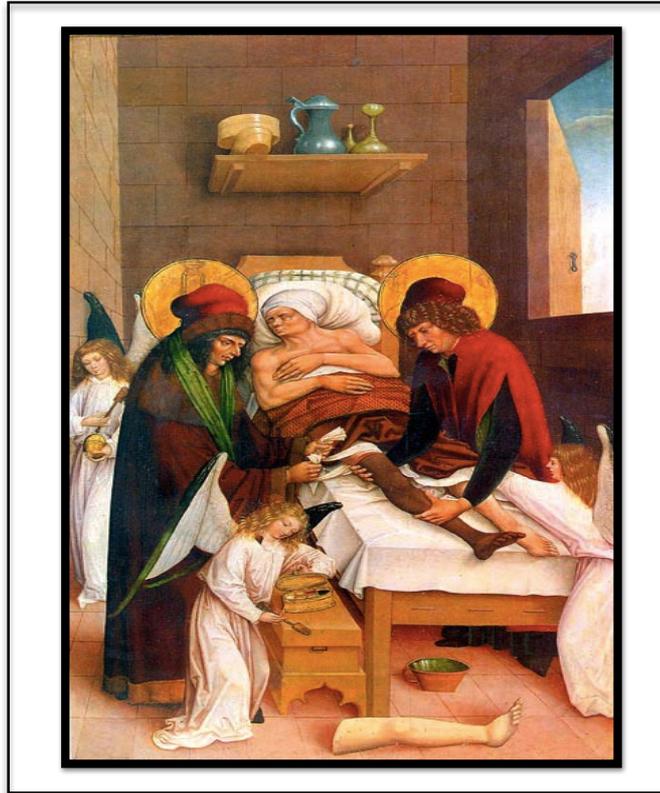


Figura 2- Quadro “O milagre dos santos Cosme e Damião” por mestre Stettener, século XVI. Acervo do *Württembergisches Landesmuseum*, Stuttgart, Alemanha. Fonte: Página *Image of Surgery*; Disponível em: http://www.imageofsurgery.com/surgery_history_art.htm.

Outro grande contribuidor foi Alexis Carrel, que em um de seus experimentos de transplantação de rim canino, obteve sobrevivência de até nove meses para um dos animais estudados. Ele foi o primeiro a descrever a importância das anastomoses arteriovenosas, permitindo assim a transposição de órgãos vascularizados. Alexis Carrel, em 1912, recebeu o Prêmio Nobel por suas contribuições para as cirurgias vasculares e de transplantes. Contribuiu também com inúmeras outras descobertas, como a solução antisséptica Carrel-Dakin, utilizada no tratamento de soldados durante a primeira guerra mundial, além de melhorias e criações de técnicas de cultivo celular e de preservação de órgãos fora do corpo, que deram a ele o título de “Pai dos transplantes de órgãos” (COOPER; EKSER; TECTOR, 2015; DUTKOWSKI; DE ROUGEMONT; CLAVIEN, 2008).

O primeiro relato de transplante de órgãos em humano data de 1902, realizado pelo cirurgião Ullmann, que transplantou rim suíno em uma mulher com síndrome nefrótica. Em 1906, há outro relato por Mathieu Janoulay, em Lyon, onde realizou dois xenotransplantes renais com funcionamento de 1 hora cada. Em 1933, foi realizado o

primeiro alotransplante renal, por Voronoy. Entretanto, um dos primeiros relatos bem-sucedidos datam da década de 50. Em 23 de dezembro de 1954, Joseph Murray realizou o primeiro transplante renal singênico. O enxerto apresentou sobrevida de 11 meses (KROTH, 2015; PEREIRA, 2004; RIELLA, 2003).

Em um cenário margeado por insucessos, várias hipóteses surgiam na tentativa de explicar as causas da perda do enxerto. Ainda em meados da década de 50, foram descritas as bases de um sistema antigênico expresso na superfície das células, chamado de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), do inglês *Human Leukocyte Antigens*. Posteriormente, foi verificado que se tratava do sistema principal de histocompatibilidade em humanos. Guthrie foi quem sugeriu pela primeira vez o envolvimento do sistema imunológico, o que impulsionou diversos estudiosos a avançarem por este campo. Peter Medawar desenvolveu suas pesquisas com enxertos de pele em coelhos e ganhou o Prêmio Nobel em 1960 ao descrever “as leis do transplante”. De forma sucinta, ele constatou que o processo de rejeição do enxerto seguia as mesmas leis da resposta imunológica contra o não-próprio, com especificidade e geração de células de memória. E Jean Dausset, Prêmio Nobel de Medicina em 1980, demonstrou a influência do HLA em transplante de pele em humanos. O HLA do enxerto foi então considerado o principal alvo da resposta imune do receptor. Sua compreensão passou a ser fundamental para o entendimento dos mecanismos de rejeição (KROTH, 2015; PEREIRA, 2004; RIELLA, 2003).

Com o advento da imunossupressão, melhorias das técnicas cirúrgicas, avanços das tipagens teciduais com o desenvolvimento dos testes de prova cruzada e conhecimentos acumulados em torno dos processos de rejeição, a história dos transplantes tornou-se mais relevante. Dando início a uma nova fase para o transplante renal, bem como para os outros órgãos e tecidos, devido ao aumento da sobrevida do aloenxerto e maior qualidade de vida para os receptores. Com o surgimento da ciclosporina em 1976 e o seu emprego nas terapias de manutenção dos transplantes em 1983, o transplante de órgãos foi se transformando cada vez mais em uma forma de terapia efetiva (BARROS *et al.*, 2006; KROTH, 2015; PEREIRA, 2004).

2.1.2 O transplante renal no Brasil

O primeiro transplante renal realizado no Brasil foi em 16 de abril de 1964 no Hospital dos Servidores no Rio de Janeiro, mas o receptor perdeu o enxerto devido a rejeição aguda (RA) e faleceu no oitavo dia pós-operatório. O primeiro transplante bem-sucedido ocorreu em janeiro de 1965, com doador vivo, realizado no Hospital das Clínicas de São Paulo e o primeiro com doador falecido ocorreu no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A partir daí o número de transplantes renais realizados aumentou progressivamente, ganhando visão internacional (KROTH, 2015; PEREIRA, 2004).

Devido a nova realidade favorável no cenário dos transplantes, a captação de grande número de órgãos e tecidos provenientes de doador falecido tornou-se imperiosa para a realização em grande escala dos transplantes. Dessa forma foi necessário o desenvolvimento de conceitos éticos e legislativos a fim de assegurar suporte legal para os procedimentos, além de resguardar a gratuidade do ato de doação e direitos, tanto para o doador quanto para o receptor. Em 8 de janeiro de 1988, foi criada no Brasil a Resolução 1.246 do Conselho Federal de Medicina, que no capítulo VI, retrata o tema Doação e Transplante de Órgãos e Tecidos. A partir daí, inúmeras resoluções foram criadas e substituídas com o objetivo de suprir as questões em aberto que surgiam ao longo dos avanços dos procedimentos (ABTO, 2009; PEREIRA, 2004).

As práticas clínicas envolvidas no transplante renal obedecem diversas leis e estatutos. No Brasil, a Lei nº 9.434/1997 conhecida como a Lei da Doação Presumida de Órgão foi uma das primeiras a serem formuladas. Ela determinava que qualquer indivíduo que venha a falecer seria um potencial doador de órgão, sem a necessidade da consulta familiar, sendo que o cidadão contrário à doação de órgãos necessitava documentar sua decisão em vida. Devido sua má repercussão na população e entidades médicas, foi editada dando origem à Lei nº 10.211, em 23 de março de 2001, quando voltou a ser utilizado o consentimento informado. A nova legislação passou a regular também todos os programas assistenciais, além de equipes e instituições. Tal resolução em vigor para a política nacional de transplantes está em sintonia com as Leis nº 8.080/1990 e nº 8.142/1990 que regem o funcionamento do

Sistema Único de Saúde (SUS) (ABTO, 2009; SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, 2014).

Em 1997, através do Decreto Federal nº. 2.268, foram criados no Brasil órgãos para controle, registro e fiscalização dos procedimentos relacionados aos transplantes de órgãos e tecidos financiados pelo SUS. Dentre eles foram criados o Sistema Nacional de Transplantes (SNT) e as Centrais de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos (CNCDO), presentes em cada estado. A partir de 2001, por determinação da portaria GM/MS nº 905/2000, foram criadas as Comissões Intra-Hospitalares de Doação de Órgãos e Tecidos para Transplantes (CIHDOTTs) que possuem um importante papel em todas as etapas do processo de transplante. Atualmente, estão em atividade 673 CIHDOTTs em todo o país. O Brasil possui o maior sistema público de transplantes do mundo, onde aproximadamente 95% dos procedimentos e cirurgias são realizados por meio da utilização dos recursos públicos. O SUS oferece assistência integral ao paciente transplantado (ABTO, 2017b; BRASIL, 2017).

O Ministério da Saúde e a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) divulgaram, pelo Registro Brasileiro de Transplantes (RBT), os dados numéricos referentes à atual situação do país em relação aos transplantes de órgãos e tecidos realizados em cada estado. O **Quadro 1** evidencia a evolução dos transplantes de órgãos em números absolutos realizados no Brasil, de janeiro de 2007 até março de 2017.

Quadro 1 – Números absolutos de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil entre janeiro de 2007 e março de 2017

Órgãos	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017*	Jan\07-mar\17
Coração	161	201	201	166	160	228	271	311	353	357	83	2.492
Fígado	1.008	1.177	1.334	1.413	1.496	1.600	1.722	1.757	1.809	1.881	506	15.703
Pâncreas	163	174	160	133	181	153	143	128	120	134	32	1.521
Pulmão	46	53	59	61	49	69	80	67	74	92	16	666
Rim	3.475	3.823	4.298	4.662	4.993	5.435	5.657	5.657	5.590	5.512	1.416	50.325

*Dados referentes ao primeiro trimestre de 2017.
Fonte: ABTO, 2017a

Em 2016 foram realizados 5.512 transplantes renais, sendo 1.216 com doadores vivos e 4.296 com doadores falecidos. O estado de São Paulo é o principal estado transplantador, onde foram realizados cerca de 2.049 transplantes renais, seguido por Minas Gerais, com cerca de 563 cirurgias. Infelizmente, houve uma redução de 1,7% no número de transplantes renais feitos no ano de 2016 em relação ao ano anterior. O Ministério da Saúde justifica esta queda devido à diminuição dos transplantes renais com doador falecido (redução de 2,4%), mesmo com o aumento da taxa dos doadores efetivos. Estes dados atentam para um provável aumento dos descartes dos aloenxertos e da recusa de doação pelas famílias. Em relação aos doadores vivos, os números são animadores. Houve uma estabilização no número de doadores vivos com um consequente crescimento de 0,9%, após dez anos em constante queda. Mesmo assim, a atual taxa de 5,9 por milhão de população (pmp) se encontra muito abaixo da taxa ideal, a qual gira em torno de 10 pmp (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO, 2017a; MOTA *et al.*, 2016).

Os números para o primeiro trimestre de 2017 (janeiro/março) são promissores. Foi detectado um aumento de doadores efetivos de 8,9% se comparado à taxa do mesmo período em 2016. Muito se deve ao aumento (31%) da taxa de notificação e efetivação. Entretanto esses dados nem sempre foram favoráveis. Em 2015 a ABTO emitiu um alerta por meio do RBT, relatando uma redução na taxa de potenciais doadores se comparado ao mesmo período em 2014, considerada a primeira redução desde 2007. A meta para o ano de 2017 é de 16,6 pmp de doadores efetivos. Em relação ao número de transplantes realizados, comparado ao mesmo período de 2016, houve um aumento de 2,8% no transplante renal. Em comparação, com doador falecido este aumento foi de 3,2% e com doador vivo 1,0% (ABTO, 2017b).

Mesmo com tais avanços descritos, ainda é grande a espera pelo transplante devido ao baixo número de doadores em potencial. O número de pacientes que aguardam em lista de espera a realização do transplante renal no Brasil, em março de 2017, foi de 20.965 com uma taxa de mortalidade em fila de 2,3%. Para o estado de Minas Gerais os números são de 2.352 pacientes ativos em fila de espera com taxa de mortalidade em março de 2017 de 2,4%. A taxa de não aproveitamento de rins de doador falecido no ano de 2017 ainda se encontra bastante elevada (31%). O não aproveitamento se deve à perda da viabilidade do órgão que pode ser devido a diversos fatores, tais como, tempo prolongado de isquemia fria e acondicionamento inadequado. O aprimoramento dos aspectos relacionados à doação de órgãos,

transplante e à lista de espera são os objetivos propostos pela ABTO para o ano de 2017 (ABTO, 2016, 2017b; MOTA *et al.*, 2016).

2.1.3 Classificação dos potenciais doadores e receptores

Para que um paciente esteja apto a receber o órgão enxertado, ele não deve apresentar condições clínicas e laboratoriais que possam por em risco a própria vida ou prejudicar a função do enxerto (COTTONE *et al.*, 2007). O preparo do receptor se inicia mediante uma avaliação clínica e laboratorial completa. São poucas as contraindicações para o transplante renal, e devem ser diagnosticadas e corrigidas quando possível. O **Quadro 2** informa as principais contraindicações, absolutas ou relativas para o transplante renal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006).

Quadro 2: Principais contraindicações absolutas e relativas para o transplante renal

Contraindicações absolutas	Contraindicações relativas
Sorologia positiva para HIV	Portadores de oxalose primária
Neoplasias malignas (ou tratadas, com menos de 2 anos de seguimento)	Idade superior a 60 anos com cateterismo e/ou mapeamento cardíaco alterados
Doença pulmonar crônica avançada	Portadores de diabetes mellitus com cateterismo e/ou mapeamento cardíaco alterados ou doppler de artérias ilíacas demonstrando arteriopatia moderada
Doença cardíaca grave sem indicação de tratamento cirúrgico ou intervencionista	Doença neuro-psiquiátrica grave
Vasculopatia periférica grave, com sinais clínicos evidentes de insuficiência vascular periférica ou com estudo de doppler mostrando lesões graves em artérias ilíacas	Portadores de anomalias urológicas e/ou disfunção vesical severa. Poderão ser aceitos após estudo clínico e cirúrgico do caso
Pacientes portadores de cirrose hepática	Crianças com peso inferior a 15 Kg. Poderão ser aceitas após estudo clínico e cirúrgico do caso
	Obesidade mórbida
	Ausência de suporte familiar ou pessoal para adesão ao tratamento, pelas condições sociais, de vida e de moradia

HIV: Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)
 Fonte: SBN, 2006.

Algumas contraindicações são consideradas temporárias, tais como: presença de infecções ativas ou com tratamento incompleto; transfusões sanguíneas recentes (< 15 dias); perda do enxerto por mecanismos imunológicos e úlcera gastroduodenal em atividade (SBN, 2006).

A obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento da doença renal crônica (DRC), sendo uma contraindicação relativa para o transplante renal. Pacientes com índice de massa corporal (IMC) $\geq 35 \text{ Kg/m}^2$ são desqualificados para o transplante (KAZANCIOĞLU, 2013). Quanto mais elevado o IMC maiores são os riscos para efeitos adversos a longo prazo após o transplante, como problemas de cicatrização de feridas, infecções, sangramentos, obstrução uretral e internações hospitalares mais frequentes. Pacientes obesos apresentam, ainda, maiores incidências de perda do enxerto por rejeições agudas e crônicas. O comprometimento renal se relaciona com a presença da hipertrofia tubular e hiperfiltração glomerular, o que pode ocasionar uma maior tensão na parede do capilar. A obesidade também contribui para a patogênese da DRC e pode favorecer o processo inflamatório, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial (KAZANCIOĞLU, 2013; KURNATOWSKA *et al.*, 2016).

A seleção e a identificação de potenciais doadores são consideradas um dos principais passos para o processo de transplantação. O doador é avaliado rigorosamente, sendo foco de intensa investigação clínica, física, laboratorial e de imagem. Desta forma, assegura-se a qualidade do órgão por evitar a transmissão de patologias ao receptor, além de favorecer o sucesso da terapia. Os potenciais doadores para o transplante renal são classificados quanto ao seu tipo: falecido, vivo relacionado (parente) ou vivo não-relacionado (não-parente) (ABTO, 2008; BARROS *et al.*, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006).

Os doadores falecidos devem apresentar como causa do óbito a morte encefálica, definida como a parada total e irreversível da atividade do tronco e hemisférios cerebrais, de acordo com a resolução nº 1.480/97 do Conselho Federal de Medicina. Para a confirmação da causa da morte, são necessários dois exames clíniconeurológicos e um exame gráfico complementar. Com o objetivo de manter a viabilidade do possível órgão a ser transplantado, deve-se manter em constante monitoramento a função respiratória do doador através da ventilação mecânica e medicações, além da homeostase de qualquer outro sistema. Doadores com parada

cardíaca recente podem doar os órgãos, em especial os rins. Aqueles com parada cardíaca tardia (até 6 horas) podem doar apenas tecidos (ABTO, 2009; BARROS *et al.*, 2006). O candidato a doador falecido deve se enquadrar em condições preestabelecidas como idade entre 5 e 65 anos, ausência de doença renal, infecções sistêmicas e neoplasias. É desejável também a ausência da hipertensão arterial sistêmica, bem como de diabetes mellitus (DM). O potencial doador não deve apresentar anúria e/ou creatinina sérica acima de 2,5mg/dL (ABTO, 2009; PEREIRA, 2004). Considera-se doador vivo relacionado aqueles com parentesco consanguíneo até o quarto grau, e para os demais casos, doador vivo não relacionado. O ato de doação de órgãos entre vivos deve ser de livre e espontânea vontade, de forma gratuita, sem configurar transação comercial. Em muitos casos há necessidade de autorização judicial. Os doadores vivos devem ser maiores de idade, com idade máxima de 70 anos e estarem em condições de saúde física e mental ótimas (ABTO, 2017a; GALLIFORD; GAME, 2009; WEITZ *et al.*, 2006).

Além da compatibilidade do grupo sanguíneo e da maior compatibilidade possível em relação ao HLA entre doador e receptor, o teste de prova cruzada (cross-match) do receptor deve ser negativa para aloantígenos específicos do doador. Desta forma, as taxas de rejeição ao enxerto são menores (ABTO, 2017a; GALLIFORD; GAME, 2009; WEITZ *et al.*, 2006). O doador vivo é a melhor opção para o transplante renal, por proporcionar melhor sobrevida do paciente e do enxerto quando comparado ao doador falecido, além da não necessidade de espera em fila. Entretanto, a retirada do rim no doador vivo pode ocasionar problemas de saúde futuros. Assim, medidas são tomadas para aumentar o número de captação de órgãos provenientes de doadores falecidos, mesmo estando relacionados com uma menor sobrevida do enxerto (ABTO, 2017b; DAVIS; DELMONICO, 2005).

Com o objetivo de preservar e reduzir os riscos cardiovasculares, tem-se aplicado o transplante em condição pré-emptiva, ou seja, em fase pré-dialítica desde que o potencial receptor apresente uma taxa de filtração glomerular (TFG) menor que 20mL/min/1,73m². Essa estratégia tem aumentado a sobrevida do enxerto, visto que o tempo da terapia dialítica antes do transplante influencia negativamente na sobrevida do enxerto (ALVES *et al.*, 2015), sendo que quanto maior o tempo de diálise realizado no pré-transplante, maior é a chance da ocorrência de comorbidades no pós-transplante, como a disfunção endotelial. O transplante pré-emptivo é indicado para qualquer receptor, principalmente para pacientes com DM (COOREY *et al.*, 2009).

2.2 Aspectos gerais do sistema imunológico no transplante renal

No transplante renal, a resposta imunológica frente ao enxerto, se inicia com a ação dos linfócitos T, ao reconhecerem por meio de seu receptor de membrana [receptor de célula T (TCR)], antígenos não-próprios derivados do enxerto, chamados de aloantígenos. Estes são proteínas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do inglês, *Major Histocompatibility Complex*. Nos seres humanos, o MHC é formado pela reunião de genes localizados na região do braço curto do cromossomo 6, que compõem o sistema HLA (ABBAS; LICHTMAN, 2007; RIELLA, 2003).

O reconhecimento de aloantígenos, ou alorreconhecimento, pode ocorrer por meio de mecanismos diretos ou indiretos, com a participação de células apresentadoras de antígenos. No alorreconhecimento direto, as células T alorreativas identificam diretamente os antígenos HLA do doador por meio da apresentação de antígeno por uma célula do doador, desencadeando a resposta imune. Pela via indireta, o alorreconhecimento ocorre por meio da apresentação de antígenos por células do próprio receptor. Após o alorreconhecimento, inúmeros eventos se iniciam com o objetivo de intensificar a resposta contra o não-próprio, com envolvimento de várias células e da intensa produção de citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2007; BARROS *et al.*, 2006; RIELLA, 2003).

Estes eventos são considerados peças centrais para o desenvolvimento do processo de rejeição ao enxerto que devido a intensificação da resposta inflamatória irá provocar destruição do órgão transplantado, ocasionada pela infiltração tecidual de leucócitos e de sua atividade citotóxica. O processo de rejeição constitui a principal causa de disfunção do enxerto no pós-transplante recente e tardio devido a deteriorização da função renal, sendo considerada a principal causa de insucesso da terapia de transplantação (BARROS *et al.*, 2006; RIELLA, 2003).

2.2.1 Rejeição ao Enxerto

Os transplantes de órgãos e tecidos culminam de forma invariável para o processo de rejeição ao enxerto devido a uma resposta imunológica adaptativa. O principal alvo da resposta imunológica no transplante renal, com sistema ABO

compatível, são as moléculas que compõem o sistema HLA (ABBAS; LICHTMAN, 2007; SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, 2014).

A rejeição ao aloenxerto tem sido classificada de acordo com o período de ocorrência (hiperaguda, aguda e crônica) e a forma predominante de resposta do sistema imune (celular e/ou humoral) (DUMMER, 2011; MUBARAK *et al.*, 2017).

O diagnóstico da rejeição ao enxerto deve ser realizado precocemente, a fim de evitar grandes perdas do tecido renal. Entretanto os marcadores usuais clínicos para a função renal são considerados marcadores tardios, pois grande parte só se eleva quando a função renal já está sendo perdida de forma significativa, como é o caso da creatinina sérica e proteinúria. A biopsia é considerada o “padrão-ouro” para o diagnóstico de rejeição, mas trata-se de um método invasivo, de alto custo e que exige profissionais altamente qualificados para sua realização e análise. Por essa razão, tem-se optado cada vez mais por métodos bioquímicos de avaliação da função renal (JUNG; LEE; KWON, 2012).

Com o objetivo de padronizar os termos e classificações histopatológicas das rejeições, foi criada a classificação de Banff em 1991. Tal classificação é hoje reconhecida mundialmente. As reuniões para a formulação dos critérios Banff trouxeram grandes melhorias para as diversas áreas dos transplantes por meio da criação de diretrizes e uma maior compreensão sobre as principais patologias presentes após o transplante renal. Desta forma, os critérios de Banff procuram esclarecer e ampliar o conhecimento sobre a resposta imune mediada por anticorpos, além do papel do endotélio vascular na rejeição, favorecer a determinação de marcadores não-invasivos e oferecer atualizações sobre os transplantes de órgãos (HAAS *et al.*, 2014; SIS *et al.*, 2010; SOLEZ, KIM, 2010).

Os critérios para a classificação das rejeições agudas mediadas por anticorpos foram incluídas na classificação de Banff em 2003, os quais eram compostos por três principais tópicos; evidências sorológicas, imunopatológicas e morfológicas (KUO *et al.*, 2015). As classificações de Banff são constantemente atualizadas e novos critérios são formulados para classificar as rejeições. Recentemente, em 2015, ocorreu uma nova reunião para discutir e atualizar as categorias diagnósticas de Banff. O **Quadro 3** representa, de forma resumida, as categorias diagnósticas atualmente em vigor.

Quadro 3 – Resumo dos critérios para classificação das categorias Banff em vigor

Categoria	Descrição
1. Normal	Padrão histologicamente normal
2. Alterações mediadas por anticorpos	Presença de anticorpos circulantes anti-doador, deposição de C4d sem evidência de rejeição ou patologia do enxerto. Pode ser RA ou RC, ou presença de C4d sem evidência de rejeição
3. Alterações Borderline	Presença de focos de tubulite intersticial e artrite
4. Rejeição mediada por células	Rejeição aguda mediada pelas células T ou rejeição crônica mediada pela ativação precoce das células T, com arteriopatia crônica do enxerto
5. FIAT	Fibrose intersticial/Atrofia tubular (FIAT) sem evidências de uma etiologia específica
6. Outras alterações	Outras alterações, não atribuíveis à rejeição aguda ou crônica. Esta categoria inclui a hipertensão crônica, a toxicidade por drogas imunossupressoras, a obstrução renal crônica, a pielonefrite e as infecções virais

RA: rejeição aguda; RC: rejeição crônica;

Fonte: (LOUPY *et al.*, 2016; MUBARAK *et al.*, 2017; SEMENTILLI *et al.*, 2008).

Com o desenvolvimento de testes mais modernos para a avaliação dos perfis de histocompatibilidade entre doador e receptor e de novas terapias imunossupressoras, os casos de rejeição hiperaguda e aguda tem reduzido significativamente. Entretanto a rejeição crônica do enxerto ainda permanece como uma das principais causas de perda do enxerto (JUNG; LEE; KWON, 2012).

2.2.1.1 Rejeição hiperaguda

A rejeição hiperaguda (RH) é aquela que se manifesta pouco tempo após o término do procedimento cirúrgico ou até mesmo durante o procedimento. É mediada por anticorpos preformados contra aloantígenos do doador, em virtude da existência de uma sensibilização prévia. A sensibilização pode ser proveniente de transfusões sanguíneas pregressas, gravidez ou transplantes passados. Pode ocorrer também devido a incompatibilidade entre doador e receptor, pode ser tanto por

incompatibilidade ABO como por HLA. Os receptores que apresentam este tipo de rejeição geralmente têm altos títulos de anticorpos circulantes anti-HLA (ABBAS; LICHTMAN, 2007; BARROS *et al.*, 2006; RIELLA, 2003).

A RH pode ocasionar grandes lesões endoteliais e, conseqüentemente, ativação plaquetária e do sistema complemento aumentada. Em parte, devido a expressão do fator de von Willebrand (FvW) pelo endotélio exposto lesionado. De forma resumida, este processo culminará em um dano isquêmico irreversível devido a diversos fatores imunológicos e hemostáticos, como por exemplo, o aumento de fatores pró-coagulantes que favorecem a formação de trombos e oclusão vascular. Esse tipo de rejeição apresenta péssimo prognóstico, além de difícil controle e tratamento. A utilização de testes de prova cruzada pré-transplante é considerada uma forma de prevenção de ocorrência da RH, através da seleção de um órgão com maior compatibilidade possível. Sua realização no pós-transplante é indicada para a detecção de anticorpos anti-HLA, o que auxilia no diagnóstico das rejeições (ABBAS; LICHTMAN, 2007; DUMMER, 2011; RACUSEN; HAAS, 2006).

2.2.1.2 Rejeição aguda

A RA ocorre entre o período de três a noventa dias pós-transplante, mas pode ocorrer também em fases mais tardias, principalmente se a terapia imunossupressora instalada for inadequada ou por causas da não adesão ao tratamento pelo receptor. É detectada inicialmente pelo quadro clínico com piora da função renal, elevação dos níveis de creatinina sérica, febre, hipertensão arterial, ganho de peso, enxerto dolorido e com maior volume e redução do débito urinário (BARROS *et al.*, 2006).

A RA é subdividida de acordo com o mecanismo mediador principal das alterações teciduais, pode ser tanto celular como humoral. Normalmente, o componente celular é o mais predominante e uma rápida intervenção terapêutica pode reverter esta situação na maioria dos casos. Esse tipo de rejeição é tratada primeiramente com pulsoterapia de corticoide e na falta de resposta terapêutica são empregados anticorpos específicos contra linfócitos. As RAs não pressupõem uma pré-sensibilização do doador contra o receptor e se iniciam quando o sistema imune do receptor entra em contato com os aloantígenos do enxerto (ABBAS; LICHTMAN, 2007; KOO *et al.*, 2015).

A RA celular é caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório intersticial focal ou difuso que culmina em perda tecidual, com grande participação das células T. O principal alvo são as células do endotélio vascular renal, formando endotelite endovascular. Este é o principal achado histopatológico (KOO *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015).

Na rejeição aguda mediada por anticorpos ocorre o que é chamado de reação aloantígeno-aloanticorpo com envolvimento do HLA do enxerto. Esta ligação favorece a ativação da via clássica do complemento que leva à destruição do endotélio, aumentando o infiltrado celular e a formação de trombos (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

2.2.1.3 Rejeição crônica

A Rejeição Crônica (RC), também denominada por nefropatia crônica do enxerto, apresenta evolução lenta e pode não ser precedida por episódios de RA. É considerada como a principal causa de perda e redução da sobrevida do enxerto devido principalmente ao espessamento vascular. O dano tecidual é gradual, dominado por obliteração vascular progressiva e fibrose intersticial, ocorrendo a substituição progressiva do parênquima renal normal por tecido fibroso (LOUPY *et al.*, 2016). A patogênese da RC ainda não está totalmente elucidada, há indícios de envolvimento tanto de processos imunológicos como não-imunológicos. O tempo de isquemia fria, o número de episódios de rejeição, a incompatibilidade HLA e infecções por citomegalovírus (CMV) são os mais importantes fatores que favorecem a RC (RIELLA, 2003; SERÓN; MORESO, 2007; SIS *et al.*, 2010).

Na avaliação histopatológica, a RC pode apresentar graus variados de intensidade. As principais alterações histológicas são esclerose glomerular, arteriopatia crônica, fibrose intersticial e atrofia tubular (FIAT) (LOUPY *et al.*, 2016; SOLEZ, K. *et al.*, 2008).

O endotélio vascular tem um papel importante na fisiopatologia da RC, visto que estas células ativadas aumentam a produção de mediadores químicos pró-inflamatórios, elevam a expressão de MHC e de moléculas de adesão. Desta maneira eleva-se a resposta inflamatória local, com proliferação do tecido muscular liso induzindo diretamente a deposição de matriz extracelular, o que poderá originar uma obliteração vascular, parcial ou total (SOLEZ, K. *et al.*, 2008).

2.3 Endotélio vascular

O endotélio vascular renal é considerado a primeira interface entre doador e receptor no transplante de rim. Desempenha um papel como apresentador de antígeno de forma direta ou indiretamente às células T citotóxicas e, ao mesmo tempo, podem ser o alvo da ação da resposta imune (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015).

O endotélio reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e está intimamente ligado ao subendotélio, constituído por matriz extracelular (CHENG *et al.*, 2015). Por apresentar variada morfologia, normalmente suas células são caracterizadas como planas. No entanto, podem apresentar formato cúbico ou retangular com espessuras variadas (0,1 -1,0 micra). As células endoteliais se alinham na direção do fluxo sanguíneo em resposta à pressão hemodinâmica de cisalhamento do sangue (*Shear-stress*). O endotélio pode ser contínuo (fenestrado ou não fenestrado) ou descontínuo. A matriz extracelular é formada por proteínas derivadas do endotélio, tais como: colágeno, laminina, fibronectina, FvW, trombospondina, entre outras. A ativação das células endoteliais pode ocorrer devida à ação de efeitos físicos e químicos, favorecendo a modulação de respostas que visam a manutenção da homeostase vascular quando há a liberação de anticoagulantes, pró-coagulantes, moléculas de adesão, fatores fibrinolíticos entre outras (HOFFBRAND; MOSS, 2013; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

As células endoteliais apresentam diferentes funções. São responsáveis por regular o tônus vascular e garantir, em condições normais, um estado vascular antitrombótico. Controlam 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 de fibrinólise, do metabolismo de lipoproteínas e da apresentação de antígenos de histocompatibilidade. Além de participarem de outras reações inflamatórias e hemostáticas (HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015; YAU; TEOH; VERMA, 2015). Nos rins, as células endoteliais apresentam características fenotípicas distintas nos variados tipos de vasos sanguíneos e nos capilares glomerulares (CHENG *et al.*, 2015).

A disfunção endotelial é caracterizada como perda rápida ou progressiva das funções das células endoteliais vasculares, podendo ser alterações temporárias ou permanentes. Sabe-se que sua exposição prolongada e repetida aos agentes tóxicos, infecciosos ou aterogênicos pode induzir a perda da integridade endotelial, sendo este

um dos principais eventos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015).

A avaliação das alterações endoteliais em receptores do transplante renal (RTx) tem sido dificultada por vários fatores, dentre eles a avaliação pontual por meio de biópsia do enxerto. Essa técnica, conforme mencionado anteriormente, apresenta várias limitações, como oferecer apenas um quadro restrito ao tempo e à localização dos danos endoteliais, visto que pode subestimar a lesão vascular sistêmica. Por essa razão, a avaliação endotelial por meio de marcadores plasmáticos tem se mostrado mais fácil e acessível, como a determinação do FvW, da trombomodulina solúvel (TM) (ZAHARAN *et al.*, 2015), do óxido nítrico (NO) (PENG *et al.*, 2014) e, mais recentemente, pelo emprego das micropartículas endoteliais (EMP) (AL-MASSARANI *et al.*, 2009; FRANÇA *et al.*, 2015).

2.4 Micropartículas celulares

As micropartículas (MPs) constituem um grupo de vesículas de origem celular formadas a partir da membrana plasmática de diversos tipos de células e apresentam tamanho variado (0,1 - 2,0 µm de diâmetro). São liberadas após ativação celular ou apoptose. Podem ser encontradas em circulação no sangue periférico, urina, líquidos cavitários ou em outros líquidos corporais. Apresentam antígenos de membrana e conteúdo citoplasmático provenientes das células de origem. As proteínas de membrana e citoplasmáticas, ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), microRNAs, ácido desoxirribonucleico (DNA) e fatores pró-coagulantes são os principais exemplos de constituintes das MPs. Entretanto, são encontrados antígenos de membrana distintos daqueles da célula de origem devido a uma provável remodelação da membrana, conferindo às MPs funções específicas (AL-MASSARANI *et al.*, 2009; BRODSKY *et al.*, 2008; BUDAJ *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2017; NOMURA, 2016; SHANTSILA *et al.*, 2014).

As MPs apresentam um amplo espectro de funções biológicas que se relacionam com os seus constituintes. Proporcionam uma comunicação intercelular ao transferirem seu conteúdo através da fusão membranar ou através da interação de seus receptores de membrana com outras células, estando estas próximas ou não ao seu local de origem. Esta comunicação se relaciona com a mudança do fenótipo e das

funções das células alvo, além de induzir a ativação de cascatas de sinalização (BEYER; PISETSKY, 2010; FRANÇA *et al.*, 2015; NOMURA, 2016; PUDDU *et al.*, 2010; QAMRI *et al.*, 2014). Sendo assim, as MPs têm um papel importante na homeostase celular, regulam a inflamação, estimulam a coagulação, afetam as funções vasculares e apoptóticas, podem desempenhar um papel na proliferação e diferenciação celular, além de contribuírem para o desenvolvimento da aterosclerose e do câncer. Entretanto, todas as suas funções não estão completamente elucidadas (AL-MASSARANI *et al.*, 2009; TURTURICI *et al.*, 2014).

As principais MPs em circulação no plasma são derivadas das plaquetas, células leucocitárias e células endoteliais. Níveis elevados de MPs em circulação têm sido detectados em desordens vasculares, bem como em doenças trombóticas, inflamatórias sistêmicas, cardíacas (BUDAJ *et al.*, 2012; HELBING *et al.*, 2014; MOREL *et al.*, 2011; KAM *et al.*, 2015), pulmonares (VION *et al.*, 2013) e doenças renais (AMABILE *et al.*, 2012).

As MPs podem ser caracterizadas e quantificadas por técnicas laboratoriais como a citometria de fluxo, considerada como a principal ferramenta de análise, e por imunoenensaio enzimático (ELISA) de captura. As metodologias baseiam-se na detecção de antígenos de membrana provenientes das células de origem, presentes nas MPs e na presença da fosfatidilserina externalizada. Ambas apresentam vantagens e desvantagens e fica a critério do pesquisador optar pela metodologia ideal (DANIEL *et al.*, 2008; SHANTSILA *et al.*, 2014).

2.4.1 A formação das micropartículas

Todas as células sanguíneas são capazes de produzir e liberar as MPs. Sua formação e liberação envolvem uma reorganização da distribuição da membrana plasmática, com exposição da camada de fosfatidilserina e modificação do citoesqueleto celular. Diferentemente das MPs, os exossomas (30 a 100 nm de diâmetro) são originados a partir de um produto final da via endocítica e os corpos apoptóticos (1,0 – 5,0 µm de diâmetro) a partir de fragmentos celulares após estímulos apoptóticos (**Figura 3**). O termo microvesículas inclui os exossomas, as MPs e os corpos apoptóticos e, muitas vezes, o seu uso é ambíguo na literatura. Essas três populações se diferenciam tanto por seu tamanho, quanto pela composição e

formação (BUDAJ *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2017; GYÖRGY *et al.*, 2011; HELBING *et al.*, 2014; SHANTSILA *et al.*, 2014).

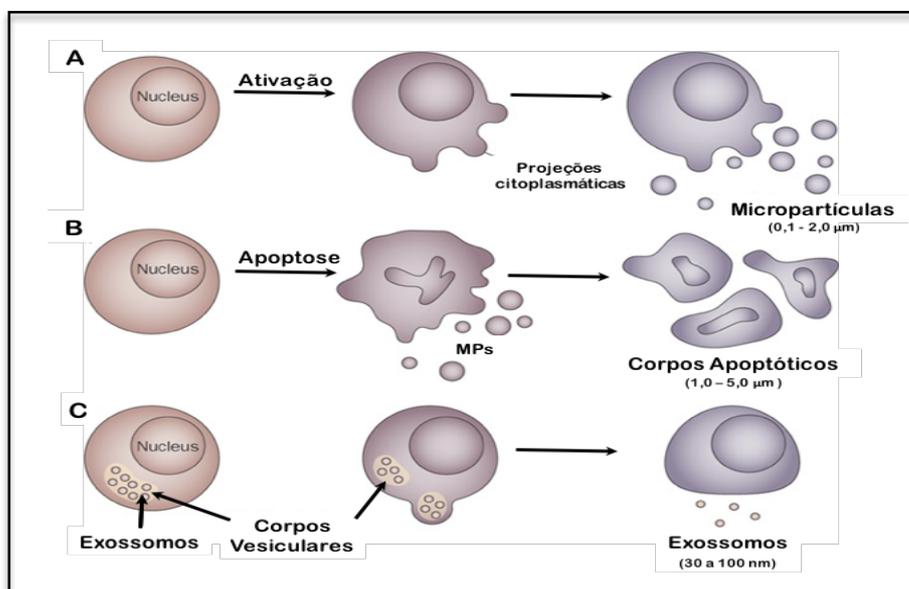


Figura 3 - Representação esquemática do processo de formação das vesículas extracelulares e as diferenças do diâmetro entre elas. **A:** Formação das micropartículas celulares (MPs) após ativação celular; **B:** Célula em processo de apoptose, com formação de MPs e corpos apoptóticos; **C:** Exossomos dentro dos corpos vesiculares e externamente, após a liberação das vesículas.

Fonte: Adaptado de BEYER; 2010.

As células em seu estado quiescente apresentam uma composição distinta da sua forma ativada. Em repouso, a distribuição dos fosfolípides da membrana plasmática é assimétrica, sendo que a fosfatidilserina e o fosfatidilinositol estão localizados no folheto interno da bicamada, enquanto a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina estão no folheto externo. A manutenção dessa assimetria é mantida por três enzimas distintas: flippases, floppases e scramblases (MOREL *et al.*, 2011). As flippases contribuem para a translocação de fosfatidilserina e fosfatidilinositol do folheto externo para o interno, são consideradas como Adenosina Trifosfato (ATP) dependentes. A elevação da concentração de cálcio intracelular inibe seu transportador. As floppases são ativadas pela elevação do cálcio intracelular e atuam como catalisadoras no transporte de fosfatidilserina do folheto interno para o externo. Finalmente, as scramblases, consideradas como ATP independentes, também são ativadas pela elevação do cálcio intracelular, o que promove movimentos aleatórios que facilitam a circulação de fosfatidilserina entre ambos os folhetos da membrana, interno e externo. A elevação das concentrações de cálcio são essenciais

para a alteração da disposição dos folhetos e perda da assimetria com a exposição da fosfatidilserina, evento chave para a formação das MPs (DANIEL *et al.*, 2008; DURSUN; YEL; UNSUR, 2015; MOREL *et al.*, 2011; NOMURA, 2016; TURTURICI *et al.*, 2014). A **Figura 4** elucida o processo de formação das MPs.

A ativação ou apoptose celular induzem a liberação das MPs através de estímulos químicos e físicos, como citocinas, trombina, endotoxinas, *shear-stress* e hipóxia. Estes estímulos promovem o aumento do cálcio intracelular, proveniente do retículo endoplasmático, importante para a ativação enzimática e responsável pela reorganização do citoesqueleto. Estas alterações celulares culminarão em uma exposição da fosfatidilserina e a formação das vesículas, com a liberação das MPs para a circulação. Porém, o processo de formação das micropartículas ainda não está totalmente elucidado e mais estudos são necessários para uma maior compreensão da sua constituição e fisiologia (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015; MOREL *et al.*, 2011; NOMURA, 2016).

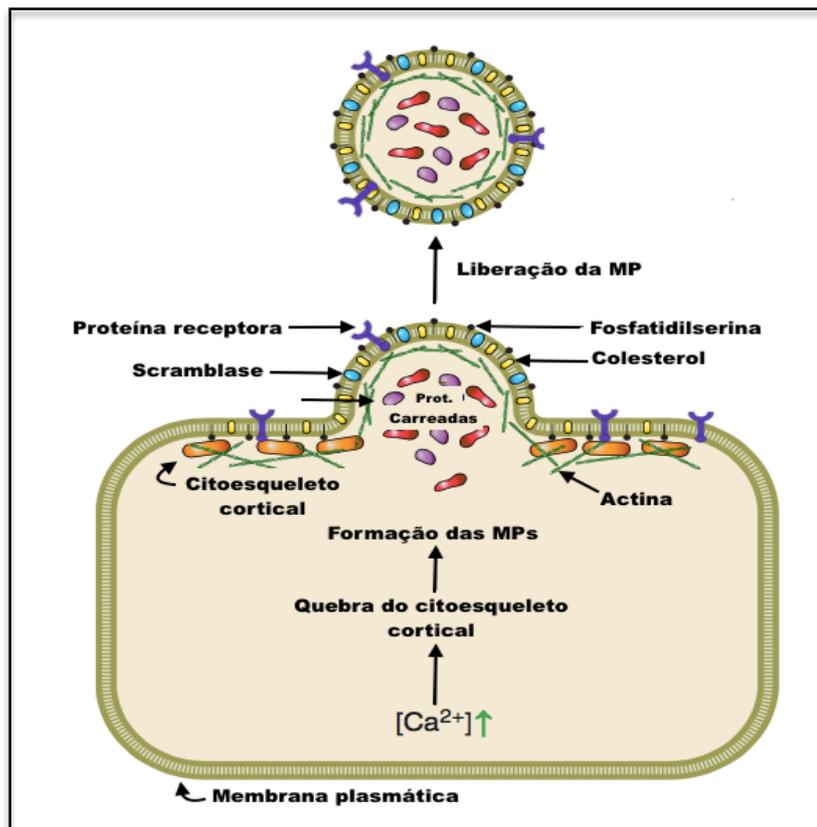


Figura 4 - Representação do processo de formação das micropartículas celulares (MPs). A célula progenitora após receber o estímulo (ativação e/ou apoptose celular) ocorre um aumento do cálcio intracelular favorecendo a quebra do citoesqueleto cortical, evento

essencial para a externalização da fosfatidilserina com formação das micropartículas derivadas da membrana plasmática celular.

Fonte: Adaptado de TURTURICI, 2014.

2.4.2 Micropartículas derivadas das plaquetas e células endoteliais

As micropartículas derivadas das plaquetas (PMPs) correspondem a 70 - 90% do total das MPs circulantes em indivíduos saudáveis. Estão relacionadas com eventos favoráveis e desfavoráveis para a homeostase vascular. São produzidas em resposta a estímulos diversos, como *shear-stress*, trombina e colágeno. Diferentes efeitos biológicos têm sido atribuídos às PMPs, incluindo estimulação da coagulação sanguínea, participação na patogênese da aterosclerose, lesão vascular, processos inflamatórios, proliferação de células ósseas, trombose e progressão do tumor, bem como a interação com células endoteliais e leucócitos. Além de estarem associadas com a regeneração vascular, favorecendo a angiogênese (FRANÇA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2004; MEZOUAR *et al.*, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2014). Apresentam várias glicoproteínas de membranas, tais como GPIIb/IIIa e GPIb/IX, e expressam P-selectina e CD154 (NOMURA, 2016).

Baldwin *et al.* (2011) demonstraram que as PMPs podem migrar para fora dos vasos sanguíneos quando há a ligação com neutrófilos ativados ou monócitos contribuindo para a infiltração celular no enxerto renal, favorecida pela maior comunicação das PMPs com as células T, macrófagos e células dendríticas no interstício do órgão transplantado (BALDWIN; KUO; MORRELL, 2011).

Um outro estudo já demonstrou que as PMPs apresentam efeitos sobre as células endoteliais conferindo a elas proteção contra a apoptose e induzindo a proliferação e formação de estruturas tubulares. Por outro lado, as PMPs também podem provocar lesões nas células endoteliais reduzindo a vasodilatação mediada pelo NO (KIM *et al.*, 2004).

As EMPs representam uma pequena porção de MPs circulantes (cerca de 5%), que podem conter os antígenos FvW e Fator Tissular (FT) ancorados em sua membrana. Estão fortemente associadas com a patogêneses das doenças cardiovasculares e principalmente com a disfunção endotelial (FRANÇA *et al.*, 2015). A gravidade da lesão ou disfunção endotelial tem relação direta com os níveis de EMPs em circulação. Devido a isso, as MPs podem ser consideradas novos

marcadores para a disfunção endotelial (CUI *et al.*, 2010). A circulação das EMPs contribui para a elevação da disfunção vascular pré-existente, por prejudicar a capacidade das células endoteliais em produzirem e liberarem NO. Este fato já foi observado em estudos com pacientes com DRCT (AMABILE, *et al.*, 2012). A hipertensão arterial sistêmica (HAS), pré-eclâmpsia, aterosclerose e a disfunção crônica do enxerto são condições onde há uma intensa disfunção endotelial, no qual as EMPs podem ser utilizadas como marcadores substitutivos para a avaliação da função do endotélio (HELBING *et al.*, 2014).

2.5 Fator de von Willebrand

O FvW é uma glicoproteína multimérica formada por subunidades funcionais unidas entre si por ligações dissulfeto, originando dímeros de 500KDa e multímeros de variados tamanhos. Seu gene está localizado na extremidade do braço curto do cromossomo 12, contém 52 exons separados por 51 introns. A síntese do FvW ocorre nas células endoteliais e nos megacariócitos, onde são estocados e armazenados na forma de grandes multímeros (gmFvW) nos corpúsculos de Weibel-Palade e nos grânulos alfa, respectivamente. Pode ser secretado para o plasma ou subendotélio, constituindo a matriz extracelular em resposta a eventos inflamatórios, quando as células endoteliais são ativadas e/ou após sofrerem algum tipo de dano tecidual, com consequente exposição do colágeno subendotelial. O FvW em circulação no plasma é derivado, quase que exclusivamente, das células endoteliais. Estas podem secretar o FvW tanto após a sua produção como após um período de armazenamento, ao contrário dos megacariócitos que secretam o FvW constituído nos grânulos, após a ativação plaquetária (XIANG; HWA, 2016).

Os multímeros do FvW apresentam variações em relação ao seu peso molecular. Dentro dos compartimentos de estoque são maiores em relação aos multímeros em circulação. Os gmFvW em circulação aderem-se às plaquetas e formam grandes agregados plaquetários e trombos, principalmente em pequenos vasos. Devido a isso, os gmFvW sofrem a ação de uma enzima responsável por clivá-los em multímeros menores, menos prejudiciais. Esta enzima é denominada de ADAMTS13 (do inglês, *A Disintegrin and Metalloproteinase with Trombospondin-1-like domains*). A ADAMTS13 é uma desintegrina e metaloproteinase com domínio

trombospondina tipo 1, responsável pela clivagem da ligação peptídica entre a tirosina (posição 1605) e a metionina (posição 1606) no domínio A2 do FvW, **Figura 5**. É sintetizada pelo fígado, plaquetas, células endoteliais e pelas células renais (ALPOIM *et al.*, 2011; COHEN-HAGAI *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2015; XIANG; HWA, 2016).

O FvW é crucial para a manutenção da hemostasia. Sua ligação com o fator VIII da coagulação proporciona um aumento da meia vida deste fator, por reduzir sua depuração plasmática pela proteína C e por atuar na agregação e adesão plaquetária em sítios de lesão vascular com colágeno exposto. Em resposta ao *shear-stress*, o FvW altera sua conformação circular para uma forma linear e ativa, atuante no recrutamento de plaquetas. Níveis plasmáticos elevados do FvW estão associados com processos trombóticos e ateroscleróticos, bem como com a redução da função do endotélio. Devido a isso, pode ser considerado um potencial marcador laboratorial da disfunção endotelial (ALPOIM *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2015; JY *et al.*, 2005; XIANG; HWA, 2016).

O agravamento da DRC proporciona uma intensa ativação plaquetária e disfunção endotelial, podendo ser consequência da HAS e proteinúria, comum nestes pacientes. Estudos já relataram a ocorrência de elevados níveis do FvW em portadores de DRC, e que este biomarcador se correlacionou positivamente com o declínio da função renal (CHENG *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2012).

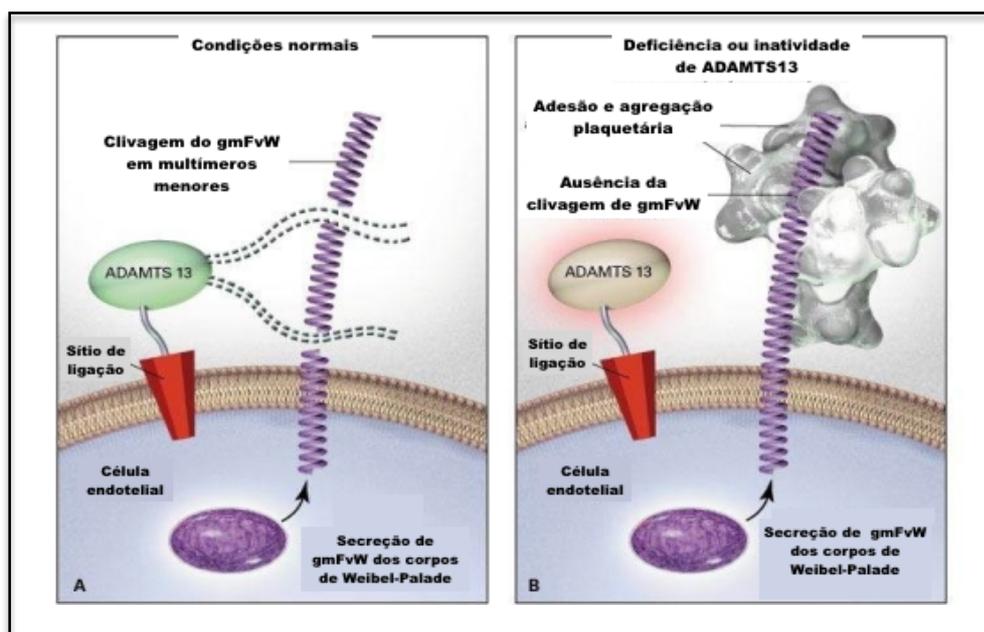


Figura 5 - Representação esquemática do processo de clivagem dos gmFvWs pela ADAMTS13. **A:** modelo normal com clivagem do FvW em multímeros menores; **B:** modelo

com ADAMTS13 deficiente com a formação de agregados plaquetários. Fonte: Adaptado de Lecturio.com. Disponível em: <https://www.lecturio.com/magazine/hemostaseology-blood-disorders>. Acesso em junho de 2017.

2.6 Óxido Nítrico

Como relatado anteriormente, o endotélio é responsável por variadas funções como regular o fluxo sanguíneo. Esta função é dependente da taxa de geração de NO, um dos principais produtos do endotélio. O NO é caracterizado como um radical livre gasoso, formado a partir da oxidação de um dos nitrogênios guanidino da L-arginina, sendo transformada em L-citrulina com a participação de enzimas catalizadoras, denominadas sintases do óxido nítrico (NOS) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; MONCADA, 1994; REDDY *et al.*, 2015).

A produção e liberação de NO é influenciada por diversos fatores tais como: a adenosina-5-difosfato, a trombina, bradicinina, agonistas muscarínicos, a serotonina, o *shear-stress*, entre outros (AZARPIRA *et al.*, 2013; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; REDDY *et al.*, 2015). Existem vários inibidores das sintases de NO, como a L-Arginina Dimetil Assimétrica (ADMA), potente inibidor competitivo endógeno da NOS, e seus níveis aumentados já foram associados com a presença da disfunção endotelial com conseqüente redução dos níveis de NO em portadores de DRC (REDDY *et al.*, 2015). O NO produzido pelas células endoteliais se difunde facilmente para o lúmen vascular e para outras células. Assim, participa de diversas reações fisiológicas e fisiopatológicas. É um importante neurotransmissor e vasodilatador e apresenta papel central no processo de relaxamento dos vasos sanguíneos, além de desempenhar um papel como inibidor da ativação plaquetária. Está envolvido em processos de imunorregulação de mecanismos inflamatórios, autoimunes e fibrinolíticos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A preservação da função endotelial é essencial para a manutenção da função renal e o NO apresenta papel importante neste controle (NAKAYAMA *et al.*, 2010). Nos rins, o NO participa do controle da hemodinâmica renal, por agir em processos fisiopatológicos importantes para a função dos néfrons (DELLAMEA *et al.*, 2014). O NO pode aumentar a TFG por exercer efeitos nas arteríolas aferente e eferente, pode ainda ser responsável pela manutenção da pressão de natriurese e reabsorção glomerular por exercer influência na absorção de Ca^{2+} em diferentes segmentos dos

túbulos renais, induzir a secreção de renina e controle do *feedback* tubuloglomerular. Além de modular a atividade do nervo simpático renal (DELLAMEA *et al.*, 2014).

Um desequilíbrio da biodisponibilidade de NO tem sido relatado nas doenças cardiovasculares, doenças renais e na disfunção endotelial com consequente aumento da progressão da lesão arteriosclerótica, alterações do fluxo sanguíneo, da pressão arterial e redução da irrigação renal. Níveis reduzidos de NO estão relacionados a doenças como HAS, aterosclerose, DRC e em lesões por isquemia-reperfusão (AZARPIRA *et al.*, 2013; DELLAMEA *et al.*, 2014; REDDY *et al.*, 2015).

As NOS são enzimas sintetizadas como monômeros que necessitam formar dímeros para se ligarem à tetrahidrobiopterina e à L-Arginina, anteriormente à sua ação catalisadora da reação de produção de NO. O acoplamento da NOS é muito importante para a produção final de NO, visto que os NOS não acoplados aos cofatores ou substratos geram apenas ânions superóxidos instáveis do NO. Esta reação é denominada como "desacoplamento de NOS" (LEE *et al.*, 2016). As NOS são caracterizadas como hemeoproteínas da família do citocromo P450-*like*, apresentam três isoenzimas (isoforma I, II e III) produzidas por inúmeros tipos celulares e cada isoforma possui origem genética distintas (AZARPIRA *et al.*, 2013; HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015).

A isoforma I ou sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) é produzida pelos neurônios em maior quantidade, responsável pela produção de pequenas quantidades de NO, implicado na regulação da excitabilidade neuronal, potencialização ou depressão da plasticidade simpática e em processos ligados à memória e aprendizagem. Pode ser expresso também pelas células cardíacas, músculo esquelético liso, células endoteliais vasculares e nas células da mácula densa renal (LEE *et al.*, 2016).

A isoforma II ou sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) é a única isoforma que não é produzida constitutivamente, sua produção ocorre nos macrófagos, Linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas em resposta a endotoxinas bacterianas e citocinas, sendo independente da disponibilidade de Ca^{2+} . A produção de NO derivado das iNOS é bem superior se comparado às NOS constitutivas, logo uma superexpressão desta isoforma está relacionada à efeitos deletérios para a função cardiovascular, favorecendo os processos ateroscleróticos (AZARPIRA *et al.*, 2013; HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015).

A isoforma III ou sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) é a principal isoforma responsável por regular a função vascular. É produzida principalmente por células endoteliais, mas também por todas as células em circulação no sangue e já foi demonstrado que as micropartículas celulares também podem expressar eNOS (HORN *et al.*, 2013). As isoformas constitutivas nNOS e eNOS estão mais envolvidas em processos hemostáticos e são denominadas como Ca^{2+} dependentes, pois necessitam da ligação Ca^{2+} /Calmodulina para a sua ativação. Quando esse complexo se desfaz as NOSs são inativadas (AZARPIRA *et al.*, 2013; HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015). Quando há baixa expressão de uma das isoformas constitutivas pode ocorrer efeito compensatório pela outra isoforma, por exemplo, a baixa expressão de eNOS pode ser compensada pelo aumento da expressão de nNOS (LEE *et al.*, 2016).

2.6.1 Sintase do Óxido Nítrico endotelial e seus principais polimorfismos

A eNOS está presente ancorada à membrana plasmática das células endoteliais, esta associação facilita a interação com inúmeras proteínas sinalizadoras da transdução de sinal, repercutindo em sua atividade enzimática e seu acesso às vias intracelulares relacionadas com a produção de NO (VIARO *et al.*, 2000). A presença de fatores estimuladores, como por exemplo o aumento do atrito exercido pelas células circulantes e a bradicinina, ocasiona sua translocação para o citosol e sua ativação, resultando no aumento do guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e consequentemente em maior liberação de NO justaposto ao vaso sanguíneo, o aumento da concentração de GMPc no interior da célula muscular promove o relaxamento das fibras musculares, **Figura 6** (AKCAY *et al.*, 2004; HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015).

A eNOS é codificada por um gene com 26 exons localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q35-36) com tamanho de 21Kb que codifica uma proteína de 135kDa contendo 1203 ácidos amino (DELLAMEA *et al.*, 2014; ELUMALAI *et al.*, 2014). A região relacionada à informação genética da eNOS está envolvida com outras patologias, como a síndrome metabólica, doenças cardiovasculares (DCV) e renais (NATH *et al.*, 2009).

A expressão de eNOS é regulada por vários fatores como alterações da taxa de transcrição, da estabilidade do RNAm e por fosforilações. O RNAm da eNOS é constituído por uma longa cadeia de 4052 nucleotídeos que apresentam um tempo de meia-vida de aproximadamente 10-35 horas. A síntese da proteína persiste mesmo após a interrupção da expressão gênica (DELLAMEA *et al.*, 2014; ELUMALAI *et al.*, 2014).

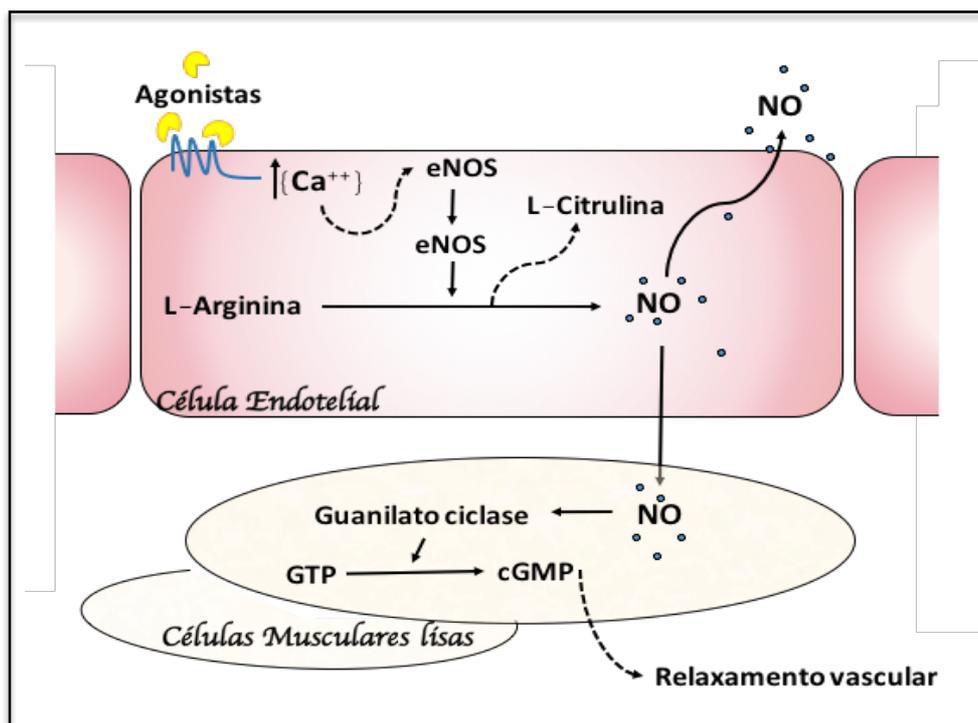


Figura 6 - Representação esquemática do processo de formação do óxido nítrico (NO) nas células endoteliais. A oxidação da L-Arginina produz NO e L-Citrulina através da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

Fonte: produzido pela autora.

A eNOS é muito expressa no endotélio vascular renal, nas arteríolas glomerulares e em menor quantidade nos túbulos renais. Outra isoforma que também pode ser encontrada nos rins é a nNOS, sua presença está mais relacionada com a liberação de renina (DELLAMEA *et al.*, 2014). A eNOS também participa do processo denominado de “desacoplamento de NOS” que é responsável, em partes, pela redução da biodisponibilidade de NO. Este processo, que ao final gera superóxidos, pode apresentar papel importante no processo de várias DCVs (DELLAMEA *et al.*, 2014).

A produção total de NO está diminuída na DRC, o que contribui para os eventos cardiovasculares e progressão do dano renal. São muitas as causas, como a limitação da disponibilidade do substrato L-Arginina e aumento dos inibidores endógenos, em particular da ADMA. Juntos, têm sido apontados como fatores favoráveis para a aceleração da DRC (DELLAMEA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016; NAKAYAMA *et al.*, 2010).

Variações genéticas da eNOS também se relacionam com alterações dos níveis sintetizados de NO. O que pode estar relacionado com o agravamento da DRC (DELLAMEA *et al.*, 2014; ELUMALAI *et al.*, 2014). Entretanto, nem sempre é possível correlacionar as alterações da expressão genica da eNOS com os níveis de NO sintetizado e disponíveis. Isto se deve porque a síntese de NO é dependente da disponibilidade de seus substratos e co-fatores, e foi relatado também que nas células renais ocorrem variações muito rápidas da síntese de NO e este fato torna os estudos dos eventos moleculares envolvidos na regulação de eNOS renal muito mais complexos (DELLAMEA *et al.*, 2014), o que justifica a pouca existência de estudos neste campo.

Estudos demonstram que a presença de deleções no gene da eNOS, que culminam em sua baixa expressão, estão associadas com a ocorrência de HAS, disfunção endotelial e anormalidades renais congênitas como hipoplasia glomerular e morte de células tubulares (DELLAMEA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016; NAKAYAMA *et al.*, 2010).

Variados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido descritos para o gene da eNOS. A presença de SNPs pode estar relacionada a alterações da síntese de eNOS, com influência nos níveis de NO em circulação (ELUMALAI *et al.*, 2014). Os polimorfismos da eNOS mais bem elucidados são o G894T, o T-786C e o VNTR b/a (do inglês, *Variable Number of Tandem Repeat*) (AKCAY *et al.*, 2004; HEISS; RODRIGUEZ-MATEOS; KELM, 2015). Estes polimorfismos têm sido associados à várias patologias. O estudo de Bhandary *et al.* (2008) afirma que a presença dos alelos -894T e -786C está associada com a presença da hipertensão arterial e doenças cardiovasculares em RTx. Outros estudos já relataram altas frequências desses polimorfismos em pacientes com DRCT e na nefropatia diabética (MAMOULAKIS *et al.*, 2009; EZZIDI *et al.*, 2008; ACKAY *et al.*, 2004; VIKLICKÝ *et al.*, 2002).

O SNP G894T é formado pela substituição de uma guanina por uma timina, no nucleotídeo 1917, com formação de aspartato ao invés de glutamato no códon 298 do

exon 7. Este SNP tem grande influência na atividade enzimática de eNOS e na sua estabilidade, sendo o mais bem estudado entre os SNPs da eNOS (BAMBHA *et al.*, 2010; RAI *et al.*, 2014). Este SNP está relacionado com a alteração da estrutura primária da proteína final, o que pode induzir uma alteração funcional (DUTKIEWICZ *et al.*, 2010). No entanto, são encontrados dados conflitantes na literatura. Alguns estudos não demonstraram diferenças significativas entre os genótipos de G894T na atividade enzimática da eNOS (FAIRCHILD *et al.*, 2001; TESAURO *et al.*, 2000). Por outro lado, outros estudos apontam uma associação do alelo variante -894T com o desenvolvimento de patologias que cursam com baixa disponibilidade de NO, como a HAS, doenças coronarianas e a pré-eclâmpsia (AKCAY *et al.*, 2004; ALPOIM *et al.*, 2014).

Bambha *et al.* (2010) observaram que a presença do alelo variante -894T está associada com a piora da função renal e com o aumento do risco de DRC entre os indivíduos pré e pós-transplante hepático. Tesauero *et al.* (2000) demonstraram que a presença do alelo variante em homozigose está relacionada a maior fragilidade da eNOS *in vitro* se comparado ao alelo selvagem em homozigose. Esta fragilidade pode refletir em uma menor produção de NO, devido a degradação da eNOS.

No SNP T-786C, a variação ocorre na região promotora do gene na posição 786, na qual há uma troca de uma timina por uma citosina. A presença deste polimorfismo está ligada à diminuição da expressão da eNOS por reduzir a atividade promotora, diminuindo assim a expressão do gene (SHENKER *et al.*, 2003; NATH *et al.*, 2009).

Mahmoodi *et al.* (2017) associaram a presença do polimorfismo T-786C com o aumento do risco de desenvolvimento e agravamento da doença cardiovascular na população iraniana. Uma meta-análise conduzida por Kong *et al.* (2017) revelou também que o polimorfismo T-786C está associado com o aumento do risco de infarto do miocárdio na população asiática. Este SNP também já foi associado com o desenvolvimento da retinopatia em pacientes com DM tipo 1 (EZZIDI *et al.*, 2008) e HAS (SANDRIM *et al.*, 2006), e baixos níveis de NO em portadores de DM tipo 2 (SANDRIM *et al.*, 2006).

O polimorfismo VNTR b/a está localizado no íntron 4, sendo que o alelo a contém cinco repetições em tandem de 27pb e o alelo b, quatro repetições em tandem de 27pb (KONG *et al.*, 2017). Sua presença não está relacionada com alterações da estrutura enzimática final, mas sim com alterações das taxas de transcrição e ou

produção. Podendo interferir também na funcionalidade normal da eNOS (DUTKIEWICZ *et al.*, 2010). O estudo de Zhang *et al.* (2005) sugere que a baixa produção de NO derivado do alelo variante do VNTR b/a esteja relacionado com a baixa síntese do RNAm, resultado em menores níveis de eNOS.

Já foi descrito uma associação do VNTR b/a com a função retardada do enxerto em RTx, indicando que a presença do alelo variante se correlaciona com baixos níveis de NO e diminuição da expressão da proteína (DUTKIEWICZ *et al.*, 2010). O estudo de Elumalai *et al.* (2014) defende a existência de uma associação entre o VNTR b/a e o agravamento da DRC entre pacientes portadores de doença renal policística autossômica dominante.

Existem poucos estudos relacionando os polimorfismos da eNOS ao transplante renal e sua evolução, com a presença de resultados controversos. Grande parte dos resultados contraditórios podem ser justificados levando-se em consideração as diferenças étnicas, além de fatores ambientais de cada população estudada (AKCAY *et al.*, 2004; DUTKIEWICZ *et al.*, 2010; RAI *et al.*, 2014; SHENKER *et al.*, 2003; UKAR *et al.*, 2014; VIKLICKY *et al.*, 2002; YILMAZ *et al.*, 2009), o que demonstra a necessidade de novos estudos. Portanto, devido a grande importância desta enzima e de seus polimorfismos, o nosso estudo visa contribuir com novos dados na população brasileira.

2.7 A disfunção endotelial no transplante renal

Os RTx representam uma população de risco para o desenvolvimento da disfunção endotelial e aterosclerose, em função das diversas comorbidades associadas e da própria terapia imunossupressora. Lesões vasculares culminam em uma ativação endotelial que poderá resultar em uma coagulação excessiva e prejudicial. A hipercoagulabilidade propicia a substituição do tecido renal por tecido fibroso e deposição de matriz extracelular. É sabido que a fibrina em excesso leva a uma ativação ainda maior da coagulação, intensificando o quadro protrombótico. A formação da aterosclerose nos vasos poderá levar à perda renal por quadros isquêmicos, além de outras complicações (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015; MOTA *et al.*, 2015).

Juntamente com a rejeição do enxerto, a aterosclerose e a HAS são consideradas as principais complicações pós-transplante, sendo fatores de risco para a perda do enxerto renal. Além disso, a perda da flexibilidade da parede arterial, parcialmente influenciada pelo NO e pelo endotélio, tem sido vista como um fator independente para os eventos cardiovasculares, relativamente frequentes em pacientes com DRCT (AMABILE *et al.*, 2005; DURSUN; YEL; UNSUR, 2015).

Níveis elevados de MPs foram detectados em processo de lesão vascular associada às doenças renais. Está bem estabelecido que os pacientes com DRC apresentam um processo acelerado de formação da aterosclerose, devido à presença da disfunção endotelial. Sendo assim, as MPs poderiam representar novos biomarcadores úteis para avaliar o risco cardiovascular associado à DRC e, posteriormente, à disfunção do enxerto no pós-transplante (DANIEL *et al.*, 2008).

Apesar da mensuração de novos biomarcadores ser bastante promissora, os estudos acerca de suas aplicações na rotina clínica e laboratorial ainda necessitam de maiores investimentos e padronizações, a fim de tornar a determinação desses marcadores uma realidade na monitorização do transplante renal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a relação das micropartículas celulares, do fator de von Willebrand e de polimorfismos genéticos da sintase do Óxido Nítrico endotelial com a função do enxerto, tempo pós-transplante e a presença de história prévia de rejeição em receptores do transplante renal.

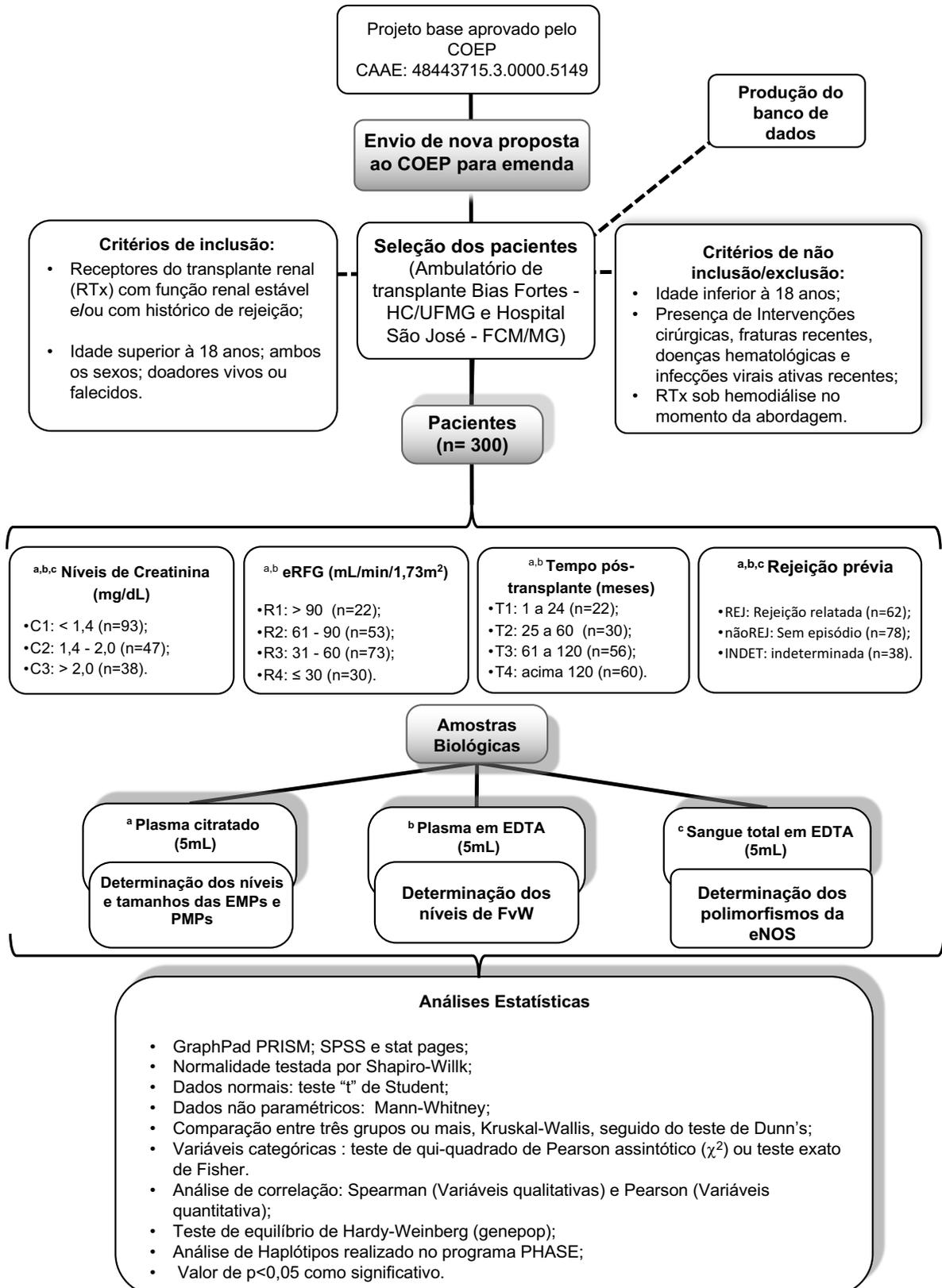
3.2 Objetivos específicos

Em receptores do transplante renal (RTx):

- Avaliar os níveis plasmáticos e o tamanho das micropartículas endoteliais (EMP) e plaquetárias (PMP) de acordo com os níveis séricos de creatinina, o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG), o tempo pós-transplante e a presença de história prévia de rejeição;
- Avaliar os níveis plasmáticos do fator de von Willebrand (FvW) e correlacioná-los com os níveis séricos de creatinina, o eRFG, o tempo pós-transplante e a presença de história prévia de rejeição;
- Determinar e comparar as frequências alélicas, genotípicas, e dos haplótipos dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da eNOS de acordo com os níveis plasmáticos de creatinina e a presença de história prévia de rejeição;
- Investigar a associação dos biomarcadores avaliados entre si e com outros parâmetros clínicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental e aspectos éticos



O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, CAAE – 48443715.3.0000.5149 (**ANEXO A e B**) sendo o título do projeto original “Avaliação de marcadores genéticos, inflamatórios e hemostáticos em pacientes transplantados renais”.

O esclarecimento dos objetivos propostos pela pesquisa foi realizado pela equipe pesquisadora para todos os participantes envolvidos no estudo. Com o emprego de uma linguagem clara e objetiva, foi enfatizada a participação voluntária, gratuita e a livre decisão de interromperem a participação no estudo, além da grande contribuição científica. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO C**) foi obtido de todos os voluntários no momento da coleta sanguínea. Uma ficha clínica padronizada (**ANEXO D**) foi formulada e preenchida para cada integrante do estudo, com bases em seus dados clínicos e laboratoriais relevantes obtidos de seus prontuários médicos, para produção do banco de dados.

4.2 Casuística

Foram selecionados para este estudo transversal, 178 RTx 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 de cada participante do estudo, sem a necessidade prévia de jejum, no mesmo momento da coleta sanguínea para o monitoramento laboratorial pós-transplante, solicitado pelo nefrologista responsável. A seleção dos participantes do estudo foi realizada entre o período de agosto de 2015 à dezembro de 2016.

A data do transplante, o tipo de doador, a doença de base e outros dados referentes ao transplante renal foram obtidos dos prontuários médicos assim como os dados clínicos e laboratoriais do dia da coleta sanguínea, para a produção de um banco de dados e categorização dos RTx em grupos. Os RTx foram distribuídos em diferentes grupos de acordo com os níveis de creatinina sérica, eRFG, tempo pós-transplante e presença ou não de rejeição prévia (JUNG; LEE; KWON, 2012; LING *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2013).

Para a estratificação dos grupos de acordo com a creatinina sérica, foram estabelecidos os seguintes valores de corte para os grupos:

- C1: Creatinina inferior a 1,4mg/dL (n=93);
- C2: Creatinina entre 1,4 e 2,0mg/dL (n=47);
- C3: Creatinina superior a 2,0mg/dL (n=38).

Os RTx também foram distribuídos em grupos de acordo com o ritmo de filtração glomerular, calculado pela fórmula *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) simplificada, sendo Homens = $175 \times \text{creatinina plasmática}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203}$ e Mulheres = $175 \times \text{creatinina plasmática}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203} \times 0,742$. Os grupos estabelecidos de acordo com o eRFG foram baseados na classificação dos cinco estágios da DRC. Os estágios quatro e cinco da DRC foram incorporados em um único grupo (R4) (LAU *et al.*, 2017).

- R1: eRFG > 90mL/min/1,73m² (n=22);
- R2: eRFG entre 90 e 61 mL/min/1,73m² (n=53);
- R3: eRFG entre 60 e 31 mL/min/1,73m² (n=73);
- R4: eRFG: ≤ 30mL/min/1,73m² (n=30).

Além disso, os RTx foram distribuídos novamente em quatro grupos de acordo com o tempo pós-transplante. Dez RTx não foram incluídos nesta análise devido a não obtenção da data correta do transplante renal. Os demais participantes foram distribuídos nos seguintes grupos:

- T1: 1 a 24 meses (n=22);
- T2: 25 a 60 meses (n=30);
- T3: 61 a 120 meses (n=56);
- T4: acima de 120 meses pós-transplante (n=60).

Finalmente, os RTx foram distribuídos em grupos de acordo com a presença ou não de rejeição prévia ao enxerto renal. Os dados para categorização destes grupos foram obtidos dos prontuários médicos. Sendo esta informação ausente ou não relatada em 38 RTx. Desta forma, os RTx foram distribuídos da seguinte maneira:

- REJ: Rejeição prévia relatada (n=62);
- nãoREJ: Sem episódio de rejeição (n=78);
- INDET: História prévia de rejeição indeterminada (n=38).

4.2.1 Critérios de inclusão

- Receptores do transplante renal (RTx) com função renal estável e/ou com histórico de rejeição;
- Idade superior à 18 anos; ambos os sexos; doadores vivos e falecidos.

A confirmação da estabilidade clínica dos RTx foi realizada pela equipe de nefrologia colaboradora deste estudo e por meio da consulta aos dados clínicos e laboratoriais disponíveis nos prontuários. A confirmação da rejeição foi diagnosticada de acordo com os resultados das biópsias do enxerto renal e/ou definida por um aumento nos níveis séricos de creatinina em 0,3 mg/dL a partir do valor basal, não sendo atribuída esta elevação à nenhuma outra causa, com normalização dos níveis de creatinina após o tratamento com esteróides ou anticorpos anti-linfocíticos.

4.2.2 Critérios de exclusão\ Não inclusão

- Idade inferior à 18 anos;
- Intervenções cirúrgicas recentes;
- Presença de fraturas recentes;
- Presença de infecções virais ativas, tais como CMV ou que estivessem em terapia antiviral profilática;
- RTx sob hemodiálise no momento da abordagem;
- RTx portadores de distúrbios hematológicos, tais como hemorragias, hemofilias, trombofilia, confirmados por meio de consulta ao prontuário ou por relato do médico.

4.3 Amostras biológicas

Foram coletados, de cada integrante do estudo, 5 mL de sangue venoso em anticoagulante citrato de sódio 0,109 mol/L (VACUETTE®) e 5 mL em tubos contendo anticoagulante K3 - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1,8mg/mL em tubos (VACUETTE®), por meio de coleta a vácuo, devidamente identificados, para obtenção das amostras de plasma e DNA, respectivamente. 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.

4.3.1 Preparo das amostras biológicas

Para as amostras coletadas em EDTA, foi recolhida uma alíquota inicial de 600 µL de sangue total, para a extração de DNA, com a finalidade de investigar os polimorfismos do gene da eNOS. As alíquotas de sangue total foram armazenadas imediatamente em freezer vertical a -20°C (Eletrolux® modelo FE26) e descongeladas apenas para a realização da técnica de extração de DNA gênomico. O material excedente foi submetido à centrifugação, 2.500 rpm, por 20 minutos, em centrífuga refrigerada (Jouan® modelo BR4i), à 4°C, para obtenção das amostras de plasma. Foram realizadas alíquotas de 500 µL de plasma em triplicata, armazenadas em microtubos de polipropileno atóxico de centrifugação (Axygen®) devidamente identificados e armazenadas em freezer vertical à -80°C (Jouan® modelo VX380) até o momento do uso. As amostras colhidas em citrato foram centrifugadas à 3.500 rpm, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada (Jouan® modelo BR4i), à 4°C, para obtenção das amostras de plasma pobre em plaquetas (PPP). Alíquotas de 500 µL de plasma citratado foram preparadas e armazenadas no mesmo tipo de microtubo descrito anteriormente. O PPP foi armazenado em freezer vertical à -80°C (Jouan® modelo VX380). Cada alíquota de plasma (EDTA ou citrato) foi descongelada apenas uma única vez para a realização dos ensaios de FvW e MPs, respectivamente (CAMPOS *et al.*, 2010).

4.4 Métodos

4.4.1 Isolamento das micropartículas e análise por citometria de fluxo

4.4.1.1 Purificação das Micropartículas

As amostras de PPP foram descongeladas em banho-maria à 37°C apenas no momento do uso. As amostras descongeladas foram centrifugadas à 13.000 rpm, durante cinco minutos para obtenção do plasma livre de plaquetas (PLP). Finalmente, 100 µL do PLP foram diluídos em solução de tampão fosfato alcalino (PBS) contendo citrato e heparina (1,0 µg/mL) na proporção de 1:3 e posteriormente centrifugados à 14.000 rpm, durante 90 minutos, à 15°C. O sedimento resultante rico em MPs, foi ressuspenso em 100 µl de tampão de ligação anexina 1X (*Annexin V binding*® - BD Biosciences, Califórnia, EUA) (CAMPOS *et al.*, 2010).

4.4.1.2 Quantificação e fenotipagem das micropartículas

As MPs foram quantificadas e fenotipadas por citometria de fluxo. A técnica foi adaptada de Campos *et al.*, 2010.

A caracterização fenotípica das MPs para determinação de sua origem celular foi realizada com a incubação de 100 µL da solução contendo as MPs com os anticorpos monoclonais específicos para: plaquetas (2,5 µL de CD41a/ alofocianina - APC), células endoteliais (5,0 µL de CD51/61 PE) e 2 µL de Anexina V- Isotiocianato de fluoresceína (FITC), para reconhecimento dos resíduos de fosfatidilserina, que geralmente estão presentes na superfície das MPs.

Como controle de isotipo, utilizou-se anticorpos IgG de camundongo marcados com APC e PE. Após a adição dos anticorpos, as amostras foram incubadas por 30 min., protegidas da luz e em temperatura ambiente. Após a incubação, as MPs foram ressuspensas em 300 µL do tampão de ligação de Anexina V (BD Pharmingen). As amostras foram levadas ao citômetro de fluxo (LSR Fortessa - Becton-Dickinson, Califórnia, EUA), na Faculdade de Farmácia da UFMG, para as análises dentro de um intervalo de 60 segundos de aspiração para cada amostra, assim contabilizando o número de eventos dentro de um determinado tempo. Para a quantificação absoluta das MPs, ajustou-se o citômetro de fluxo para realizar a leitura da amostra em alta velocidade (60 µL/segundo) para cada amostra. O número de MPs/µL de plasma foi

então calculado como descrito previamente por Campos *et al.*, 2010 de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{MPs}/\mu\text{L} = (\text{N} \times 400) / (60 \times 100)$$

Onde:

N = número de eventos adquiridos na região das MPs;

400 = volume final por tubo antes da fenotipagem (μL);

60 = volume de amostra analisada durante a fenotipagem (μL);

100 = volume original da suspensão de MPs (μL).

As análises dos resultados obtidos por citometria de fluxo foram realizadas com a utilização do programa *FlowJo*, versão 8.7 (Tree Star). As estratégias de análises estão representadas nas **Figuras 7 e 8**. As MPs foram analisadas de acordo com sua complexidade e seu tamanho, sendo *forward scatter* (FSC) *versus side scatter* (SSC), respectivamente, com distribuição de dispersão comparada a microesferas sintéticas fluorescentes de tamanho definido, 0,7 μm , 0,8 μm e 0,9 μm (*Amino Fluorescent Particles* - Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, EUA) para auxiliar a identificação das populações das micropartículas avaliadas. Utilizou-se 10 μL da solução de microesferas fluorescentes adicionadas à 100 μL de PBS 1x estéril e foi realizada a sobreposição dessas microesferas sobre as MPs, alvo do estudo. Uma vez definida a localização correspondente às MPs, com a utilização dos gráficos de FSC *versus* SSC, foi estabelecido o quadrante (*gate*) para seleção das populações das MPs, marcadas com o anticorpo *Annexin V* FITC (**Figura 7 A**). Em seguida, foram delimitados os gráficos com os quadrantes específicos para anti-CD51 PE (endotélio) *versus* SSC e anti-CD41 APC (plaquetas) *versus* SSC para quantificação das EMPs e PMPs, respectivamente (**Figura 7 B**). Com a finalidade de eliminar quaisquer interferentes provenientes de marcações inespecíficas, foram realizados controle de isotipos dos anticorpos utilizados (**Figura 7 C**).

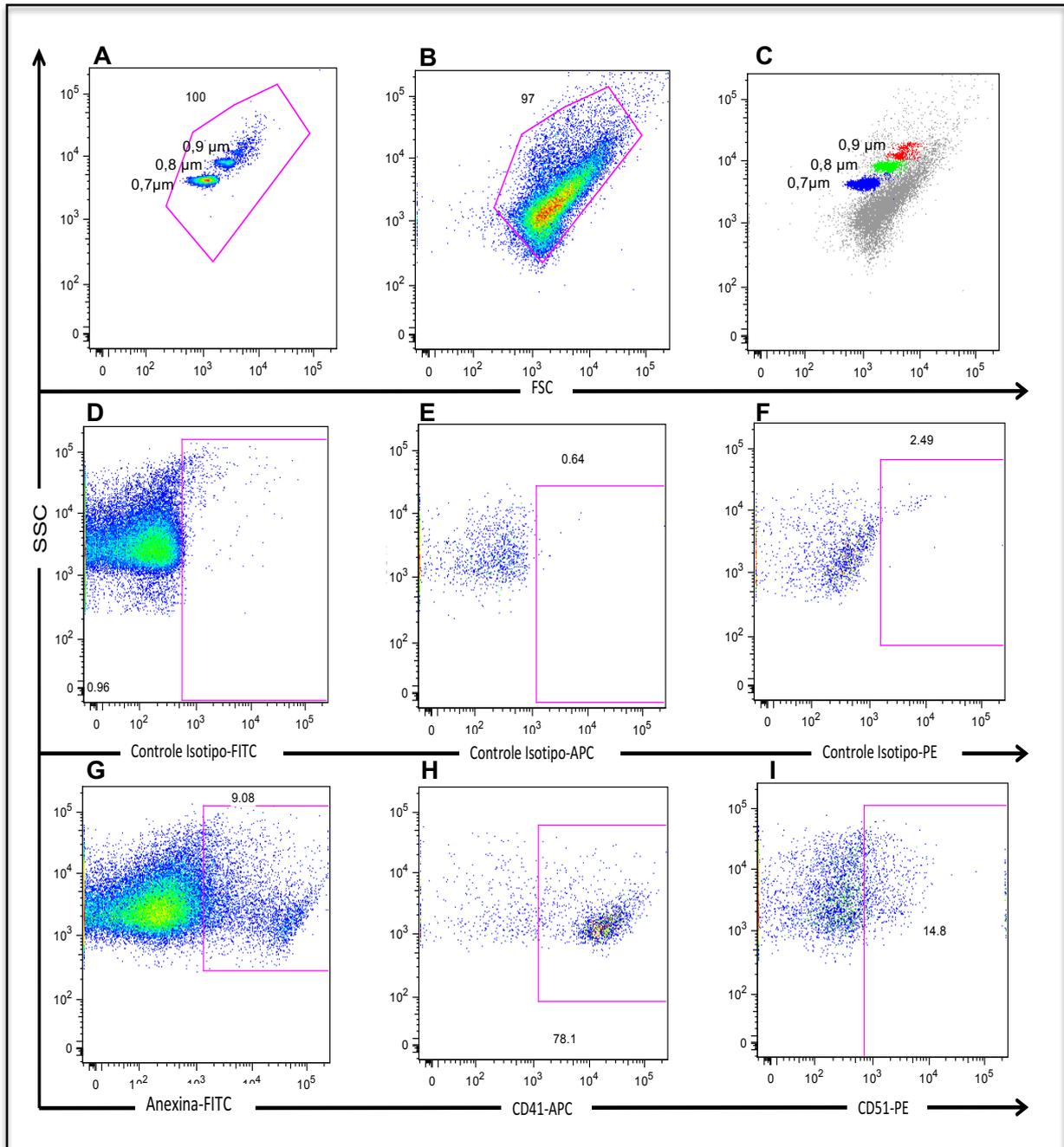


Figura 7: Estratégia de análise para a quantificação das micropartículas celulares (MPs). **A:** Identificação da região contendo as populações de microesferas sintéticas de tamanho definido ($0,7\mu\text{m}$, $0,8\mu\text{m}$ e $0,9\mu\text{m}$); **B:** Definição da região contendo as populações de MPs; **C:** Sobreposição das microesferas sintéticas ($0,7\mu\text{m}$, $0,8\mu\text{m}$ e $0,9\mu\text{m}$) sobre as populações de MPs alvo do estudo; **D:** Controles de isotipo FITC; **E:** Controles de isotipo APC; **F:** Controles de isotipo PE; **G:** Determinação das micropartículas celulares positivas para a marcação com anexina-FITC; **H:** Determinação das micropartículas plaquetárias (PMP) positivas para a marcação CD41+/APC; **H:** Determinação das micropartículas endoteliais (EMP) positivas para a marcação CD51+/PE.

As MPs foram analisadas tanto por seu número total por volume de amostra como por subgrupos de acordo com seu o tamanho. A análise por tamanho leva em

consideração o potencial inflamatório das micropartículas avaliadas, uma vez que o tamanho das MPs se correlaciona com a intensidade do processo inflamatório envolvido. De modo que, quanto menor for seu tamanho mais intenso é o quadro inflamatório e/ou pró-coagulante instalado (DEAN *et al.*, 2009; MONTORO-GARCIA *et al.*, 2012; MONTORO-GARCÍA *et al.*, 2014, 2015). Para a análise das MPs de acordo com seu tamanho foi utilizado microesferas sintéticas de tamanho definido citadas previamente para distribuição das MPs em dois novos grupos (**Figura 8**). Sendo:

- Micropartículas maiores: $> 0,7\mu\text{m}$
- Micropartículas menores: $\leq 0,7\mu\text{m}$

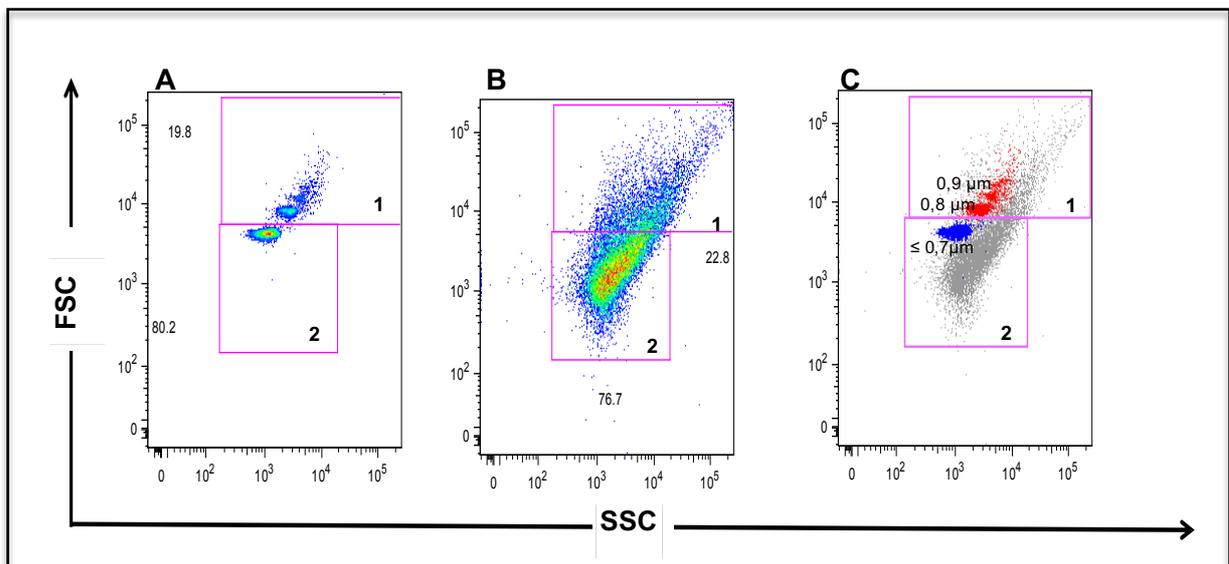


Figura 8: Estratégia de análise por tamanho das micropartículas celulares (MPs). **A:** Identificação da região contendo as populações de microesferas sintéticas de tamanho definido ($0,7\mu\text{m}$ $0,8\mu\text{m}$ e $0,9\mu\text{m}$); **B:** Definição da região contendo as populações de MPs; **C:** Sobreposição das microesferas sintéticas ($0,7\mu\text{m}$ $0,8\mu\text{m}$ e $0,9\mu\text{m}$) sobre as populações de MPs alvo do estudo; **1:** Definição da região contendo as MPs de tamanho maior que $0,7\mu\text{m}$. **2:** Definição da região contendo as MPs de tamanho menor ou igual a $0,7\mu\text{m}$.

4.4.2 Determinação dos níveis plasmáticos do Fator de von Willebrand

A metodologia utilizada para a determinação dos níveis plasmáticos de FvW foi o ELISA de captura. O princípio do teste consiste na captura dos antígenos FvW presente no plasma, por anticorpos policlonais anti-FvW, fixados em placas. Foi utilizado o conjunto diagnóstico IMUBIND® FvW (American Diagnostica® Inc.,

Stamford, EUA), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A amostra utilizada para este fim foi o PPP colhido em EDTA.

A leitura do ensaio foi realizada com o leitor de microplacas (VersaMax Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES, USA), na Faculdade de Farmácia da UFMG. A concentração do FvW de cada plasma testado foi obtida interpolando-se as leituras das amostras em uma curva padrão construída.

O fabricante do kit diagnóstico não fornece valores de referência para os níveis plasmáticos de FvW. Foi utilizado o valor médio de determinações realizadas em plasmas de voluntários saudáveis obtidos no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais [805 mU/mL (683-1012mU/mL)].

4.4.4 Análise molecular dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial

4.4.4.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de alíquotas de sangue total com o emprego do conjunto de reagentes BIOPUR mini spin®. As instruções de uso do fabricante foram seguidas rigorosamente. As amostras de DNA foram armazenadas em microtubos de centrifugação a -20°C até o momento das análises por reações em cadeia de polimerase (PCR).

4.4.4.2 Reação em cadeia da polimerase e Polimorfismo de fragmentos de restrição

O DNA genômico extraído das amostras de sangue de todos os participantes do estudo foi submetido à investigação da presença dos polimorfismos no gene da eNOS (G894T, T786C e VNTR b/a). As técnicas realizadas para este estudo foram padronizadas no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG. As condições de reação foram previamente descritas e adaptadas para este estudo (ALPOIM *et al.*, 2013; AZARPIRA *et al.*, 2013). Para os SNPs, G894T e T-786C, foi empregada a metodologia de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP) e para o polimorfismo em repetição em Tandem, VNTR b/a, foi utilizada apenas a técnica de PCR convencional.

Foram utilizados os seguintes reagentes para as reações de PCR: oligonucleotídeos iniciadores (IDT®), desoxirribonucleotídeos (Fermentas®), tampão (pht Buffer B 10X- phoneutria®) e Taq polimerase (phoneutria®). As reações continham um volume final de 15 µL e foram realizadas em termocicladores (MJ Research® modelo PT 100, EUA). Detalhes, incluindo as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, concentrações dos reagentes, condições empregadas na PCR, número de ciclos, temperaturas de anelamento, tamanhos dos produtos após as ampliações por PCR e após as ações das endonucleases de restrição estão representados no **Quadro 4**.

Quadro 4: Descrição das etapas empregadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) para a genotipagem dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da sintase do óxido nítrico endotelial

	SNP (rs)		
	G894T (rs1799983)	T-786C (rs 2070744)a	VNTR bla
Óligo senso	5'- CATGAGGCTCAGCCC CAGAAC-3'	5'- TGGAGAGTGCTGGTGTGA CCCCA-3'	5'- AGGCCCTATGGTAGT GCCTTT-3'
Óligo antisenso	5'- AGTCAATCCCTTGGT GCTCAC-3'	5'- GCCTCCACCCACCCT GTC-3'	5'- TCTCTTAGTGCTGTGG TCAC-3'
	Concentração dos reagentes por reação de PCR		
Tampão 10x	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
dNTP (400 mM/mL)	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
Óligo senso (10µM)	0,5 µL	1,0 µL	1,0 µL
Óligo antisenso (10µM)	0,5 µL	1,0 µL	1,0 µL
Taq (5U/ L)	0,15 µL	0,15 µL	0,15 µL
DNA (35ng/ L)	1,0 µL	1,0 µL	2,0 µL
Água q.s.p.	15,0 µL	15,0 µL	15,0 µL
Condições de PCR	1 ciclo de 95°C 5 min 30 ciclos: 95°C 60s, 63°C 60s, 72°C 60s, 72°C 5min	1 ciclo de 94°C 4 min 35 ciclos: 94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 60s, 72°C 5min	1 ciclo de 94°C 4 min 35 ciclos: 94°C 30s, 63°C 30s, 72°C 60s, 72°C 5min
Amplificação	206pb	223pb	393pb e 420pb
	Concentração por reação de RFLP		
Tampão da enzima 10x	1,5 µL (Tango10X)	1,5µL (tampão B)	N.S.

/continua

Enzima de restrição (10 u/ L)	<i>Mbol</i> 5U (Fermentas®)	<i>HpaII</i> 5U (Fermentas®)	N.S.
Produto de PCR	3,0 µL	5,0 µL	N.S.
Água q.s.p.	15,0 µL	15,0 µL	N.S.
Tamanho do alelo	G= 206 pb T= 119pb e 87pb.	T= 140pb e 40pb C= 90pb, 50pb e 40pb	Alelo a= 393 bp Alelo b= 420 bp

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; PCR: reação em cadeia da polimerase; dNTP: Desoxinucleótido Trifosfato; DNA: ácido desoxirribonucleico; q.s.p: quantidade suficiente para; RFLP: polimorfismo de fragmentos de restrição; pb: pares de base.

Fonte: (ALPOIM *et al.*, 2014; AZARPIRA *et al.*, 2013).

Após amplificação do segmento específico, utilizou-se a enzima *Mbol* (Fermentas®) para a obtenção do genótipo G894T. Esta enzima reconhece a sequência 5'-GATC-3', presente no alelo 894T, no qual cria um sítio de clivagem no fragmento amplificado gerando dois fragmentos de 119 pb e 87 pb, visualizados pós corrida eletroforética. Os indivíduos que não possuem este alelo apresentam apenas uma banda na altura do material amplificado sem digestão (206 pb). Os indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam as 3 bandas descritas.

Para o polimorfismo T-786C, utilizou-se a endonuclease *HpaII* (Fermentas®), que reconhece a sequência 5'-CCGG-3', presente no alelo selvagem (-786T ou TT) que originou fragmentos de 140 pb e 40 pb. Por outro lado, para os indivíduos homozigotos para o alelo -786C ou CC, foi observado fragmentos de 90 pb, 50 pb e 40pb (os dois últimos não são visualizados, pois são perdidos durante a corrida eletroforética). Indivíduos heterozigotos apresentaram as bandas de 140pb, 90pb, 50pb e 40pb.

Para o genótipo VNTR b/a foram obtidos fragmentos de 420 pb (genótipo bb) ou 393 pb (genótipo aa) ou ambos (genótipo ab). Os produtos gerados por PCR e RFLP foram analisados em gel de poliacrilamida à 8%, corado com nitrato de prata. A **Figura 9** representa os padrões de pares de base para cada polimorfismo e seus genótipos.

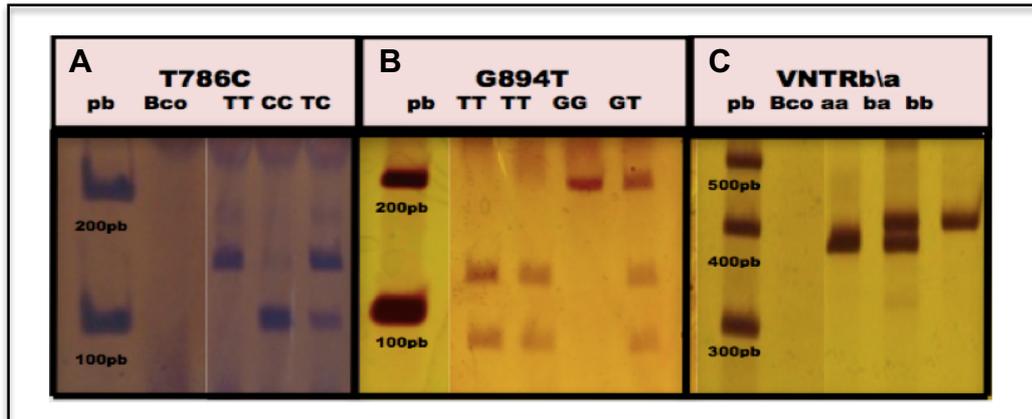


FIGURA 9 – Gel de poliacrilamida contendo fragmentos obtidos após realização da PCR (VNTR b/a) e digestão com endonucleases de restrição (G894T e T-786C). **A:** Fragmentos do SNP T-786C, primeira canaleta: padrão de peso molecular de 100pb; segunda canaleta: controle negativo (branco); terceira canaleta: genótipo homocigoto selvagem (TT) com peso molecular de 140pb, quarta canaleta: homocigoto para o alelo variante (CC) com peso molecular de 90pb; quinta e última canaleta: heterocigoto para o alelo variante (TC) com as bandas 140 e 90pb. Nota-se que as bandas de 50 e 40pb não são observadas no gel. **B:** Fragmentos do SNP G894T, primeira canaleta: padrão de peso molecular de 100pb; segunda e terceira canaletas: genótipo homocigoto para o alelo variante (TT) com peso molecular de 119 e 87pb; quarta canaleta: homocigoto selvagem (GG) com peso molecular de 206pb; quinta canaleta: heterocigoto para o alelo variante com peso molecular de 206, 119 e 87pb. **C:** Fragmentos do polimorfismo VNTR b/a: primeira canaleta: padrão de peso molecular de 100pb; segunda canaleta: controle negativo (branco); terceira canaleta: genótipo homocigoto para o alelo variante (a) com 393pb; quarta canaleta: heterocigoto com peso molecular de 420 e 393pb.

4.5 Produção do banco de dados

Mediante as análises dos prontuários médicos foi possível a obtenção dos resultados laboratoriais dos participantes do estudo, referentes ao dia da sua inclusão na pesquisa, tais como: hemograma, dosagens de imunossupressores, marcadores de função renal e hepática, urina rotina, dentre outros. Também foram obtidos dados referentes ao transplante renal, como: data do transplante, tipo de doador, compatibilidade HLA, doença de base, comorbidades, terapia imunossupressora de manutenção, etc. Estas informações foram utilizadas para compor os diferentes subgrupos do estudo e correlacionar os dados clínicos com os marcadores avaliados.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização dos programas GraphPad PRISM (versão 7.0), SPSS (versão 13.0) e *stat pages*. 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 do teste de *Dunn’s*. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado de Pearson assintótico (χ^2) 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.

Foi verificado se as populações estavam sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando-se o programa genepop (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html). Para análise de haplótipos foi utilizado o programa PHASE (versão 2.1). As frequências encontradas para cada haplótipo nos diferentes grupos foram comparadas pelo teste de qui-quadrado de Pearson assintótico (χ^2). As variáveis não-paramétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil (IQ) e as variáveis paramétricas como média e desvio-padrão (SD). Foram consideradas como diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização clínica e demográfica dos receptores do enxerto renal

O presente estudo transversal contou com a participação de 178 RTx, sendo 109 do sexo masculino (61,2%) e 69 do sexo feminino (38,8%). Os principais dados clínicos e demográficos dos participantes do estudo estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Caracterização clínica e demográfica dos integrantes do estudo

Parâmetros	Masculino (n=109)	Feminino (n=69)	p	Total (n=178)
Idade (anos)**	46 (57-37,5)	38 (52-27,5)	0,012*	45 (55,2-32)
Causa primária de DRC [n(%)]				
Glomerulopatias	24 (22,0%)	13 (18,9%)	0,318	37 (20,8%)
Nefroesclerose hipertensiva	23 (21,1%)	8 (11,5%)		31 (17,4%)
Nefropatia do diabetes	6 (5,5%)	9 (13,1%)		15 (8,4%)
Outras causas***	19 (17,5%)	23 (33,3%)		42 (23,6%)
Etiologias desconhecidas	24 (22,0%)	10 (14,5%)		31 (17,4%)
Não informado	13 (11,9%)	6 (8,7%)		19 (10,6%)
Tempo de HD (meses)**	32 (60-15)	33 (48-18)	0,839	32 (16-60)
Tempo pós Tx (meses)**	99,5 (165,8-47)	91,5 (135,3-52,7)	0,558	96 (153,5-52,2)
Tipo de doador [n (%)]			0,490	
Falecido	52 (47,7%)	44 (63,8%)		96 (53,9%)
Vivo	47 (43,1%)	21 (30,4%)		68 (38,2%)
Indeterminado	10 (9,2%)	4 (5,8%)		14 (7,9%)
Comorbidades [n (%)]			0,439	
ITU de repetição	00 (0%)	04 (5,8%)		04 (2,2%)
DM	22 (20,2%)	15 (21,7%)		37 (20,8%)
HAS	58 (53,2%)	33 (47,8%)		91 (51,1%)
Dislipidemia	17 (15,6%)	12 (17,4%)		29 (16,3%)
CMV	00 (0%)	02 (2,9%)		02 (1,1%)
Outras	42 (38,5%)	33 (47,8%)		75 (42,1%)
Não apresentam/não relatado	29 (26,6%)	12 (17,4%)		41 (23,0%)
Terapia Imunossupressora [n (%)]			0,976	
TAC+MMF+PDN	61 (56,0%)	37 (53,6%)		98 (55,0%)
CSA+MMF+PDN	18 (16,5%)	16 (23,2%)		34 (19,1%)
Outras	18 (16,5%)	10 (14,5%)		28 (15,7%)
Outras	12 (11,0%)	6 (8,7%)		17 (9,6%)
Indeterminado				
Outros Medicamentos [n (%)]			0,962	
Hipotensores				
IECA	25 (22,9%)	12 (17,4%)		37 (20,8%)
β-bloqueadores	34 (31,2%)	22 (31,8%)		56 (31,5%)
Antagonistas do canal Ca ²⁺	34 (31,2%)	21 (30,4%)		55 (30,9%)
ARA	26 (23,8%)	14 (20,3%)		40 (22,4%)
Diuréticos	32 (29,3%)	18 (26,0%)		50 (28,1%)
Ácido Acetilsalicílico	08 (7,3%)	07 (10,1%)		15 (8,4%)
Estatinas/Fibratos	42 (38,5%)	27 (39,1%)		69 (38,8%)
Suplementos/Polivitamínicos	48 (44,0%)	43 (62,3%)		91 (51,1%)
Ansiolíticos/Antidepressivos	08 (7,3%)	16 (23,2%)		24 (13,5%)
Insulina/Hipoglicemiantes orais	18 (16,5%)	15 (21,7%)		33 (18,5%)
Outros	13 (11,9%)	06 (8,7%)		19 (10,6%)
Rejeição prévia [n (%)]			0,989	

/continua

REJ	39 (35,8%)	23 (33,3%)		62 (34,8%)
nãoREJ	46 (42,2%)	32 (46,4%)		78 (43,8%)
Indeterminado/Não informado	24 (22,0%)	14 (20,3%)		38 (21,3%)
Dados clínicos e laboratoriais				
IMC (Kg/m ²)**	23,3 (26,3-20,6)	24,2 (27,8-21,3)	0,413	24,1 (26,5-20,6)
Creatinina (mg/dL)**	1,50 (1,91-1,21)	1,11 (1,67-0,85)	<0,001*	1,34 (1,85-1,06)
eRFG (mL/min/1.73m ²)**	56,7 (72,7-38,8)	59,0 (71,7-36,4)	0,559	57,2 (72,9-39,1)
Ureia (mg/dL)**	49 (64,5-37,0)	41 (58,5-31,5)	0,048*	45 (63-35,0)
Ácido Úrico (mg/dL)**	68 (81-57)	51 (69,5-44,5-)	<0,001*	65 (77,7-51)
Plaquetas (µL)**	213402 (54416)	242156 (73829)	0,009*	224159 (63676)

*p≤0,05=significativo. **Os dados não-paramétricos estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (Mann-Whitney). *** Outras causas de doença de base: Rins policísticos, Lúpus, Atresia renal congênita, Síndrome hemolítica urêmica, Síndrome de Fanconi entre outras. Os dados paramétricos estão apresentados como média e desvio padrão (Pearson). Dados de frequência (%) foram analisados pelo teste χ^2 ou pelo teste exato de Fisher. IMC: índice de massa corporal; DRC: doença renal crônica; HD: hemodiálise; TAC: tacrolimus; MMF: micofenolatomofetil; PDN: prednisona; CSA: ciclosporina; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; ARA: antagonistas dos receptores de angiotensina; ITU: infecção do trato urinário; DM: diabetes mellitus; HAS: hipertensão arterial sistêmica; CMV: citomegalovírus; ND: não determinado. Valores de referência: IMC - Eutrófico: 18,5 a 25; Creatinina: 0,4 - 1,3 mg/dL; eRFG: ≥ 90 mL/min/1.73m²; Ureia: 16-40 mg/dL; Ácido úrico: 2,5 - 7,4 mg/dL; Plaquetas: 150.000 a 450.000µL.

Ao se comparar a idade dos pacientes, considerando os sexos feminino e masculino, foi encontrada uma diferença (p=0,012), sendo a mediana de 46 para homens e 38 para mulheres. Em relação às doenças primárias que culminaram na DRCT, entre as diagnosticadas ou relatadas, as glomerulopatias lideraram com 26,9% dos casos de doença base na população total, sendo 27,5% em homens e 26,1% em mulheres. A nefrosclerose hipertensiva (17,4% da população total) foi mais frequente em homens (23%) do que em mulheres (11,5%) mas não foi significativo. Outras causas e nefropatia do diabetes foram mais comuns em mulheres (28,9% e 13,4%) do que em homens (14,7% e 4,6%) no entanto, também não foram significativos. É importante salientar que grande parte dos RTx não apresentaram doença de base definida ou esta não estava relatada nos prontuários médicos (28,1%). Não foram encontradas diferenças entre as doenças de base na população estudada (p=0,234). O tempo de hemodiálise pré-transplante, realizada pelos RTx, também não apresentou diferenças (p=0,839). A mediana para o período transcorrido entre a realização da cirurgia e a data da coleta das amostras (tempo pós-transplante) foi de 96 meses para a população total, com variação entre 1 a 477 meses pós-transplante (**Tabela 1**).

O tipo de doador mais frequente foi o falecido, com 53,9% da população, sendo 47,7% em homens e 63,8% em mulheres. Infelizmente, não foi possível a identificação do tipo de doador em 14 RTx (7,9%), contribuindo para a diferença não significativa ($p=0,490$).

Em relação à presença de comorbidades e/ou complicações detectadas após o transplante renal, a hipertensão arterial foi a mais comum (51,1%), seguida por outras comorbidades variadas (42,1%), DM (20,8%), dislipidemia e obesidade (16,3%), infecção do trato urinário (ITU) e CMV somaram juntas 3,3%. Não apresentaram comorbidades pós-transplante ou não possuíam essa informação relatada em seus prontuários 23,0% da população (**Tabela 1**).

A terapia imunossupressora tripla, composta por Tacrolimus + prednisona + micofenolato de mofetil foi a mais utilizada (55,0%) e, infelizmente, não foi possível a determinação da terapia em uso para 9,4% dos participantes. Todos os receptores faziam uso de outros medicamentos além da terapia imunossupressora. Cento e vinte nove receptores (72,5%) faziam o uso de hipotensores, cerca de 91 (51,1%) faziam o uso de suplementação/polivitamínicos e 84 (38,8%) em uso de estatinas e fibratos. A comparação estatística desta frequência não foi significativa ($p=0,962$).

Levando em consideração a ocorrência prévia de rejeição ao enxerto, 34,8% já apresentaram episódios de rejeição diagnosticada por biópsia renal ou por meio da evolução clínica e níveis plasmáticos de creatinina, sendo controlada por indução medicamentosa. Novamente, o não relato nos prontuários ou a não confirmação da presença de rejeição foi elevada (21,3%).

Não foi encontrada diferença comparando-se o IMC entre os sexos ($p=0,413$). Por outro lado, pode-se notar que grande parte da população se encontrava na faixa eutrófica para o IMC (Entre 18,6 e 24,9 Kg/m²).

Os marcadores da função de filtração renal (creatinina, ureia e ácido úrico) apresentaram diferenças entre os sexos, sendo menores entre as mulheres. Com valores de $p<0,001$, 0,048 e $<0,001$, respectivamente. Em relação ao eRFG, não foram encontradas diferenças entre os sexos ($p=0,559$). Dentre os parâmetros hematológicos, a contagem média das plaquetas apresentou diferença, sendo 213.402 para os homens e 242.156 para as mulheres ($p=0,009$), **Tabela 1**.

5.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de micropartículas endoteliais e plaquetárias

Foram avaliados os níveis de EMP e PMP em 97 RTx, inicialmente distribuídos de acordo com os níveis de creatinina sérica, C1: <1,4mg/dL (n=51), C2: 1,4 e 2,0mg/dL (n=25) e C3: >2,0mg/dL (n=21). Foram observados maiores níveis de MPs totais (EMP + PMP) nos RTx do grupo C1 (C1: 284,7/ μ L; IQ: 429,7-201,4) se comparados aos demais grupos (C2: 211,1/ μ L; IQ: 311,5-126,1 e C3: 175,5/ μ L; IQ: 375,4-130,8) e maiores níveis de PMP em C1 se comparado ao C3 (C1: 186,9/ μ L; IQ: 315,5-104,0 e C3: 109,1/ μ L; IR: 180,4-66,5). Não foram encontradas diferenças numéricas de EMPs entre os grupos C1, C2 e C3 ($p=0,511$), **Figura 10**. E não foram observadas diferenças nas análises em relação às MPs > 0,7 μ m nestes mesmos grupos.

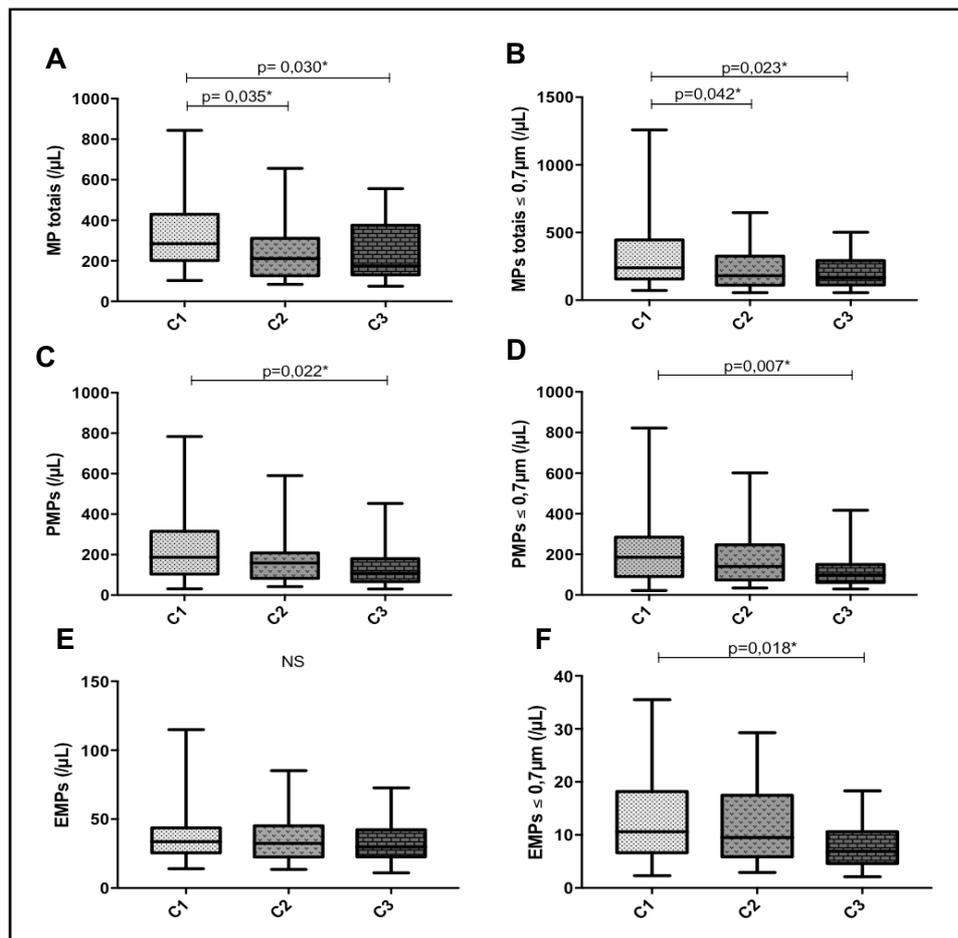


Figura 10 – Avaliação das micropartículas celulares totais (MPs), micropartículas plaquetárias (PMPs) e micropartículas endoteliais (EMPs) de acordo com o número (**A**, **C** e **E**) e por tamanho (**B**, **D** e **F**) nos diferentes grupos estratificados de acordo com os níveis de creatinina sérica (C1: <1,4mg/dL; C2: 1,4 e 2,0mg/dL e C3: >2,0mg/dL). Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's; $p<0,050$ como significativo.

Com a finalidade de verificar o potencial inflamatório das MPs, foi realizada a análise por tamanho, considerando o ponto de corte de 0,7 μm , o qual demonstrou um predomínio de MPs totais menores que 0,7 μm decrescentemente nos grupos C1, C2 e C3, com medianas e IQ de MPs totais (C1: 239,6/ μL , IQ: 446,2-156,8; C2: 180,5/ μL , IQ: 325,2-110,0 e C3: 163,6/ μL , IQ: 293,5-111,6). Além disso, as PMPs e EMPs menores também foram diferentes entre os grupos C1 e C3 (PMPs - C1: 185,1/ μL ; IQ: 284,9-90,33; C2: 140,5/ μL ; IQ: 246,7-73,57; C3: 98,1/ μL ; IQ: 150,4-61,65 e EMPs - C1: 10,7/ μL ; IQ: 18,2-6,7; C2: 9,53/ μL ; IQ: 17,5-5,9; C3: 6,9/ μL ; IQ: 10,6-4,7), **Figura 10**. Não foram observadas diferenças entre os níveis de MPs de maiores tamanhos nos RTx do presente estudo.

Os RTx foram novamente distribuídos em grupos de acordo com o eRFG. No entanto, nenhuma diferença foi encontrada nesta avaliação para os diferentes níveis e tamanhos das MPs ($p > 0,050$), **Tabela 2**.

Tabela 2 – Comparação dos níveis e tamanhos das micropartículas de acordo com o ritmo de filtração glomerular

Parâmetros (μL)	R1 (n=18)	R2 (n=38)	R3 (n=30)	R4 (n=11)	p
MPs totais	226,9 (393,0-151,9)	218,4 (422,0-125,5)	289,2 (421,7-191,2)	274 (307,1-201,4)	0,462
PMPs	127,1 (211,3-88,4)	167,2 (266,8-86,1)	191,8 (317,7-97,1)	201,4 (293,1-135,3)	0,318
EMPs	31,17 (43,5-26,1)	32,47 (47,0-21,3)	32,87 (43,5-25,7)	33,3 (38,5-25,8)	0,993
MPs >0,7 μm	89,4 (140,2-51,5)	59,6 (88,2-45,2)	65,3 (116,7-50,7)	70,6 (139,7-49,33)	0,186
PMPs >0,7 μm	33,3 (52,2-17,6)	30,6 (41,6-20,4)	31,9 (43,7-25,1)	26,5 (44,6-18,6)	0,580
EMPs >0,7 μm	20,4 (36,1-15,6)	21,7 (32,7-13,4)	22,3 (31,8-14,9)	23,7 (44,6-14,4)	0,838
MPs \leq 0,7 μm	206,3 (356,7-124,1)	188,0 (411,9-106,5)	234,9 (303,9-152,7)	219,3 (336,1-142,7)	0,960
PMPs \leq 0,7 μm	107,8 (186,2-70,8)	159,8 (348,5-73,5)	184,4 (237,5-85,1)	151,9 (250,1-74,4)	0,540
EMPs \leq 0,7 μm	7,9 (14,8-5,73)	9,73 (19,0-5,8)	10,9 (20,4-6,8)	11,0 (21,6-8,6)	0,828

Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil (Kruskal-Wallis teste seguido do teste de Dunn`s). R1: eRFG maior que 90mL/min/1,73m²; R2: eRFG 90 - 60 mL/min/1,73m²; R3: eRFG 60 - 30mL/min/1,73m²; R4: eRFG menor ou igual a 30mL/min/1,73m². $p < 0,050$ como significativo.

Para avaliar a influência do tempo pós-transplante sobre as MPs, os RTx foram distribuídos em quatro novos grupos, T1: 1 a 24 meses (n=19); T2: 25 a 60 meses (n=26); T3: 61 a 120 meses (n=30) e T4: acima 120 meses pós-transplante (n=22). As

MPs foram avaliadas de acordo com seu número e tamanho, como descrito anteriormente. Foram encontradas diferenças para as medianas dos níveis de EMPs entre os grupos T1 vs T4 e T2 vs T4, (T1: 38,8/ μ L, IQ: 48,7 - 22,2; T2: 35,7/ μ L, IQ: 45,9 - 29,3; T3: 31,2/ μ L, IQ: 41,5 - 26,9; T4: 24,0/ μ L, IQ: 35,0 - 21,7). Em relação à análise por tamanho das MPs, foi observado um predomínio de MPs maiores que 0,7 μ m, tanto de origem plaquetária como endotelial nos grupos T1 e T2 em relação aos pacientes com maior tempo pós-transplante (T3 e T4), **Figura 11**. Não foram observadas diferenças entre os níveis de MPs totais, PMPs e EMPs de tamanho menor que 0,7 μ m.

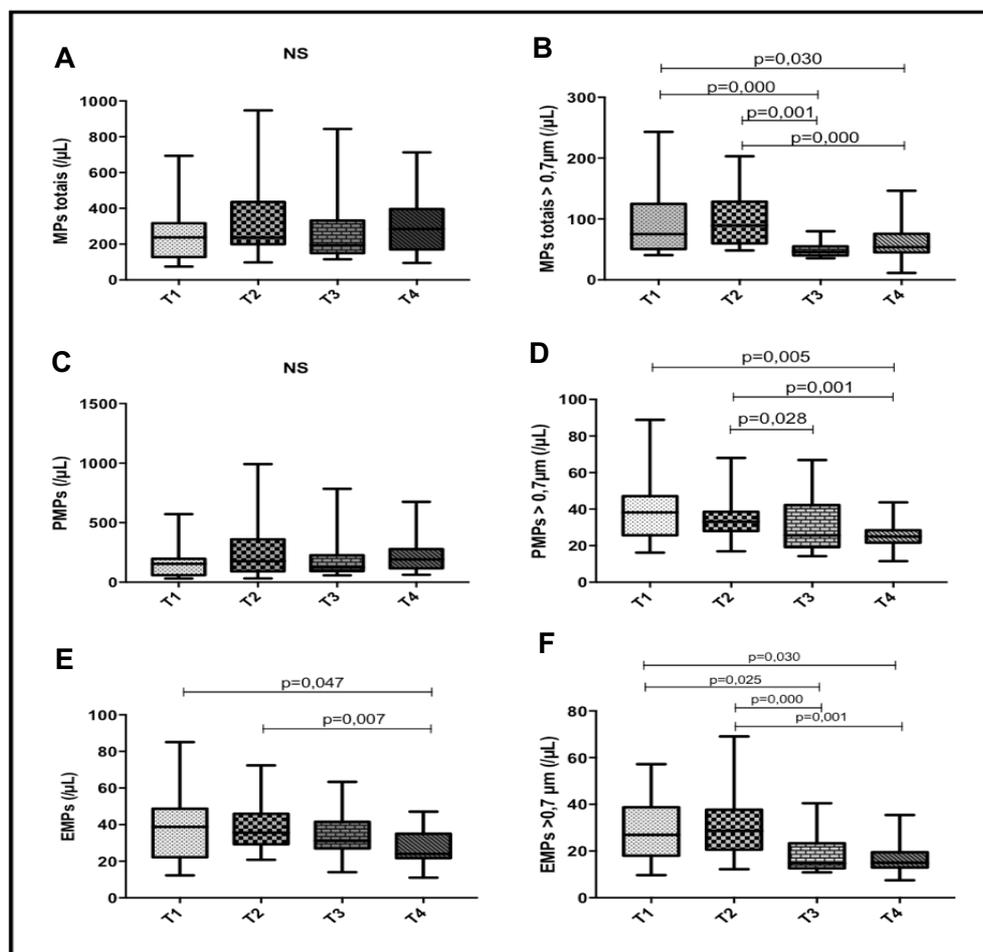


Figura 11 – Avaliação das micropartículas celulares totais (MPs), micropartículas plaquetárias (PMPs) e micropartículas endoteliais (EMPs) de acordo com o número (**A**, **C** e **E**) e por tamanho (**B**, **D** e **F**) nos diferentes grupos estratificados de acordo com o tempo pós-transplante (T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses; e T4: acima 120 meses pós-transplante). Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's; $p < 0,050$ como significativo.

A presença de história de rejeição não mostrou nenhuma diferença nas análises realizadas, envolvendo as MPs, **Tabela 3**.

Tabela 3 – Comparação dos níveis e tamanhos das micropartículas de acordo com a história de rejeição prévia

Parâmetros (µL)	REJ (n=38)	nãoREJ (n=45)	INDET (n=14)	p
MPs totais	242,9 (435,1-151,9)	284,7 (414,2-173,5)	246,1 (354,9-151,3)	0,842
PMPs	171,1 (326,9-98,8)	181,5 (277,7-87,7)	173,1 (269,6-92,1)	0,960
EMPs	34,9 (45,6-27,2)	33,7 (45,6-27,2)	26,0 (41,2-20,7)	0,312
MPs >0,7µm	74,2 (124,8-50,7)	69,4 (110,9-48,9)	54,8 (98,7-45,6)	0,592
PMPs >0,7µm	74,2 (124,8-50,7)	69,4 (110,9-48,8)	54,8 (98,7-45,6)	0,592
EMPs >0,7µm	23,8 (37,9-18,5)	21,4 (30,8-14,5)	16,4 (33,0-12,4)	0,200
MPs ≤0,7µm	214,3 (438,9-124,1)	234,9 (391,9-144,6)	218,1 (345,3-126,1)	0,959
PMPs ≤0,7µm	165,5 (371,3-78,3)	171,4 (283,7-79,2)	161,1 (248,9-81,2)	0,987
EMPs ≤0,7µm	10,2 (20,1-6,3)	10,0 (21,5-5,6)	9,8 (17,5-6,6)	0,818

Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil (Kruskal-Wallis teste seguido do teste de Dunn's). REJ: rejeição prévia do enxerto; nãoREJ: sem história de rejeição prévia do enxerto e INDET: história indeterminada ou não relatada; p<0,050 como significativo.

5.3 Avaliação dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand

Os níveis plasmáticos de FvW foram avaliados em 83 RTx. De acordo com a estratificação em relação aos níveis de creatinina. Foram observados maiores níveis do FvW no grupo de RTx com níveis intermediários de creatinina (C2), com mediana acima do intervalo de referência, em relação ao grupo C1 (C1: 878mU/mL, IQ: 1106,0 - 791,0 e C2: 1136mg/dL, IQ: 1136,0 – 878,3), como demonstrado na **Figura 12A**. Um maior nível de FvW foi encontrado no grupo de RTx que apresentaram história de rejeição do enxerto (n=36), 1091,0mU/mL (IQ: 1202,0 – 852,8,0) se comparado aos sem rejeição (n=38), 888,00mU/mL (IQ: 1084,0 – 782,0), **Figura 12B**.

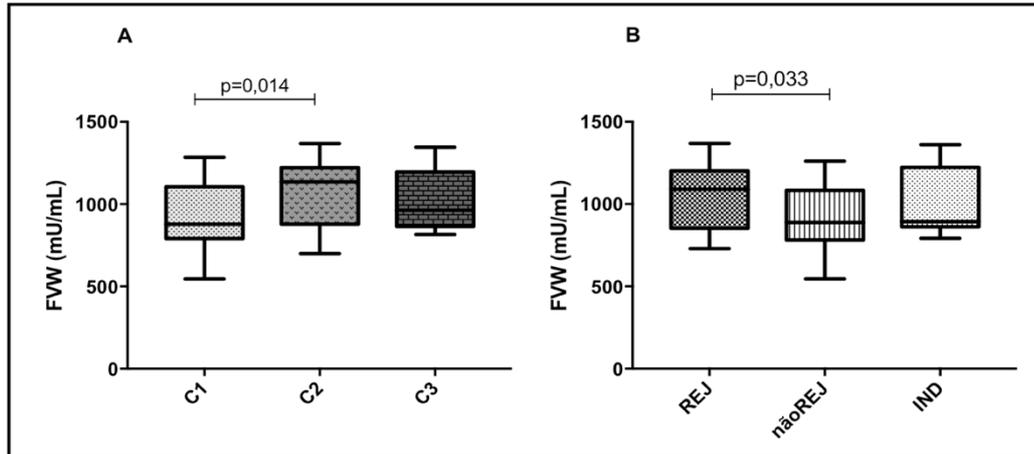


Figura 12 – Comparação entre os níveis plasmáticos do fator de von Willebrand (FvW) nos diferentes grupos de RTx. **A:** RTx divididos de acordo com a creatinina sérica (C1<1,4mg/dL; C2: 1,4 e 2,0mg/dL e C3: >2,0mg/dL); **B:** RTx distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto renal (REJ: presença de rejeição; nãoREJ: sem história de rejeição e IND: história não relatada ou ausente). Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn`s; $p < 0,050$ como significativo.

Os pacientes com rejeição prévia apresentaram níveis acima do intervalo de referência estipulado (683,0 a 1012,0mU/mL). Nenhuma diferença foi observada entre os níveis do FvW quando avaliados em função do eRFG e tempo pós-transplante, como representado na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Comparação dos níveis do Fator de von Willebrand em receptores do transplante renal

Parâmetros	FvW (mU/mL)	p
eRFG (mL/min/1.73m ²)		0,302
R1 (n=14)	1096 (1210- 869,5)	
R2 (n=32)	939 (1190 - 846,5)	
R3 (n=29)	915,0 (1151,0 – 791,0)	
R4 (n=08)	879,0 (947,0 - 795,5)	
Tempo pós-transplante (meses)		0,726
T1 (n=17)	1088 (1225,0 - 839,5)	
T2 (n=27)	882,0 (1129,0 - 867,0)	
T3 (n=25)	915,0 (1151,0 - 807,5)	
T4 (n=14)	973,0 (1232,0 - 806,3)	

Os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil (Kruskal-Wallis teste seguido do teste de Dunn`s). R1: > 90mL/min/1,73m²; R2: ≤90 - >60 mL/min/1,73m²; R3: ≤60 - > 30mL/min/1,73m²; R4: ≤ 30mL/min/1,73m²; T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses; T4: acima 120 meses pós-transplante. $p < 0,050$ como significativo.

5.4 Determinação e comparação das frequências dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da sintase do óxido nítrico endotelial

No total foram determinados os polimorfismos de 174 RTx. As populações mostraram-se sob equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,025$).

Inicialmente, a população do estudo foi distribuída de acordo com os níveis de creatinina sérica (grupos C1, C2 e C3), foram realizadas as análises das frequências alélicas e genóticas (**Tabela 5**), no qual não foram encontradas diferenças entre os três grupos (C1, C2 e C3) conforme representado na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Distribuição e comparação das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com os níveis séricos de creatinina

Genótipo	C1 (n=91)	C2 (n=46)	C3 (n=36)	p
G894T				
G	135 (82,3%)	72 (78,2%)	50 (78,1%)	0,376 ^a ; 0,528 ^b
T	49 (62,8%)	20 (50,0%)	22 (61,1%)	0,199 ^c
GG	53 (54,6%)	26 (46,0%)	10 (71,4%)	0,158
GT	29 (26,8%)	20 (31,7%)	00 (0,0%)	
TT	10 (18,5%)	14 (22,2%)	04 (28,5%)	
VNTR b/a				
b	134 (79,7%)	70 (76,0%)	41 (68,3%)	0,561 ^a ; 0,185 ^b
a	50 (59,8%)	22 (50,0%)	23 (67,6%)	0,199 ^c
bb	50 (54,3%)	24 (52,1%)	19 (76,0%)	0,066
ba	34 (36,9%)	22 (47,8%)	11 (30,5%)	
aa	08 (8,6%)	00 (0,0%)	06 (16,6%)	
T-786C				
T	109 (70,7%)	63 (75,0%)	44 (68,7%)	0,135 ^a ; 0,784 ^b
C	75 (62,5%)	29 (58,0%)	28 (58,3%)	0,325 ^c
TT	32 (49,2%)	45 (52,3%)	15 (65,2%)	0,545
TC	21 (32,3%)	21 (24,4%)	04 (17,4%)	
CC	12 (18,5%)	20 (23,3%)	04 (17,4%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); C1: <1,4mg/dL; C2: 1,4 e 2,0mg/dL; C3: >2,0mg/dL; ^a grupo C1 vs C2; ^b grupo C1 vs C3; ^c grupo: C2 vs C3. $p < 0,050$ como significativo.

Uma vez que não se conhece o padrão de herança genética dos polimorfismos da eNOS, optou-se por realizar a comparação das frequências genóticas levando-se em consideração os carreadores alélicos, **Tabela 6**. Verificou-se maior frequência

do carreador b (VNTR b/a) no grupo C1 em relação aos demais grupos, com $p=0,021$. Para o polimorfismo G894T e T-786C não foram observadas diferenças nas distribuições das frequências dos carreadores entre os grupos.

Tabela 6 – Distribuição genotípica referente aos carreadores alélicos dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com os níveis séricos de creatinina

Genótipo	C1 (n=91)	C2 (n=46)	C3 (n=36)	p
G894T				
Carreador G				0,064
GG +GT	82 (89,1%)	46 (100%)	32 (88,8%)	
TT	10 (10,9%)	00 (0,0%)	04 (11,2%)	
Carreador T				0,732
TT+GT	39 (42,3%)	20 (43,4%)	18 (50,0%)	
GG	53 (57,7%)	26 (56,5%)	18 (50,0%)	
VNTR b/a				
Carreador b				0,021*
bb+ ba	84 (94,7%)	46 (88,5%)	30 (91,9%)	
aa	08 (5,3%)	00 (11,5%)	06 (8,1%)	
Carreador a				0,967
aa + ba	42 (43,4%)	22 (55,7%)	17 (37,8%)	
bb	50 (56,6%)	24 (44,3%)	19 (62,2%)	
T-786C				
Carreador T				0,422
TT + TC	77 (83,6%)	42 (91,3%)	32 (88,9%)	
CC	15 (16,3%)	04 (8,6%)	04 (11,1%)	
Carreador C				0,394
CC + TC	48 (65,2%)	39 (54,3%)	22 (66,7%)	
TT	28 (34,8%)	22 (45,7%)	15 (33,3%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); C1: <1,4mg/dL; C2: 1,4 e 2,0mg/dL; C3: >2,0mg/Dl. $p<0,050$ como significativo.

A análise das distribuições das frequências dos haplótipos (**Tabela 7**) para os polimorfismos estudados foi realizada para os grupos de acordo com os níveis de creatinina sérica em comparação ao haplótipo de referência formado pelos alelos selvagens ou não variantes (G-T-b). Os haplótipos com frequência menor que 5% em ao menos um dos grupos foram excluídos das análises (T-C-a, G-C-a, T-T-a, G-C-a). Foi observada uma maior frequência do haplótipo T-C-b entre os RTx dos grupos C1 e C3.

Tabela 7 – Frequências haplotípica dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da sintase do óxido nítrico endotelial nos grupos estratificados de acordo com os níveis de creatinina sérica

Haplótipos	C1 (n=76)	C2 (n=61)	C3 (n=37)	p ^a	p ^b	p ^c
G-T-b	34,0 (ref)	43,0 (ref)	32,0 (ref)	Ref	Ref	Ref
C-T-b	7,0	11,0	9,0	0,794	0,781	1,000
G-C-b	12,0	14,0	15,0	0,859	0,536	0,405
T-C-b	18,0	7,0	11,0	0,021*	0,341	0,193
G-T-a	17,0	13,0	15,0	0,244	0,881	0,323

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos; ^a grupo C1 vs C2; ^b grupo C1 vs C3; ^c grupo C2 vs C3. p<0,050 como significativo.

A população do estudo foi distribuída também de acordo com a história prévia de rejeição do enxerto. Foram avaliadas as frequências alélicas e genotípicas (**Tabela 8**), dos carreadores alélicos (**Tabela 9**) e dos haplótipos (**Tabela 10**) dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C para cada grupo (nãoREJ; REJ e IND). Não foram encontradas diferenças na distribuição das frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos estudados (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Distribuição e comparação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição

Genótipo	NãoREJ (n=76)	REJ (n=61)	IND (n=37)	p
G894T				
G	112 (81,2%)	90 (78,9%)	55 (80,8%)	0,987 ^a ; 0,918 ^b ; 0,932 ^c
T	40 (60,6%)	32 (57,1%)	19 (59,3%)	
GG	43 (56,6%)	33 (54,1%)	21 (56,8%)	0,963
GT	26 (34,2%)	24 (39,3%)	13 (35,1%)	
TT	07 (9,2%)	04 (6,6%)	03 (8,1%)	
VNTR b/a				
b	115 (79,8%)	81 (75,0%)	57 (83,8%)	0,091 ^a ; 0,468 ^b ; 0,114 ^c
a	37 (56,0%)	41 (60,2%)	17 (60,7%)	
bb	43 (56,6%)	27 (44,3%)	23 (62,2%)	0,340
ba	29 (38,2%)	27 (44,3%)	11 (29,7%)	
aa	04 (5,3%)	07 (11,5%)	03 (8,1%)	
T-786C				
T	91 (72,2%)	77 (70,0%)	48 (72,7%)	0,583 ^a ; 0,468 ^b ; 0,805 ^c
C	61 (63,5%)	45 (57,6%)	26 (59,0%)	
TT	28 (38,8%)	22 (36,1%)	15 (40,5%)	

/continua

TC	35 (46,1%)	33 (54,1%)	18 (48,6%)	0,710
CC	13 (17,1%)	06 (9,8%)	04 (10,8%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); nãoREJ: sem história de rejeição; REJ: presença de rejeição prévia e IND: história não relatada ou ausente. ^a grupos não rejeição x Indeterminado; ^b grupos não rejeição x rejeição prévia; ^c grupos rejeição x Indeterminado. $p < 0,050$ como significativo

A análise de carreadores alélicos não demonstrou diferenças entre os grupos de acordo com a história de rejeição prévia (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Frequências genótípicas referentes aos carreadores alélicos dos polimorfismos da sintase do óxido nítrico endotelial em receptores do transplante renal, distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição

Genótipo	NãoREJ (n=76)	REJ (n=61)	IND (n=37)	p
G894T				
Carreador G				0,851
GG +GT	69 (90,8%)	57 (93,4%)	34 (91,9%)	
TT	07 (9,2%)	04 (6,6%)	03 (8,1%)	
Carreador T				0,949
TT+GT	33 (43,4%)	28 (45,9%)	16 (43,2%)	
GG	43 (56,6%)	33 (54,1%)	21 (56,8%)	
VNTR b/a				
Carreador b				0,414
bb+ ba	72 (94,7%)	54 (88,5%)	34 (91,9%)	
aa	04 (5,3%)	07 (11,5%)	03 (8,1%)	
Carreador a				0,174
aa + ba	33 (43,4%)	34 (55,7%)	14 (37,8%)	
bb	43 (56,6%)	27 (44,3%)	23 (62,2%)	
T-786C				
Carreador T				0,407
TT + TC	63 (82,9%)	55 (90,2%)	33 (89,2%)	
CC	13 (17,1%)	06 (9,8%)	04 (10,8%)	
Carreador C				0,899
CC + TC	48 (63,2%)	39 (63,9%)	22 (59,5%)	
TT	28 (36,8%)	22 (36,1%)	15 (40,5%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; Os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); nãoREJ: sem história de rejeição; REJ: presença de rejeição prévia e IND: história não relatada ou ausente $p < 0,050$ como significativo.

A **Tabela 10** representa a distribuição das frequências dos haplótipos dos polimorfismos de acordo com a história prévia de rejeição em comparação ao haplótipo de referência formado pelos alelos selvagens ou não variantes (G-T-b). As variações dos haplótipos formados com uma frequência menor que 5% em ao menos um dos três grupos avaliados não foram incluídos no estudo (T-C-a, G-C-a, T-T-a). Não foram encontradas diferenças nas distribuições das frequências dos haplótipos nos grupos estudados.

Tabela 10 – Frequências haplotípica dos polimorfismos G894T, T-786C e VNTR b/a no gene da sintase do óxido nítrico endotelial nos grupos com e sem história de rejeição ao enxerto

Haplótipos	NãoREJ (n=76)	REJ (n=61)	IND (n=37)	p ^a	p ^b	p ^c
G-T-b	38,78 (ref)	35,57 (ref)	35,24 (ref)	Ref	Ref	Ref
C-T-b	7,76	7,98	10,07	0,604	1,000	0,794
G-C-b	10,49	13,62	19,21	0,125	0,483	0,483
T-C-b	11,31	17,37	14,41	0,495	0,276	0,602
G-T-a	16,35	15,85	12,00	0,688	0,850	0,947
G-C-a	9,68	5,99	7,22	0,789	0,583	0,573

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; Os dados foram apresentados como valores absolutos; nãoREJ: sem história de rejeição; REJ: presença de rejeição prévia e IND: história não relatada ou ausente; (ref): valor de referência; ^a grupos não rejeição x Indeterminado; ^b grupos não rejeição x rejeição prévia; ^c grupos rejeição x Indeterminado. p<0,050 como significativo.

5.5 Análise de correlação entre os parâmetros avaliados

Para investigar uma possível associação dos parâmetros avaliados entre si e com os parâmetros clínicos usuais, foi realizada a análise de correlação de Spearman. A **Tabela 11** representa as correlações significativa obtidas neste estudo.

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

Parâmetros	Receptores do enxerto renal	
	r	p
Tempo pós-Tx vs MPs totais maiores	-0,310	0,002

/continua

Tempo pós-Tx vs PMP maiores	-0,307	0,002
Tempo pós-Tx vs EMP maiores	-0,376	<0,001
Creatinina vs Plaquetas	-0,247	0,003
eRFG vs Plaquetas	0,189	0,024
eRFG vs FvW	-0,246	0,025
Plaquetas vs MPs totais	0,462	<0,001
Plaquetas vs PMP totais	0,412	<0,001
Plaquetas vs EMP totais	0,270	0,012
Plaquetas vs PMP maiores	0,340	0,001
Plaquetas vs EMP maiores	0,336	0,002
Plaquetas vs MPs menores	0,466	<0,001
Plaquetas vs PMP menores	0,467	<0,001
Plaquetas vs EMP menores	0,425	<0,001
PMP totais vs EMP totais	0,504	<0,001
PMP totais vs EMP maiores	0,312	0,000
PMP vs EMP menores	0,761	0,000

eRFG: ritmo de filtração glomerular; MPs totais: micropartículas endoteliais e plaquetárias; PMP: micropartículas plaquetárias; EMP: micropartículas endoteliais; FvW: fator de von Willebrand; EMP menor: micropartículas endoteliais de tamanho menor que 0,7 μ m; PMP menor: micropartícula plaquetária menor que 0,7 μ m; Tx: Transplante renal. $p < 0,050$ como significativo.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização clínica e demográfica dos receptores do enxerto renal

No presente estudo foram avaliados 178 RTx, dos quais 109 eram do gênero masculino (61,2%) e 69 do gênero feminino (38,8%), **Tabela 1**. Os dados do presente estudo corroboram com a literatura, visto que outros trabalhos obtiveram um predomínio similar para o sexo masculino, na DRC e no transplante de rim.

Gupta *et al.* (2017), ao avaliarem o estado cognitivo de 226 RTx no estado do Kansas (EUA), obtiveram uma prevalência de 60,0% de integrantes homens, enquanto no estudo de Sułowicz *et al.* (2017), que objetivou comparar a incidência e o tipo de lesão cutânea maligna em 598 RTx na Polônia, foi observado um predomínio de 60,9% de pacientes masculinos. No ano de 2014, a prevalência para o gênero masculino em diálise foi de 58,0% e esses números se mantiveram os mesmos após a realização do transplante renal (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO, 2016, 2017a, b; SESSO *et al.*, 2016).

Iseki (2008), em seu estudo sobre a influencia dos gêneros na DRC, associou o maior declínio da função renal com o sexo masculino, quando avaliado pelos níveis de creatinina, compostos nitrogenados como a ureia e o ácido úrico. No presente estudo, também foram encontrados maiores níveis destes marcadores (creatinina, ureia e ácido úrico séricos) nos homens, quando comparados às mulheres, o que já era esperado em virtude das características intrínsecas do sexo masculino, como maior massa muscular, rins de maiores tamanhos, influência hormonal androgênica, maior pressão arterial e maior sobrecarga renal devido à dieta rica em conteúdos proteicos. Além disso, parece existir maior incidência de fatores de risco clássicos em homens, como tabagismo, obesidade, sedentarismo e síndrome metabólica (COBO *et al.*, 2016; ISEKI, 2008; SILBIGER; NEUGARTEN, 2008). Entretanto, não foram encontradas diferenças para o eRFG entre os sexos no presente estudo e a mediana para a população total foi de 57,2 mL/min/1,73m².

O cálculo do eRFG, baseado nos níveis de creatinina, é muito utilizado na prática clínica. O eRFG é empregado como forma de nivelar e corrigir possíveis interferentes na produção de creatinina, como o sexo, a etnia, a idade e a superfície corporal ao levar em consideração estes fatores em sua fórmula, como constatado no presente estudo (BRITO *et al.*, 2016; KIRSTAJN, 2009). No entanto, existem várias

desvantagens relacionadas ao emprego, tanto das fórmulas estimadas, como dos níveis de creatinina sérica. O fato das fórmulas não utilizarem os valores de creatinina depurado em 24h, pode estar relacionado à menor acurácia diagnóstica. As fórmulas, diferentes entre si, encontram problemas de padronização, especialmente quando consideramos populações de origem étnica distintas. As principais fórmulas utilizadas para o cálculo do eRFG, se baseiam nos níveis de creatinina sérica, sofrendo a influência desse indicador, uma vez que essa não é sensível a flutuações leves ou moderadas do RFG (BURBALLA et al., 2017; BRITO *et al.*, 2016; KIRSTAJN, 2009).

Em relação à contagem de plaquetas, as mulheres apresentaram maior média (242,156/ μ L) se comparadas aos homens (224,159/ μ L). Kuo *et al.* (2015) o que sugere o envolvimento das plaquetas em processos de rejeição mediados por anticorpos. A análise de biópsias de enxerto renal em humanos diagnosticados com rejeição aguda mediada por anticorpos, revelou grande deposição de agregados plaquetários (CD41+) nos capilares peritubulares. Essa deposição favorece a adesão leucocitária, pela da liberação de grânulos plaquetários com função quimiotática, como a serotonina. A análise imuno-histoquímica revelou a formação de agregados plaquetas-monócitos nos capilares dos enxertos renais, o que contribuiria ainda mais para o aumento da ativação e infiltração de leucócitos no sítio da inflamação (KUO *et al.*, 2015).

A menor contagem de plaquetas no sexo masculino pode estar relacionada à pior função renal, se comparada ao sexo feminino, demonstrada pelos níveis séricos de creatinina, ureia e ácido úrico e pelo eRFG, representados na Tabela 1. A menor contagem periférica de plaquetas pode ter sido favorecida pela deposição de agregados plaquetários nos rins de pacientes homens (FENECH *et al.*, 1984; LEDERER *et al.*, 1992), entretanto essa afirmativa só poderia ser confirmada por meio de biópsias renais. Um outro dado que poderia fortalecer esta hipótese é a maior frequência de episódios de rejeição prévia para o sexo masculino, o que corresponde a 63% de todos os casos de rejeição prévia constatada neste estudo (62 casos). No entanto, em 38 prontuários consultados não foi possível a confirmação da existência ou não de eventos de rejeição prévia, o que dificulta as análises para esta variável.

Foram observadas diferenças nas medianas das idades entre os sexos, sendo 46 anos para os homens e 38 anos para as mulheres. A mediana da idade para a população total foi de 45 anos (mínima de 18 e máxima de 78 anos) e apenas cinco receptores (2,8%) tinham 65 anos ou mais, porém realizaram o transplante renal

anteriormente a essa idade. Sabe-se que a função renal decai com o envelhecimento, sendo um fator de risco para a incidência e prevalência de complicações cardiovasculares na população em geral, tanto para homens, como para mulheres (KAZANCIOĞLU, 2013; SHAHEEN *et al.*, 2016). O maior número de participantes do sexo masculino no estudo pode ter contribuído para a diferença significativa entre a mediana das idades entre os sexos. Outros estudos não constataram diferenças entre os sexos no transplante renal (CHENG *et al.*, 2014; MOTA *et al.*, 2015).

Em um grande estudo epidemiológico realizado na Suécia, envolvendo pacientes com DRC, coordenado por Ejerblad (2006), um dos objetivos era investigar os possíveis efeitos do aumento do IMC na incidência da DRC. Foi constatado que o excesso de peso (IMC ≥ 25 Kg/m²) está associado à elevação do risco para DRC, em comparação àqueles com IMC < 25 Kg/m² e que a obesidade mórbida de homens (IMC ≥ 30 Kg/m²) e mulheres (IMC ≥ 35 Kg/m²) elevou o risco de DRC para 3 a 4 vezes. Kurnatowska *et al.* (2016) demonstraram que RTx com elevado IMC estão mais propensos a apresentarem função retardada do enxerto, com consequente associação a piores quadros de disfunção do enxerto e elevação dos marcadores pró-ateroscleróticos. No presente estudo, o IMC para a população total foi de 24,1 Kg/m² e não houve diferenças entre os sexos, sendo que tanto homens como mulheres apresentaram IMC dentro da faixa desejável.

As glomerulopatias (20,8%), a nefrosclerose hipertensiva (17,4%) e a nefropatia do DM (8,4%) foram as principais causas primárias da DRC na população do estudo, correspondendo a 46,6%. Entretanto, 28,0% dos RTx não apresentavam etiologia definida ou não relatada nos prontuários médicos, **Tabela 1**. Os dados do presente estudo são similares, em relação às doenças mais frequentes pré-transplante, aos informados por Sesso *et al.* (2016), que relataram através do Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2014, os diagnósticos mais comuns da DRC primária, sendo: hipertensão arterial (35%), DM (29%), glomerulonefrite crônica (11%), outros diagnósticos (14%) e diagnóstico indefinido (9%). Afirmaram ainda que estes percentuais não sofreram alterações significativas nos últimos anos. Por outro lado, os percentuais encontrados em nosso estudo diferem-se, em parte, daqueles relatados por Sesso *et al.* (2016), o que pode ser justificado pela maior prevalência de dados indefinidos ou não relatados nos prontuários médicos do presente estudo. Este fato reforça a necessidade de uma maior atenção das equipes médicas para uma

melhor adequação e valorização dos registros de pacientes, visto a grande importância dos mesmos.

Segundo Shaheen *et al.* (2016), os pacientes com DRC que sobrevivem à doença primária até alcançarem o estágio dialítico geralmente são aqueles com menos comorbidades e menor comprometimento do sistema cardiovascular.

A HAS e o DM também foram as principais comorbidades encontradas na população do estudo, sendo 51,1% e 20,8% respectivamente, seguidos pela dislipidemia (16,3%). No entanto, não foi possível referenciar o momento do aparecimento das comorbidades, se pré ou pós transplante. A presença de comorbidades pré-transplante renal pode prejudicar o acesso ao mesmo, além de proporcionar maiores gastos financeiros com procedimentos médicos e, quando presentes no pós-transplante, podem favorecer os eventos que culminam em menor sobrevida do enxerto (MACHINICKI *et al.*, 2011).

Machinicki *et al.* (2011), relataram que as principais comorbidades pré-transplante encontradas na população norte-americana foram a HAS e o DM, seguido por outras DCV, ambas associadas ao aumento dos custos com cuidados médicos pós-transplante, elevação dos riscos cardiovasculares e maior risco de perda do enxerto por causas diversas. O desenvolvimento do DM e da HAS pós-transplante renal pode estar associado à própria terapia imunossupressora, como os inibidores da calcineurina e corticoesteroides.

A DCV é a causa mais comum de morte nos RTx e fator de risco para a perda do enxerto. A dislipidemia é um fator de risco importante para o desenvolvimento da DCV e o seu desenvolvimento pós-transplante pode atingir até 50% da população. Vários fatores podem influenciar a dislipidemia, como fatores genéticos, idade, sexo, presença de obesidade, baixa atividade física, DM e agentes imunossupressores (MIKOLASEVIC *et al.*, 2017).

O tempo de hemodiálise pré-transplante foi similar entre os sexos. A mediana para a população total foi de 32 meses, como demonstrado na **Tabela 1**. Pacientes em diálise apresentam maiores taxas de desnutrição, processos inflamatórios, maior necessidade de hospitalização e maior mortalidade se comparados com a população geral. Comorbidades como a calcificação vascular, a aterosclerose, desordens minerais e ósseas e a presença de fístulas do acesso venoso são comuns na população dialítica. Esses fatores contribuem para o aumento das doenças cardiovasculares e são determinantes significativos para a mortalidade dos pacientes

em diálise. O tempo de diálise pré transplante se correlaciona diretamente com o agravamento destes fatores, com influência, inclusive, após o transplante renal, podendo comprometer a sobrevida do enxerto a longo prazo. Vários são os fatores que podem influenciar o tempo de diálise pré-transplante, como a espera em fila para o transplante renal, os níveis de ureia e creatinina e o preparo do receptor (SOLEYMANIAN *et al.*, 2017). Friedewald *et al.* (2012), sugeriram que a terapia dialítica tem efeitos imunomoduladores, tornando os receptores do aloenxerto renal mais propensos ao reconhecimento de aloantígenos, mesmo sob imunossupressão.

Em alguns casos, o transplante renal é realizado antes da instalação da terapia dialítica, denominado como transplante renal preemptivo, em que, na maioria das vezes, é utilizado o rim proveniente de doador vivo. Entretanto, este procedimento não deve ser realizado com eRFG maior que 20 mL/mim/1,73m². Por não realizarem a diálise, os receptores do transplante preemptivo se livram do desgaste emocional do tratamento dialítico, reduzem os riscos cardiovasculares pré-transplante, além de evitarem comorbidades oriundas da diálise, refletindo em melhor função e sobrevida do enxerto e menores gastos com tratamentos no pós-transplante renal (FRIEDEWALD; REESE, 2012; MATOS *et al.*, 2016). Na população estudada, no presente estudo, apenas quatro receptores (2,2%) realizaram o transplante preemptivo.

A escolha do doador vivo também está relacionada com múltiplos benefícios para o receptor, como menor espera para a realização do transplante e menor incidência de função retardada do enxerto, se comparada ao doador falecido. Entretanto o doador falecido foi o mais comum entre a população do estudo, correspondendo a 53,9% e não houve diferenças entre os sexos, porém para o sexo feminino o número de doadores falecidos foi quase o dobro em relação aos doadores vivos (Tabela 1). Nossos dados estão de acordo com a ABTO (2017b), que informou que o número de doadores falecidos foi cerca de 3,6 vezes maior do que o número de doadores vivos para o transplante renal nos anos de 2015 e 2016. De fato, apesar dos conhecidos benefícios do doador vivo do ponto de vista do receptor, é desejável que o número de doadores falecidos aumente cada vez mais no transplante renal, a fim de minimizar a espera dos pacientes urêmicos na fila para a realização da cirurgia.

Além do tipo de doador, o número de transfusões sanguíneas, transplantes anteriores, intercorrências no momento do ato cirúrgico, compatibilidade HLA, adesão ao tratamento imunossupressor, presença de comorbidades e hábitos de vida

saudáveis são alguns dos fatores que influenciam a sobrevida do enxerto e, conseqüentemente, o tempo de sobrevida pós-transplante (ABTO, 2009; KDIGO, 2003; SESSO *et al.*, 2016) Em relação ao tempo pós-transplante, a mediana encontrada para a população do estudo foi de 96 meses e não foram encontradas diferenças entre homens e mulheres para esta variável.

Em relação à terapia imunossupressora, o esquema terapêutico mais utilizado pelos RTx do estudo foi constituído por Tacrolimus (inibidor da calcineurina), Micofenolato de mofetil (antiproliferativo) e Prednisona (corticoesteróide), seguindo do esquema constituído por Ciclosporina. Dados similares foram encontrados por Qu *et al.* (2017), em uma população de 218 RTx, onde 56,4% utilizavam Tacrolimus e 43,5% Ciclosporina.

Os RTx são considerados uma população heterogênea, que necessitam de um controle rigoroso da homeostase corporal. Em geral, fazem uso de múltiplos medicamentos (polifarmácia). No presente estudo os medicamentos mais utilizados foram os hipotensores. Os homens faziam maior uso dos medicamentos listados se comparados às mulheres (Tabela 1). Apenas para a classe dos ansiolíticos/antidepressivos pôde-se notar maior predomínio do uso pelo sexo feminino, 23,2% contra 7,3%. No entanto, nenhuma diferença entre o uso da polifarmácia foi significativa (BARRETO; FIGUEIREDO, 2009).

As diferenças entre os gêneros (feminino e masculino) sobre a função renal também são capazes de exercer ação sobre a presença ou não de rejeição ao enxerto. Acredita-se que os hormônios femininos, como o estradiol, possam ter efeito protetivo sobre as mulheres, enquanto os hormônios androgênicos contribuam para pior função do enxerto a longo prazo (ANTUS *et al.*, 2002). Todavia, no presente estudo, não foram encontradas diferenças para a presença de episódios de rejeição entre homens e mulheres. A rejeição prévia foi definida como a existência de episódios de rejeição, relatados em prontuário médico, anteriores à data da coleta de sangue para a realização da pesquisa. Muitos dados, entretanto, não estavam disponíveis ou não foram relatados nos prontuários dos pacientes, o que dificultou a avaliação deste parâmetro em nosso trabalho.

Em relação à realização de transplante prévio, sabe-se que os indivíduos com transplante anterior possuem características clínicas específicas e estão associados com piores prognósticos. Alguns estudos optam por excluïrem os receptores que estão em seu segundo transplante renal, no entanto não justificam, em sua totalidade,

a motivação da exclusão (MACHINICKI *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2017) em seu estudo com uma grande população de RTx do Reino Unido (2093 RTx), verificaram que 13,1% da população de seu estudo já havia transplantado anteriormente e os consideraram como um fator de confusão para algumas análises da pesquisa. No presente estudo foi observado que 8,4% da população total havia realizado transplante prévio (re-transplante) e estes foram incluídos apenas para as análises envolvendo os polimorfismos da eNOS.

6.2 Avaliação do número de micropartículas endoteliais e plaquetárias plasmáticas

Com a finalidade de avaliar o envolvimento das MPs na evolução da função renal pós-transplante, a população estudada foi distribuída em grupos de acordo com os níveis de creatinina sérica e com o eRFG. Estes dois marcadores são frequentemente utilizados para estimar a função renal na prática clínica. A análise do número das MPs nos grupos de acordo com os níveis de creatinina revelou que os RTx com melhor função de filtração (grupo C1) apresentaram números elevados de MPs totais (EMP + PMP) com o predomínio de PMPs se comparado aos demais grupos (C2 e C3). As análises envolvendo o eRFG não revelou diferença entre o número de MPs estudadas entre os RTx.

Um resultado similar foi encontrado por Lu *et al.* (2015) ao observarem maiores números de PMP e EMP em portadores da DRC nos estágios I e II em relação aos estágios finais (III e IV). Os autores sugerem que o número de PMP e EMP pode estar mais relacionado com outras causas, como a doença de base, do que com a própria função renal, uma vez que os pacientes nos estágios iniciais da DRC apresentam níveis inferiores de creatinina, muitas vezes inferior a 1,4mg/dL (semelhante ao grupo C1 do presente estudo) se comparado aos estágios finais.

Grande parte dos resultados encontrados na literatura. Cheng *et al.* (2015) sugerem que as PMPs e EMPs podem ser considerados biomarcadores de grande relevância na DRC. Os autores demonstraram uma correlação direta entre o aumento das MPs e a elevação dos níveis de creatinina sérica e enfatizaram, ainda, que as MPs são úteis para avaliar o desenvolvimento de síndrome cardiorenal e cardiovascular entre os portadores de DRC.

Em outro estudo que distribuiu 160 portadores de fibrilação atrial de acordo com o eRFG, baseado nos estágios da DRC, foi observado que o número de MPs derivadas das plaquetas / células endoteliais (EPMP) aumentaram de forma sequencial com o declínio da função renal (baixo eRFG), correlacionando a função endotelial e a função renal (LAU *et al.*, 2017).

Almquist *et al.* (2016) demonstraram que pacientes com DM e DRC estágios 3-4 (eRFG: 15–59 mL/min/1,73m²) tinham maiores níveis plasmáticos de PMPs e EMPs se comparado aos pacientes com DM e eRFG normal. Sugeriram que isto ocorre provavelmente devido ao aumento da atividade inflamatória e disfunção endotelial, o que poderia indicar uma ativação plaquetária aumentada, favorecendo os eventos pró-trombóticos e ao aumento do risco cardiovascular nesses pacientes. Cumpre ressaltar que a maioria dos estudos encontrados avaliam as MPs no pré e pós-transplante, enquanto no presente estudo foram avaliados as MPs apenas no pós-transplante, o que pode ter dificultado o aparecimento das diferenças entre os grupos do nosso trabalho (AL-MASSARANI *et al.*, 2009; QAMRI *et al.*, 2014). Além disso, ainda são poucos os estudos que avaliam as MPs no transplante renal (AL-MASSARANI *et al.*, 2008, 2009; BITZER *et al.*, 2012;).

Na tentativa de explicar os dados encontrados no presente estudo (elevados níveis de MPs nos RTx com melhor função renal), foi realizada a comparação dos valores medianos para as contagens de plaquetas entre os grupos. Foi observado que RTx com maiores níveis de creatinina (C2 e C3) apresentaram menores contagem de plaquetas se comparado a C1 e uma correlação inversa entre os níveis de creatinina e as contagens de plaquetas. Este fato pode ter influenciado os maiores níveis de MPs no grupo C1, pois um maior número de plaquetas poderia favorecer sua maior ativação, contribuindo para maior número de MPs na circulação (KUO *et al.*, 2015; MEEHAN *et al.*, 2003; SCHWARZENBERGER *et al.*, 2015). Correlações positivas entre as contagens de plaquetas e o número de todas as MPs avaliadas foram encontradas, o que corrobora com essa hipótese.

Adicionalmente, outro estudo demonstrou a ocorrência de deposição de plaquetas e PMPs nos capilares glomerulares em resposta ao processo de rejeição ao enxerto, em biópsias do enxerto renal analisadas por imuno-histoquímica (MEEHAN *et al.*, 2003). Outros estudos afirmam, ainda, que pode acontecer a deposição de plaquetas em transplantes renais em estágios iniciais de rejeição (FENECH *et al.*, 1984; LEDERER *et al.*, 1992). Kuo *et al.* (2015) demonstraram que a

maior deposição dos agregados plaquetários também foi correlacionada com os escores de Banff.

Estes estudos sustentam a hipótese da ocorrência de deposição de plaquetas nos capilares do rim transplantado nos RTx dos grupos C2 e C3, o que poderia refletir em menor número de MPs circulantes nos pacientes com níveis mais elevados de creatinina em relação àqueles com menores níveis (grupo C1).

Apesar da creatinina ser considerada um marcador tardio e não específico para a avaliação da função renal, sua elevação se correlaciona com o avanço da DRC e com a presença da rejeição ao enxerto, sendo comumente utilizada na prática clínica (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015). Sendo assim, da mesma forma que números elevados de MPs podem estar associados à inflamação e à rejeição, números reduzidos também poderia resultar do processo de rejeição, sinalizando para o consumo de MPs no enxerto. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreensão destes mecanismos.

As PMPs apresentam superfícies pró-coagulantes envolvidas na trombogênese, além de componentes inflamatórios, como citocinas e fatores de crescimento, o que poderia contribuir para o agravamento da disfunção endotelial com elevação dos riscos cardiovasculares, que podem levar à rejeição e destruição de órgãos transplantados. As PMPs também podem ativar plaquetas e células endoteliais, potencializando ainda mais a liberação de MPs influenciando ainda em seus diâmetros e/ou tamanhos (DOŁEGOWSKA; BLOGOWSKI; DOMANSKI, 2012).

Uma nova estratégia de análise foi realizada com o objetivo de averiguar o perfil das MPs de acordo com o seu diâmetro nos diferentes grupos do presente estudo. Ao separar as MPs em duas populações com base em seu diâmetro, foi observado um predomínio de PMP e EMP de menor tamanho (diâmetro $\leq 0,7\mu\text{m}$) nos RTx com menores níveis de creatinina (grupo C1). Entretanto, quando os RTx foram distribuídos de acordo com o eRFG não foram observadas diferenças entre os tamanhos das MPs nos diferentes grupos. A análise considerando o tamanho das MPs tem como objetivo avaliar seu potencial inflamatório e/ou pró-coagulante, visto que estudos anteriores demonstraram que quanto menor o diâmetro das MPs maior o estado inflamatório envolvido em sua liberação (DEAN *et al.*, 2009; MONTORO-GARCIA *et al.*, 2012; MONTORO-GARCÍA *et al.*, 2014, 2015). Sabe-se que as MPs de diferentes tamanhos apresentam componentes e atividade funcional distintas. As proteínas de membrana são mais reativas à medida que o diâmetro da MP diminui,

facilitando a interação com o subendotélio, com o FvW, fatores de crescimento e citocinas (DEAN *et al.*, 2009). Dessa forma, era esperado que com o aumento dos níveis plasmáticos de creatinina, o diâmetro das MPs diminuísse, refletindo a potencial piora da função renal. A inclusão de um marcador inflamatório para avaliar a relação do diâmetro das MPs e o estado inflamatório torna-se essencial e será uma perspectiva para outro estudo

É importante ressaltar que não foram encontrados estudo comparando o tamanho das MPs em grupos de acordo com a função renal, o que enfatiza a importância e ineditismo do presente estudo.

Montoro-García *et al.* (2015), avaliaram a relação entre a circulação de MPs de pequeno diâmetro em pacientes com insuficiência cardíaca aguda (ICA) e em pacientes sem doença cardiovascular (DCV), grupo controle. Concluíram que número elevado de MPs de diâmetros menores estavam associados a piores prognósticos de ICA. Sugeriram que a avaliação por tamanho pode ser uma ferramenta valiosa de diagnóstico para pacientes com risco de ICA sem evento isquêmico, por prever melhor o grau do estado patológico. Um outro estudo deste mesmo grupo sugerem que a presença de PMPs menores que 0,5 μm são fonte direta para maior ativação de plaquetas e monócitos, favorecendo um estado pró-trombótico, em parte pela expressão de P-selectina (MONTORO-GARCÍA *et al.*, 2014).

A avaliação da influência do tempo pós-transplante e número de MPs, no presente estudo revelou que aqueles pacientes com menor tempo de transplante tinham maior número de EMPs, se comparados aqueles que possuíam tempo maior. Essa diferença foi ainda maior para a análise envolvendo a comparação por tamanho das MPs, o que sinalizou um predomínio de MPs maiores que 0,7 μm entre os RTx com menor tempo pós-transplante.

Sabe-se que a DRCT cursa com número elevado de EMPs e PMPs (AMABILE *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2015) e que após o transplante renal, o número das MPs reduzem significativamente com o sucesso da cirurgia, de forma gradual, especialmente nos dois primeiros anos pós-transplante (AL-MASSARANI *et al.*, 2009). Desta forma, o número de MPs dos pacientes transplantados recentemente pode estar sob influência do período anterior à cirurgia e do próprio ato cirúrgico. Vale ressaltar que no grupo T1, o tempo pós-transplante variou de 1 a 24 meses e nesse grupo foi encontrado o maior número de MPs. Por outro lado, nesse mesmo grupo as MPs possuíam maior tamanho o que, de certa forma, contraria o que era esperado

em relação à influência da resposta inflamatória provocada pelo ato cirúrgico. Porém cumpre ressaltar que pacientes transplantados renais utilizam terapia imunossupressora composta dentre outros medicamentos, por corticoides que são antiinflamatórios. A avaliação da influência da terapia imunossupressora sobre o número de MPs constitui uma perspectiva de novo estudo.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças para os níveis e tamanhos de MPs em função da presença ou não da história de rejeição ao enxerto. Qamri et al. (2014) avaliaram o número de EMPs entre os RTx com e sem diagnóstico de RA. Observaram maior número de EMPs entre aqueles com RA se comparado àqueles sem diagnóstico. Singh *et al.* (2012) também obtiveram maior número de EMPs e rejeição ao enxerto, em pacientes que fizeram transplante cardíaco. Sugeriram que as EMPs podem ser consideradas como preditores independentes para a presença da vasculopatia do aloenxerto cardíaco em crianças e adolescentes.

Estudos sugerem que o aumento do número de EMPs pode fornecer informações úteis sobre o papel do endotélio vascular nos processos de rejeição ao enxerto (DURSUN; YEL; UNSUR, 2015; QAMRI *et al.*, 2014). No presente estudo, o grande número de RTx com dados indeterminados ou ausentes para rejeição e o tamanho amostral para esta variável (MPs) certamente comprometeram a avaliação fidedigna da relação entre número de MPs e rejeição ao enxerto.

6.3 Avaliação dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand

No presente estudo foi observado que os RTx com níveis intermediários de creatinina sérica (grupo C2) apresentaram maiores níveis de FvW se comparado ao RTx com níveis menores de creatinina (grupo C1). No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos C2 e C3. Quando os RTx foram distribuídos de acordo com o eRFG, não foram observadas diferenças entre os grupos. Houve correlação negativa e fraca entre os níveis de FvW e eRFG.

A influência dos imunossupressores sobre os níveis plasmáticos de FvW tem sido relatada. Lu *et al.* (2008) observaram níveis reduzidos de FvW entre os pacientes em uso de corticoesteroides e/ou micofenolato mofetil, atribuindo essa redução à influência dos imunossupressores sobre o endotélio e controle da inflamação. No presente estudo, os principais esquemas terapêuticos empregados no transplante

renal incluíam o uso de pelo menos um desses, sendo que a maioria dos pacientes do grupo C3 estavam em uso concomitante destes dois imunossupressores, o que pode ter contribuído para o menor nível do FvW em relação ao grupo C2.

Resultados semelhantes ao do presente estudo foram obtidos por Malyszko *et al.* (2008) e Zbroch *et al.* (2012). Estes estudos relataram a elevação dos níveis do FvW com o declínio da função renal em RTx. Outros estudos também revelaram que o declínio da função renal está associado à disfunção endotelial com consequente elevação dos níveis de FvW, o que favorece um ambiente pró-trombótico (CHENG *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2012).

Dubin *et al.* (2011) demonstraram associações moderadas do FvW, fator VIII, trombomodulina solúvel, D-dímero, complexo plasmina-antiplasmina, inibidor da via do fator tecidual, e fibrinogênio com o eRFG. As elevações dos níveis destes marcadores se relacionaram com a redução do eRFG em 6751 portadores de DRC. Os autores concluíram que a alteração da hemostasia pode ser um mecanismo pelo qual a redução da função renal promove maior risco cardiovascular (DUBIN *et al.*, 2011). Zahran *et al.* (2015) relataram uma correlação positiva entre os fatores hemostáticos (TM, FvW, PAI-1 e t-PA) e os níveis plasmáticos de creatinina, ureia, PCR ultra-sensível e com o diâmetro da espessura média da carótida entre portadores de DRC. Estes dados reforçam que a DRC, especialmente em estágios mais avançados, contribui para um estado de hipercoagulabilidade.

O declínio da função renal cursa com desequilíbrio eletrolítico e ácido-base, aumento das toxinas urêmicas e exacerbação do processo inflamatório, com elevação de marcadores de fase aguda. O que pode alterar a atividade de enzimas da coagulação, isso favorece a lesão endotelial, resultado no aumento dos níveis de FvW na circulação (DUBIN *et al.*, 2011). No entanto, seria esperado que este aumento ocorresse de forma proporcional à elevação da creatinina, o que não foi observado no presente estudo, o nível de FvW no grupo C3 foi menor que aqueles do grupo C2. Este achado pode estar relacionado a maior exposição do FvW nas células endoteliais do enxerto, o que favoreceram a formação de agregados plaquetários nos eventos iniciais de rejeição ao enxerto, reduzindo os níveis desse fator na circulação (HARTMANN *et al.*, 2016; HUGENHOLTZ *et al.*, 2015). No entanto, não se pode descartar a influência do tamanho amostral. De fato, grande parte dos estudos encontrados na literatura envolviam um grande número de pacientes.

Zahran et al. (2015) demonstraram uma redução dos níveis de ADAMTS13 com o declínio da função renal em portadores de DRC. Níveis elevados do FvW também foram relacionados à redução de ADAMTS13 circulante e/ou redução da atividade dessa enzima em pacientes transplantados (CHENG *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2012). Esta relação pode justificar a existência de maiores níveis do FvW entre os RTx do grupo C2 em relação ao C1, visto que os RTx no grupo C2 apresentam níveis de creatinina maiores do que os RTx do grupo C1 indicando um declínio da função de filtração renal, o que pode estar associado à redução dos níveis e/ou da atividade de ADAMTS13 nestes pacientes. A determinação dos níveis e a atividade de ADAMTS13 é uma perspectiva do presente estudo.

A análise do nível plasmático do FvW e o tempo pós-transplante não revelaram diferença entre os grupos. Resultados similares foram demonstrados por Mota *et al.* (2015), que não encontraram diferenças entre os níveis de FvW em RTx distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós-transplante e com os níveis de creatinina. No entanto, esses investigadores observaram que outros parâmetros hemostáticos (Dímero-D, Trombomodulina e ADAMTS13) se associaram aos níveis plasmáticos de creatinina e à função do enxerto, o que reforça o envolvimento da hemostasia com o declínio da função renal.

Ao avaliar a relação da presença de história de rejeição ao enxerto com os níveis de FvW em RTx, no presente estudo os níveis de FvW foram mais elevados entre os pacientes com história prévia de rejeição ao enxerto, sugerindo uma provável disfunção endotelial residual nestes receptores. Kuo *et al.* (2015) relataram que o FvW foi altamente expresso no endotélio vascular em biópsias com deposição de C4d e foi fortemente associado à perda do enxerto. Estudos *in vitro* demonstraram que a presença de anticorpos anti-MHC classe I induz a exocitose de FvW dos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais (VALENZUELA *et al.*, 2013; YAMAKUCHI *et al.*, 2007). Modelos em animais para RA também afirmaram o envolvimento do FvW nos processos de rejeição ao enxerto. Wasowska et al. (2001) sugeriram que a liberação de FvW está relacionada à adesão de plaquetas ao endotélio vascular durante o processo de rejeição e aloenxertos cardíacos.

No presente estudo, não foram evidenciadas correlações entre FvW e as PMPs e EMPs. No entanto, Lu et al. (2015) relataram a existência de correlação positiva entre estes parâmetros. Sabendo que as EMPs são consideradas marcadores da

disfunção endotelial, e, essas podem carrear gmFvW e contribuir para o agravamento da lesão ao endotélio (JY *et al.*, 2005).

6.4 Determinação e comparação das frequências dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da sintase do óxido nítrico endotelial

A população do presente estudo estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) nos diferentes grupos avaliados para os três polimorfismos da eNOS. Sabe-se que estar em equilíbrio de EHW significa que os alelos se distribuem de forma aleatória na população, não sofrendo interferência de fatores que tendem a deslocar o equilíbrio, como a seleção, endogamia, migração e mutações, não alterando suas frequências ao longo das gerações (GRIFFTHS *et al.*, 2008).

Com a finalidade de investigar uma possível associação dos polimorfismos da eNOS e a função renal, os pacientes foram distribuídos em grupos de acordo com os níveis de creatinina sérica. Considerando a análise de carreadores alélicos, observou-se uma menor frequência do carreador b do polimorfismo VNTR b/a nos grupos com elevados níveis de creatinina (grupo C2 e C3). Sabe-se que a presença do alelo variante do VNTR b/a (alelo a) está relacionada a alterações das taxas de transcrição e ou produção da eNOS, resultando em alterações funcionais da enzima. Estudos sugerem que a presença do alelo variante do VNTR b/a esteja relacionado a síntese diminuída do RNAm da eNOS, o que reflete em menores níveis da enzima e consequentemente de NO (DUTKIEWICZ *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2005).

A redução da transcrição gênica está relacionada à presença de RNA de interferência (RNAi) e RNA não codificantes. Esses últimos, quando presentes, exercem função de feedback negativo, inibindo a síntese do RNAm (WANG *et al.*, 2008). A produção destes RNAi está relacionada ao número de repetições no polimorfismo VNTR b/a, sendo que, quanto maior o número de repetições, maior será a síntese do RNAi, potencializando o feedback negativo. O alelo a apresenta uma repetição a mais que o alelo b, logo, resultando em níveis reduzidos de NO (ZHANG *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). Em concordância, Dutkiewicz *et al.* (2010) relataram que a presença do alelo variante (a) se correlacionou com a presença de níveis reduzidos de NO e diminuição da síntese de eNOS em RTx. Além disso, a presença

do alelo a pode conferir maior predisposição ao desenvolvimento da função retardada do enxerto em RTx.

Resultados similares aos do presente estudo foram obtidos por Ukar *et al.* (2014) ao observarem que RTx com genótipo bb apresentaram melhor função renal com baixa incidência de perda do enxerto. Elumalai *et al.* (2014) mostraram que a presença do genótipo aa do polimorfismo VNTR b/a influencia no agravamento da função renal e no risco de desenvolvimento de hipertensão arterial. Outro estudo que corrobora com estes achados é o de Sener *et al.* (2014), ao detectarem diferenças significativa entre as frequências do genótipo aa e alelo a (VNTR b/a) em portadores de DRCT em relação ao grupo controle.

No presente estudo os RTx com melhor função renal (avaliada pelos níveis de creatinina) apresentaram a prevalência do alelo b do polimorfismo VNTR b/a, o que permite inferir que esse alelo preservou a função da eNOS, contribuindo para melhor função do enxerto a longo prazo

A análise de haplótipos entre os grupos distribuídos de acordo com os níveis de creatinina (C1, C2 e C3) revelou maior frequência do haplótipo T-C-b no grupo C1. O termo haplótipo corresponde a combinação de alelos em variados *loci* existentes em um mesmo cromossomo homólogo, que são herdados em conjuntos (BORGES-ÓSORIO; ROBINSON, 2001). O haplótipo em questão apresenta dois alelos variantes (894T e -786C), e está relacionado ao desenvolvimento de outras patologias que cursam com níveis reduzidos de NO, como na pré-eclâmpsia e hipertensão arterial (ALPOIM *et al.*, 2014; DÍAZ-OLGUÍN *et al.*, 2011; TANUS-SANTOS *et al.*, 2007). Entretanto, devido à maior frequência do carreador b neste mesmo grupo, sugere-se que os demais alelos presentes no haplótipo tenham sido segregados em conjunto ao alelo b e, devido ao seu efeito menos deletério para a síntese de NO, estes RTx apresentam melhores níveis de creatinina. Paradoxalmente, outros investigadores não observaram diferenças entre as frequências dos haplótipos dos polimorfismos da eNOS na DRC e/ou transplante renal (MARSON *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011). Dessa forma, torna-se necessário outros estudos para melhor compreender estes marcadores genéticos no transplante renal.

Grande parte dos relatos encontrados na literatura abordam o envolvimento dos polimorfismos da eNOS com as DCV, episódios de isquemia/reperfusão do enxerto, hipertensão arterial, aterosclerose e entre outras patologias (BAMBHA *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2009; OCHODNICKY *et al.*, 2006; TANG; LIU; XIE, 2008). Chand *et*

al. (2014) propuseram que a presença do genótipo GG do polimorfismo G894T está associado a pior fenótipo entre os 140 pacientes portadores de DRC com insuficiência cardíaca sub-clínica detectada por ressonância magnética cardíaca. Estes pesquisadores avaliaram alterações sistólicas e diastólicas nos portadores de DRC sem diagnóstico prévio de doença cardíaca e daqueles com insuficiência sub-clínica tinham o genótipo GG. Propuseram que esta variante genética pode ser um poderoso biomarcador genético, auxiliando na terapia intervencionista destes pacientes (CHAND *et al.*, 2014). Em concordância com estes dados, um estudo conduzido na população brasileira revelou um aumento na frequência do genótipo GG em pacientes com insuficiência cardíaca, ao se comparar com o grupo controle. Além disso, houve associação a mortalidade (por todas as causas) em pacientes hipertensos (VELLOSO *et al.*, 2010).

Em concordância com o presente estudo e contrapondo os estudos que enfatizam a associação dos polimorfismos da eNOS, Santos *et al.* (2011), ao investigarem a associação dos polimorfismos T-786C, G894T e VNTR b/a da eNOS com a doença renal em 617 brasileiros portadores de DM tipo 2, não observaram diferença entre as frequências alélicas, genotípicas e dos haplótipos, comparando com o grupo controle (SANTOS *et al.*, 2011).

Em outra análise, os RTx foram novamente distribuídos de acordo com a presença da história prévia de rejeição ao enxerto, sendo nãoREJ, REJ e IND. Os resultados encontrados para as frequências alélicas, genotípicas, modelos de carreadores alélicos e análise de haplótipos dos polimorfismos estudados não mostraram diferença significativa entre os grupos. É importante ressaltar que foram encontrados poucos relatos na literatura avaliando a associação dos polimorfismos da eNOS e a ocorrência da rejeição ao enxerto renal. Azarpira *et al.* (2013) enfatizaram o envolvimento do polimorfismo T-786C e a ocorrência da RA em 66 RTx. Foi observado maior frequência do alelo T e uma diferença significativa entre o modelo TT vs TC+CC (análise de carreadores alélicos) entre os RTx com RA, além da prevalência do haplótipo G-C-b em RTx sem rejeição. No entanto, não demonstraram associação dos polimorfismos G894T e VNTR b/a com a ocorrência da rejeição ao aloenxerto renal. Propuseram ainda que uma possível justificativa para os achados seria o tamanho amostral (AZARPIRA *et al.*, 2013). Em um outro estudo, com um tamanho amostral considerável (187 RTx), coordenado por Dutkiewicz *et al.* (2009),

nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos G894T e VNTR b/a e a rejeição ao enxerto renal.

Considerando os resultados conflitantes envolvendo os polimorfismos da eNOS e a evolução da função renal do enxerto, torna-se necessário novos estudos para o estabelecimento de conclusões entorno dos processos envolvidos. Várias são as razões que poderiam justificar os resultados conflitantes obtidos nos estudos. É possível que os polimorfismos da eNOS não desempenhem um papel central nas alterações funcionais primárias da DRC, bem como para a rejeição ao enxerto renal pós-transplante. Além disso, como a eNOS exerce grande parte de seus efeitos próximos aos locais de sua síntese, e internamente às células, torna-se necessário a determinação dos polimorfismos da eNOS do doador e a confirmação se poderiam exercer efeitos significativos no desenvolvimento da evolução/rejeição ao enxerto e piora da função renal no pós-transplante (AZARPIRA *et al.*, 2013). Por fim, o tamanho amostral, a individualidade dos pacientes e a miscigenação encontrada na população poderiam contribuir para a omissão das diferenças.

7 CONCLUSÕES

As micropartículas endoteliais e plaquetárias apresentaram variação no número e tamanho diante do declínio da função renal ou processo de rejeição nos receptores do transplante renal avaliados.

O transplante renal recente (menor tempo pós cirurgia) pode ser caracterizado como um fator indutor para a maior liberação de micropartículas celulares.

O aumento dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand foi correlacionado com o declínio da função renal e episódios prévios de rejeição. Este biomarcador mostrou-se promissor para futuras avaliações da função renal pós-transplante.

A presença do alelo b do polimorfismo VNTR b/a foi relacionado a menores níveis de creatinina. A avaliação deste polimorfismo pode ser considerada uma potencial estratégia no prognóstico da função do enxerto renal.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das limitações desse estudo foi a alta frequência de informações não disponíveis ou não informadas nos prontuários clínicos, dificultando algumas análises de interesse. Como exemplos: dados relacionados às biopsias do aloenxerto, determinações dos HLAs dos doadores e receptores, tipagem sanguínea, proteinúria e albuminúria.

O tamanho amostral, a individualidade dos pacientes e a miscigenação encontrada em nossa população poderiam contribuir para a não detecção omissão das diferenças.

9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Avaliar um marcador inflamatório para esclarecer a relação do tamanho das MPs e a inflamação nos RTx.

Avaliar a influência da terapia imunossupressora sobre os níveis de MPs e FvW em RTx;

Determinar os níveis plasmáticos e a atividade de ADAMTS13 nos RTx distribuídos de acordo com a função renal e presença da rejeição ao enxerto;

Determinar e comparar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos da eNOS em RTx distribuídos de acordo com o eRFG e do tempo pós-transplante;

Determinar os polimorfismos da eNOS do doador e verificar se poderiam exercer efeitos significativos no desenvolvimento da evolução/rejeição ao enxerto e piora da função renal no pós-transplante;

Avaliar os principais desfechos clínicos dos RTx e compará-los com os biomarcadores alvo do estudo.

REFERÊNCIAS

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

ALMQUIST, T. et al. Effects of lipid-lowering treatment on circulating microparticles in patients with diabetes mellitus and chronic kidney Disease. **Nephrol Dial Transplant**, v.31, p. 952–960, 2016.

AKCAY, A et al. Association of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and endothelial nitric oxide synthase with chronic renal transplant dysfunction. **Transplantation**, v. 78, n. 6, p. 892–8, 2004.

AL-MASSARANI, G. et al. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 8, n. 11, p. 2360–2367, 2008.

AL-MASSARANI, G. et al. Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 3, p. 550–557, 2009.

ALPOIM, P. N. et al. ADAMTS13, FVIII, von Willebrand factor, ABO blood group assessment in preeclampsia. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23–24, p. 2162–2166, 2011.

ALPOIM, P.N. et al. Endotelial nitric-oxide synthase gene polymorphisms in early and late-onset severe preeclampsia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, p. 651, 2013.

ALPOIM, P. N. et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 42C, p. 19–23, 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.

AMABILE, N. et al. Circulating Endothelial Microparticles Are Associated with Vascular Dysfunction in Patients with End-Stage Renal Failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 11, p. 3381–3388, 2005.

AMABILE, Nicolas et al. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 27, n. 5, p. 1873–80, 2012.

ANTUS, B. et al. Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. **Transpl Int**. v. 15, n. 9-10, p. 494-501, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. **Projeto Diretrizes Doadores Limítrofes no Transplante de Rim: Quanto à Transmissão de Doenças ou à Presença de Anomalias Anatômicas Projeto Diretrizes.** [S.l.: s.n.]. p. 1–16, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. **Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgão e Tecidos da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos.** [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). **RBT**, v. 4, n. 1, p. 81, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO. Ano XXIII No 1 : **Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instuição no período: JANEIRO / MARÇO - 2017.** [S.l.: s.n.] 2017a.

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

AZARPIRA, N. et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T/C, 4a4B, 894G/T) on Iranian kidney transplant recipients. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 11, n. 1, p. 21–26, 2013.

BALDWIN, W. M; KUO, H.; MORRELL, C. N. Platelets: versatile modifiers of innate and adaptive immune responses to transplants. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 16, n. 1, p. 41–6, 2011.

BAMBHA, K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene variation associated with chronic kidney disease after liver transplant. **Mayo Clinic proceedings**, v. 85, n. 9, p. 814–20, 2010.

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

BARROS, E. et al. **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento.** 3. ed. Porto Alegre, Artmed, 2006.

BEYER, C.; PISETSKY, D. S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 1, p. 21–29, 2010.

BITZER, M. et al. Microparticles and MicroRNAs of Endothelial Progenitor Cells Ameliorate AKI. **Kidney Int.** v.82, n.4, p. 375–377, 2012.

BHANDARY, U.V. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with hypertension and cardiovascular disease in renal transplantation. **Nephrology (Carlton)**. v. 13, n. 4, p. 348-355, 2008.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. Porto Alegre: Artemed, 2001.

BRASIL. **Sistema Nacional de Transplantes**. [S.l.: s.n.], [200-?], Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/sas/transplantes/sistema-nacional-de-transplantes>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

BRITO, T. N. S. et al. Glomerular filtration rate estimated in adults: characteristics and limitations of equations used. **SBAC**, [S.l.: s.n.], 2016.

BRODSKY, S. V. et al. Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 17, n. 3, p. 261–268, 2008.

BUDAJ, M. et al. Microparticles: A component of various diseases. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej**, v. 122, n. SUPPL.1, p. 24–29, 2012.

BURBALLA, C. et al. MDRD o CKD-EPI en la estimación del filtrado glomerular del donante renal vivo. **Nefrologia**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2017.02.007>>. Acesso em: 16 ago 2017.

CARVALHO, L. M. L. et al. Microparticles: Inflammatory and haemostatic biomarkers in Polycystic Ovary Syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 443, p. 155-162, 2017.

CAMPOS F. M. F. et al.; Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. **Malaria Journal (Online)**, v. 9, p. 327, 2010.

CHAND, S. C. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Single Nucleotide Polymorphism and Left Ventricular Function in Early Chronic Kidney Disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0116160, 2014.

CHENG, H. et al. Renal Endothelial Dysfunction in Diabetic Nephropathy. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**.; v. 14, n. 1, p. 22–33, 2014.

CHENG, Y. L. et al. Levels of circulating microparticles in patients with chronic cardiorenal disease. **J Atheroscler Thromb**, v. 22, n. 3, p. 247-56, 2015.

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.

COHEN-HAGAI, K. et al. Effect of Vitamin D status on von Willebrand factor and ADAMTS13 in diabetic patients on chronic hemodialysis. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 155–158, 2017.

COOPER, D. K. C.; EKSER, B.; TECTOR, A. J. A brief history of clinical xenotransplantation. **Int J Surg**, n. 23, p. 205–210, 2015.

COOREY, G. M et al. Barriers to preemptive kidney transplantation. **The American journal of nursing**, v. 109, n. 11, p. 28–37, 2009.

COTTONE, S. et al. Inflammation and endothelial activation are linked to renal function in long-term kidney transplantation. **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**. [S.l: s.n.], 2007.

CUI, J. et al. Differential diagnosis of acute rejection and chronic cyclosporine nephropathy after rat renal transplantation by detection of endothelial microparticles (EMP). **Medical Hypotheses**, v. 75, n. 6, p. 666–668, 2010.

DANIEL, L. et al. Circulating microparticles in renal diseases. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 7, p. 2129–2132, 2008.

DAVIS, C. L; DELMONICO, F. L. Living-Donor Kidney Transplantation: A Review of the Current Practices for the Live Donor. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, p. 2098–2110, 2005.

DEAN, W. L. et al. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. **Thrombosis and haemostasis**, v. 102, n. 4, p. 711-718, 2009.

DÍAZ-OLGUÍN, L. et al. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with preeclampsia in Maya mestizo women. **Dis Markers**, v. 31, n. 2, p.83-9, 2011.

DELLAMEA, B. S. et al. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.6, n. 17,2014.

DOŁEGOWSKA, B.; BLOGOWSKI, W.; DOMANSKI, L. Association between the perioperative antioxidative ability of platelets and early Post-Transplant function of kidney allografts: A pilot study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2012.

DUBIN, R. et al. Kidney function and multiple hemostatic markers: cross sectional associations in the multiethnic study of atherosclerosis. **BMC Nephrology**, v.12, n. 3, 2011.

DUMMER, C. D. **Expressão gênica e proteica do fator de transcrição FOXP3 em biopsias do aloenxerto renal e sua associação com a função e sobrevida tardia do rim transplantado**. 2011. f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

DUTKIEWICZ, G. et al. The association between eNOS intron 4 VNTR polymorphism and delayed graft function of kidney allografts. **Clin Transplant**, v. 24: p. E130–E136, 2010.

DUTKOWSKI, P.; DE ROUGEMONT, O.; CLAVIEN, P. A. Alexis Carrel: Genius, innovator and ideologist. **American Journal of Transplantation**, [S.l: s.n.], 2008.

EJERBLAD, Elisabeth et al. Obesity and risk for chronic renal failure. **JASN**, v. 17, n. 6, p. 1695–702, 2006.

ELUMALAI, R. et al. Role of endothelial nitric oxide synthase VNTR (intron 4 a/b) polymorphism on the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. **J Renal Inj Prev**, v. 3, n. 33, p. 69–73, 2014.

EZZIDI, I. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu-298Asp, 4b/a, and -786T>C gene variants with diabetic nephropathy. **J Diabetes Complications**, v. 22, p. 331–8, 2008.

FAIRCHILD, T.A. et al. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)–>Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 28, 2001.

FENECH, A. et al. The value of autologous indium (111In)-labelled platelets in the diagnosis of renal transplant rejection. **Clin Nephrol**, n. 21: p.220–222, 1984.

FRANÇA, C. N. et al. Microparticles as potential biomarkers of cardiovascular disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 104, n. 2, p. 169–74, 2015.

FRIEDEWALD, J et al. The Kidney-First Initiative: What is the Current Status of Pre-emptive Transplantation?. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 19, n.4, p. 252–256, 2012.

GALLIFORD, J; GAME, D S. Modern renal transplantation: present challenges and future prospects. **Postgraduate medical journal**, v. 85, n. 1000, p. 91–101, 2009.

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à Genética**. 9ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 764p. 2008.

GUPTA, A. et al. Prevalence and correlates of cognitive impairment in kidney transplant recipients. **BMC Nephrology**, 2017 18:1, v. 18, n. 1, p. 158, 2017.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**. [S.l: s.n.], 2011.

HARTMANN, M; SZALAI, C.; SANER, F. H. Hemostasis in liver transplantation: Pathophysiology, monitoring, and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n.4, p.1541-1550, 2016.

HAAS, M. et al. Banff 2013 meeting report: Inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. **Am J Transplant**. v.14, n.2, p. 272-83, 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.

HELBING, T. et al. Role of microparticles in endothelial dysfunction and arterial hypertension. **World journal of cardiology**, v. 6, n. 11, p. 1135–9, 2014.

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

HORN, P. et al. Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2013.

HUGENHOLTZ, G. C. G. et al. Development of a Hyperactive Primary Hemostatic System During Off-Pump Lung Transplantation Resulting From an Unbalance Between von Willebrand Factor and Its Cleaving Protease ADAMTS13. **American Journal of Transplantation**, v. 15, p. 1958–1966, 2015.

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

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.

JY W. microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. **J Thromb Haemost**, v.3, p. 1301–08, 2005.

KAM, A. et al. Curcumin reduces tumour necrosis factor-enhanced annexin v-positive microparticle release in human vascular endothelial cells. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 424–433, 2015.

KAZANCIOĞLU, Rumez. Risk factors for chronic kidney disease: an update. **Kidney International Supplements**, v. 3, n. 4, p. 368–371, 2013.

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. K. et al. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. **British Journal of Haematology**, v. 124, n. 3, p. 376–384, 2004.

KIRSTAJN, G.M. Avaliação de Função Renal. **J Bras Nefrol**, v. 31, (Supl 1), p. 14–20, 2009.

KONG, X. Z. et al. The Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T-786C Polymorphism Increases Myocardial Infarction Risk: A Meta-Analysis. *Medical Science Monitor. International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, v. 23, p. 759-766. 2017.

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.

KROTH, L. V. **Avaliação dos 35 anos de transplante renal no Hospital São Lucas da PUCRS**. 2015. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

KUO, H. H. et al. Platelets in Early Antibody-Mediated Rejection of Renal Transplants. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, v. 26, n. 4, p. 855-863, 2015.

KURNATOWSKA, I. et al. Long-term effect of body mass index changes on graft damage markers in patients after kidney transplantation. *Annals of Transplantation*, v. 21, p. 626–631, 2016.

LAU, Y. C. et al. Relationship between renal function and circulating microparticles, soluble P-selectin and E-selectin levels in atrial fibrillation. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 43, n. 1, p. 1–6, 2017.

LEDERER, E.D. et al. Correlation between percutaneous renal biopsy and the indium-111-labeled platelet scan in diagnosing acute renal allograft rejection. *Transplantation*, v. 53, p. 945–947, 1992.

LEE, J. et al. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *CMJ*, v. 52, n. 2, p. 81-90, 2016.

LIN, J. et al. Conditional linkage and genome-wide association studies identify UGT1A1 as a major gene for anti-atherogenic serum bilirubin levels – The Framingham Heart Study Jing-Ping. *Atherosclerosis*, v. 206, n. 1, p. 228–233, 2009.

LING, Q. et al. Alternative Definition of Acute Kidney Injury Following Liver Transplantation: Based on Serum Creatinine and Cystatin C Levels. *Transplantation Proceedings*, v. 39, n. 10, p. 3257–3260, 2007.

LOUPY, A et al. The Banff 2015 Kidney meeting report: Current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2016.

LU, G. Y. et al. Significance of plasma von Willebrand factor level and von Willebrand factor-cleaving protease activity in patients with chronic renal diseases. *Chinese medical journal*, v. 121, n. 2, p. 133–136, 2008.

LU, G. Y. et al. Alteration of circulatory platelet microparticles and endothelial microparticles in patients with chronic kidney disease. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 9, p. 16704–16708, 2015.

MACHINICKI, G. et al. Three-year post-transplant Medicare payments in kidney transplant recipients: associations with pre-transplant comorbidities. **Saudi J Kidney Dis Transpl.** v.22, n. 1, p. 24-39. 2011

MAHMOODI, K.; SOLTANPOUR, M. S.; KAMALI, K. Assessment of the role of plasma nitric oxide levels, T-786C genetic polymorphism, and gene expression levels of endothelial nitric oxide synthase in the development of coronary artery disease. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences.** v. 22, n. 34, 2017.

MALYSZKO, J. et al. Endothelial function and novel adhesion molecule CD44 in kidney allograft recipients. **Transplant Pro**, v. 40, n. 10, p.3470-3, 2008.

MAMOULAKIS D. et al. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase eNOS gene and early microangiopathy in type 1 diabetes. **Int J Immunogenet**, v. 36, n. 3, p. 153–157, 2009.

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

MARSON, B. P. et al. Endothelial nitric oxide genotypes and haplotypes are not associated with end-stage renal disease. **DNA Cell Biol**, v. 30, n. 1, p. 55-9, 2011.

MEEHAN, S. M. et al. Platelets and capillary injury in acute humoral rejection of renal allografts. **Human Pathology**, v. 34, n. 6, p. 533–540, 2003.

MEZOUAR, S. et al. Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis. **Seminars in Oncology**, v. 41, n. 3, p. 346–358, 2014.

MIKOLASEVIC, Ivana et al. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: Etiology and management. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 10, p. 35–45, 2017.

MONCADA, S. et al. Nitric Oxide. **J Hypertens Suppl.** v. 12, n. 10, p. S35-9, 1994.

MONTORO-GARCIA, S. et al. Small-size circulating microparticles levels in acute coronary syndrome patients: On the trail of novel prognostic markers. **European heart journal**, v. 33, p. 600, 2012.

MONTORO-GARCÍA, S. et al. Small-size platelet microparticles trigger platelet and monocyte functionality and modulate thrombogenesis via P-selectin. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 4, p. 571–580, 2014.

MONTORO-GARCÍA, S. et al. Small-size Microparticles as Indicators of Acute Decompensated State in Ischemic Heart Failure. **Revista española de cardiología (English ed.)**, v. 68, n. 11, p. 951–958, 2015.

MOREL, O. et al. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 1, p. 15–26, 2011.

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

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

MOTA, L. S. et al. Comparative study between kidney transplantation with deceased donor expanded criteria and donor standard criteria in a single center in Brazil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 3, p. 334–343, 2016.

MUBARAK, M. et al. Immunohistopathologic Characterization of Plasma Cell-Rich Acute Rejection in Living-Related Renal Transplant Recipients. **Experimental and Clinical Transplantation**, p. 18–22, 2017.

NAKAYAMA, T. et al. Endothelial von Willebrand Factor Release Due to eNOS Deficiency Predisposes to Thrombotic Microangiopathy in Mouse Aging Kidney. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 5, 2010.

NATH, S. D. et al. The 27-bp repeat polymorphism in intron 4 (27 bp-VNTR) of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene is associated with albumin to creatinine ratio in Mexican Americans. **Mol Cell Biochem**, 331, n. 1-2, p. 201–205, 2009.

NOMURA, S. Microparticle and Atherothrombotic Diseases. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 23, n. 1, p. 1–9, 2016.

OCHODNICKY, P et al. Microalbuminuria and endothelial dysfunction: emerging targets for primary prevention of end-organ damage. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47 Suppl 2, p. S151-62–6, 2006.

PENG, T. et al. Correlation Between Endothelial Dysfunction and Left Ventricular Remodeling in Patients with Chronic Kidney Disease. **Kidney Blood Press Res**, v. 39, p. 420-426, 2014.

PEREIRA, W. A. **Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos**. 3. ed. [S.I.]: Guanabara Koogan, 2004.

PUDDU, P. et al. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. **Canadian journal of cardiology**, v. 26, n. 4, p. e140–e145, 2010.

QAMRI, Z. et al. Early posttransplant changes in circulating endothelial microparticles in patients with kidney transplantation. **Transplant Immunology**, v. 31, n. 2, p. 60–64, 2014.

QU, L. et al. Tacrolimus dose requirement based on the CYP3A5 genotype in renal transplant patients. **Am J Transplant**, v.17, (suppl 3), 2017.

RACUSEN, L. C.; HAAS, M.. Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 1, n. 3, p. 415–420, 2006.

RAI, H. et al. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113363, 2014.

REDDY, Y.S. et al. Nitric oxide status in patients with chronic kidney disease. **Indian Journal of Nephrology**, v. 25, n. 5, p. 287-291, 2015.

RIELLA, M. C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

SANDRIM, V.C. et al. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 1, p. 241–246. 2006.

SANTOS, K. G. et al. Association of eNOS gene polymorphisms with renal disease in Caucasians with type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 91, n. 3, p. 353–362, 2011.

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ. **Manual de Transplantes**. CENTRAL ESTADUAL DE TRANSPLANTES DO PARANÁ, 2014. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CET/Manual_CentralEstadualdeTransplantes_2014.pdf>. Acesso em: 26 jan 2017.

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

ŞENER, E. F. et al. The role of endothelial nitric oxide synthase gene G894T and intron 4 VNTR polymorphisms in hemodialysis patients with vascular access thrombosis. **AKD: the Anatolian journal of cardiology**, v. 14, n. 3, p. 239–43, 2014.

SERÓN, D.; MORESO, F. Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. **Kidney international**, v. 72, n. 6, p. 690–7, 2007.

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

SCHWARZENBERGER, C. et al. Platelets Are Relevant Mediators of Renal Injury Induced by Primary Endothelial Lesions. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 308, n. 11, 2015.

- SHAHEEN, F. A. M. et al. Cardiovascular and cerebrovascular comorbidities in hemodialysis patients from the Gulf Cooperation Council countries enrolled in the dialysis outcome and practice pattern study phase 5 (2012-2015). **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 27, n. 7, p. 24, 2016.
- SHANTSILA, E. et al. Circulating microparticles: Challenges and perspectives of flow cytometric assessment. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 111, n. 6, p. 1009–1014, 2014.
- SHEN, L et al. Von Willebrand factor, ADAMTS13 activity, TNF- α and their relationships in patients with chronic kidney Disease. **Experimental and therapeutic medicine**, v.3, p. 530-534, 2012.
- SHENKER, N. et al. The impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on long-term renal allograft outcome. **Transpl Int**, v. 16, p.391-395, 2003.
- SHI, J. et al. Increased circulating follicular helper T cells with decreased programmed death-1 in chronic renal allograft rejection. **BMC nephrology**, v. 16, n. 1, p. 182, 2015.
- SILBINGER S, NEUGARTEN J: Gender and human chronic renal disease. **Gend Med**, v. 5, p. S3–S10, 2008.
- SINGH, N. et al. Circulating apoptotic endothelial cells and apoptotic endothelial microparticles Independently Predict the Presence of Cardiac Allograft Vasculopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 4, p. 324–331, 2012.
- 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.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Projeto Diretrizes, Transplante Renal: Indicações Contra-Indicações**. 2006.
- SOLEYMANIAN, T. et al. Predictors of Clinical Outcomes in Hemodialysis Patients: a Multicenter Observational Study. **Iranian journal of kidney diseases**, v. 11, n. 3, p. 229–236, 2017.
- SOLEZ, K. et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. **Am J Transplant**. v. 8, n. 4, p. 753-60, 2008.
- SOLEZ, K.. History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 15, n. 1, p. 49–51, 2010.
- SUŁOWICZ, J. et al. Comparison of the incidence of skin cancers in patients on dialysis and after kidney transplantation. **Postepy dermatologii i alergologii**, v. 34, n. 2, p. 138–142, 2017.

TANG, F-Y. et al. Association of angiotensin-converting enzyme and endothelial Nitric Oxide synthase gene polymorphisms with vascular disease in ESRD patients in a Chinese population. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 319, n. 1–2, p. 33–39, 2008.

TANUS-SANTOS, J. E.; CASELLA-FILHO, A. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to hypertension: genotype versus haplotype analysis. **Hypertension**, v.49, n. 1, 2007.

TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 6, p. 2832-2835, 2000.

TURTURICI, G. et al. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 306, n. 7, p. C621-33, 2014.

UKAR, M. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism influences renal allograft outcome. **Clin Transplant**, v. 28, n. 2, p. 223-8, 2014.

VALENZUELA, N. M.; MULDER, A.; REED, E. F. HLA class I antibodies trigger increased adherence of monocytes to endothelial cells by eliciting an increase in endothelial P-selectin and, depending on subclass, by engaging FcγRs. **J Immunol**, v. 90, p. 6635–6650, 2013.

VELLOSO, M. W M et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multiethnic population with heart failure and controls. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 220–225, 2010.

VIARO, F. et al. Expressão das Óxido Nítrico Sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares, **Rev Bras Cir Cardiovasc** v.15, n.1, São Paulo. 2000.

VION, A. C. et al. Mechanical forces stimulate endothelial microparticle generation via caspase-dependent apoptosis-independent mechanism. **Pulmonary circulation**, v. 3, n. 1, p. 95–9, 2013.

VIKLICKY, O. et al. G-protein beta- 3-subunit and eNOS gene polymorphism in transplant recipients with long-term renal graft function. **Kidney Blood Press Res**, v. 25: n. 245. 2002.

WANG, J. et al. Biogenesis of Short Intronic Repeat 27-Nucleotide Small RNA from Endothelial Nitric-oxide Synthase Gene. **JBC**, 2008.

WASOWSKA, B. A. et al. Passive transfer of alloantibodies restores acute cardiac rejection in IgKO mice. **Transplantation**, v.71, p. 727–736, 2001.

WEITZ, J. et al. Living-donor kidney transplantation: risks of the donor-benefits of the recipient. **Clinical transplantation**, v. 20 Suppl 1, p. 13–16, 2006.

WILLIAMS, M. S. et al. Do Platelet-Derived Microparticles Play a Role in Depression, Inflammation, and Acute Coronary Syndrome?. **Psychosomatics**, v. 55, n. 3, p. 252–260, 2014.

WU, D. A. et al. Barriers to living donor kidney transplantation in the United Kingdom: a national observational study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 5, p. 890–900, 2017.

XIANG, Y.; HWA, J. Regulation of VWF expression, and secretion in health and disease. **Current opinion in hematology**, v. 23, n. 3, p. 288–293, 2016.

YAMAKUCHI, M. et al. Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 1301–1306. 2007.

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

YILMAZ, E.; MIR, S.; BERDELI, A. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism in early term chronic allograft nephropathy. **Transplant Proc.** v.41, n. 10, p. 4361-5, 2009.

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

ZAHRAN, M. et al. The Role of Hemostatic Factors in Atherosclerosis in Patients with Chronic Renal Disease. **Electronic physician**, v. 7, n. 5, p. 1270–6, 2015.

ZHANG, M-X. et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. **PNAS**, v. 102, n. 47, p. 16967–16972 BI, 2005.

ZHANG, M-X. et al. Biogenesis of Short Intronic Repeat 27-Nucleotide Small RNA from Endothelial Nitric-oxide Synthase Gene. **The journal of biological chemistry**, v. 283, n.21, p.14685–14693, 2008.

ZBROCH E. et al. Renalase, kidney function, and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. **Pol Arch Med Wewn.** v. 122, n. 1-2, p. 40-4, 2012.

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



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

Projeto: CAAE – 48473415.0.0000.5149

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

DECISÃO

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

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

**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, CAAE (Atualizada em 2016).



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

Projeto: CAAE – 48443715.3.0000.5149

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

DECISÃO

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

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

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

Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C – 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

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

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

ANEXO D – Ficha Clínica

Ficha Clínica

“AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS, INFLAMATÓRIOS E HEMOSTÁTICOS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS”

Número de ID do participante: _____ Data da coleta: ____________ Prontuário: _____

1. Identificação:

Nome: _____ DN: ____________ Sexo: _____
 Naturalidade: _____ Endereço: _____
 Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Tel: _____
 Etnia: _____ Médico: _____ Outras Infos: _____

2. Dados Clínicos:

a) Peso (Kg): _____ Altura (m) _____ IMC (Kg/m²) _____ 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: _____

Dados Laboratoriais - Data: ____________

Hemograma	Ionograma	Bioquímica	Bioquímica
Hm\Ht\Hb: \ \	Na\k: \	Creat:	BD\BT: \
GL:	Mg\PCl: \ \	Uréia:	Nível Med____:
Seg\Bast: \	Ca\Cai: \	Ác. úrico:	Albumina:
Baso\Eos: \	Urina	HbA1c:	Globina:
Linf\Mono: \	DU\pH: \	Glico JJ:	LDH:
Plaq:	Micro\Prot: \	TGO\AST:	Colest T:
VCM\HCM: \	Prot. 24h:	TGP\ALT:	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)	
HLA A:	B:	HLA A:	B:
	DR:		DR:
PRA PRÉ (data):		Prova Cruzada:	GS:
PRA PÓS (data):		Outros:	
Biópsia:		Infecções pós-Tx:	
Outros:			

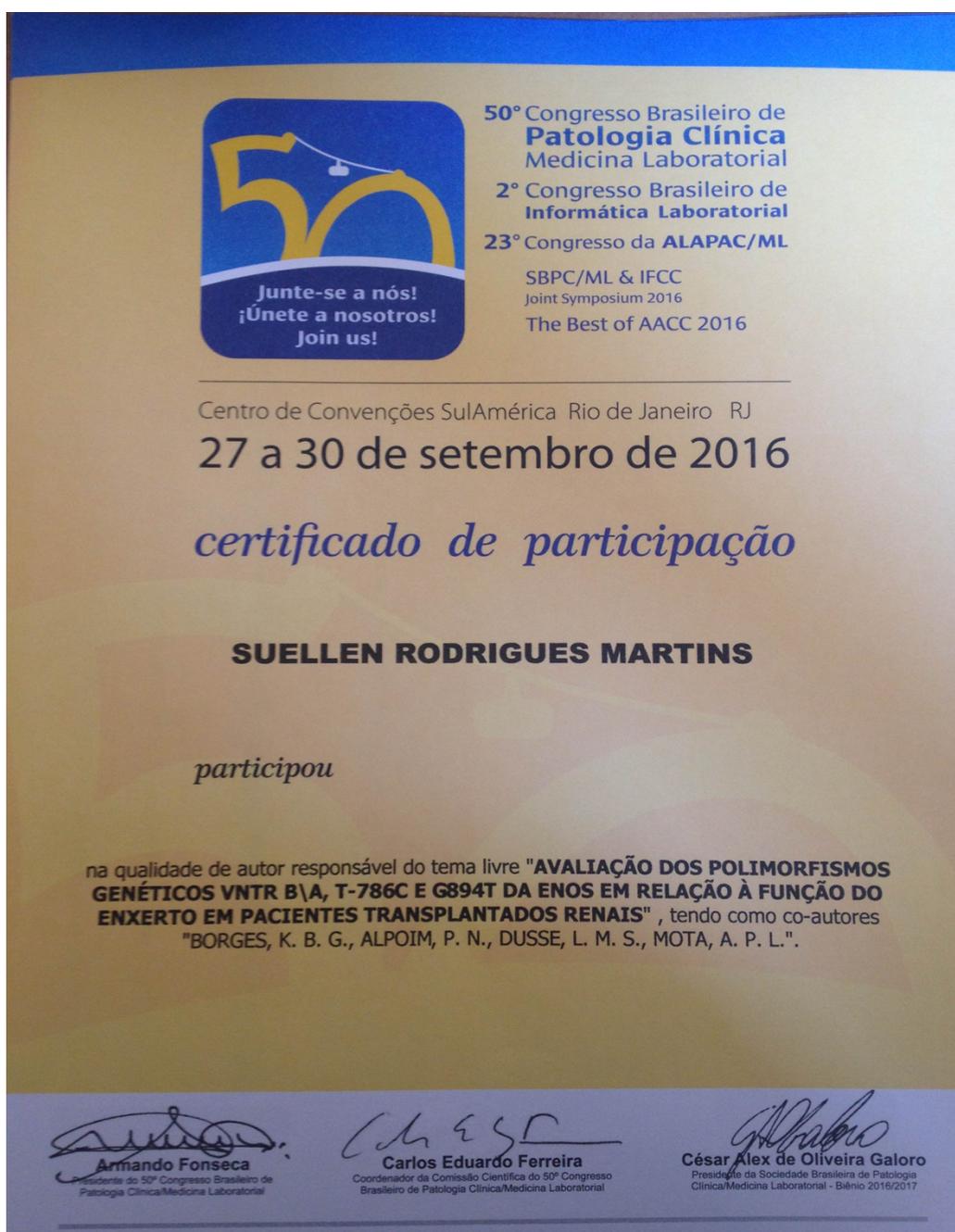
PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

Local: Rio de Janeiro

Data: 27 a 30 de setembro de 2016.

Apresentação de pôster: "Avaliação dos polimorfismos genéticos VNTR B\A, T-786C e G894T da eNOS em relação à função do enxerto em pacientes transplantados renais".



50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

Local: Rio de Janeiro

Data: 27 a 30 de setembro de 2016.

Apresentação de pôster: "Distribuição dos polimorfismos genéticos VNTR b\la, T-786C e G894T da eNOS de acordo com o ritmo de filtração glomerular em pacientes transplantados renais".

50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial
2º Congresso Brasileiro de Informática Laboratorial
23º Congresso da ALAPAC/ML
 SBPC/ML & IFCC
 Joint Symposium 2016
 The Best of AACC 2016

Centro de Convenções SulAmérica Rio de Janeiro RJ
27 a 30 de setembro de 2016
certificado de participação

SUELLEN RODRIGUES MARTINS

participou

na qualidade de autor responsável do tema livre "**DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS VNTR B\A, T-786C E G894T DA ENOS DE ACORDO COM RITMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI**", tendo como co-autores "BORGES, K. B. G., ALPOIM, P. N., DUSSE, L. M. S., MOTA, A. P. L.".

Amando Fonseca
 Presidente do 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Carlos Eduardo Ferreira
 Coordenador da Comissão Científica do 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

César Alex de Oliveira Galoro
 Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial - Biênio 2016/2017

Realização

SBPC/ML
 SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL

AMB
 Associação Médica Brasileira

IFCC
 International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

AACC
 American Association for Clinical Chemistry

XXVI Biennial Congress and 63rd Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis

Local: Berlin, Alemanha

Data: 08 a 13 de julho de 2017

Apresentação de pôsteres:

- ◆ PB674: Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms Influence on Endothelial Microparticles Levels in Renal Transplantation
- ◆ PB686: Endothelial and Platelet Microparticles in Kidney Transplanted Recipients: Influence of Time Post Transplantation and Donor Type
- ◆ PB1422: Assessment of Endothelial and Inflammatory Markers in Brazilian Renal Transplant Recipients

