

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

RÍVIA MARA MORAIS E SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO ENDOTELIAL E
DISFUNÇÃO PLAQUETÁRIA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS**

Belo Horizonte - MG

2016

RÍVIA MARA MORAIS E SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO ENDOTELIAL E
DISFUNÇÃO PLAQUETÁRIA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de
Farmácia da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau
de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª Drª Luci Maria Sant'Ana Dusse

Co-orientadora: Profª Drª Ana Cristina Simões e
Silva

Colaboradora: Fernanda Campos Nunes Freire

Belo Horizonte - MG

2016

Dedicatória

Dedico essa tese à minha família, que foi envolvida sem querer no meu projeto. À Fernanda, minha filhotinha amada, que foi obrigada a aguentar e a entender como adulta as minhas ausências. Ao Mauricio, pelo companheirismo, pelo apoio, pela paciência, e por ter assumido papel de mãe, mesmo contra a natureza masculina. Aos meus pais pelo apoio diário, em especial à minha mãe, que cuidou da minha filha nas minhas ausências. Às minhas irmãs, com as quais pude conviver e dividir o mesmo espaço novamente, depois de muitos anos.

*"Em você existem as causas da sua derrota
e vibram as forças de seu triunfo"
André Luiz*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me proporcionou grandes provações, mas que se converteram em aprendizado e evolução intelectual e moral, e me fez olhar o próximo com mais caridade, sem julgamentos que me fizessem rotulá-lo erroneamente.

Às crianças com doença renal e seus familiares, que mesmo em meio às adversidades, se permitiram contribuir com a pesquisa para que outros se beneficiassem.

Às crianças e adolescentes do Centro Pedagógico da UFMG e do COLTEC UFMG que, também por solidariedade, se dispuseram a participar do estudo.

À Letícia Nunes Parreiras, por compartilhar esse trabalho comigo e pela amizade construída.

Aos queridos amigos do Laboratório de Hematologia: Marcos Vinícius Ferreira Silva, Karine Silvestre, Rita Carolina Duarte, Lorena Caixeta, e em especial à Letícia Gonçalves Freitas e Cristina Mello Loures, que me ajudaram do início ao fim. Obrigada pela agradável convivência, pela disponibilidade em ajudar com total desprendimento. Sem vocês eu não teria conseguido desenvolver nem terminar o doutorado.

À orientadora Luci Maria Sant'Ana Dusse, pelo competente trabalho de orientação e por ter tolerado minha “insubordinação”.

À co-orientadora Ana Cristina Simões e Silva, pelo suporte, por ter nos dado a oportunidade de conhecer e trabalhar com as crianças com doença renal e ter aberto as portas da Faculdade de Medicina da UFMG para a viabilização do estudo.

À Fernanda Nunes Freire Campos, pela colaboração em várias etapas desse trabalho.

À professora Edna Reis, pela contribuição nas análises estatísticas.

À Ana Paula Lucas Motta, pela ajuda em algumas etapas e pelas agradáveis conversas.

Aos professores da Faculdade de Farmácia, que se dedicam com tanto brilhantismo à missão acadêmica.

Aos médicos Cristina M. B. Soares e Sérgio Pinheiro pela colaboração essencial na seleção das crianças participantes do estudo.

À Cláudia Natália Ferreira, professora do COLTEC/ UFMG, e às funcionárias do Centro Centro Pedagógico da UFMG, pela prestimosa colaboração no recrutamento e seleção dos voluntários saudáveis.

Aos funcionários da Unidade de Nefrologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFMG.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial ao Márcio e à Marisa, do Laboratório de Hematologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) está associada à elevada morbimortalidade, inclusive por alterações hemostáticas e doenças cardiovasculares, e ao comprometimento na qualidade de vida dos pacientes. Na infância, essas alterações são extremamente relevantes por afetarem não só o curso da doença, como também desencadear comprometimentos na vida adulta. O objetivo do presente estudo foi investigar as funções endotelial e plaquetária em pacientes pediátricos com DRC pré-dialítica e comparar com indivíduos saudáveis, bem como avaliar se os biomarcadores analisados estão relacionados com a doença renal crônica em crianças e adolescentes. O estudo incluiu 95 participantes, sendo 43 pacientes pediátricos com doença renal crônica (DRC) em estágios 1 a 4 em tratamento conservador, e 52 crianças saudáveis (grupo-controle), pareados em idade e sexo. Como marcadores da ativação plaquetária foram determinadas, por citometria de fluxo, a expressão plaquetária de P-selectina (CD62P), GPIIb/IIIa (CD41a), GPIIIa (CD61) e CD40L (CD154), e a porcentagem de agregados plaquetas-leucócitos. Os níveis plasmáticos dos biomarcadores de ativação endotelial sE-selectina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), moléculas de adesão celular vascular (sVCAM-1) e intercelular (sICAM-1) foram determinados por ELISA, bem como os biomarcadores receptor de uPA solúvel (suPAR), ADAMTS13 e FVW. As expressões de P-selectina e GPIIIa nos pacientes com DRC foram inferiores ao grupo-controle. A porcentagem de agregados plaquetas-monócitos (APM), os níveis plasmáticos de sE-selectina, VEGF, sICAM-1, sVCAM-1, suPAR, FVW e a relação FVW:ADAMTS13 foram mais elevados na doença. Os níveis de FVW e a sE-selectina se apresentaram reduzidos nos pacientes tratados com os antagonistas do Sistema Renina-Angiotensina, refletindo uma proteção endotelial conferida por esses medicamentos. Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que houve evidências de disfunção plaquetária e ativação endotelial nas crianças e adolescentes com DRC em estágio pré-dialítico; as alterações encontradas estão presentes precocemente na população pediátrica e são promovidas principalmente pela doença renal; as alterações dos marcadores de função plaquetária e endotelial e os níveis de FVW e ADAMTS13 nas crianças e adolescentes com DRC em estágios avançados pré-dialíticos suportam a existência de um estado de hipercoagulabilidade nesses pacientes; a etiologia da DRC (malformações congênitas, glomerulopatias ou outras) não mostrou associação com a alteração dos biomarcadores hemostáticos, de disfunção plaquetária e endotelial; houve correlação entre a expressão dos biomarcadores plaquetários e também entre a produção dos marcadores de ativação endotelial. A redução do RFG foi associada à menor expressão dos receptores plaquetários, à maior formação de APM e aos maiores níveis de marcadores endoteliais. Os biomarcadores de ativação plaquetária e endotelial, quando avaliados em conjunto por meio da regressão logística, mostraram relação com a DRC e com o RFG.

Palavras-chave: Nefrologia pediátrica. Hemostasia. Ativação endotelial e plaquetária.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is associated with high morbidity and mortality, including hemostatic changes and cardiovascular diseases, and compromised patients' quality of life. In childhood, these changes are extremely relevant because they affect not only the course of the disease but also triggering impairments in adult life. The objective of the present study was to investigate the endothelial and platelet functions in pediatric patients with pre-dialytic CKD and compare it with healthy individuals, as well as to evaluate if the biomarkers analyzed were related to chronic kidney disease in children and adolescents. The study included 95 participants, 43 pediatric patients with chronic renal disease (CKD) in stages 1 to 4 on conservative treatment, and 52 healthy children (control group) matched for age and sex. Platelet activation markers expression: P-selectin platelet (CD62P), GPIIb/IIIa (CD41a), GPIIIa (CD61) and CD40L (CD154), and the percentage of platelet-leukocyte aggregates were determined by flow cytometry. Plasma levels of the endothelial activation biomarkers sE-selectin, vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular cell adhesion molecules (sVCAM-1) and intercellular (sICAM-1), uPA receptor biomarkers soluble (suPAR), ADAMTS13 and FvW were determined by ELISA. Expressions of P-selectin and GPIIIa in patients with CKD were lower than the control group. The percentage of platelet-monocyte aggregates, plasma levels of sE-selectin, VEGF, sICAM-1, sVCAM-1, suPAR, FvW and the FvW: ADAMTS13 ratio were higher in the disease. The levels of VWF and sE-selectin were reduced in patients treated with the Renin-Angiotensin Systems antagonists, reflecting an endothelial protection conferred by these drugs. The results allow to conclude that there was evidence of platelet dysfunction and endothelial activation in pre-dialytic CKD children and adolescents; the alterations are present early in the pediatric population and was promoted by renal disease; the changes in of platelet and endothelial biomarkers function and the levels of VWF and ADAMTS13 in CKD children and adolescents in pre-dialytic stages support the existence of a hypercoagulable state in these patients; the etiology of CKD (congenital malformations, glomerulopathies or others) showed no association with alteration of hemostatic biomarkers, platelet and endothelial dysfunction; there was a correlation between the expression of the platelet biomarkers and also between the production of endothelial activation markers. Reduction of RFG was associated with lower expression of platelet receptors, higher APM formation, and higher levels of endothelial markers. The biomarkers of platelet and endothelial activation, when assessed together by logistic regression, showed a relationship with CKD and with RFG.

Keywords: Pediatric nephrology. Hemostasis. Endothelial and platelet activation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos motivos de exclusão das pacientes pediátricos com DRC em estágios 3 ou 4 no estudo.	44
Tabela 2: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para avaliação das glicoproteínas plaquetárias.....	49
Tabela 3: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para avaliação de agregados plaquetas-leucócitos.....	52
Tabela 4: Características clínicas e epidemiológicas dos participantes do estudo.	58
Tabela 5: Resultados laboratoriais dos participantes do estudo.....	59
Tabela 6: Expressão dos biomarcadores de ativação plaquetária nos participantes do estudo.	60
Tabela 7: Níveis plasmáticos dos biomarcadores endoteliais sE-selectina, VEGF, sICAM-1 e sVCAM-1 para o grupo com DRC e para o grupo-controle.	63
Tabela 8: Níveis plasmáticos dos biomarcadores endoteliais e hemostáticos suPAR, FVW e ADAMTS13 e da relação FVW:ADAMTS13 nos pacientes com DRC e no grupo-controle.....	65
Tabela 9: Diferenças estatísticas entre os biomarcadores em relação ao uso de medicamentos antagonistas do SRA.	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Estágio da DRC, descrição e valores do RFG*.	11
Quadro 2- Valores de referência da RFG para crianças.	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Complicações clínicas da DRC: uma dupla perspectiva.	13
Figura 2: Prevalência estimada de DRC e doença renal terminal (DRCT) em crianças em todo o mundo.	15
Figura 3: Prevalência de diagnóstico primário em pacientes abaixo de 19 anos de idade com DRC e submetidos à diálise crônica ambulatorial no Brasil em 2012.	19
Figura 4: Representação do modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares.....	24
Figura 5: Papel do suPAR na lesão renal: envolvimento na fibrinólise e na angiogênese.....	38
Figura 6: Clivagem do Fator de von Willebrand pela ADAMTS13.....	39
Figura 7: Estratégias para análise da expressão dos marcadores de ativação plaquetária por citometria de fluxo.	50
Figura 8: Estratégias para análise da formação dos agregados plaquetas-leucócitos por citometria de fluxo.	53
Figura 9: Distribuição dos valores de expressão dos biomarcadores de ativação plaquetária P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa e CD40L nos grupos DRC e controle.	61
Figura 10: Distribuição dos valores obtidos para a percentagens de plaquetas-monócitos (APM) e plaquetas-neutrófilos (APN) nos grupos DRC e Controle.	62
Figura 11: Distribuição dos valores de sE-selectina (ng/mL), VEGF (pg/mL), sICAM-1 (ng/mL) e sVCAM (ng/mL) para os grupos DRC e controle.	64
Figura 12: Distribuição dos valores de suPAR (pg/mL), ADAMTS13 (ng/mL), FVW (mU/mL) e relação FVW:ADAMTS13 para os grupos DRC e Controle... ..	66
Figura 13: Correlações (Spearman) entre os marcadores de expressão plaquetária, FVW, ADAMTS13 e RFG.	69
Figura 14: Correlações (Spearman) entre os marcadores de ativação endotelial, FVW, ADAMTS13 e RFG.	69
Figura 15: Curva ROC e boxplots de probabilidade estimada de DRC do modelo de regressão logística com biomarcadores de ativação plaquetária (GPIIIa, CD40L, e P-selectina) e RFG.....	71
Figura 16: Curva ROC e boxplots de probabilidade estimada de DRC do modelo de regressão logística com biomarcadores de ativação endotelial (suPAR e FVW) e RFG.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT₁: receptor de angiotensina tipo 1

ADAMTS13: *Desintegrin-like and Metalloprotease Thrombospondin Type 1 Motif, Member 13*

AGM: alterações glomerulares mínimas

AMP cíclico: adenosina monofosfato cíclico

APL: agregados plaquetas-leucócitos

APM: agregados plaquetas-monócitos

APN: agregados plaquetas-neutrófilos

BRA: bloqueador do receptor de angiotensina II

CAKUT: anomalias congênitas dos rins e do trato renal e urinário

CCL2: quimiocina anteriormente denominada MCP-1

CD14: *cluster differentiation* 14, presente em monócitos

CD154: nomenclatura análoga de CD40L

CD16: *cluster differentiation* 16, presente em neutrófilos

CD40: *cluster differentiation* 40 ou grupo de diferenciação 40

CD40L: *cluster differentiation* 40 ligante

CD41a: glicoproteína GPIIbIIIa plaquetária

CD61: glicoproteína GPIIIa plaquetária

CD62P: P-selectina

COX: cicloxigenase

CXCL8: quimiocina anteriormente denominada Interleucina-8/ IL-8

D-Di: dímero D

DRC: doença renal crônica

DRCT: doença renal crônica em estágio terminal

Fator II: protrombina

Fator IIa: trombina

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

FT: fator tecidual

FVW: fator de von Willebrand

GESF: glomerulosclerose focal e segmentar

GNIgA: glomerulonefrite por depósitos mesangiais de IgA

GNMI: glomerulonefrite membranosa idiopática

GNMP: glomerulonefrite membranoproliferativa
GPIb: glicoproteína Ib das plaquetas
GPIIb/IIIa: glicoproteína IIb/IIIa das plaquetas
IAM: Infarto agudo do miocárdio
IECA: enzima conversora de angiotensina
IL: Interleucina
IL-8: Interleucina-8, quimiocina cuja nomenclatura atual é CXCL8
iNOS: NO-sintase induzível
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1, cuja nomenclatura atual é CCL2
MDRD: Modification of Diet in Renal Disease
mRNA: ácido desoxirribonucléico mensageiro
MS: Ministério da Saúde/ Brasil
NFκB (ou NF kappa B): fator transcricional nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio
PAR: receptor de protease ativado
PCa: proteína C ativada
PCR: proteína C-reativa
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2: prostaciclina
PMIC: pacientes por milhão em idade compatível
PS: proteína S, cofator da Proteína C
PSGL-1: receptor glicoproteína ligante-1 da P-selectina
sCD40L: forma solúvel do CD40L
SN: síndrome nefrótica
SNLM: síndrome nefrótica de lesões mínimas
SRA: sistema renina-angiotensina
sE-selectina: E-selectina solúvel
sICAM-1: molécula de adesão intercelular solúvel
suPAR: receptor de uPA solúvel
sVCAM-1: molécula de adesão celular-vascular 1 solúvel
TAFI: Inibidor da Fibrinólise Ativável por Trombina
RFG: ritmo ou taxa de filtração glomerular
TFPI: Inibidor da via do fator tecidual

TGF- β : fator transformador de crescimento beta-1

TM: trombomodulina

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

t-PA: ativador tecidual do plasminogênio

TSP: trombospondina

TTP: púrpura trombocitopênica trombótica

UL-FVW: *ultra large* von Willebrand (multímeros “ultra grandes” do FVW)

uPA: ativador do plasminogênio tipo uroquinase

uPAR: receptor de uPA

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Doença renal crônica	10
2.2 DRC na infância	12
2.2.1 Diagnóstico da DRC na infância	16
2.2.2 Etiologia da DRC na infância	17
2.3 Progressão e manejo da DRC na infância	19
2.4 Doença renal, hemostasia e inflamação	23
2.4.1 Hemostasia - Considerações gerais	23
2.4.2 Hemostasia e doença renal	25
2.4.3 Inter-relação entre hemostasia e inflamação na doença renal	27
2.5 Marcadores de ativação plaquetária e endotelial	31
2.5.1 E-selectina (CD62E) e P-selectina (CD62P)	31
2.5.2 Agregados plaquetas-leucócitos, GPIIb/IIIa (CD41a e CD61) e CD40L (CD154)	32
2.5.3 Molécula de adesão celular-vascular 1 (VCAM-1) e Molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1)	33
2.5.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	34
2.5.5 Receptor de uPA (uPAR) e sua forma solúvel (suPAR)	35
2.5.6 ADAMTS13 e Fator de von Willebrand	38
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
4.1 Casuística	43
4.1.1 Aspectos Éticos	43
4.1.2 Seleção dos participantes do estudo	43
4.1.3 Critérios de exclusão dos participantes grupo-controle	45
4.2 Amostra biológica	46
4.3 Métodos	47
4.3.1 Delineamento experimental	47

4.3.2	Protocolo de estudo da expressão de componentes plaquetários....	48
4.3.3	Protocolo de estudo dos agregados plaquetas-leucócitos.....	51
4.3.4	Determinação dos níveis plasmáticos de sE-Selectina.....	54
4.3.5	Determinação dos níveis plasmáticos de VEGF	55
4.3.6	Determinação dos níveis plasmáticos de sICAM-1.....	55
4.3.7	Determinação dos níveis de plasmáticos de sVCAM-1	55
4.3.8	Determinação dos níveis plasmáticos de suPAR	56
4.3.9	Determinações dos níveis plasmáticos de ADAMTS13	56
4.3.10	Determinação dos níveis plasmáticos de FVW	56
4.3.11	Hemograma completo e dosagem de creatinina dos participantes do grupo-controle.....	57
4.4	Análise estatística	57
5	RESULTADOS	58
5.1	Características clínicas da população estudada	58
5.2	Avaliação dos parâmetros laboratoriais	59
5.3	Avaliação dos biomarcadores de ativação plaquetária P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa, CD40L, agregados plaquetas-leucócitos (APM e APN)...	60
5.4	Avaliação dos biomarcadores de ativação endotelial.....	62
5.4.1	sE-selectina, sVEGF, sVCAM-1 e sICAM-1.....	62
5.4.2	suPAR, FVW e ADAMTS13.....	65
5.5	Comparação dos biomarcadores em relação ao uso dos medicamentos antagonistas do sistema renina-angiotensina (SRA)	67
5.6	Análises de Correlação	68
5.7	Análises de Regressão Logística.....	70
6	DISCUSSÃO	73
6.1	Características clínico-laboratoriais dos pacientes pediátricos com DRC73	
6.2	Avaliação dos biomarcadores de ativação plaquetária P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa e CD40L.....	78
6.3	Avaliação da formação de agregados plaquetas-monócitos (APM) e plaquetas-neutrófilos (APN)	81
6.4	Avaliação dos biomarcadores de ativação endotelial.....	82
6.4.1	sE-selectina, VEGF, sVCAM-1 e sICAM-1	82
6.4.2	Receptor solúvel de uPA (suPAR).....	85
6.4.3	Fator de von Willebrand e ADAMST13	86

6.5 Avaliação do uso dos medicamentos antagonistas do sistema renina-angiotensina (SRA)	88
6.6 Correlações entre os biomarcadores avaliados	89
6.7 Análise dos modelos de regressão logística	90
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
8 CONCLUSÃO.....	92
9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	93
10 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXO 1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG....	112
ANEXO 2 ANUÊNCIA DO DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA PEDIÁTRICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG.....	113
APÊNDICE 1 TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ..	114
APÊNDICE 2 FICHA CLÍNICA	122
APÊNDICE 3 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES PLAQUETÁRIOS E ENDOTELIAIS.....	125

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A doença renal crônica (DRC) é definida por anormalidades estruturais e funcionais dos rins em período maior que três meses, com implicações para a saúde do paciente. A classificação de risco da DRC é baseada na causa, no grau de redução da taxa de filtração glomerular (RFG) e no grau da albuminúria. Quando o RFG é reduzido para menos de 15mL/min/1,73m², caracteriza-se a falência renal, sendo necessária a realização de terapia de substituição renal para a manutenção da vida ¹.

Nos adultos, o diabetes melitus e a hipertensão arterial são as principais causas de DRC. Na população pediátrica, as principais causas são as anomalias congênitas dos rins e do trato renal e urinário (*CAKUT*), seguidas pelas glomerulopatias e nefropatias hereditárias². Dentre as glomerulopatias, destaca-se a glomerulosclerose focal e segmentar (GESF). Os registros e informações acerca da DRC na população pediátrica ainda são limitados, sendo que os dados epidemiológicos, em geral, referem-se aos estágios mais avançados da doença, quando as crianças já estão em diálise ou após o transplante ^{3; 4}.

A DRC na infância possui uma baixa prevalência, quando comparada à população adulta. No entanto, tem grande relevância devido à elevada mortalidade e morbidade, principalmente por complicações cardiovasculares associadas ao estágio final da doença. As crianças e adolescentes com DRC vivenciam alterações emocionais, físicas e sociais, que comprometem a qualidade de vida das mesmas. As medidas precoces de prevenção da DRC tornam-se necessárias visando retardar a sua progressão e reduzir a morbidade e a mortalidade das crianças. O conhecimento da fisiopatologia da DRC, de suas complicações clínicas associadas e dos mecanismos de progressão, bem como a definição de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da doença renal são importantes para o diagnóstico precoce, predição do prognóstico e auxílio no aconselhamento das crianças e suas famílias ⁵.

O presente estudo incluiu pacientes pediátricos (menores de 18 anos de idade) com DRC, em tratamento conservador pré-dialítico, acompanhadas na Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG. Cumpre ressaltar que essa Unidade tem caráter interdisciplinar e constitui um serviço de referência em Nefrologia Pediátrica, no qual as crianças e adolescentes têm acesso ao atendimento por nefrologistas, enfermeiros, nutricionistas, psicólogos, assistentes sociais e terapeutas

ocupacionais. O objetivo principal desse serviço é monitorar as alterações clínicas e psicossociais associadas à DRC e instituir a terapia adequada, visando preservar a função renal e retardar o período de início da diálise e, dessa forma, reduzir a morbidade associada à doença ^{6; 7; 8}.

Sabe-se que a DRC está associada a episódios hemorrágicos ou a eventos trombóticos venosos e arteriais, que podem estar relacionados à ativação plaquetária e das proteínas da coagulação, redução da atividade dos anticoagulantes naturais, comprometimento da fibrinólise, dentre outras causas ⁹. Além disso, a exacerbação da resposta inflamatória tem sido observada nas crianças e adolescentes com DRC ¹⁰.

As células endoteliais são importantes na composição da estrutura glomerular e são essenciais para a manutenção adequada do processo de filtração ¹¹. Em condições fisiológicas, o endotélio intacto expressa moléculas que inibem o processo hemostático e inflamatório. No entanto, em condições patológicas, as células endoteliais interagem com outras estruturas, favorecendo a expressão e secreção de diversas moléculas que ativam a coagulação, atraem células inflamatórias para o local, resultando em lesão vascular e destruição tecidual. É evidente o envolvimento do endotélio, plaquetas e leucócitos, tanto na hemostasia como nos processos inflamatórios ¹².

As plaquetas, além do papel essencial que desempenham na manutenção da hemostasia, também têm uma participação importante no processo inflamatório. As citocinas e fatores de crescimento liberados pelas plaquetas induzem a atração de células inflamatórias. A expressão de receptores plaquetários promove a interação das plaquetas com o endotélio e com os leucócitos. Essas interações promovem a ativação das células endoteliais com liberação e expressão de mais citocinas e outras moléculas de adesão ^{12; 13}.

Está bem estabelecido que o fator de von Willebrand (FVW), sintetizado pelas células endoteliais, é essencial ao processo de adesão plaquetária. Sabe-se que a redução dos níveis de ADAMTS13, a enzima responsável pela clivagem do FVW, resulta na elevação nos níveis de grandes multímeros de FVW (UL-FVW), predispondo ao processo trombótico, principalmente em condições de *shear stress*, como na microcirculação renal. Dessa forma, o comprometimento da clivagem dos UL-FVW contribui para a progressão da DRC. A síntese da ADAMTS13 ocorre

principalmente no fígado e, recentemente, a síntese endotelial, plaquetária e renal foi demonstrada¹⁴.

O presente estudo teve por objetivo caracterizar o estado de ativação endotelial e plaquetária em pacientes pediátricos com DRC pré-dialítica, comparando-os com crianças e adolescentes saudáveis pareados por idade e sexo.

As principais motivações para a realização do presente estudo foram a escassez de investigações das alterações associadas à DRC em pacientes pediátricos, principalmente em estágios pré-dialíticos, e a detecção, em estudos anteriores, de um fenótipo pró-inflamatório nessa população atendida na Unidade de Nefrologia Pediátrica¹⁵. A maioria dos estudos de alterações hemostáticas na DRC são realizados em pacientes adultos e quando esses já se encontram em diálise, mas são poucos os realizados em pacientes em fases precoces da doença. Sabe-se que a diálise, por si só, predispõe a alterações hemostáticas. Sabendo da relação da resposta inflamatória com a hemostasia e da importância da resposta inflamatória na indução de fibrose tecidual na DRC, os resultados desse estudo permitirão o entendimento dos distúrbios hemostáticos na população pediátrica com DRC, o que poderá subsidiar condutas terapêuticas que visem retardar a progressão da lesão renal.

Considerando a relevância das alterações hemostáticas nas crianças e adolescentes com DRC, uma vez que essas alterações podem impactar não somente na piora da função renal, como também em alterações clínicas quando esses atingirem a fase adulta, a necessidade de definir o risco cardiovascular e o grau de proteção endotelial a longo prazo, conferido pelos antagonistas do sistema renina-angiotensina, e a escassez de estudos na população pediátrica, o presente estudo reveste-se de grande importância.

Admite-se que quanto mais precoces forem o diagnóstico e o tratamento das doenças renais e de suas morbidades, maiores serão as chances de preservação da função renal. Nos pacientes adultos com DRC, as alterações hemostáticas descritas, associadas à relevante morbidade e mortalidade inerentes à doença, podem se confundir com outros fatores que predispoem ao risco aterosclerótico. Como os pacientes pediátricos ainda não possuem muitos desses fatores, é imperativo avaliar precocemente o risco cardiovascular, e que estaria associado principalmente à doença renal.

Acredita-se que o presente estudo servirá como base para estudos longitudinais, avaliando os marcadores que se mostraram promissores, associados a marcadores de risco cardiovascular para se determinar o momento em que as alterações hemostáticas têm início e qual a importância do risco cardiovascular a partir dessas alterações. As evidências da disfunção plaquetária e endotelial, que são os eventos primários na ativação dos mecanismos da coagulação, poderão contribuir para o monitorar e tratar a doença renal e retardar a perda da função dos rins, melhorando indiscutivelmente a qualidade de vida das crianças e adolescentes com DRC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) é definida como anormalidades estruturais e funcionais dos rins em período maior que três meses, com implicações para a saúde do paciente ¹.

A avaliação laboratorial da função renal tenta estimar o ritmo ou taxa de filtração glomerular (RFG), definida como o volume plasmático de uma substância que pode ser completamente filtrada pelos rins em uma determinada unidade de tempo. O RFG é uma das mais importantes ferramentas na análise da função renal, sendo também um indicador do número de néfrons funcionais ¹⁶.

Duas equações matemáticas são utilizadas para estimar o RFG em adultos a partir da dosagem sérica da creatinina, que consideram variáveis demográficas como idade, gênero, etnia e área corporal. A equação de Cockcroft-Gault consiste na seguinte fórmula ¹⁷:

$$\text{Depuração de creatinina (mL/min)} = \frac{140 - \text{idade (anos)} \times \text{peso (Kg)}}{72 \times \text{Creatinina sérica}} \times 0,85 \text{ se mulher}$$

Na equação abreviada do estudo *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) a fórmula é ¹⁸:

$$\text{RFG (mL/min/1,73m}^2\text{)} = 186 \times \text{Creatinina sérica} \times (\text{idade})^{-0,203} \times (0,742 \text{ se mulher}) \times (1,210 \text{ se indivíduo afro-americano})$$

Em crianças e adultos, a faixa de referência do ritmo de filtração glomerular (RFG) é superior a 90mL/min/1,79m². Uma redução no RFG para valores menores ou iguais a 60mL/min/1,79m² caracterizam a DRC ¹⁹. Sua classificação de risco é baseada na causa, no grau de redução do RFG e no grau da albuminúria ¹.

A função renal na DRC piora progressivamente, e quando o RFG reduz para menos de 15mL/min/1,73m² se caracteriza o *estágio final de doença renal* (DRCT) ou falência renal, tornando necessárias as terapêuticas de substituição renal para manutenção da vida ^{20; 21}.

Considerando o papel central do RFG na fisiopatologia das complicações, a DRC é classificada em cinco estágios, com base no RFG¹, como definido no Quadro 1 abaixo:

Quadro 1- Estágio da DRC, descrição e valores do RFG*.

Estágio da DRC	Descrição	RFG (mL/min/1,73m ²)
1	RFG normal ou aumentado	Superior a 90
2	Lesão renal com RFG levemente reduzido	60-89
3a	Lesão renal com RFG leve a moderadamente reduzido	45-59
3b	Lesão renal com RFG moderado a intensamente reduzido	30-44
4	Lesão renal com RFG intensamente reduzido	15-29
5	Falência renal	Inferior 15

*RFG: ritmo de filtração glomerular. Fonte: KDIGO, 2013¹.

O número de pacientes adultos com DRC vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, principalmente devido ao envelhecimento da população e à ocorrência frequente de doenças como *Diabetes mellitus* tipo 2. Nos adultos, a diabetes e a hipertensão arterial são as principais causas de DRC ².

A DRC é considerada o principal problema de saúde pública em todo o mundo e há grande possibilidade de alcançar proporções epidêmicas nos próximos anos ². No Brasil, a Sociedade Brasileira de Nefrologia estimou que 100.397 pacientes estavam em diálise em 2013. A prevalência de pacientes em diálise, que no ano de 1994 era de 155 pacientes por milhão (pmp) de habitantes, em 2013 foi de 499pmp, e foram 34.161 novos casos no ano ²².

O declínio irreversível da função renal é causado por uma reação fibrótica nos rins que destrói o interstício e gradualmente substitui os néfrons funcionais por tecido cicatricial. Esse tecido é composto por uma variedade de proteínas da matriz extracelular que se acumulam excessivamente pela deposição de fibrina. A fibrose nos órgãos constitui o estágio final de várias doenças e é um processo comum da DRC em estágio final, o que leva a glomerulosclerose e fibrose tubulointersticial. Muitos tipos de proteases que degradam os componentes da matriz extracelular estão envolvidos no desenvolvimento da fibrose renal ^{23; 21}. Em um estudo de glomérulos em ratos idosos, foi detectado um processo inflamatório, procoagulante e fibrótico

induzido pelo fator transcricional NF kappa B (NFkB), semelhante ao que é observado na aterosclerose. Houve um aumento da expressão gênica de moléculas de adesão, citocinas quimiotáticas, metaloproteinases de matriz e ativação do TGF- β (envolvida em processos fibróticos) pelas células endoteliais e epiteliais dos glomérulos e pelos macrófagos teciduais ²⁴.

2.2 DRC na infância

Apesar dos mecanismos fisiopatológicos da DRC serem os mesmos do adulto, na infância essa doença apresenta características clínicas que são específicas e totalmente peculiares, tais como o impacto da doença sobre o crescimento, decorrentes de desordens minerais e ósseas por comprometimento no metabolismo da vitamina D, cálcio, fósforo e outros minerais, níveis de paratormônio e alterações no hormônio do crescimento ³. Outros achados clínicos característicos da DRC pediátrica ou em adultos são a anemia, a hipertensão e o risco de doenças cardiovasculares elevado. As crianças também apresentam fraqueza muscular, redução da capacidade respiratória com dificuldade na realização de atividades físicas e estão vulneráveis aos impactos psicossociais, que comprometem a qualidade de vida desses pacientes, bem como de seus familiares ^{3; 25; 26}.

A etiologia da DRC ou as complicações cardiovasculares subsequentes influenciam não apenas na saúde do paciente durante a infância, mas têm ter um impacto sobre a vida adulta futura dessas crianças. Este impacto muitas vezes não é reconhecido, mas não deve ser negligenciado ³. Na Figura 1 estão representadas algumas manifestações clínicas da DRC na infância e o consequente comprometimento no paciente quando em idade adulta.

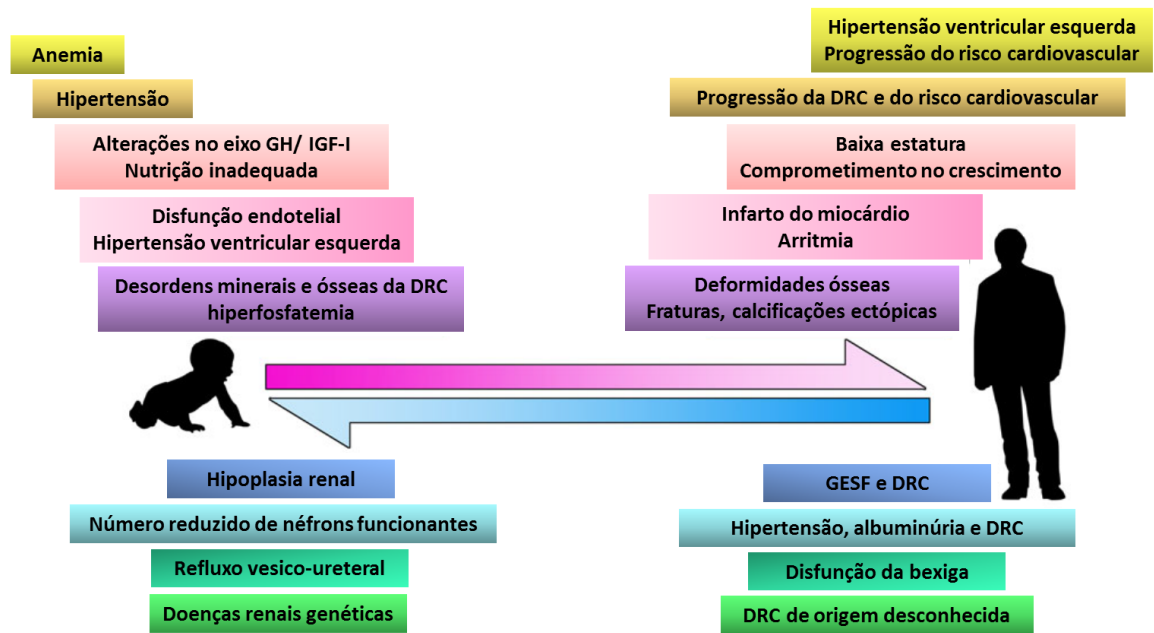


Figura 1: Complicações clínicas da DRC: uma dupla perspectiva.

A parte superior da figura mostra a correspondência entre as características clínicas e as complicações da DRC com início na infância (esquerda, superior) e as consequências relacionadas à vida adulta (direita, superior). A parte inferior mostra os achados da DRC em um adulto (direita e inferior) que encontram explicação nas anormalidades estruturais e funcionais renais que já existiam durante a infância (esquerda, inferior), mas que podem ter sido perdidas ou subdiagnosticadas por serem clinicamente silenciosas. DRC: doença renal crônica; GH-IGF-I: eixo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina; GESF, glomeruloesclerose focal segmentar. **FONTE:** Traduzido de Becherucci et al., 2016³.

A expectativa de vida de pacientes com doença renal crônica terminal (DRCT) até os 14 anos de idade é de aproximadamente 30 anos²⁷, sendo a taxa de sobrevivência aproximadamente 30 vezes menor do que em crianças saudáveis. Dessa forma, diversas estratégias são necessárias para preservar a função renal e reduzir a morbidade associada às doenças cardiovasculares^{28; 29}. A relevância da DRC na infância é grande principalmente pela mortalidade e morbidade cardiovasculares associadas ao estágio final dessa doença².

De modo geral, a prevalência da DRC na população pediátrica é menor que na população adulta¹². Porém, os registros e informações acerca da DRC em pacientes pediátricos vêm se elevando apenas nos últimos anos, mas os dados epidemiológicos atualmente disponíveis sobre a prevalência e a incidência são limitados, pouco precisos e falhos em razão das diferenças metodológicas entre as várias fontes^{12;3}. Em geral, esses dados se concentram em estágios mais avançados da doença, quando as crianças já estão em diálise ou após transplante^{2; 4}. A escassez de informação é atribuída ao não reconhecimento da doença, muitas vezes silenciosa, e à subnotificação dos casos diagnosticados³⁰. A comparação entre os estudos

epidemiológicos de DRC na população pediátrica, realizados em diferentes regiões geográficas, também é complicada devido às diferenças metodológicas na definição de casos e na classificação da doença ^{3; 31}.

Grande parte das crianças com alteração da função renal, particularmente quando decorrente de anomalias congênitas dos rins e do trato renal e urinário, alcança o estágio de DRCT acima da idade pediátrica, não sendo, portanto, incluídas nesses registros que, em consequência, fornecem informações incompletas ²⁵. O fato de muitas crianças nos estágios iniciais da DRC serem assintomáticas também contribui para a falta de informações sobre a prevalência a doença ¹². Entretanto, o conhecimento mais profundo dessa população de pacientes é de importância fundamental, uma vez que estágios menos avançados de lesão renal são potencialmente mais susceptíveis a intervenções terapêuticas que possam modificar o curso da doença e evitar que evolua para o estágio terminal ²⁵.

Nos Estados Unidos, a prevalência de DRCT na infância em 2007 foi estimada em 84,6 pacientes por milhão de população com idade compatível (pmpic)³². Na Europa, dados do *European Registry for Children on Renal Replacement Therapy* revelaram uma incidência de 11-12 de pmpic com DRC em estágios 3 a 5, e uma prevalência aproximada de 50 pmpic ^{33; 34}. De acordo com um registro populacional prospectivo conduzido na Itália, o *ItaKid Project*, a incidência média de DRC pré-terminal (definida como depuração de creatinina $<75\text{mL/min/1,73m}^2$) entre 1995 e 2000, foi de 12,1 casos/ano/1 milhão de pessoas, com prevalência pontual em 1° de janeiro de 2001 de 74,7 por milhão de população com idade compatível em crianças e adolescentes menores de 20 anos ³¹. Um levantamento epidemiológico realizado na França, entre 1975 e 1990, revelou que a taxa de incidência de DRC em estágios 3 e 4 foi estimada em 7,5 casos/ 1 milhão de pessoas, com idade compatível em crianças com menos de 16 anos. A prevalência de DRCT variou de 29,4 e 54 por milhão nessa população com idade compatível ³⁵.

No Brasil, os dados sobre DRC na infância são escassos, e a incidência exata é desconhecida, sendo a maioria dos dados disponíveis provenientes de crianças já em diálise ^{36; 37}. Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia, dos 34.161 novos casos de diálise no ano de 2012 a 2013, 0,4% tinham 1 a 12 anos de idade e 5,6% 13 a 18 anos. Os pacientes de 19 a 64 anos, de 65 a 80 anos, e com mais de 80 anos de idade somaram, respectivamente, 62,6%, 26,7% e 4,7% ²². Um estudo realizado em São Paulo com crianças com DRCT encontrou uma prevalência de 23,4 casos pmpic

no ano de 2008 ³⁷. Em 2015, Konstantyner *et al.* ³⁶ encontraram um total de 1.283 pacientes pediátricos em tratamento de diálise crônica no Brasil, resultando em uma prevalência de 20 casos pmic e uma incidência de 6,6 casos pmic em 2012 ³⁶. As possíveis explicações para a menor prevalência no Brasil em comparação com outros países incluem a mortalidade de pacientes em DRCT, que pode ser maior em nosso meio ou a subnotificação de casos da doença ^{36; 37}.

Becherucci *et al.*³ publicaram um estudo de revisão no qual incluíram dados epidemiológicos mundiais da DRC em crianças, porém os dados da população do Brasil não foram considerados. A Figura 2 representa as prevalências mundiais definidas por Becherucci *et al.*³, porém com o acréscimo dos dados para população pediátrica brasileira, obtidos no estudo de Konstantyner *et al.* ³⁶.

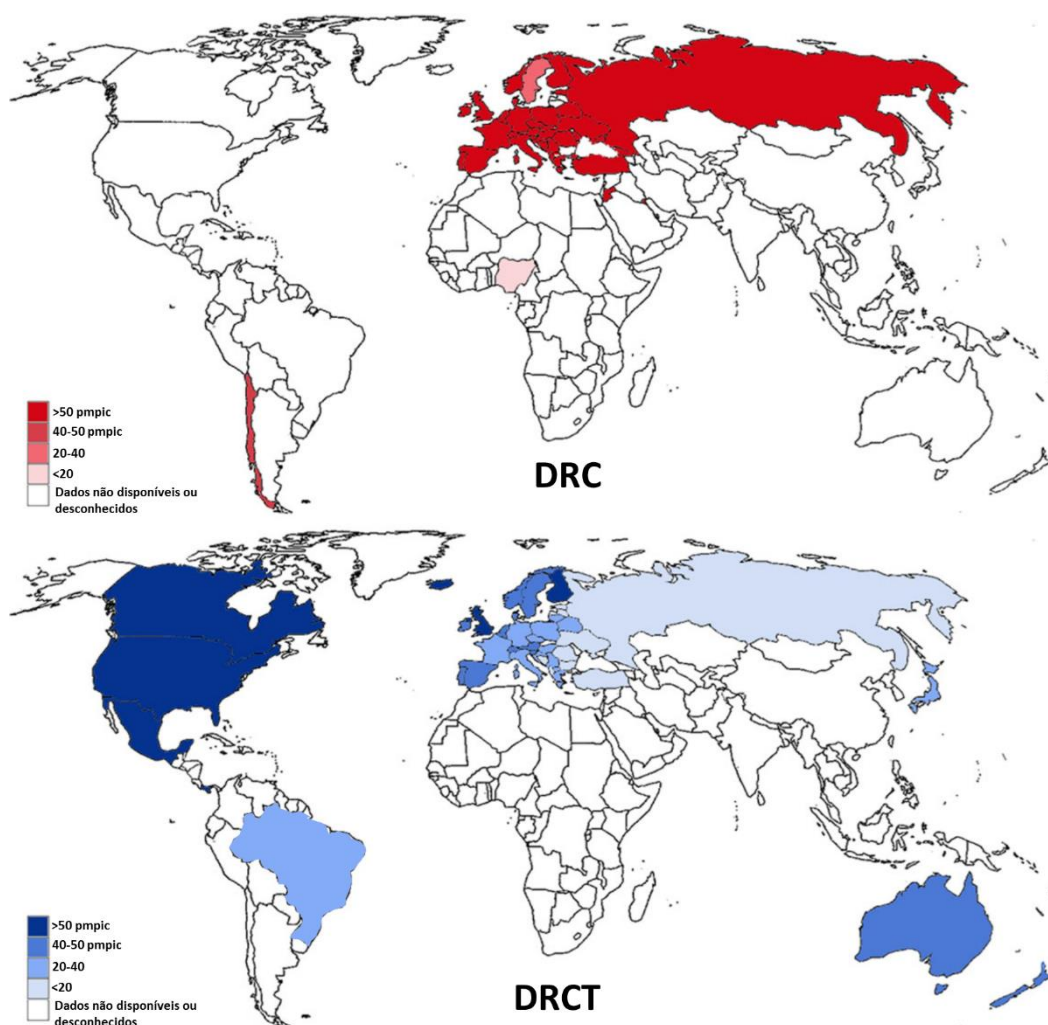


Figura 2: Prevalência estimada de DRC e doença renal terminal (DRCT) em crianças em todo o mundo.

Pmic: pacientes por milhão de pessoas em idade compatível. *DRCT:* insuficiência renal terminal. **Fonte:** traduzido e modificado de Becherucci *et al.*³; Konstantyner *et al.* ³⁶.

2.2.1 Diagnóstico da DRC na infância

O diagnóstico da DRC na infância por meio do RFG, bem como a classificação da doença renal nos estágios iniciais são complexos, principalmente pela dificuldade de se determinar com acurácia o RFG em crianças menores de dois anos de idade (pela dificuldade da coleta de urina de 24 horas para determinar a depuração de creatinina). Em recém-nascidos com anormalidades estruturais, o critério diagnóstico que inclui a confirmação após três meses da suspeita inicial também não é válido. No entanto, o diagnóstico da DRC é essencial para a prevenção primária, detecção e tratamento precoces, visando evitar a evolução para o estágio final da doença ^{4; 38}.

Como a coleta da urina de 24 horas é um fator limitante, pode ser feita uma estimativa do RFG por meio de cálculos matemáticos que relacionam a estatura ou altura em centímetros da criança com o valor da creatinina sérica. Diversas fórmulas foram propostas para estimar o RFG e são baseadas na relação entre a creatinina plasmática (corrigida para sexo, massa corporal, etnia e/ou idade) e o RFG ³⁹.

Uma das fórmulas mais empregadas na população pediátrica, recomendada pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, é a fórmula de Schwartz modificada: $RFG = (k \times h) / CCr$, na qual o RFG é estimado em mililitros/minuto/1,73m², sendo que h corresponde à altura em centímetros, k é uma constante empírica e CCr é a concentração plasmática de creatinina em miligramas/decilitro. O valor da constante k depende da idade e do sexo e do método de determinação laboratorial da creatinina plasmática. Quando a creatinina é determinada pelo método colorimétrico de Jaffé são utilizados os seguintes valores para a constante K; 0,45 para recém-nascidos a termo até o primeiro ano de vida; 0,55 para crianças de ambos os sexos e adolescentes do sexo feminino e 0,7 para adolescentes do sexo masculino ^{40; 41}. No entanto, quando a creatinina é medida por espectrometria de massa (IDMS), recomenda-se para crianças acima de um ano de idade, independente do sexo, o uso do valor de 0,413 para a constante K, ou seja, utiliza-se a fórmula de Schwartz modificada ⁴².

Os valores de referência do RFG para crianças são distintos dos adultos e variam de acordo com a idade e o gênero ^{43; 44}, como representado no Quadro 2:

Quadro 2- Valores de referência da RFG para crianças.

Idade	RFG mL/min/1,73m ²
1 semana	41±15
2-8 semanas	66±25
>8 semanas	96±22
2-12 anos	133±27
13-21 anos (gênero masculino)	140±30
13-21 anos (gênero feminino)	126±22

Dados em média±desvio-padrão. Fonte: Hogg *et al.*⁴³

2.2.2 Etiologia da DRC na infância

A etiologia da DRC difere significativamente na população pediátrica em comparação aos adultos. Enquanto o diabetes e a hipertensão são os principais responsáveis pela ocorrência de DRC nos adultos, as causas congênitas respondem pelo maior percentual da doença nas crianças ^{2; 4}.

As principais causas de DRC na infância são as anormalidades congênitas dos rins e trato urinário (*Congenital Anomalies Kidney Urinary Tract* - CAKUT) ². Nos EUA, as CAKUT são responsáveis por 48% das DRC na infância, enquanto as nefropatias hereditárias respondem por 10% e as glomerulonefrites por 14%. Na Europa, a proporção de CAKUT é de aproximadamente 58% ⁴.

A prevalência varia no mundo de acordo com a etnia e as condições socioeconômicas. Nos países em desenvolvimento, incluindo América Latina, Índia, sudeste asiático, região do Caribe e África Subsaariana, as doenças glomerulares crônicas possuem prevalência entre 30 e 60%, e as glomerulonefrites secundárias a doenças infecciosas parasitárias, virais e bacterianas que afetam os rins são muito comuns ².

Na América Latina, a *Latin American Pediatric Nephrotic Association* (ALANEPE) coletou dados de transplante renal no Brasil, Argentina, Chile, Venezuela, México, Cuba, Colômbia, Costa Rica, Nicarágua, Equador, Guatemala, Honduras, Paraguai, Peru e foi observado que 1458 pacientes menores de 21 anos e portadores de DRCT receberam transplante renal no período de 2004 a 2008 (30). A etiologia e o respectivo percentual dos casos que resultaram no transplante renal foram uropatia/nefropatia de refluxo (27%), doenças glomerulares (24%), sendo glomeruloesclerose

focal e segmentar 12%, hipoplasia/displasia (11%), causa congênita/hereditária (5%), doenças vasculares (5%) e etiologia desconhecida (19%). Considerando todas as faixas etárias, as CAKUT constituíram a maior proporção de diagnóstico etiológico da DRC. Esses dados mostraram que as doenças glomerulares como causa de DRC aumentaram com a idade dos pacientes e as causas desconhecidas predominaram em crianças mais jovens. O diagnóstico de defeitos estruturais, tais como uropatia obstrutiva, nefropatia de refluxo e hipoplasia/displasia, representou a maior proporção (38%) de causas primárias de DRC entre as crianças com menos de cinco anos ⁴⁵.

No Brasil, um estudo conduzido em São Paulo revelou que as CAKUT responderam por 24,9% dos casos de DRC na infância, glomerulonefrites (exceto GESF) por 18,9% e a glomerulosclerose focal e segmentar (GESF) por 10% ³⁷. Cerqueira *et al.* ⁷ verificaram em crianças portadoras de DRC pré-dialítica que a principal etiologia da doença foram as CAKUT (59.9%), seguidas da GESF (10%).

Outro estudo, realizado em Ribeirão Preto/ SP, avaliou prontuários de crianças com DRC e revelou que 58,7% eram do sexo masculino. A média de idade de entrada foi 59,1 meses e os pacientes menores que 5 anos somaram 62,5% do total. As causas básicas de DRC foram uropatias (48,8%), glomerulopatias (20,7%), displasias renais congênitas ou policísticas (7,4%), vasculopatias (6,6%), tubulopatias (2,5%), outras causas (7,4%) e causa indeterminada (6,6%). Das glomerulopatias, os tipos histológicos encontrados foram a GESF (25,0%), a proliferação mesangial difusa (20,8%), a glomerulonefrite avançada (12,5%), a glomerulonefrite crescêntica (8,3%) e a Síndrome de Alport (8,3%), sendo que 4,2% dos casos foram considerados indeterminados e 20,8% dos pacientes não foram submetidos à biópsia ⁴⁶.

Dados brasileiros mais recentes incluindo crianças com DRCT em diálise, também detectaram maior prevalência de CAKUT como diagnóstico primário. A Figura 3 demonstra as prevalências encontradas nesse estudo ³⁶.

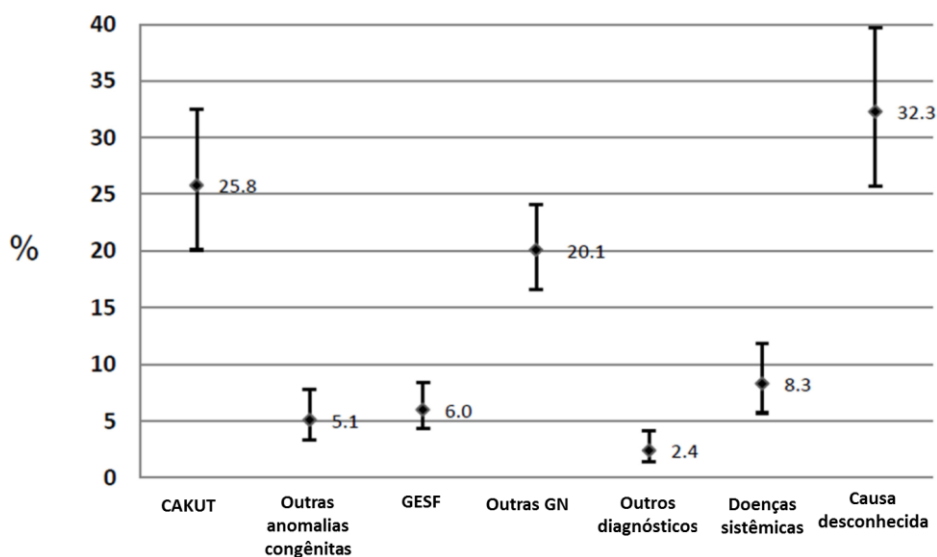


Figura 3: Prevalência de diagnóstico primário em pacientes abaixo de 19 anos de idade com DRC e submetidos à diálise crônica ambulatorial no Brasil em 2012.

CAKUT: Anomalias congênitas do rim e do trato renal e urinário; GESF: glomeruloesclerose focal e segmentar; GN: A glomerulonefrites. **Fonte:** traduzido de Konstantyner, 2015³⁶.

As diferenças nos relatos de casos de DRC pediátrica entre as diversas regiões geográficas podem ser atribuídas, pelo menos em parte, a características ambientais, genéticas e culturais distintas, como, por exemplo, a frequência de casamentos consanguíneos⁴. As causas de DRC variam ainda com a idade, havendo predomínio de causas estruturais em pacientes mais jovens, enquanto doenças glomerulares são mais expressivas em crianças maiores de 12 anos². Entre as causas glomerulares individuais, a GESF aparece em vários estudos como causa importante de DRC^{2; 31; 45}.

2.3 Progressão e manejo da DRC na infância

O tratamento geral de doenças glomerulares como a síndrome nefrótica (SN) é clínico e consiste na restrição de sal e uso de diuréticos (para reverter o edema), de inibidores da enzima conversora de angiotensina (para reduzir a proteinúria), uso de estatinas (para controle da hiperlipidemia) e anticoagulação nos casos de tromboembolismo, aliado à dieta com conteúdo controlado de proteínas⁴⁷.

O tratamento específico é indicado para evitar a perda progressiva da função renal, sendo administrados imunossupressores como a prednisona, com avaliação

periódica da proteinúria e de outros parâmetros clínicos. A conduta depende do tipo histológico de SN, definido a partir da biópsia renal, e também da resposta aos corticosteroides. O paciente tratado pode ter remissão completa da SN (desaparecimento de todos os sintomas), parcial (proteinúria entre 0,3-3,5g/1,73m², com queda maior ou igual a 50%, atingindo valores sub-nefróticos), recidiva (novo surto nefrótico após resposta parcial), resistência a esses medicamentos (persistência da SN, mesmo após 6 meses de tratamento), ou ser dependente do corticosteroide (recidiva com a redução da dose ou retirada do medicamento). Se não houver redução significativa na proteinúria, a ciclosporina ou o micofenolato mofetil podem ser adicionados ao esquema terapêutico ^{47; 48}.

O sistema renina-angiotensina (SRA) está envolvido na patogênese da lesão renal e cardiovascular, e tem sido o alvo terapêutico preferido para a proteção renal⁴⁹. Os medicamentos inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da angiotensina (BRA) são amplamente usados para bloquear o SRA ⁵⁰. A terapia de longo prazo com IECA resulta em aumento significativo da sobrevida de pacientes com doenças cardiovasculares ateroscleróticas. Acredita-se que esses medicamentos proporcionam uma proteção adicional ao inibir a angiotensina II, sintetizada localmente ao nível do receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) ⁵¹.

Os medicamentos antagonistas do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) reduzem a lesão do endotélio vascular glomerular, e são utilizados na DRC não só para a hipertensão, mas também na redução da proteinúria e para retardar a insuficiência renal ^{52; 53}.

A monoterapia com IECA ou BRA na doença renal, juntamente com o controle da pressão arterial constitui o principal tratamento para retardar a progressão para DRCT ⁴⁹. Em pacientes com diabetes e doença renal, IECA e BRA previnem o desenvolvimento de DRCT ⁵⁰. A combinação de uma das drogas com um antagonista do receptor de aldosterona promove redução da albuminúria e possivelmente melhora o desfecho renal, embora tenha risco aumentado de efeitos secundários potencialmente graves. Além disso, a terapia de combinação não é capaz de fornecer proteção cardiovascular adicional, e deve ser limitada a pacientes selecionados com proteinúria residuais e de risco renal alto ⁴⁹.

A progressão dos estágios iniciais de DRC é bastante variável e imprevisível. Pode estar associada à doença subjacente, gravidade da lesão inicial e presença de

fatores de risco adicionais ². Por exemplo, em relação à síndrome nefrótica primária, os pacientes que respondem à terapia padrão com corticosteroides têm bom prognóstico em longo prazo, e raramente evoluem para DRCT ^{54; 55}. Por outro lado, os pacientes que não respondem aos corticosteroides podem ter uma série de complicações clínicas.

As complicações tromboembólicas são frequentes e decorrem de alteração das proteínas da coagulação, fibrinólise e plaquetas. O risco de trombooses venosas e arteriais em crianças é menor que em adultos, mas ocorrem em 1,8 a 5% dos casos. Esses pacientes podem desenvolver doença renal crônica e permanecer em estado nefrótico por meses a anos. Na infância, as infecções são importantes, devido à perda de imunoglobulinas, complemento e alteração na função de linfócitos T, pelo uso de imunossupressores. Outras complicações são hiperlipidemia, desnutrição, insuficiência renal crônica, decorrente do desenvolvimento da glomerulonefrite, distúrbios hidroeletrólíticos e endócrinos, hipertensão e anemia ^{55; 56}.

A compreensão das causas de mortalidade e morbidade em crianças com DRC requer informações sobre os fatores de risco que levam aos resultados adversos ⁵⁷.

Crianças portadoras de anomalias renais congênitas sofrem progressão mais lenta para DRCT do que aquelas com doenças glomerulares e, por isso, verifica-se uma proporção menor de hipodisplasia e uropatias na população com DRCT, quando comparada a estágios iniciais de DRC ⁶. As doenças glomerulares primárias possuem associação independente com a progressão para DRCT, e o tempo médio de sobrevida renal é menor, comparado a outras doenças renais primárias ⁷. Pacientes com GESF têm um tempo médio de progressão mais rápido para DRCT do que outras etiologias ²⁷.

A puberdade e o início do período pós-púbere parecem ser críticos para os pacientes com comprometimento da função renal, independente do grau inicial de disfunção renal. A taxa de progressão da DRC pode se elevar nesse período da vida do paciente, havendo queda acentuada na sobrevida dos rins ³¹. As causas incluem elevação da pressão arterial com desequilíbrio entre a massa renal residual, maiores necessidades de filtração durante as modificações rápidas no tamanho corporal, e alterações na fisiologia endócrina ^{2; 31}.

Há também uma relação entre a presença de proteinúria e de pressão arterial elevada com a progressão da DRC em crianças ⁵⁸. A proteinúria, antes de ser consequência da DRC, contribui diretamente para a progressão da lesão renal. Sabe-

se que as proteínas acumuladas no lúmen tubular podem provocar efeitos que favorecem a inflamação e a esclerose, promovendo lesão estrutural intersticial e progressão da doença. A remissão da proteinúria com o tratamento eleva a sobrevida renal em longo prazo e indica prognóstico favorável ^{55; 58}.

A redução no RFG se relaciona com valores elevados da razão proteína/creatinina urinárias ^{55; 59}. Na população pediátrica, a progressão para DRCT é inversamente proporcional ao valor da depuração de creatinina, independentemente da doença renal subjacente e da presença de fatores de risco adicionais ^{4; 31}.

A progressão da DRC é, ainda, influenciada por diversos fatores de risco, incluindo os fatores modificáveis por medidas terapêuticas, como anemia, hipoalbuminemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia e crescimento inadequado e fatores não-modificáveis como genética, gênero e idade, a causa primária e estágio da DRC no momento do diagnóstico ^{4; 27}. A obesidade infantil, por estar associada à hipertensão, albuminúria e dislipidemias, contribui para a progressão da DRC ^{4; 55}. O peso reduzido ao nascer é acompanhado de um número menor de néfrons, o que também pode predispor à hipertensão e à doença renal ao longo da vida ². Além da influência biológica, a condição socioeconômica pode desempenhar um papel significativo na saúde e bem-estar das crianças com DRC ⁵⁷. Essas crianças sofrem de uma infinidade de complicações físicas, mentais e psicológicas. Além de expectativa de vida reduzida, apresentam comprometimento do crescimento, baixa autoestima, problemas comportamentais e de aprendizagem, de habilidades motoras e atraso no desenvolvimento ⁵⁷. Crianças que sobrevivem à DRCT apresentam pior qualidade de vida relacionada à saúde, colocação no mercado de trabalho e independência dos pais, quando comparados à população em geral ²⁷. A melhoria no manejo clínico e terapêutico da DRC na infância tem resultado em grande número de adultos que enfrentam problemas que são específicos para doença renal e que surgiram na infância ³.

Como manejo clínico, é recomendado que o paciente seja encaminhado precocemente a uma equipe especializada, antes da necessidade do tratamento dialítico. A constituição de equipes interdisciplinares especializadas na abordagem da DRC pode contribuir para melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes. Na fase pré-diálise, os fatores que deterioram a função renal podem ser controlados pela abordagem adequada da nutrição, da anemia, dos distúrbios metabólicos e acidobásicos, além de programas de suporte para os familiares e pacientes, da

garantia de um acesso vascular adequado e a indicação da terapia de substituição da função renal em um tempo ideal ^{5; 30}. A proposição de tratamentos capazes de desacelerar a progressão da DRC é altamente necessária ²⁷.

Em 2014, algumas diretrizes clínicas foram estabelecidas pelo Ministério da Saúde (MS) no Brasil, para tratamento conservador e manejo dos pacientes com DRC no Sistema Único de Saúde, de acordo com o estágio da DRC. O MS preconiza o tratamento medicamentoso e não medicamentoso, como a correção da anemia e dos distúrbios do metabolismo mineral e ósseo, que coexistem com a doença renal, e destaca a necessidade de equipes multidisciplinares para dar suporte aos pacientes ⁶⁰.

2.4 Doença renal, hemostasia e inflamação

2.4.1 Hemostasia - Considerações gerais

O sistema hemostático é responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade vascular, visto que é capaz de formar um tampão quando ocorre lesão do endotélio vascular. Dessa forma, a hemostasia minimiza a perda sanguínea e promove a restauração da arquitetura vascular normal ⁶¹.

O endotélio possui um papel crítico na hemostasia e responde a uma série de estímulos mecânicos como a pressão, *shear stress*, estímulo hormonal e de substâncias vasoativas, além de secretar substâncias que modulam o tônus vascular, a coagulação sanguínea, a proliferação celular e a inflamação ⁶².

O sistema hemostático é regulado pelo endotélio com a liberação de substâncias importantes, como o fator tecidual (FT), ativador do plasminogênio (t-PA), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), fator de von Willebrand (FVW), óxido nítrico (NO) e prostaciclina ⁶². Além do endotélio, têm participação chave no processo hemostático, as proteínas da coagulação, o sistema da anticoagulação natural e o sistema fibrinolítico ^{61; 63}.

Tão logo ocorre lesão endotelial, as plaquetas fazem o contato e aderem ao local lesado por meio da GPIb/IX da superfície plaquetária e do FVW, presente no plasma. A seguir, as plaquetas liberam o conteúdo de seus grânulos para congregar

mais plaquetas para o local e agregam entre si por meio da glicoproteína GPIIb/IIIa e do fibrinogênio plasmático ^{14; 64}.

As plaquetas desempenham um papel crucial na fisiologia da hemostasia, formando imediatamente um tampão no local lesado, prevenindo a perda de sangue e fornecendo a superfície adequada para a ativação sequencial dos fatores da coagulação, que culmina com a formação de fibrina estável ⁶⁵.

Os fatores de coagulação circulam na forma inativa e são ativados de forma sequencial no local da lesão. Essa ativação depende dos fosfolípides das células e das plaquetas como superfície ⁶¹. O modelo atualmente aceito da cascata da coagulação, representado na Figura 4, tem por base as superfícies celulares.

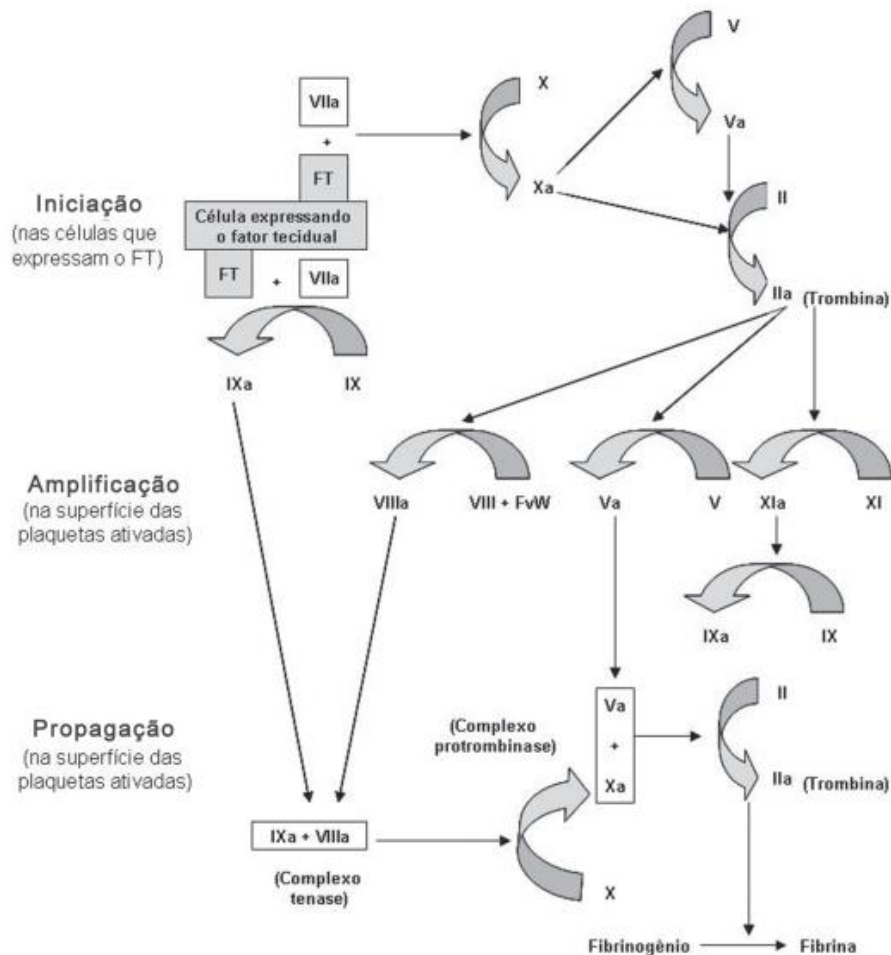


Figura 4: Representação do modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares.

A fase de iniciação se dá em células que expressam fator tecidual (FT), que ativa uma pequena quantidade de fatores. A fase de amplificação e propagação podem ocorrer na superfície de plaquetas ativadas e a produção e ativação de grandes quantidade de fatores de coagulação culminam com a formação da fibrina. **Fonte: Ferreira et al.**⁶⁶.

Nesse novo modelo, o início da cascata ocorre pela exposição no plasma do FT, que é o iniciador da cascata, e as plaquetas e as células lesadas funcionam como superfície para a ativação dos fatores da coagulação. Este processo ocorre em três fases, iniciação, amplificação e propagação. A etapa de iniciação ocorre nas células que liberam o FT e esse ativa o fator VII, formando um complexo (FT:FVII) que ativa os fatores IX e X. O fator Xa atua somente na superfície das células, pois ao sair para o plasma é prontamente inativado pelo *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI). O fator Xa forma o complexo protrombinase que ativa o fator II e forma pequenas quantidade de trombina (fase de iniciação). A trombina inicialmente formada ativa os fatores V, VIII e IX e as plaquetas (fase de amplificação). O fator IXa desprende-se da superfície celular onde foi ativado e alcança a superfície das plaquetas, desencadeando a fase de propagação, quando os fatores IXa, Va, VIIIa, XIa são formados em quantidades suficientes para a geração de grande quantidade de fibrina estável ^{66; 67}.

O controle da formação de fibrina ocorre por três mecanismos principais que envolvem o TFPI (que inibe o FXa e o complexo FT-VIIa), a proteína C (que é ativada quando a trombina se liga à trombosmodulina (TM) expressa no endotélio íntegro e cliva os fatores VIIIa e Va, inativando-os) e a antitrombina (que se liga principalmente à trombina, inibindo sua atividade) ⁶⁸.

Uma vez que a parede vascular lesada é reconstituída, o coágulo de fibrina torna-se desnecessário e representa um obstáculo à passagem do sangue. Simultaneamente à formação da fibrina, o processo de fibrinólise é iniciado e constitui um mecanismo importante para garantir a hemostasia, ou seja, a manutenção do sangue circulando na forma fluida dentro da rede vascular. A fibrinólise envolve a ativação do plasminogênio em plasmina, enzima responsável pela degradação da fibrina. A ativação do plasminogênio em plasmina é promovida pelos ativadores de plasminogênio tecidual (t-PA) e tipo uroquinase (uPA). O inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) inibe tanto o t-PA quanto o uPA e tem, portanto, a função de controlar a quantidade de plasmina formada ^{68; 69}.

2.4.2 Hemostasia e doença renal

Alterações no mecanismo da coagulação e da fibrinólise, nas funções endoteliais e plaquetárias são comumente observadas em pacientes com DRC e resultam tanto em sangramento, como em complicações trombóticas. A terapia de

substituição renal também contribui para o estado de hipo ou hipercoagulabilidade visto nestes pacientes, o que dificulta a prevenção e o tratamento das complicações vasculares e respondem por 20 a 25% das causas de hospitalização ^{9; 70}.

A disfunção endotelial desempenha um papel crítico no desenvolvimento da aterosclerose e de lesões vasculares, que podem ser uma via de patogênese comum para a DRC e para a doença cardiovascular ⁷¹. A uremia é considerada uma indutora da lesão endotelial ⁶². Na DRC a alteração endotelial é exacerbada pela hipertensão, *shear stress* e pelas toxinas urêmicas presentes no plasma, o que também contribui para um estado hipercoagulável ⁷⁰. Muitos pacientes com DRC não chegam ao estágio final da doença renal e morrem prematuramente em consequência a doenças cardiovasculares. O risco desses eventos é cerca de cinco vezes maior nos pacientes com DRC em estágio final quando comparados aos indivíduos saudáveis ²¹.

Por outro lado, as hemorragias ocorrem em aproximadamente 50% de pacientes com DRC em falência renal, devido a uma série de fatores como uremia, trombocitopenia e alterações funcionais plaquetárias ⁷⁰. Apesar da contagem de plaquetas estar normal na maioria das vezes, essas possuem disfunções na adesão, devido à uremia e ao acúmulo de outros metabólitos. Plaquetas de pacientes com DRC podem apresentar menor expressão da glicoproteína GPIIb/IIIa, baixa afinidade ao FvW, e alterações conformacionais nos receptores de fibrinogênio. A secreção dos grânulos e a agregação plaquetária pode ser inibida pelo aumento de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), que induzem o relaxamento vascular, bem como pela redução da ciclooxigenase (COX), que diminuem os níveis de AMP cíclico e tromboxana A₂ intraplaquetário (TXA₂) ^{69; 70}.

Apesar do comprometimento da função plaquetária, os pacientes com DRC podem se apresentar hipercoaguláveis, devido ao estado inflamatório constante e de baixo grau ^{70; 72}.

Nos pacientes com DRCT, durante o processo de hemodiálise, é observada uma elevação dos fatores procoagulantes, comprometimento da anticoagulação natural, hiperfibrinogenemia, aumento da formação de trombina, comprometimento da fibrinólise, ativação de células endoteliais e de monócitos, dislipidemia, hemoconcentração e ativação da coagulação ⁷⁰.

Okumura *et al.* ⁷³ evidenciaram a importância da ação plaquetária na indução de lesão renal. Esses pesquisadores verificaram que a TXA₂, indutora da ativação e agregação plaquetária, contribuiu para a progressão da nefropatia diabética em ratos

e o uso de inibidores de TXA2 reduziram a trombose glomerular e glomerulosclerose, prevenindo a proteinúria.

Níveis elevados de FT e de fator VII e a redução dos anticoagulantes naturais, proteína S (PS) e TFPI, foram relatados em pacientes com DRC, em relação a indivíduos saudáveis, sugerindo ativação da coagulação pela via do FT ^{69; 74}.

Adams *et al.* ⁶⁹ verificaram que a função endotelial também está alterada nos pacientes com DRC, pelos níveis elevados de sE-selectina e trombomodulina. Esses autores sugeriram que o FT expresso nas células endoteliais ou nos monócitos e os níveis elevados de trombomodulina plasmática comprometem a anticoagulação pela via da proteína C.

Al-Saady *et al.* ⁷⁵ verificaram um aumento de monócitos expressando FT que determinaram grande geração de trombina, evidenciada pelos níveis elevados de fator 1+2 da protrombina, nos pacientes com DRC que faziam hemodiálise ou não. Pawlak *et al.* ⁷⁴ propuseram que os níveis de FT possuem uma correlação forte com o grau de insuficiência renal.

Landray *et al.* ⁷² detectaram níveis plasmáticos elevados de P-selectina solúvel e de FVW (marcadores de ativação endotelial e plaquetária) em pacientes com DRC, que foram relacionados ao grau de lesão renal. Esses pesquisadores detectaram, também, níveis elevados de PCR e reduzidos de albumina e propuseram que a DRC está associada a um estado inflamatório de baixo grau, disfunção endotelial e ativação plaquetária, mesmo nos pacientes com insuficiência renal moderada.

Experimentos mostraram que a coagulação intrarrenal e a fibrinólise estão envolvidas na patogênese da nefropatia. A expressão gênica nos rins de PAI-1 está aumentada em ratos diabéticos, e de t-PA e uPA estão reduzidas, resultando em inibição da fibrinólise ⁷⁶. Os marcadores de ativação da fibrinólise, uPA, suPAR (receptor solúvel de uPA), PAI-1 e do complexo plasmina-antiplasmina mostraram-se elevados nos pacientes com DRC em relação a um grupo controle saudável e quanto maior o grau de disfunção renal, maiores foram os níveis dessas moléculas ⁷⁴.

2.4.3 Inter-relação entre hemostasia e inflamação na doença renal

Os mecanismos de sinalização celular que guiam os processos de coagulação e inflamação são complexos e estão intimamente relacionados ⁷⁷. A ativação da coagulação sanguínea produz proteases que não só interagem com os fatores da

coagulação, mas também com receptores celulares específicos envolvidos na resposta inflamatória. Os sistemas da coagulação e inflamatório interagem e realizam uma modulação mútua, e estão envolvidos na patogênese de doenças vasculares ⁷⁸.

A trombina (fator IIa) resulta da clivagem da protrombina e é a enzima responsável pela quebra da molécula do fibrinogênio em monômeros de fibrina. Além desta ação, a trombina age em uma variedade de células, incluindo as endoteliais, musculares lisas, leucócitos, monócitos e plaquetas. Nas células endoteliais, a trombina pode alterar significativamente a expressão gênica (promovendo um fenótipo pró-inflamatório) e pode também induzir a expressão de fatores pró-trombóticos, tais como o FT e PAI-1. A trombina pode, ainda, induzir a expressão pelo endotélio de moléculas de adesão, incluindo a molécula de adesão celular-vascular 1 (VCAM-1), e a expressão de algumas citocinas e quimiocinas como IL-6 (interleucina-6), CXCL8 (interleucina-8) e MCP-1/ CCL2. A CCL2 aumenta o recrutamento de células inflamatórias para a superfície endotelial, que pode levar à aterosclerose ⁷⁹. Nas plaquetas, a trombina induz a degranulação e liberação de mais trombina e nos monócitos induz a liberação de IL-8/ CXCL8 ⁸⁰.

O endotélio ativado sintetiza alguns moduladores inflamatórios, incluindo o NO, molécula de adesão intercelular (ICAM-1), VCAM-1, sE-selectina e fator NFκB ⁶². O NFκB é um fator de transcrição e induz a produção de moléculas inflamatórias como TNFα, IL-6 e CCL2 ⁸¹. O endotélio vascular contribui para a mitogênese, angiogênese, permeabilidade vascular e equilíbrio de líquidos ⁶².

Nos últimos anos, tornou-se claro que as plaquetas são importantes, não só na hemostasia e trombose, mas também na inflamação e em aspectos distintos da aterosclerose. Sabe-se que as plaquetas apresentam uma grande variedade de funções, são capazes de interagir com inúmeras células, como as endoteliais e musculares lisas e os leucócitos, e essas interações têm sido implicadas na fisiopatologia da inflamação vascular. Atualmente é aceito que as plaquetas têm um papel altamente inflamatório, sendo capazes de realizar o transporte, síntese e depósito de citocinas, de quimiocinas, e de mediadores lipídicos, iniciando e propagando a doença aterosclerótica ⁶⁵.

Uma vez na parede vascular, as plaquetas ativadas atraem leucócitos circulantes por meio da liberação de vários mediadores. As plaquetas possuem grânulos alfa, lisossomos e grânulos densos, bem como um conjunto complexo de membranas preparadas para estocar uma série de moléculas e liberá-las

rapidamente. Essas moléculas incluem os fatores V e XI, PAI-1, plasminogênio, proteína S, proteínas de adesão (fibrinogênio, fibronectina, FVW, trombospondina, P-selectina, GPIIb/IIIa), quimiocinas (RANTES, fator plaquetário 4) e citocinas (IL-1 β , CD40L) ⁸².

As citocinas inflamatórias aumentam o número e a atividade das plaquetas e estimulam a expressão de FT pelos monócitos. A PCR, que se encontra elevada nos pacientes com DRC, facilita as interações entre as células endoteliais e os monócitos, promovendo ativação adicional dos monócitos, expressão de mais FT e ativação do sistema do complemento, aumentando a ativação plaquetária ⁷⁰.

Os fatores da coagulação têm um papel na indução do processo inflamatório ⁸³. A trombina, FT, fatores VIIa e Xa podem se ligar a receptores de protease ativados (PARs), localizados nas células endoteliais, mononucleares, plaquetas, fibroblastos e células musculares lisas. Essa ligação aos PARs altera a produção de citocinas e induz a apoptose celular ^{84; 85; 86}. Há quatro isoformas de PARs (1,2,3 e 4). Os PARs-1, 3 e 4 respondem à sinalização pela trombina, os PAR-1, 2 e 3 respondem ao fator Xa e o PAR-2 transmite a sinalização ao fator VIIa. A ligação dos fatores da coagulação aos PARs provoca a clivagem e ativação de receptores e, dessa forma, sinalizam para a produção, expressão e secreção de diversas moléculas inflamatórias, incluindo a IL-6, CXCL8, CCL2, TGF- β , PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), VEGF, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1, mobilização de cálcio intracelular e ativação da enzima sintase do NO induzível (iNOS), e cicloxigenase (COX2), com consequente síntese de NO e PGE2. Como consequência ocorre vasodilatação, agregação plaquetária e atração de células inflamatórias ^{80; 83}.

Estudos evidenciam que o processo inflamatório possui um papel importante na instalação e progressão da DRC ²¹. O processo inflamatório é considerado um fator preditor independente de mortalidade em crianças com DRC ¹⁵.

Landray *et al.* ⁷² demonstraram um estado inflamatório em grau baixo em pacientes com DRC, detectado pelos níveis plasmáticos elevados das proteínas de fase aguda, proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio e níveis reduzidos de albumina.

A migração e infiltração de macrófagos e linfócitos no glomérulo e interstício é uma característica comum da doença renal tanto nas formas aguda ou crônica. Uma vez no tecido, os macrófagos representam uma fonte de mediadores inflamatórios, tais como lipídios bioativos, incluindo metabólitos do ácido araquidônico, metabólitos reativos de oxigênio, enzimas proteolíticas e uma variedade de citocinas e fatores de

crescimento. Como consequência, a infiltração de macrófagos tem sido associada, em estudos com humanos ou animais, à proteinúria e ao declínio da função renal ⁸⁷. Os macrófagos são considerados participantes ativos na indução da fibrose renal e há uma correlação entre o grau da fibrose e o número de macrófagos infiltrados no tecido renal lesado ²³.

Tem sido sugerido um papel importante de algumas citocinas inflamatórias e fatores de crescimento na DRC, incluindo as quimiocinas ¹⁵. Suas ações incluem a quimiotaxia e a ativação de células inflamatórias com indução de degranulação ou explosão oxidativa, modulação da adesividade de leucócitos, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, estimulação ou inibição da proliferação celular e angiogênese ¹⁹.

O TGF- β 1 tem sido associado à progressão da doença renal devido às suas propriedades fibrogênicas e regulatórias. Uma de suas ações é induzir o acúmulo de monócitos e a estimulação de fibroblastos pelo aumento da expressão da quimiocina MCP-1/ CCL2 ^{15; 54; 88}. Nas células endoteliais vasculares, o TGF- β 1 atua induzindo a angiogênese ²¹. Fank *et al.* ⁸⁹ demonstraram que o TGF- β 1 causa grande recrutamento e infiltração tecidual de células hematopoiéticas *in vivo* e induz uma expressão elevada de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) pelas células recrutadas. Isto poderia explicar o mecanismo de indução de crescimento e remodelamento vascular em processos inflamatórios, nos quais ocorre uma produção elevada desse fator de crescimento. Souto *et al.* ⁵⁴ encontraram níveis elevados de TGF- β 1 em crianças com SN idiopática resistentes aos corticosteroides, em relação a um grupo de crianças sem lesão renal e sugeriram que esse está envolvido na progressão da doença. De forma semelhante ao TGF- β 1, a CCL2 está envolvida em processos de deposição de matriz extracelular no tecido renal e proteinúria. A CCL2 pode ser induzida em diversas formas de lesão renal e é responsável pela infiltração de leucócitos na doença renal ⁸⁷. Os níveis plasmáticos e urinários de CCL2 estão elevados nas doenças glomerulares, rejeição ao enxerto e nefrite intersticial. Um aumento significativo de CCL2 foi obtido em crianças com DRC, quando comparados às crianças saudáveis. Esses níveis também estavam elevados nas crianças com a doença por causas glomerulares, quando comparados àquelas com malformações do trato urinário ¹⁵.

A IL-8/ CXCL8 é um dos mediadores importantes da resposta inflamatória, sendo secretada por vários tipos celulares, como células endoteliais e macrófagos.

Essa citocina funciona como um quimioatraente de linfócitos, neutrófilos e monócitos no sítio de inflamação e é, também um fator angiogênico potente ^{54; 87}. Sob condições de fluxo sanguíneo rápido, a CXCL8 facilita a adesão de monócitos ao endotélio. Em doenças cardiovasculares esse processo é importante na migração dessas células para a camada íntima e determinação da arterioesclerose. A lesão de reperfusão após o infarto, bem como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica tem sido associadas ao aumento dos níveis de IL-8/ CXCL8 ^{90; 91}.

2.5 Marcadores de ativação plaquetária e endotelial

2.5.1 E-selectina (CD62E) e P-selectina (CD62P)

As moléculas de adesão celular desempenham um papel primordial nas interações celulares em diversos processos patogênicos. As selectinas e seus ligantes são essenciais para a adesão de leucócitos e rolamento sobre as células endoteliais para a iniciação da resposta inflamatória. As selectinas são lectinas do tipo C e são compostas por três membros: P, L, e E-selectinas. A P-selectina é expressa após estimulação inflamatória em plaquetas e células endoteliais. A L-selectina é expressa constitutivamente em linfócitos e está implicada no retorno desses para os linfonodos. A E-selectina é especificamente induzida no endotélio após estimulação inflamatória. Assim, a E-selectina e a P-selectina possuem um papel importante no recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios ⁹².

Kato *et al.* ⁹³ demonstraram que a E-selectina induziu lesão renal aguda após a isquemia e reperfusão animais, aumentando a atração de neutrófilos para o local da lesão.

As plaquetas estão ativadas em várias condições, incluindo *shear stress*, inflamação e hipertensão, e expressam a P-selectina, que é translocada dos grânulos α para sua superfície ⁹⁴. A P-selectina é uma glicoproteína de membrana encontrada tanto nos grânulos alfa das plaquetas como nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais. Após a ativação celular por agonistas, como a trombina, a P-selectina é rapidamente redistribuída para a superfície celular, ligando-se a um receptor expresso nos neutrófilos e monócitos (receptor glicoproteína ligante-1 da P-selectina ou PSGL-1), mediando, dessa forma, as interações entre plaquetas e células

endoteliais com os leucócitos ^{95; 96; 97}. Os níveis de P-selectina apresentaram-se elevados em pacientes com angina instável, em comparação com pacientes com angina estável, demonstrando maior ativação plaquetária no rompimento da placa de ateroma ⁹².

2.5.2 Agregados plaquetas-leucócitos, GPIIb/IIIa (CD41a e CD61) e CD40L (CD154)

As interações celulares entre plaquetas e leucócitos são capazes de modular a inflamação e promover eventos na parede vascular, no local da formação do trombo ou na circulação ⁹⁸. As plaquetas circulantes interagem com os leucócitos e células endoteliais nos processos de remodelação, inflamação vascular e trombose ^{99; 100}.

Além da P-selectina, os receptores CD40-ligante (CD40L) expressos nas plaquetas ativadas estão também diretamente envolvidos com a interação entre plaquetas, endotélio e leucócitos. A ligação do receptor CD40 das células endoteliais ao CD40L das plaquetas induz a ativação de neutrófilos e monócitos que liberam CXCL8, FT, CCL2, TNF- α e moléculas quimioatraentes, além de promover a adesão dos neutrófilos e expressão de FT pelos monócitos. Nas células endoteliais, a ativação de CD40 induz ao aumento da expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, predispondo à aterosclerose, e a inibição de CD40/CD40L pode inibir esse processo ^{82; 101}. Ao formar agregados de plaquetas e monócitos via P-selectina/ PSGL-1, há um aumento da expressão de integrinas pelos monócitos, que ativam o endotélio e aumentam a adesão de monócitos via VCAM-1 ⁹⁸.

Tanto a ativação plaquetária quanto a formação de agregados plaquetas-leucócitos tem sido avaliada em uma série de doenças inflamatórias, especialmente nos eventos cardiovasculares com aterosclerose ⁸². Os complexos plaquetas-leucócitos constituem um fator importante na patogênese das doenças vasculares isquêmicas, como na fase aguda de infarto e isquemia cerebral. O processo de adesão celular, migração de monócitos e macrófagos e a transmigração das células através do endotélio são essenciais para a aterogênese ⁹⁴.

Durante a hemodiálise, plaquetas e leucócitos são ativados e formam os agregados plaquetas-leucócitos, nos quais há envolvimento da expressão da GPIIb/IIIa e também de P-selectina ^{99; 100}. Dessa forma, os agregados plaquetas-

monócitos são considerados marcadores promissores da ativação plaquetária *in vivo* e podem ser determinados por citometria de fluxo ¹⁰².

2.5.3 Molécula de adesão celular-vascular 1 (VCAM-1) e Molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1)

As moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina fazem parte da superfície das células endoteliais, e sua expressão ocorre em resposta a citocinas pró-inflamatórias. A expressão exacerbada dessas moléculas indica ativação endotelial e aumento da interação com leucócitos. Essas moléculas representam marcadores promissores da relação entre ativação endotelial e inflamação ^{103; 104}.

E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 são transcricionalmente reguladas por citocinas, lipopolissacárides, ou outros mediadores de inflamação. As combinações de citocinas podem modular, de forma diferente, a indução dessas moléculas de adesão. Vários agonistas induzem a expressão de E-selectina e VCAM-1. A trombina é capaz de ativar a expressão conjunta de E-selectina, ICAM-1, VCAM-1. Há um recrutamento seletivo de subpopulações de leucócitos durante a resposta inflamatória ou imunitária, de acordo com cada receptor expresso. Tem sido admitido que o endotélio de grandes vasos e aquele da microcirculação expressam quantidades diferentes de moléculas de adesão. No entanto, de uma forma geral, a E-selectina e outras selectinas promovem uma capacidade de adesão mais fraca, participando da etapa inicial de ativação endotelial, rolamento e ativação dos leucócitos. As moléculas como ICAM-1 e VCAM-1 participam de etapas de adesão tardia e migração transendotelial ¹⁰⁵.

A liberação de moléculas de adesão tem sido avaliada em muitas condições clínicas, tais como na aterosclerose, hipertensão, terapia imunossupressora, doenças autoimunes e processos de rejeição a enxertos ¹⁰³. Níveis plasmáticos elevados de VCAM-1 foram detectados em pacientes com DRC, dializados e não dializados, e houve correlação com o processo inflamatório (avaliado pelos níveis elevados de PCR), com o risco de doenças cardiovasculares e com a subnutrição. Os níveis de VCAM-1 e ICAM-1 foram identificados como fatores preditores independentes de mortalidade nos pacientes com DRC e em transplantados renais, com o prognóstico de mortalidade e com o risco cardiovascular, independentes da função renal ^{103; 104}.

2.5.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF é uma proteína que age especificamente nas células endoteliais vasculares e tem como função principal a indução da angiogênese ¹⁰⁶. O VEGF estimula a proliferação de células endoteliais e da diferenciação, aumenta a permeabilidade vascular, medeia a vasodilatação dependente do endotélio e promove a quimiotaxia de monócitos e expressão de moléculas de adesão. A exposição de células endoteliais e macrófagos ao VEGF ativa do fator de transcrição NFκB, que induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas ¹⁰⁷.

O VEGF é produzido largamente por células epiteliais e macrófagos. Nos rins, sua expressão foi detectada nos podócitos glomerulares, túbulos distais e em menor quantidade nos túbulos proximais ^{108; 109; 110}. As plaquetas ativadas também liberam o VEGF de seus grânulos alfa ¹¹¹.

O VEGF possui um papel importante em doenças associadas à angiogênese anormal, como em algumas condições inflamatórias e crescimento tumoral. Citocinas e fatores reguladores de crescimento podem modular a angiogênese por regulação da expressão de VEGF em algumas células. Alguns fatores podem potencializar sua produção, tais como condições de hipóxia, fator de crescimento de fibroblastos 4 (FGF-4), PDGF, TGF-β, IL-1, TNF-α, fator de crescimento de queratinócitos, dentre outros ^{89; 106}.

Peng *et al.* ¹⁰⁷ relataram que os níveis de VEGF plasmáticos e urinários mostraram-se elevados nos pacientes transplantados renais com rejeição subclínica do órgão (antes da alteração dos níveis de creatinina). A expressão de VEGF está aumentada em condições patológicas associadas à infiltração de macrófagos, como ocorre na rejeição ao enxerto. Os monócitos e linfócitos T podem produzir VEGF em processos inflamatórios e infecciosos. O VEGF provoca atração de mais monócitos, pelo aumento da expressão da molécula de adesão P-selectina no endotélio e pelo aumento da permeabilidade capilar, o que pode conduzir ao episódio de rejeição. Por ser um fator de crescimento, o VEGF também pode refletir um processo contínuo de lesão e reparação tecidual no enxerto.

A trombina interage com os receptores PAR-1 nas células endoteliais e promove, dentre outros efeitos, uma ação angiogênica. O fator Xa além de contribuir indiretamente com a angiogênese, por sintetizar trombina, é capaz de induzir uma resposta proliferativa em fibroblastos e a síntese de proteínas de matriz extracelular

(importantes na fibrogênese) por sinalização de PAR-2 que, por sua vez, induz a liberação de VEGF pelos fibroblastos ¹¹².

Pawlak *et al.* ⁷⁴ investigaram os níveis plasmáticos de VEGF e sua relação com a desregulação do sistema hemostático em pacientes com DRC. Verificaram que estes apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de VEGF e que correlacionavam com o grau de disfunção renal. Verificaram, ainda, que os níveis de VEGF também correlacionaram com os níveis de marcadores de ativação de coagulação (FT) e da fibrinólise (uPA, suPAR, PAI-1 e complexo plasmina-antiplasmina). Dessa forma, esses investigadores propuseram que existe uma relação entre a angiogênese anormal, a coagulação e a ativação excessiva da fibrinólise.

2.5.5 Receptor de uPA (uPAR) e sua forma solúvel (suPAR)

O sistema fibrinolítico apresenta um efeito contraditório e ainda desconhecido na promoção da fibrogênese e angiogênese na doença renal. Alguns estudos relataram um efeito protetor e outros, um efeito promotor de lesão renal. A fibrogênese é uma resposta do tecido à lesão tecidual e ao processo inflamatório. Em geral, após a lesão do tecido e o estabelecimento de uma reação inflamatória, a fibrose se desenvolve visando a resolução do processo com cicatrização (ou reparação tecidual). No entanto, em situações patológicas, o processo de reparação se perpetua e a fibrose progressiva leva à destruição da arquitetura do órgão, caracterizada por lesão cicatricial ^{21; 113}.

O ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA) é expresso nos túbulos renais em grandes quantidades. Quando ocorre lesão renal é também sintetizado pelos macrófagos e fibroblastos, recrutados para a área da lesão. Como o uPA atua ativando o plasminogênio em plasmina, é esperado que esse apresente um efeito protetor contra a fibrogênese no rim, uma vez que a plasmina, além de degradar a fibrina, degrada também proteínas de matriz. Por outro lado, o PAI-1, que inibe o uPA, teria potencial fibrogênico ²¹.

Em condições fisiológicas, o PAI-1 não é produzido pelos rins, mas quando ocorre lesão, sua expressão é induzida nos macrófagos, fibroblastos, epitélio tubular e células glomerulares ²¹.

Com a ligação da P-selectina ao seu receptor nos leucócitos *ligante de P-selectina* (PSGL-1), ocorre regulação da expressão de proteínas, como o receptor do

ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPAR), uma protease de superfície que tem ação reguladora da adesão de leucócitos (mediada por integrina) e está envolvida em processos inflamatórios ⁸².

O ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA) liga-se ao seu receptor de superfície celular (uPAR) e esses produzem efeitos sinalizadores de adesão celular, migração e proliferação de uma variedade de células, contribuindo para a proteólise pericelular em processos de remodelamento tecidual ^{114; 115}.

A forma solúvel do receptor de uPA (suPAR), resultante da clivagem do uPAR, está significativamente aumentada em fluidos biológicos durante as diferentes condições infecciosas e inflamatórias e correlaciona positivamente com o nível de ativação do sistema imune ¹¹⁶. Os níveis de suPAR também correlacionam com os níveis de marcadores clássicos de disfunção renal como a creatinina, ureia e cistatina C ¹¹³.

O suPAR expresso pelas células vasculares é hiperregulado por fatores de crescimento e citocinas pró-angiogênicos e pró-aterogênicos. Este receptor é liberado no lado basolateral das células endoteliais e se acumula na parede vascular. A interleucina-1 β , o fator de crescimento de fibroblastos ou o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumentam a liberação de suPAR das células endoteliais, enquanto que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF B), fator de crescimento de fibroblastos e interleucina-1 β estimulam sua liberação das células musculares lisas vasculares ¹¹⁴.

O uPAR está envolvido na via de ativação do plasminogênio, processos inflamatórios, modulação da adesão celular, migração e proliferação. Os receptores de membrana e a forma solúvel se ligam a integrinas e facilitam o recrutamento de monócitos e neutrófilos ¹¹³.

O receptor de uPA (uPAR) não é produzido em condições normais nos rins, mas quando há lesão renal, as células tubulares, as inflamatórias e os miofibroblastos intersticiais podem expressá-lo. tem sido admitido que o uPAR possui um efeito protetor da fibrose ao auxiliar a degradação intracelular de PAI-1 e reduzir o número de miofibroblastos no tecido. A forma solúvel suPAR se liga a receptores em leucócitos, promovendo a quimiotaxia e recrutamento de leucócitos. Por outro lado, o uPAR pode promover a angiogênese e proliferação celular, e facilitar o recrutamento dos macrófagos para o rim, exacerbando a lesão ^{21; 115}.

Wei *et al.*¹¹⁷ sugeriram que níveis circulantes elevados do suPAR estão associados à GESF. Estes pesquisadores relataram níveis elevados desse receptor em dois terços de pacientes com GESF primárias, mas não naqueles com outras doenças glomerulares. Relataram também que os níveis elevados desse receptor antes do transplante resultou em risco aumentado de recorrência de GESF pós-transplante. Em estudos utilizando ratos, estes pesquisadores detectaram que o suPAR ativa a integrina $\beta 3$ dos podócitos nos rins, provocando alterações estruturais e causando proteinúria e glomerulopatia semelhante à GESF. Wei *et al.*¹¹⁷ ainda propuseram que a redução dos níveis plasmáticos do suPAR pela plasmaférese ou por interferência de anticorpos anti-integrina $\beta 3$ ou moléculas pequenas que se ligam à integrina ou ao uPAR poderiam constituir uma ferramenta importante para o tratamento da GESF. No entanto, Parikh *et al.*¹¹⁸ questionou esses resultados e sugeriu que o suPAR é mais um candidato a marcador humoral da síndrome nefrótica idiopática.

Pawlak *et al.*⁷⁴ admitiram que o uPA e o uPAR são marcadores de hiperfibrinólise. Admitiram que esses marcadores estão associados à proteólise pericelular induzida pela plasmina e ao remodelamento tecidual e relataram que os níveis de suPAR estão relacionados aos níveis do VEGF, que tem grande importância na promoção da angiogênese.

A Figura 5 sintetiza a descrição do suPAR na lesão renal.

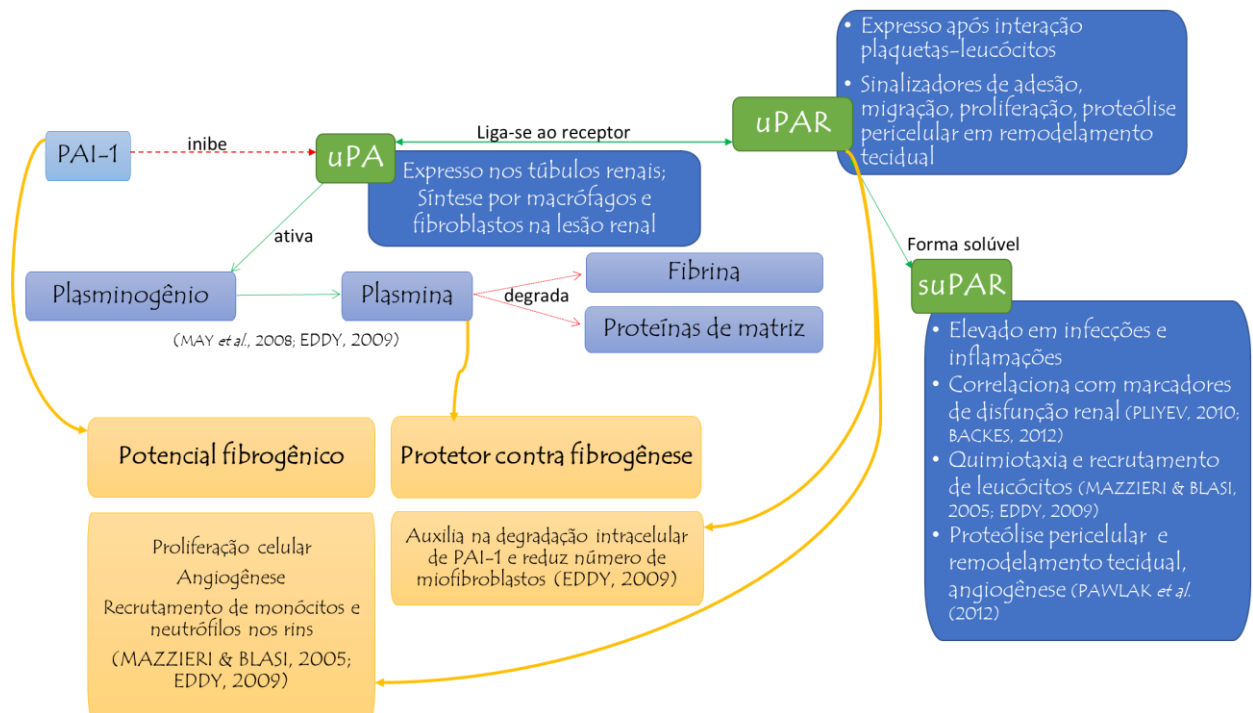


Figura 5: Papel do suPAR na lesão renal: envolvimento na fibrinólise e na angiogênese.

Fonte: elaborada pelo autor.

2.5.6 ADAMTS13 e Fator de von Willebrand

O FVW é uma proteína sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos. Nas células endoteliais o FVW é armazenado nos grânulos denominados corpos de Weibel-Palade e quando liberado para o plasma, atua como carreador do fator VIII da coagulação e mediador da adesão plaquetária ao subendotélio vascular lesado. A intensidade de adesão plaquetária ao endotélio lesado e a atividade do FVW dependem do tamanho da molécula de FVW. Moléculas com peso molecular acima de 20000Da (*ultra large FVW*) ligam à GPIb das plaquetas em toda sua extensão, resultando em agregação plaquetária excessiva ^{119; 120; 121}.

A ADAMTS13 (*Desintegrin-like and Metalloprotease Thrombospondin Type 1 Motif, Member 13*) é uma metaloprotease plasmática com função específica de clivar multímeros do FVW. Assim que multímeros *ultra large FVW* são liberados no plasma, esses são clivados especificamente pela ADAMTS13 entre os aminoácidos tirosina (posição 1605) e metionina (posição 1606) do domínio A2 reduzindo, dessa forma, seu peso molecular e a atividade ^{119; 120; 122}. Dessa forma, a ADAMTS13 faz o controle

da formação dos UL-FVW e, conseqüentemente, da intensidade de agregação plaquetária, ao gerar multímeros menores e de diferentes comprimentos. Os UL-FVW são mais ativos que multímeros menores do FVW devido à mudança na sua conformação em condições de *shear stress*, quando alteram a forma globular para a forma estendida¹²³. Quando os níveis plasmáticos de ADAMTS13 estão reduzidos há risco de ocorrência de eventos trombóticos e quando estão elevados, risco de hemorragias.^{64; 119}. Na Figura 6 está representada a ação da ADAMTS13 sobre o FVW em indivíduos normais e na púrpura trombocitopênica trombótica, na qual os níveis de ADAMTS13 estão reduzidos.

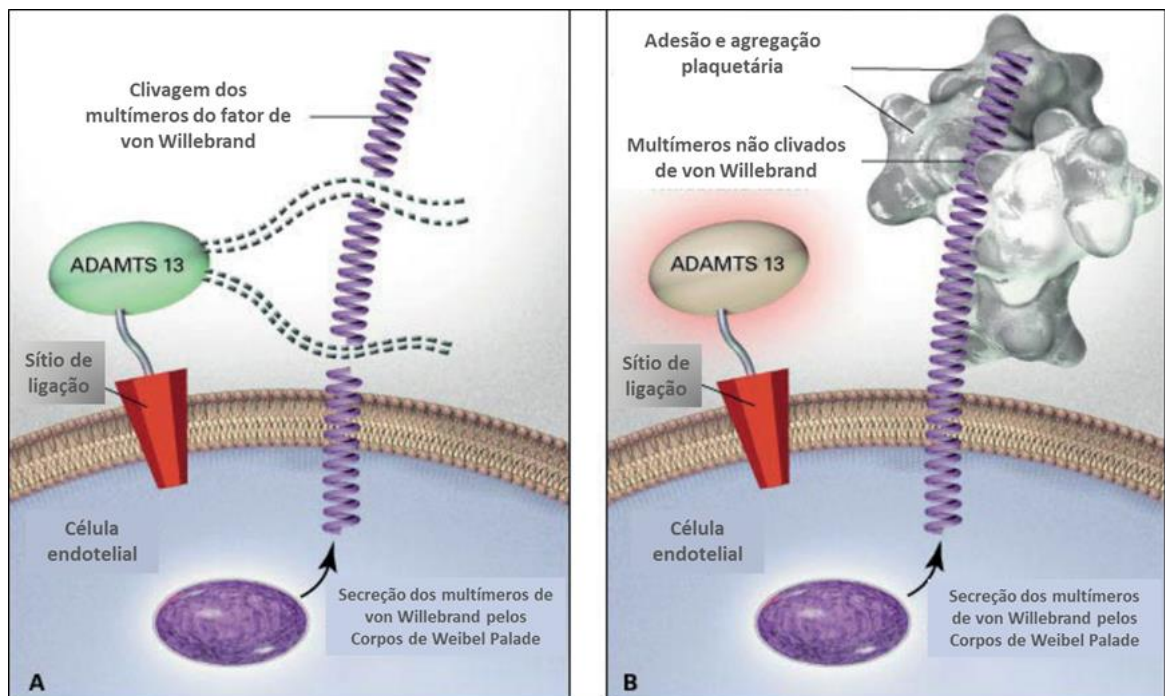


Figura 6: Clivagem do Fator de von Willebrand pela ADAMTS13.

(A) em um indivíduo normal e (B) em um paciente com púrpura trombocitopênica trombótica. Após estímulo, os grandes multímeros de FVW são liberados pelos corpos de Weibel-Palade na célula endotelial. A ADAMTS13 se conecta à célula endotelial por meio de um dos seus domínios trombospondin-1-like, cliva os grandes multímeros e impede, assim, que o FVW promova adesão e agregação plaquetária durante o fluxo sanguíneo normal. A proteólise do FVW pela ADAMTS13 parece ser crítica na prevenção de trombose na microvasculatura. **Fonte:** Boungers¹²⁴.

A redução quantitativa ou funcional de ADAMTS13 resulta em trombos formados basicamente de UL-FVW e plaquetas, principalmente em condições de fluxo sanguíneo lento e *shear stress* elevado como ocorre na microcirculação renal¹²⁰. Nessas condições, os UL-FVW podem promover a ligação entre as plaquetas via GPIb na luz vascular e não ao endotélio⁶⁴.

A redução da atividade da ADAMTS13 pode ser causada por mutações no gene que codifica essa enzima ou pela presença de anticorpos que inibem sua função. A deficiência congênita ou adquirida de ADAMTS13 pode levar à púrpura trombocitopênica trombótica ^{119; 125}. Alguns polimorfismos no gene da ADAMTS13 estão associados ao risco de eventos cardiovasculares e doenças coronarianas crônicas ¹²¹.

Estudos recentes relataram que pacientes com lesões renais como na nefropatia diabética possuem níveis reduzidos de ADAMTS13 ^{157;160}. Como a ativação plaquetária contribui para complicações na microvasculatura, os níveis reduzidos de ADAMTS13 permitem um aumento dos níveis de UL-FVW, propiciando a formação de trombos na microvasculatura renal compostos basicamente por plaquetas, que têm um papel importante na progressão da nefropatia diabética¹²³. Pacientes em hemodiálise apresentam níveis elevados de substâncias liberadas pelas células endoteliais, como a trombosmodulina, o PAI-1 e o FVW ^{120; 126; 127}.

Em gestantes com pré-eclâmpsia, uma doença específica da gravidez, que cursa com hipertensão e proteinúria, também foi detectada uma redução dos níveis plasmáticos de ADAMTS13, o que pode contribuir para as complicações da microvasculatura placentária e renal vistas nessa doença¹²⁸.

A ADAMTS13 é sintetizada no fígado, plaquetas e endotélio¹²⁴. Manea *et al.*¹²⁹ detectaram a expressão de RNAm e secreção de ADAMTS13 nos rins, incluindo endotélio glomerular, podócitos, membrana basal glomerular e células epiteliais tubulares. Rios *et al.* ¹²⁰ compararam os níveis plasmáticos de ADAMTS13 antes e após o transplante renal, nos mesmos pacientes, e obtiveram a normalização dos níveis dessa enzima, após o transplante bem-sucedido. Sugeriram que os rins possam ter um papel importante na síntese ou no metabolismo da ADAMTS13. Tati *et al.* ¹³⁰ sugeriram que a atividade proteolítica da ADAMTS13 teria um papel protetor na prevenção da deposição de plaquetas no lúmen capilar glomerular em condições de *shear stress*, que é comum ao glomérulo. Manea *et al.*¹²⁹ também sugeriram que a síntese de ADAMTS13 pelas células epiteliais tubulares teria um efeito protetor na regulação da hemostasia da microcirculação local. Ainda não está definido o papel da ADAMTS13 secretada pelas células endoteliais e não está claro se a ADAMTS13 funciona local ou sistemicamente ¹²⁵. Na púrpura trombocitopênica trombótica, a deficiência de ADAMTS13 resulta em lesão endotelial microvascular e formação de microtrombos inclusive nos pequenos vasos renais¹³¹.

A ADAMTS13 pode se complexar aos fatores XI e XIa no plasma, mas o papel destes complexos ainda não está claro. No entanto, níveis reduzidos do complexo ADAMTS13-FXI-FXIa foram associados a níveis reduzidos e baixa atividade da ADAMTS13 em pacientes com microangiopatia trombótica, incluindo púrpura trombocitopênica ¹¹⁹. Kobayashi *et al.* ¹¹⁹ propuseram a utilidade da dosagem desse complexo para o diagnóstico de microangiopatias.

A ADAMTS13 possui domínios semelhantes a outras proteínas membros das famílias ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) e ADAMTS, que são multifuncionais, capazes de regular eventos proteolíticos e não proteolíticos. O domínio metaloproteinase induz a liberação de citocinas e de fatores de crescimento, promovendo proliferação celular, migração e angiogênese. O domínio desintegrina regula processos de adesão e migração e o domínio trombospondina (TSP) inibe a angiogênese pela modulação da atividade do VEGF ¹²⁵.

Além da regulação da adesão plaquetária pela clivagem de UL-FVW, Lee *et al.* ¹²⁵ demonstraram que a ADAMTS13 possui efeitos reguladores pró e anti-angiogênicos. Esta enzima promove diretamente a angiogênese *in vitro*, no entanto, inibe o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a angiogênese induzida por esse fator, atividade essa realizada pelo domínio TSP1. Estes pesquisadores sugeriram que o efeito pró ou anti-angiogênico dependeria do microambiente e que estudos adicionais são necessários para avaliar o papel da ADAMTS13 na vasculatura.

A relação FVW/ADAMTS13 tem sido utilizada na avaliação da patogenia de algumas doenças^{132; 133}. Em pacientes submetidos a hepatectomia, a relação FVW/atividade de ADAMTS13 estava elevada em pacientes com complicações trombóticas, mesmo antes da ocorrência dessas complicações¹³⁴. Em pacientes com falência hepática também foi detectado um desequilíbrio na relação FVW/ADAMTS13¹³⁵. Em pacientes com sepse, o desequilíbrio entre a secreção UL-FVW e os níveis de ADAMTS13 pode causar a disfunção de múltiplos órgãos¹³³. Em pacientes com infarto cerebral, foi sugerido que a atividade reduzida de ADAMTS13 pode contribuir para a patogênese da doença¹³⁶. Em diabéticos, os níveis diminuídos de ADAMTS e elevados de FVW podem acelerar as complicações cardiovasculares e renais¹³⁷. Tem sido admitido que o desequilíbrio FVW/ADAMTS13 pode resultar em menor proteção endotelial na microvasculatura renal e, dessa forma, promover um declínio da função renal¹³⁸.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as funções endotelial e plaquetária em pacientes pediátricos com DRC pré-dialítica.

3.2 Objetivos específicos

Determinar, em pacientes pediátricos com DRC em estágios pré-dialíticos e em crianças e adolescentes saudáveis:

- A expressão de P-selectina (CD62P), GPIIb/IIIa (CD41a), GPIIIa (CD61) e CD40L (CD154) na membrana plaquetária
- A percentagem de agregados plaquetas-monócitos (APM) e plaquetas-neutrófilos (APN) circulantes
- Os níveis plasmáticos de sE-selectina solúvel, de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), de moléculas de adesão celular vascular (sVCAM-1) e intercelular (sICAM-1) solúveis, do receptor solúvel de uPA (suPAR), de ADAMTS13 e de FVW
- A relação plasmática de FVW:ADAMTS13.

Investigar se há diferença nos níveis dos marcadores laboratoriais avaliados entre os pacientes pediátricos com DRC e o grupo controle de crianças e adolescentes saudáveis, pareados por idade e sexo com os pacientes.

Comparar os marcadores laboratoriais avaliados entre os pacientes pediátricos com DRC tratados ou não com antagonistas do sistema renina-angiotensina.

Investigar se há correlação entre os biomarcadores laboratoriais avaliados nos participantes do estudo.

Investigar, por meio de modelos de regressão logística, se os marcadores plaquetários e endoteliais estão relacionados à DRC em pacientes pediátricos.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo caracteriza-se como analítico observacional, transversal e comparativo. A amostragem foi definida como não-probabilística por conveniência, na qual os pacientes pediátricos com DRC que realizavam acompanhamento no Ambulatório de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas/ Faculdade de Medicina da UFMG foram identificados como possíveis participantes do estudo, no período de fevereiro de 2013 a março de 2014.

4.1 Casuística

4.1.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi analisado, sob o ponto de vista ético e formal, e aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais/COEP (ANEXO 1) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas/DEPE -UFMG (ANEXO 2).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara, foi feito pelos pesquisadores a todos os pacientes envolvidos no estudo e seus responsáveis. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (APÊNDICE 1) foi assinado pelos responsáveis pelas crianças de até 7 anos de idade. Para os maiores de 7 anos, tanto o participante, quanto seus responsáveis, assinaram este termo.

4.1.2 Seleção dos participantes do estudo

O recrutamento dos pacientes foi realizado em conjunto com os médicos da Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas/UFMG. Os pacientes pediátricos já possuíam diagnóstico de DRC em estágios 3 e 4 (pré-dialíticos), e eram acompanhados periodicamente nesta Unidade.

Inicialmente foram analisados os prontuários de 84 pacientes que tinham consulta marcada na Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas/UFMG no período de fevereiro de 2013 a março de 2014. Utilizando os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos, 43 desses pacientes foram incluídos no estudo

e 41 não foram. Os motivos da exclusão dos pacientes pediátricos com DRC no estudo estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1- Relação dos motivos de exclusão das pacientes pediátricos com DRC em estágios 3 ou 4 no estudo.

Motivos	Número de crianças
Recusaram a participar do estudo	10
Menores de 2 anos de idade ou baixo peso	15
Completaram 18 anos	3
Portador de Diabetes mellitus	1
Portador de plaquetopenia	1
Portador de anemia de Fanconi	1
Portador de câncer	1
Não compareceram à Unidade de Nefrologia Pediátrica	9
Total	41

Um grupo-controle foi composto por crianças e adolescentes declaradamente saudáveis (n=52), selecionados na comunidade em geral, no Centro Pedagógico da UFMG e no Colégio Técnico da UFMG, com idade e sexo pareados com os pacientes com DRC.

Portanto, foram efetivamente incluídos no estudo 95 participantes, que foram distribuídos em dois grupos, o grupo de pacientes (grupo DRC, n=43) e o grupo de saudáveis (Grupo-Controle, n=52).

Os critérios de inclusão e de exclusão, previamente estabelecidos, estão apresentados a seguir.

4.1.2.1 Critérios de inclusão

Grupo de pacientes (DRC)

- Pacientes pediátricos com DRC causada por glomerulopatias, CAKUT ou por outras etiologias
- Ter idade inferior a 18 anos, no momento de coleta da amostra biológica
- Apresentar DRC em estágios 3 ou 4 (pré-dialíticos)

Grupo- controle

- Ser declaradamente saudável
- Idade e gênero pareáveis com os pacientes com DRC

4.1.2.2 Critérios de exclusão para os pacientes com DRC

- Idade superior a 18 anos
- Idade inferior a 2 anos ou baixo peso
- Portadores de DRC com o RFG abaixo de 15mL/min/1,73m³ e em terapia de substituição renal (hemodiálise e diálise peritoneal)
- Portadores de doenças infectocontagiosas
- Portadoras de processo infeccioso e/ou inflamatório na data da coleta ou até três semanas precedentes
- Portadores de *Diabetes mellitus*
- Portadores de outras doenças intercorrentes, tais como câncer, doenças autoimunes, doenças hepáticas, distúrbios hormonais e anemias
- Portadores de distúrbios plaquetários ou da coagulação
- Em uso de medicamentos polivitamínicos ou hormônios contraceptivos

4.1.3 Critérios de exclusão dos participantes grupo-controle

- Idade superior a 18 anos
- Idade inferior a 2 anos ou baixo peso
- Portadores de qualquer patologia renal e do trato urinário
- Portadores de doenças infectocontagiosas, câncer, doenças autoimunes, doenças hepáticas, distúrbios hormonais
- Portadores de processo infeccioso e/ou inflamatório na data da coleta ou até três semanas precedentes
- Portadores de *Diabetes mellitus* ou com outras doenças metabólicas
- Portadores de distúrbios plaquetários ou de coagulação
- Em uso de quaisquer medicamentos anti-inflamatórios, hormônios contraceptivos ou polivitamínicos

Uma ficha contendo dados clínico-laboratoriais relevantes para análise dos resultados foi preenchida, por meio de consulta aos prontuários médicos de cada

participante (APÊNDICE 2). As informações dos participantes do grupo-controle foram obtidas durante entrevista.

4.2 Amostra biológica

Um total de 10,5mL de sangue venoso foi coletado de cada participante do estudo diretamente em tubos do sistema Vacutainer®, sendo 4,5mL em tubos contendo citrato de sódio a 3,2%, 2mL em tubos contendo K₃EDTA e 4mL sem anticoagulante.

As amostras colhidas em citrato de sódio foram homogeneizadas e uma alíquota de 450µL foi transferida para outro tubo para avaliação da formação de agregados plaquetas-leucócitos, que foi realizada em até duas horas após a coleta. Essa alíquota foi centrifugada a 800rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (Megafuge X3R Thermoscientific®), para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), ao qual foi adicionado a uma solução fixadora e armazenado em geladeira (4-8°C) para posterior determinação de marcadores de ativação plaquetária.

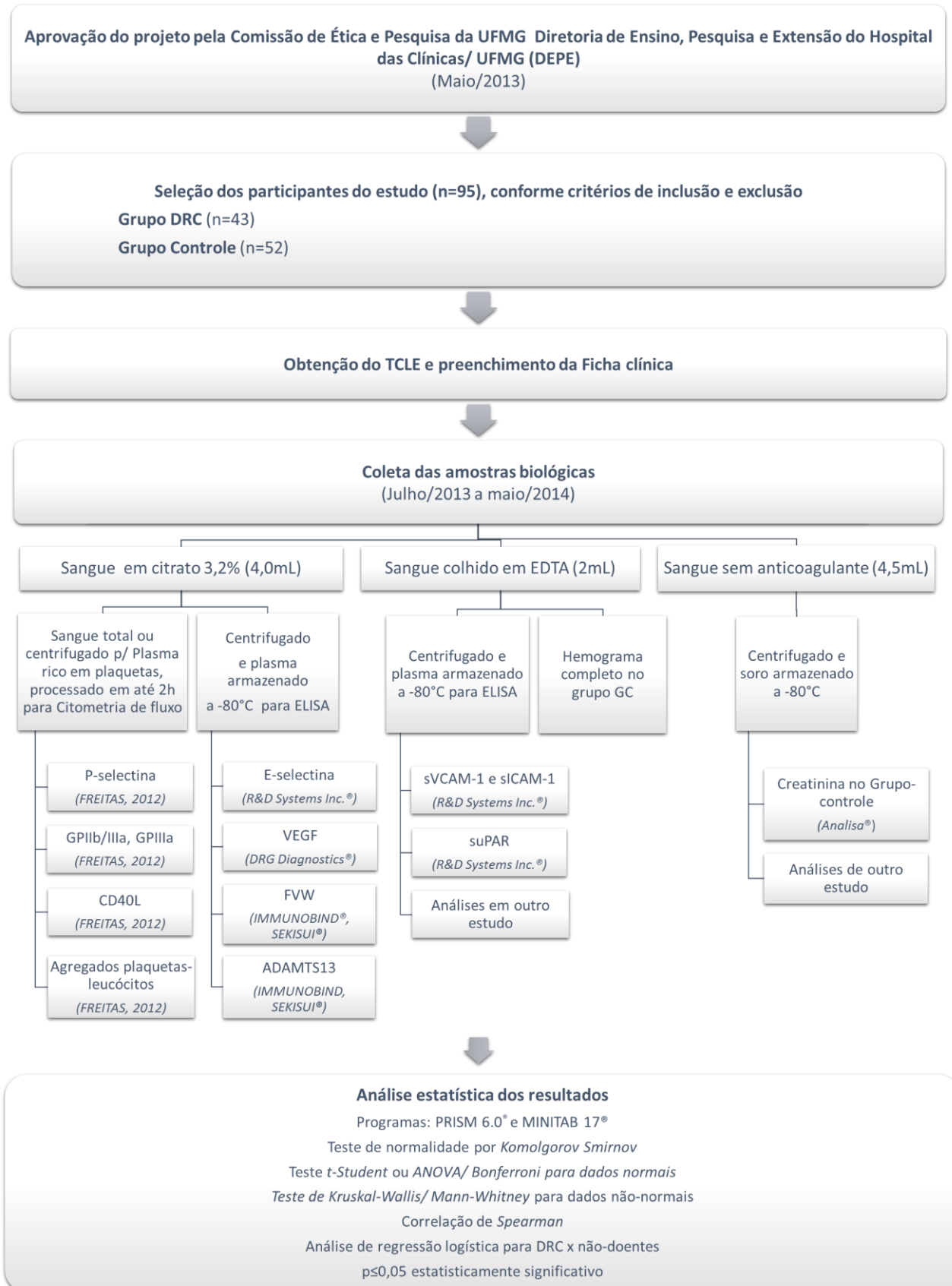
O restante da amostra em citrato de sódio foi centrifugado a 2500rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C (Megafuge X3R Thermoscientific®). Alíquotas de plasma livre de plaquetas (PLP) foram transferidas para criotubos e armazenadas a -80°C até a realização das determinações de FVW, ADAMTS13, VEGF e sE-Selectina.

A amostra colhida em EDTA foi centrifugada e alíquotas de plasma foram transferidas para criotubos e armazenadas a -80°C até a realização das determinações de sICAM, sVCAM e suPAR. Para o Grupo-controle foi realizado, com sangue total, um filme sanguíneo para avaliação dos elementos celulares ao microscópio e contagem percentual dos leucócitos e plaquetas, como parte do hemograma.

A amostra sem anticoagulante foi centrifugada e alíquotas do soro foram transferidas para criotubos e armazenadas a -80°C até a realização da determinação plasmática de creatinina.

4.3 Métodos

4.3.1 Delineamento experimental



4.3.2 Protocolo de estudo da expressão de componentes plaquetários

A expressão dos marcadores de ativação plaquetária: P-selectina (CD62P), GPIIb/IIIa (CD41a) e GPIIIa (CD61), CD40L (CD154) foi avaliada por citometria de fluxo.

O protocolo foi baseado no estudo de Freitas *et al.*¹³⁹ e nas instruções do fabricante dos anticorpos monoclonais. Algumas adaptações foram realizadas no protocolo, bem como a titulação dos anticorpos, para definição da concentração mais adequada para a população avaliada no presente estudo.

A amostra de sangue total colhido em citrato de sódio foi centrifugada a 800rpm por 10 minutos, em até 2 horas após a coleta. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi imediatamente gotejado em tubos de poliestireno contendo uma solução fixadora de plaquetas (paraformaldeído a 10g/L em cacodilato de sódio a 10,2g/L e cloreto de sódio a 6,63g/L; pH 7,2-7,4), sob agitação em vórtex (AP56®, Phoenix). As plaquetas foram acondicionadas por um período mínimo de 12 horas, em geladeira (4°C a 8°C). As plaquetas fixadas foram, então, lavadas com solução de PBS 0,015M (solução de fosfato tamponada filtrada a 0,22µm, pH=7,2) e centrifugadas a 2.200rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* foi ressuspensionado com 1mL de PBS. O contador de células COULTER T890® foi utilizado para a contagem de plaquetas e ajuste de sua concentração na suspensão para 5000 plaquetas/µL. Alíquotas de 100µL dessa suspensão foram transferidas para 4 tubos de poliestireno e incubadas com anticorpos monoclonais (Becton Dickinson Pharmingen®) dirigidos contra glicoproteínas plaquetárias, por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Um dos tubos foi utilizado como controle interno de autofluorescência (branco), no qual a suspensão de plaquetas foi incubada na ausência de anticorpos monoclonais. Nos outros três tubos foram adicionados os anticorpos, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para avaliação das glicoproteínas plaquetárias.

Tubos	Reagente/ anticorpo	Fluorocromo	Catálogo/ Referência	Volume	Clone	Fenótipo alvo
1	PBS			20µL	-	
2	Anti-CD41a	PE	555467, BD®	3µL	HIP8	GPIIb/IIIa
3	Anti-CD61	PE	555754, BD®	1,5µL	VI-PL2	GPIIIa
4	Anti-CD42a	FITC	648887	0,2µL	ALMA.16	GPIX
	Anti-CD62P	PE	555524	5µL	AK-4	P-selectina
	Anti-CD154	APC	648887	2,5µL	89-76	CD40L

PBS: tampão fosfato-salino; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; APC: alofococianina.

O anticorpo Anti-CD42a foi utilizado para identificação das plaquetas e posterior análise da P-selectina e CD40L nas mesmas.

Em seguida, foram realizadas lavagens com 1mL de PBS, homogeneização em vórtex e centrifugação a 2200rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso com 400µL de PBS para leitura no citômetro de fluxo.

Foram adquiridos 50.000 eventos por tubo, utilizando-se o citômetro de fluxo LSRFortessa BD® e o software BD FACSDIVA® 8.0.1, para aquisição e registro dos resultados. A análise dos resultados foi realizada por meio do software FlowJo ® versão 9.5.1.

A estratégia de análise está representada na Figura 7.

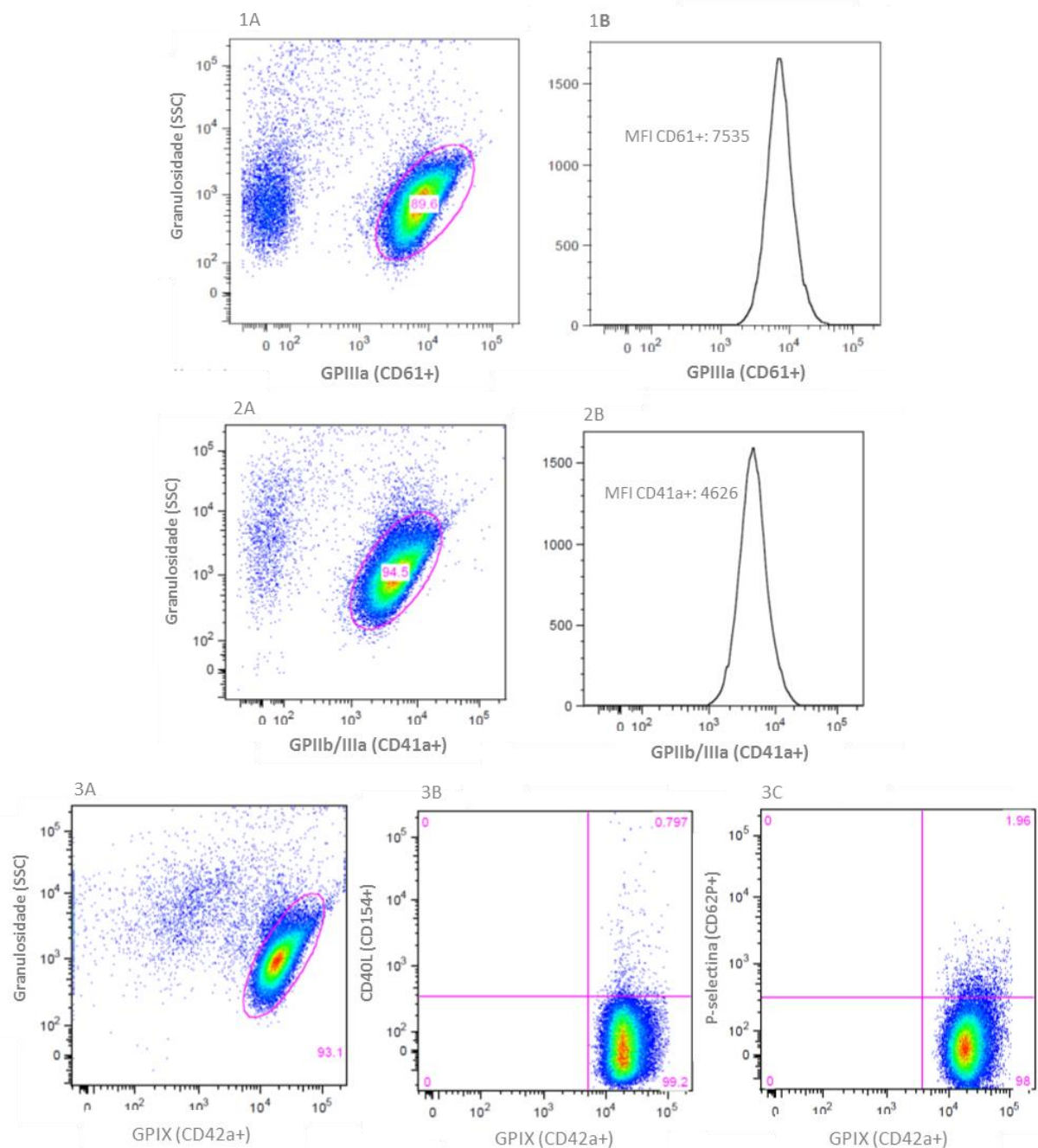


Figura 7: Estratégias para análise da expressão dos marcadores de ativação plaquetária por citometria de fluxo.

1A: Seleção da população GPIIb/IIIa (CD41a+); 1B: histograma e MFI de GPIIb/IIIa (CD41a+); 2A: Seleção da população GPIIIa (CD61+); 2B: histograma e MFI de GPIIIa (CD61+); 3A: Seleção da população GPIX (CD42a+); 3B: percentagem da população duplo positiva GPIX/CD40L (CD42a+/CD154+); 3C: percentagem da população duplo positiva GPIX/ P-selectina (CD42a+/CD62P+).

Para GPIIb/IIIa (CD41a) e GPIIIa (CD61), a população de plaquetas foi selecionada por tamanho *versus* granulosidade (FSC x SSC), seguida de SSC *versus* fluorescências específicas de cada anticorpo monoclonal (anti-CD61-PE para plaquetas CD61+ e anti-CD41a-PE para plaquetas CD41a+ (Figura 7: 1A e 2A). Foram

utilizados histogramas unidimensionais de cada fluorocromo para estabelecer a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para as glicoproteínas plaquetárias CD41a e CD61 (Figura 7: 1B e 2B). Para as análises da expressão de P-selectina (CD62P+) e de CD40L (CD154+), a população de plaquetas positivas para CD42a foi selecionada (Figura 7: 3A) e, a partir dessa, o percentual de plaquetas positivas para CD154 (Figura 7: 3B) e CD62P (Figura 7: 3C). Os resultados foram expressos em percentual de plaquetas CD42a+/CD154+ e CD42a+/CD62P+, correspondente ao quadrante superior direito-duplo positivo.

4.3.3 Protocolo de estudo dos agregados plaquetas-leucócitos

As análises da formação de agregados plaquetas-monócitos (APM) e de agregados plaquetas-neutrófilos (APN) foram realizadas por citometria de fluxo, a partir do sangue total obtido das amostras colhidas em citrato de sódio.

O protocolo foi baseado no estudo de Freitas (2012) ¹³⁹ e nas instruções do fabricante dos anticorpos monoclonais. Algumas adaptações foram realizadas no protocolo, bem como a titulação dos anticorpos, para definição da concentração mais adequada para a população avaliada no presente estudo.

Os leucócitos foram incubados com os anticorpos em até 2 horas após a coleta do sangue. Alíquotas de 100µL de sangue total foram adicionadas a 4 tubos de poliestireno e 3 desses foram incubados com os anticorpos monoclonais (Becton Dickinson Pharmingen®) dirigidos contra glicoproteínas plaquetárias (CD51/CD61), monócitos (CD14) e neutrófilos (CD16), conforme descrito na Tabela 3. O 4º tubo foi utilizado como controle interno de autofluorescência (branco), no qual o sangue total foi incubado na ausência de anticorpos monoclonais.

Tabela 3: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para avaliação de agregados plaquetas-leucócitos.

Tubos	Reagente/ anticorpo	Fluorocromo	Catálogo/ Referência	Volume	Clone	Fenótipo alvo
1	PBS	-		20µL	-	-
2	Anti-CD51/CD61	FITC	555505, BD®	0,1µL	23C6	Integrina α V β 3
	Anti-CD14	PE	345785, BD®	0,4µL	M5E2	Monócitos
3	Anti-CD51/CD61	FITC	555505, BD®	0,1µL	23C6	Integrina α V β 3
	Anti-CD16	PECy5	555408, BD®	0,1µL	3G8	Neutrófilos
4	Anti-CD14	PE	345785, BD®	0,4µL	M5E2	Monócitos
	Anti-CD16	PECy5	555408, BD®	0,1µL	3G8	Neutrófilos

PBS: tampão fosfato-salino; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PECy5: ficoeritrina-cianina 5

Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a incubação com os anticorpos, foram adicionados 2mL de uma solução de lise de hemácias (citrato trissódico dihidratado a 25g/L; heparina comercial a 5000UI/mL; formaldeído a 54v/v; dietileno glicol a 30v/v; pH ajustado para 7,85, diluída 10 vezes em água destilada), seguido de homogeneização em vórtex e incubação por 10 minutos, ao abrigo da luz. Os tubos foram centrifugados a 1.300rpm durante 7 minutos, o sobrenadante desprezado por inversão e o excesso foi retirado vertendo-se o tudo sobre papel absorvente. O pellet foi ressuspensão em vórtex e os leucócitos foram lavados com 2mL de PBS. As etapas de centrifugação e descarte do sobrenadante foram repetidas. O pellet foi então ressuspensão em 200µL de PBS e, em seguida foi realizada a leitura de 50.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo (BD LSRFortessa). O software BD FACSDIVA® 6.2 foi utilizado para a aquisição dos dados.

A análise dos resultados foi realizada por meio do software FlowJo®. A estratégia de análise foi realizada conforme Figura 8.

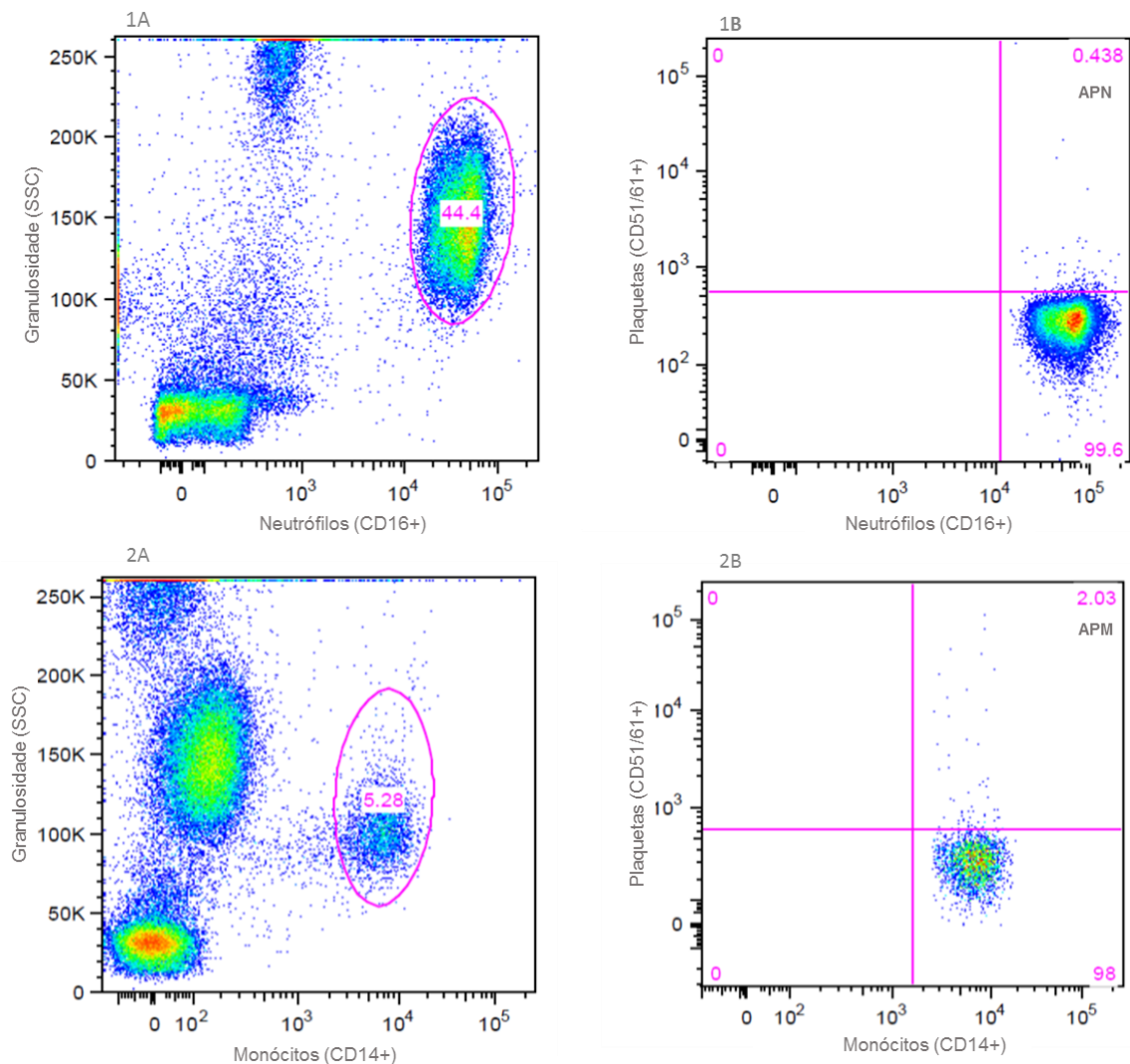


Figura 8: Estratégias para análise da formação dos agregados plaquetas-leucócitos por citometria de fluxo.

1A: Seleção da população de neutrófilos (CD16+); 1B: Percentagem de agregados plaquetas-neutrófilos- APN (CD51/61+ / CD16+); 2A: Seleção da população de monócitos (CD14+); 2B: Percentagem de agregados plaquetas-monócitos- APM (CD51/61+ / CD14+).

Um total de 50.000 eventos por tubo foi obtido usando o citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como percentual da população CD51/CD61+/CD14+ (APM) e CD51/CD61+/CD16+ (APN), correspondente ao quadrante superior direito-duplo marcado.

Para a análise seletiva de neutrófilos e determinação de APN, foi constituído o gráfico com combinação de anti-CD16 PEcy5 (ou neutrófilos, CD16+) *versus* SSC (granulosidade). A população de interesse (positiva para CD16) foi selecionada e, a partir dessa, feito o gráfico anti-CD16 PEcy5 (ou neutrófilos, CD16+) *versus* anti-CD51/CD61 FITC (plaquetas, CD51/CD61+) para definir a percentagem de APN

(Figura 8: 1A e 1B). Dessa forma, foi determinada a percentagem da população duplo-positiva CD16+/ CD51/61+.

Para a análise seletiva de monócitos e determinação de APM, foi constituído o gráfico com combinação de anti-CD14 PE (ou monócitos, CD14+) *versus* SSC (granulosidade). A população de interesse (positiva para CD14) foi selecionada e, a partir dessa, feito o gráfico anti-CD14 PE (monócitos, CD14+) *versus* anti-CD51/CD61 FITC (plaquetas, CD51/CD61+) para definir a percentagem de APM (Figura 8: 2A e 2B). Dessa forma, foi determinada a percentagem da população duplo-positiva CD14+/ CD51/61+.

4.3.4 Determinação dos níveis plasmáticos de sE-Selectina

A determinação de E-Selectina solúvel no plasma foi feita por ELISA quantitativo tipo sanduíche, utilizando-se o *Kit* Quantikine® ELISA sE-Selectin/CD62E (R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EUA; Catálogo: DUP00), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na captura dos antígenos sE-Selectina presentes nos plasmas testados por anticorpos policlonais anti-sE-Selectina, fixados na superfície de uma microplaca. Os antígenos não capturados foram retirados por lavagens sucessivas. Em seguida, adicionou-se anticorpos policlonais conjugados à peroxidase, que se ligaram a determinantes antigênicos do sE-Selectina (capturados na etapa anterior). Os anticorpos conjugados com peroxidase que não se ligaram ao foram retirados por lavagens sucessivas. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa foi feita pela reação da enzima peroxidase (HRP) ligada ao anticorpo secundário, com o substrato TMB (perborato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina), que gerou um produto de coloração azul. Essa reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor tornou-se amarela. A intensidade da cor produzida (determinada fotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de sE-Selectina na amostra plasmática.

As absorvâncias das amostras foram determinadas utilizando-se o leitor de microplacas VersaMaxMicroplate Reader- MOLECULAR DEVICES®. Os níveis plasmáticos de sE-Selectina foram calculados interpolando-se as leituras das

amostras em uma curva-padrão, construída com padrões de concentração conhecida e utilizando o *software* SoftMax Pro®.

Os valores de sE-Selectina encontrados pelo fabricante para amostras de plasma de indivíduos saudáveis foram de 13,0 a 51,3ng/mL ($29,6 \pm 9,4$).

O mesmo princípio do teste de ELISA é aplicável aos demais marcadores avaliados no presente estudo (itens 4.3.5 a 4.3.9), porém substituindo-se os antígenos E-selectina e anticorpos monoclonais anti-E-selectin pelos demais marcadores.

4.3.5 Determinação dos níveis plasmáticos de VEGF

A determinação do VEGF plasmático foi feita por ELISA quantitativo tipo sanduíche, cujo princípio é o mesmo descrito para sE-selectina, com as devidas substituições de antígenos e anticorpos monoclonais. Foi utilizado o *Kit* Human VEGF ELISA (DRG Diagnostics®, Germany; REF EIA-4819, Lote nº120822), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

O fabricante não forneceu valores de referência para os níveis plasmáticos do VEGF. No presente estudo foram utilizados os valores do grupo-controle como referência.

4.3.6 Determinação dos níveis plasmáticos de sICAM-1

A determinação do ICAM-1 plasmático foi feita por ELISA quantitativo tipo sanduíche, cujo princípio é o mesmo descrito para sE-selectina, com as devidas substituições de antígenos e anticorpos monoclonais. Foi utilizado o *Kit* Quantikine® ELISA sICAM-1/CD54 (R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EUA; Catálogo: DCD540; Lote: 313330), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

Os valores de sICAM-1 encontrados pelo fabricante para amostras de EDTA de indivíduos saudáveis foram de 100 a 307ng/mL ($211 \pm 42,9$).

4.3.7 Determinação dos níveis de plasmáticos de sVCAM-1

A determinação do sVCAM-1 plasmático foi feita por ELISA quantitativo tipo sanduíche, cujo princípio é o mesmo descrito para sE-selectina, com as devidas substituições de antígenos e anticorpos monoclonais. Foi utilizado o *Kit* Quantikine® ELISA sVCAM-1/CD106 (R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EUA; Catálogo: DVC00;

Lote: 313355), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. As amostras de plasma colhido em EDTA foram descongeladas à temperatura ambiente para realização dos testes.

Os valores de sVCAM-1 encontrados pelo fabricante para amostras de EDTA de indivíduos saudáveis foram de 341 a 897ng/mL ($531 \pm 132,5$).

4.3.8 Determinação dos níveis plasmáticos de suPAR

A determinação de uPAR solúvel no plasma (suPAR) foi feita por ELISA quantitativo tipo sanduíche, cujo princípio é o mesmo descrito para sE-selectina, com as devidas substituições de antígenos e anticorpos monoclonais. Foi utilizado o *Kit* Quantikine® ELISA Human uPAR (R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EUA; Catálogo: DUP00), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

Os valores de suPAR encontrados pelo fabricante para amostras de plasma de indivíduos saudáveis foram de 864 a 3829ng/mL.

4.3.9 Determinações dos níveis plasmáticos de ADAMTS13

A determinação da ADAMTS13 plasmática foi feita por ELISA sanduíche, cujo princípio é o mesmo descrito para sE-selectina, com as devidas substituições de antígenos e anticorpos monoclonais. Foi utilizado o *Kit* IMUBIND® ADAMTS13 (Sekisui Diagnostics®, Stamford, USA; REF 813RUO, Lote n°130801), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

O valor de ADAMTS13 para o plasma de referência fornecido pelo fabricante (controle positivo - lote 130425) era $24,0 \pm 3,6$ ng/mL, e o valor obtido no experimento foi 22,2ng/mL. O fabricante não fornece valores dos níveis plasmáticos normais de ADAMTS13.

4.3.10 Determinação dos níveis plasmáticos de FVW

A determinação dos níveis plasmáticos de FVW foi feita por ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) tipo sanduíche, cujo princípio é o mesmo descrito para sE-selectina, com as devidas substituições de antígenos e anticorpos monoclonais. Foi utilizado o *Kit* IMUBIND® FVW (Sekisui Diagnostics®, Stamford, USA; REF 828, Lote n°131502), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O fabricante não forneceu valores de referência para os níveis plasmáticos do FVW.

4.3.11 Hemograma completo e dosagem de creatinina dos participantes do grupo-controle

Para os participantes do grupo controle foi realizado o hemograma completo, utilizando a amostra colhida em EDTA, utilizando o contador automático de células Coulter T890® e a contagem diferencial de leucócitos foi feita por microscopia ótica.

A dosagem de creatinina foi feita na alíquota de soro, utilizando o conjunto diagnóstico *Creatinina Analisa*® (Catálogo 335, lote 3003), por metodologia cinética de dois pontos. As leituras das absorvâncias foram feitas no espectrofotômetro BTR811 Analisa®.

Os resultados dos exames laboratoriais de rotina das crianças com DRC foram obtidos por meio da consulta aos prontuários clínicos.

4.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se os programas Prism 6.0® e MINITAB 17®. Os dados foram primeiramente submetidos a uma análise descritiva, tanto em conjunto como individualizados por grupos, e analisados quanto à normalidade pelo teste *Shapiro-Wilk*.

Os resultados entre o grupo de pacientes (DRC) e o grupo-controle saudável foram comparados. As variáveis que seguiram a normalidade foram submetidas ao teste *t-Student* (se dois grupos) ou *ANOVA/ Bonferroni* (se três ou mais grupos para comparação de médias). Para as variáveis não-normais, foi realizado o teste de *Mann-Whitney* (se dois grupos) ou o teste de *Kruskal-Wallis*, para comparação de medianas. O coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para medir a associação entre os marcadores de ativação plaquetária e endotelial, para pacientes com DRC e para o controle saudável.

Dois modelos de regressão logística binária foram realizados para todos os participantes para se avaliar a relação conjunta dos biomarcadores plaquetários e endoteliais com o status doente *versus* não-doente. As curvas ROC (e a área sob a curva) foram utilizadas para avaliar o ajuste dos modelos.

Para todos os testes, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas da população estudada

O presente estudo incluiu 95 participantes, sendo 43 pacientes pediátricos com DRC e 52 crianças e adolescentes saudáveis, pareados por idade e sexo com os pacientes (como grupo controle). Os dados clínicos dos participantes estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Características clínicas e epidemiológicas dos participantes do estudo.

Parâmetros		Grupo DRC (n=43)	Grupo Controle (n=52)	P
Idade (anos)		14 (10–15)	11 (10-14)	-
Gênero Masculino [n (%)]		26 (60,5%)	34 (65,4%)	-
Feminino [n (%)]		17 (39,5%)	18 (34,6%)	-
Percentil altura		16 (3-40)	70 (57-93)	0,0141
Percentil peso		10 (0-50)	76 (42-95)	0,0049
IMC (Kg/m ²)		16,20 (14,38-19,49)	19,35 (16,83-21,55)	0,0188
Pressão arterial	Sistólica	107,2±12,0	-	-
	Diastólica	66,3 ± 11,2	-	-
Hipertensão arterial		32 (74,4%)	-	-
Medicamentos				
Uso de um ou mais hipotensores e/ou renoprotetores [n (%)]		31 (72,1%)	-	-
IECA		23 (53,5%)	-	-
BRA		2 (4,7%)	-	-
Beta-bloqueador		1 (2,3%)	-	-
Antagonista de canal de cálcio		5 (11,6%)	-	-
Diurético		19 (44,2%)	-	-
Estatinas		4 (9,3%)	-	-
Bicarbonato de sódio		26 (60,4%)	-	-
Imunossupressores [n (%)]*		4 (9,3%)	-	-
Tratamento da anemia**		12 (27,9%)	-	-

Dados obtidos dos prontuários médicos.

IMC: índice de massa corporal; DRC: doença renal crônica; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; BRA: antagonistas dos receptores de angiotensina; RFG: taxa de filtração glomerular. *Imunossupressores prednisona, ciclosporina ou outros; **Uso de eritropoietina e/ou sulfato ferroso. (ns): não há diferença significativa entre os grupos

Em relação à etiologia da DRC, 26 pacientes (60,4%) tinham CAKUT, 9 (20,9%) tinham glomerulopatias e 8 (18,6%) tinham DRC de etiologias distintas de glomerulopatias ou CAKUT, todas em estágio 3 ou 4 da doença renal.

5.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais

Os dados laboratoriais coletados dos prontuários médicos dos pacientes pediátricos com DRC, bem como os dados obtidos em laboratório para o grupo-controle, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados laboratoriais dos participantes do estudo.

Parâmetros	Grupo DRC (n=43)	Grupo Controle (n=52)	P
N° de hemácias x 10 ⁶ /mL	4,3±0,7 (n=34)	4,7±0,4 (n=52)	0,001
Hemoglobina (g/dL)	12,2±1,5 (n=39)	13,4±2,3 (n=52)	<0,0001
Hematócrito (%)	37±5 (n=39)	40±4 (n=52)	0,192 (ns)
N° de plaquetas x 10 ³ /mL	257,6±123,7 (n=35)	275,1±61,1 (n=52)	0,388 (ns)
N° de leucócitos x 10 ³ /mL	7,9±3,8 (n=34)	5,9±1,6 (n=52)	0,002
RFG (mL/min/1,73m ²)	40,3 (25,5-65,2) (n=43)	110,8 (102,0-131,0) (n=52)	<0,0001
Creatinina (mg/dL)	2,0 (1,2-3,2) (n=43)	0,8 (0,7-0,9) (n=52)	<0,0001
Ureia (mg/dL)	75,9±38,4 (n=42)	-	-
Sódio (mmol/L)	141,6±3,1 (n=42)	-	-
Potássio (mmol/L)	4,7±0,7 (n=43)	-	-
Cloreto (mmol/L)	105,0±3,8 (n=38)	-	-
Cálcio (mg/dL)	9,5±0,8 (n=42)	-	-
Fosfato (mg/dL)	5,3 (4,7-5,6) (n=38)	-	-
Ácido úrico (mg/dL)	6,5±1,6 (n=31)	-	-
Colesterol total (mg/dL)	160,0 (147,8-195,3) (n=30)	-	-
Triglicérides (mg/dL)	109,0 (75,0-143,0) (n=31)	-	-

Dados dos pacientes obtidos dos prontuários médicos com os resultados da mesma data da coleta sanguínea para a pesquisa. A variação do número de indivíduos (n) por grupo por analito ocorreu devido à ausência de resultados nos prontuários na data dos exames. RFG: ritmo de filtração glomerular. (ns): não houve diferença significativa entre os grupos

5.3 Avaliação dos biomarcadores de ativação plaquetária P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa, CD40L, agregados plaquetas-leucócitos (APM e APN)

O resultado da expressão dos marcadores de ativação plaquetária e dos agregados plaquetas-leucócitos para os pacientes pediátricos com DRC e para o grupo-controle estão listados na Tabela 6.

Tabela 6: Expressão dos biomarcadores de ativação plaquetária nos participantes do estudo.

Parâmetros	Grupos		P
	DRC (n=43)	Controle (n=52)	
P-selectina (%)	1,65 (1,230)	2,36 (1,897)	0,0003
GPIIbIIIa (MFI)	3537 (1954)	3690 (1277)	0,2241
GPIIIa (MFI)	3222 (1984)	6765 (2006)	<0.0001
CD40L (%)	0,534 (0,412)	0,422 (0,709)	0,3507
APM (%)	1,61 (0,628)	1,32 (0,438)	0,0008
APN (%)	0,217 (0,213)	0,188 (0,097)	0,1015

Dados apresentados em mediana (amplitude interquartil). Comparações entre os grupos realizadas por teste de *Mann-Whitney*. Diferenças significativas se $p \leq 0,05$.

MFI: Intensidade Média de fluorescência; APM: agregados plaquetas-monócitos; APN: agregados plaquetas-neutrófilos.

O grupo com DRC apresentou menor expressão plaquetária de P-selectina e de GPIIIa e uma percentagem maior de agregados plaquetas-monócitos formados em relação ao grupo-controle ($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatística entre a expressão de GPIIbIIIa, CD40L e APN, comparando-se os dois grupos.

A distribuição dos valores obtidos para P-selectina, GPIIbIIIa, GPIIIa e CD40L, bem como os valores de p representando as diferenças estatísticas entre os grupos, estão apresentados na Figura 9.

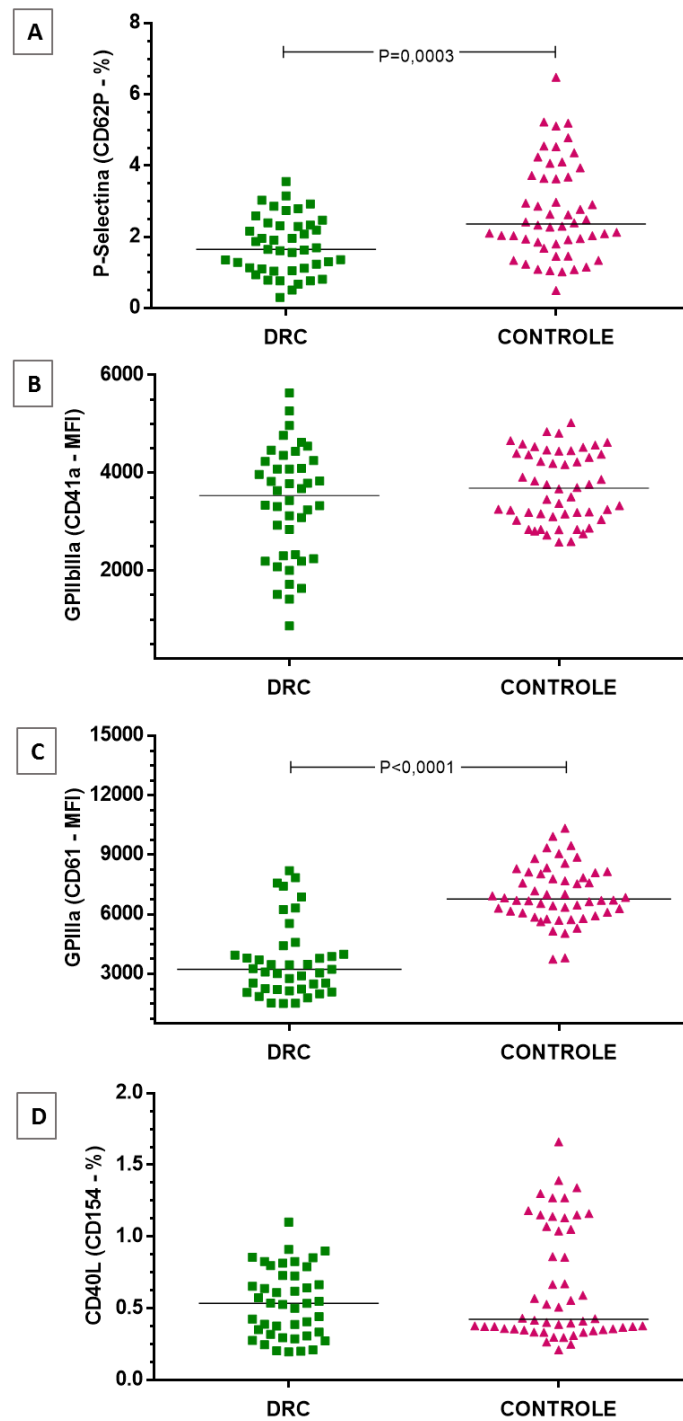


Figura 9: Distribuição dos valores de expressão dos biomarcadores de ativação plaquetária P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa e CD40L nos grupos DRC e controle.

(As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. $p<0,05$: diferenças estatísticas entre os grupos)

A distribuição dos valores das percentagens de agregados plaquetas-monócitos (APM) e plaquetas-neutrófilos (APN) por grupo, bem como os valores de P

representando as diferenças estatísticas entre os grupos, estão apresentadas na Figura 10.

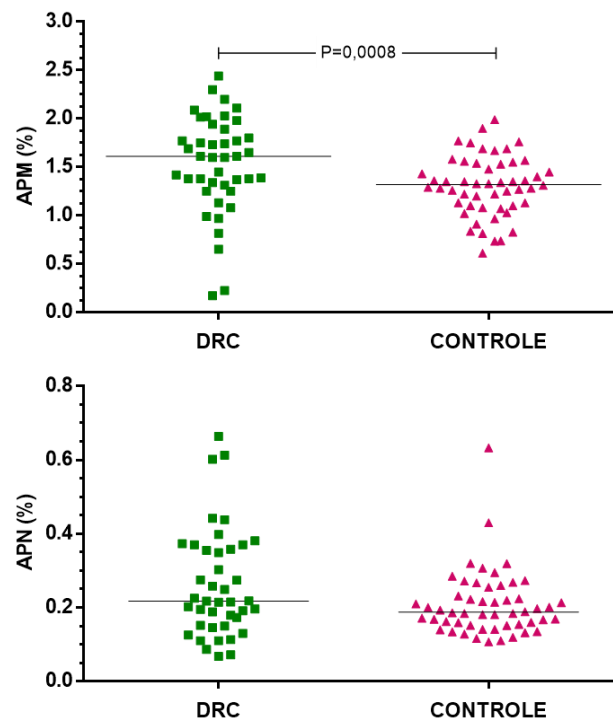


Figura 10: Distribuição dos valores obtidos para a percentagens de plaquetas-monócitos (APM) e plaquetas-neutrófilos (APN) nos grupos DRC e Controle.

(As barras horizontais representam as medianas de cada grupo; $p < 0,05$: diferenças estatísticas entre os grupos)

5.4 Avaliação dos biomarcadores de ativação endotelial

5.4.1 sE-selectina, sVEGF, sVCAM-1 e sICAM-1

Os níveis plasmáticos de sE-selectina, VEGF, sICAM-1 e sVCAM-1 avaliados na DRC e controle estão listados na Tabela 7.

Tabela 7: Níveis plasmáticos dos biomarcadores endoteliais sE-selectina, VEGF, sICAM-1 e sVCAM-1 para o grupo com DRC e para o grupo-controle.

Parâmetros	Grupos		P
	DRC (n=38)	Controle (n=31)	
sE-Selectina (ng/mL)	40,39 (32,95)	32,87 (15,16)	0,0005
VEGF (pg/mL)	253,7 (155,10)	111,0 (86,15)	<0,0001
sICAM-1 (ng/mL)	254,1 (128,50)	202,0 (109,20)	0,0024
sVCAM-1 (ng/mL)	925,6 (340,50)	511,7 (145,20)	<0,0001

Dados apresentados em mediana (amplitude interquartil). Comparações entre os grupos realizadas por teste de *Mann-Whitney*. Diferenças significativas se $p \leq 0,05$.

Os pacientes pediátricos com DRC apresentaram valores elevados em todos os parâmetros endoteliais avaliados em relação ao grupo-controle ($p \leq 0,05$).

A distribuição dos resultados de sE-selectina, VEGF, sICAM-1 e sVCAM-1 por grupo, bem como os valores de p representando as diferenças estatísticas entre os grupos, estão apresentadas na Figura 11.

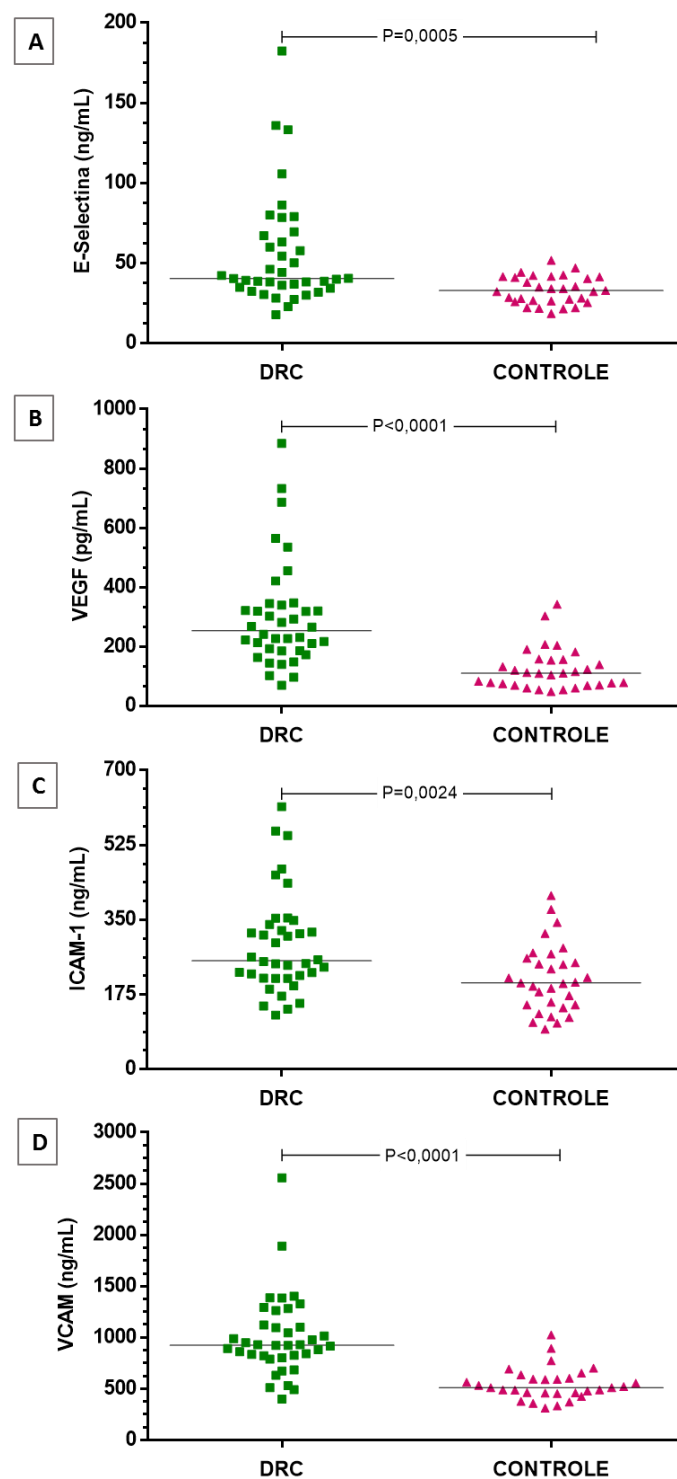


Figura 11: Distribuição dos valores de sE-selectina (ng/mL), VEGF (pg/mL), sICAM-1 (ng/mL) e sVCAM (ng/mL) para os grupos DRC e controle.

(As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. $p<0,05$: diferenças estatísticas entre os grupos)

5.4.2 suPAR, FVW e ADAMTS13

Os níveis plasmáticos dos marcadores de ativação endotelial e hemostáticos suPAR, ADAMTS13, FVW e da relação FVW:ADAMTS13 para os participantes do estudo estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Níveis plasmáticos dos biomarcadores endoteliais e hemostáticos suPAR, FVW e ADAMTS13 e da relação FVW:ADAMTS13 nos pacientes com DRC e no grupo-controle.

Parâmetros	Grupos		P
	DRC (n=38)	Controle (n=31)	
suPAR (pg/mL)	1216 (592,6)	615,8 (165,1)	<0,0001
ADAMTS13 (ng/mL)	1350 (532,0)	1505 (463,0)	0,2860
FVW (mU/mL)	1196 (529,3)	882,2 (505,5)	0,0002
FVW:ADAMTS13	0,852(0,364)	0,582 (0,418)	0,0003

Dados apresentados em mediana (amplitude interquartil). Comparações entre os grupos realizadas por teste de *Mann-Whitney*. Diferenças significativas se $p \leq 0,05$.

Os pacientes pediátricos com DRC apresentaram valores elevados de suPAR e de FVW em relação ao grupo-controle. Os níveis de ADAMTS13 não diferiram entre os grupos, porém quando realizada a relação entre os níveis de FVW e ADAMTS13, o grupo com DRC apresentou valores significativamente maiores em relação ao grupo-controle.

A distribuição dos valores de suPAR, ADAMTS13, FVW e da relação FVW:ADAMTS, bem como as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados, estão apresentadas na Figura 12.

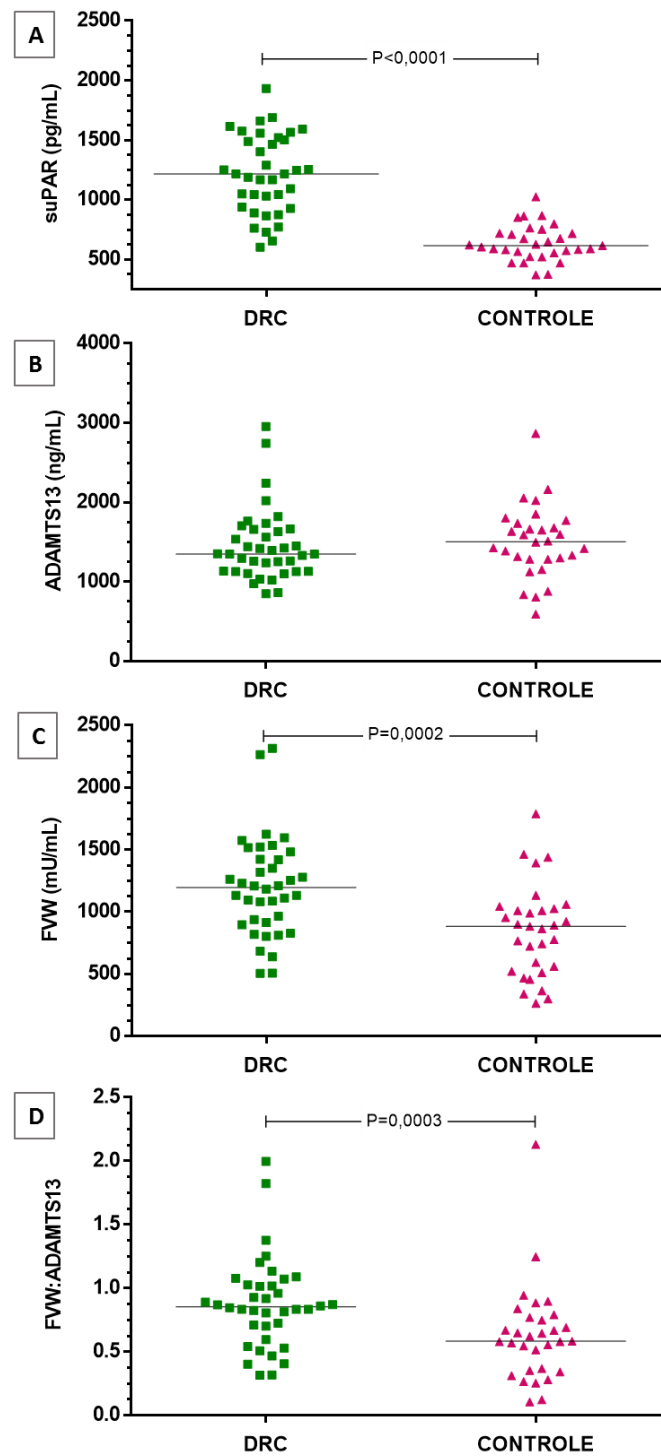


Figura 12: Distribuição dos valores de suPAR (pg/mL), ADAMTS13 (ng/mL), FWW (mU/mL) e relação FWW:ADAMTS13 para os grupos DRC e Controle.

(As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. $p < 0,05$: diferenças estatísticas entre os grupos)

5.5 Comparação dos biomarcadores em relação ao uso dos medicamentos antagonistas do sistema renina-angiotensina (SRA)

Os medicamentos antagonistas do SRA incluem os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA), e são utilizados não só para tratamento da hipertensão como também para controle da proteinúria e nefroproteção. Dos 43 pacientes avaliados, 25 faziam uso desses medicamentos, todos em monoterapia (n=23 com IECA e n=2 com BRA).

Para avaliar a influência do uso dos medicamentos antagonistas do SRA nas funções plaquetária e endotelial, os pacientes foram distribuídos em dois grupos, usuários (SIM) e não-usuários (NÃO) desses medicamentos. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados das análises entre esses dois grupos.

Tabela 9: Diferenças estatísticas entre os biomarcadores em relação ao uso de medicamentos antagonistas do SRA.

Parâmetros	Uso dos antagonistas do SRA		p
	Sim (n=25)	Não (n=18)	
P-selectina (%)	1,65 (1,24)	1,625 (1,37)	0,7469
GPIIb/IIIa (MFI)	3483 (1527)	3557 (1965)	0,5821
GPIIIa (MFI)	3042 (1600)	3937 (3540)	0,2824
CD40L (%)	0,619 (0,515)	0,4705 (0,2588)	0,2328
APM (%)	1,72 (0,622)	1,385 (0,615)	0,0718
APN (%)	0,218 (0,221)	0,216 (0,155)	0,4464
sE-Selectina (ng/mL)	38,39 (27,46)	49,34 (51,5)	0,0370**
VEGF (pg/mL)	227,1 (145,4)	266,9 (154,5)	0,3593
sICAM-1 (ng/mL)	274,1 (116,2)	234,5 (189,7)	0,2433
sVCAM-1 (ng/mL)	928,2 (462)	919,7 (334,4)	0,4926
suPAR (pg/mL)	1251 (643,7)	1178 (514,0)	0,8339
ADAMTS13 (ng/mL)	1407 (401)	1131 (641)	0,0980
FVW (mU/mL)	1091 (433,9)	1385 (409,0)	0,0102**
FVW:ADAMTS13	0,8090 (0,405)	0,9870 (0,441)	0,0032**

Dados apresentados como média±desvio-padrão se distribuição segue a normalidade. Valores em mediana (amplitude interquartil). SRA: sistema renina-angiotensina; FVW (fator de von Willebrand). **: diferença significativa entre usuários e não-usuários dos inibidores do SRA (p<0,05).

De todas as variáveis, somente a sE-selectina, o FVW e a relação FVW:ADAMST13 apresentaram reduzidos nos pacientes que faziam uso de antagonistas do SRA.

5.6 Análises de Correlação

As correlações (*Spearman*) entre as variáveis obtidas no presente estudo foram testadas para todos os participantes, e também isoladamente para o grupo-controle e para o grupo com DRC. O objetivo dessa análise foi verificar se as variáveis possuíam associação em sua produção ou expressão.

No APÊNDICE 3 estão apresentadas todas as correlações obtidas de todos os participantes e por grupo (DRC e Controle), bem como seus níveis de significância. Como o número de correlações foi bastante extenso, para possibilitar interpretação dos resultados, a representação das correlações foi realizada com os biomarcadores de ativação plaquetária, o RFG, FVW e ADAMTS13 em uma análise e os biomarcadores de ativação endotelial, RFG, FVW, e ADAMTS13 em outra análise. Nas Figuras 13 e 14 podem ser visualizadas as redes de correlações entre esses biomarcadores.

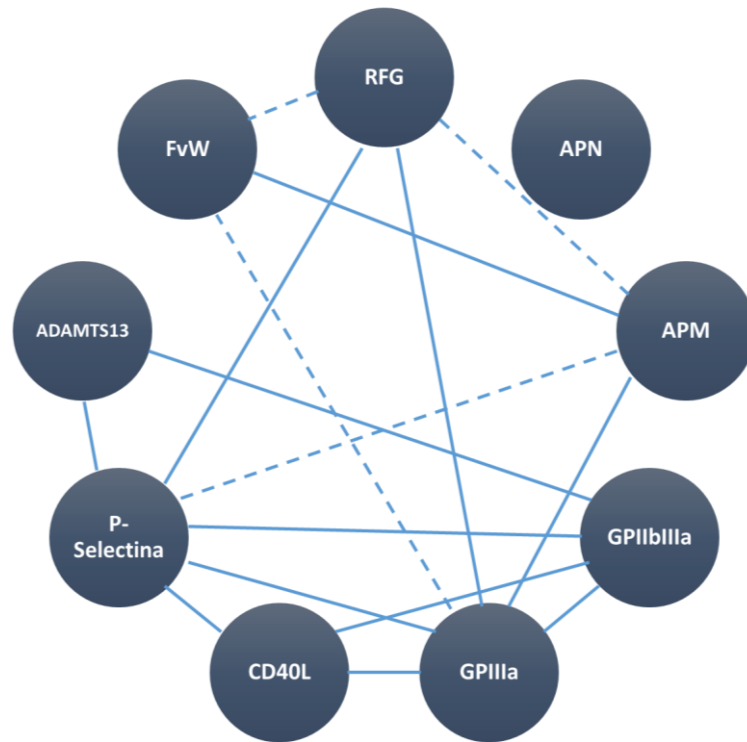


Figura 13: Correlações (Spearman) entre os marcadores de expressão plaquetária, FvW, ADAMTS13 e RFG.

Foram consideradas correlações significativas se $p \leq 0,05$, com coeficiente r de 0,2 a 1. As linhas sólidas representam correlação positiva. As linhas pontilhadas representam correlação negativa.

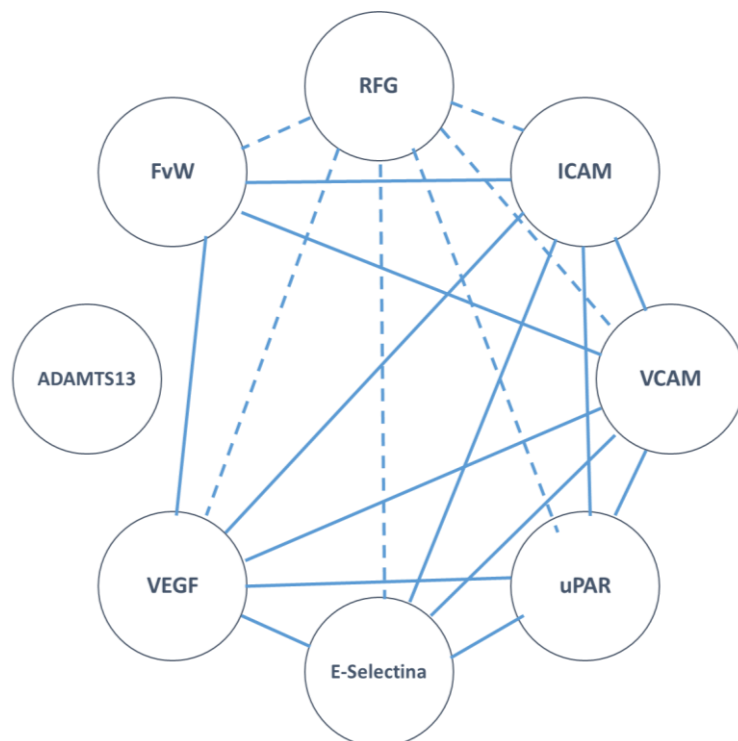


Figura 14: Correlações (Spearman) entre os marcadores de ativação endotelial, FvW, ADAMTS13 e RFG.

Foram consideradas correlações significativas se $p \leq 0,05$, com coeficiente r de 0,2 a 1. As linhas sólidas representam correlação positiva. As linhas pontilhadas representam correlação negativa.

5.7 Análises de Regressão Logística

Para avaliar a relação conjunta dos biomarcadores estudados e a presença da DRC, dois modelos de regressão logística binária foram ajustados para a condição do paciente (DRC, não-DRC) como variável resposta, baseado nos critérios de diagnóstico da doença, considerando os valores de RFG e marcadores plaquetários (ou marcadores endoteliais) como variáveis explicativas.

Para os marcadores plaquetários, o modelo final manteve os parâmetros GPIIIa, CD40L e P-selectina. A P-selectina, embora tenha apresentado coeficiente de regressão com $p=0,11$, foi mantida no modelo, uma vez que se mostrou importante teoricamente e melhorou o ajuste ($p<0,05$ no Teste de bondade de ajuste de Hosmer-Lemeshow). Este modelo estima a probabilidade π de um paciente ser doente por meio da equação ajustada

$$\pi = [1 + e^{-(7,15 - 0,02793x - 0,000856y + 3,19z - 0,734w)}]^{-1} \text{ (Eq. 1),}$$

onde x é o valor de RFG, y o valor de GPIIIa, z o valor de CD40L e w o valor de P-selectina. Por esta equação, um paciente seria classificado como “potencial doente” para valores altos de π .

Como demonstrado na Figura 15, o boxplot desta probabilidade calculada mostra que ela é marcadamente mais elevada nos pacientes com DRC. A curva ROC mostra que este modelo tem alta capacidade preditiva (área sob a curva ROC igual a 0,922). O melhor ponto de corte (cut-off) foi $\pi > 0,350$, que gerou uma classificação com sensibilidade igual a 0,829 e especificidade igual a 0,962.

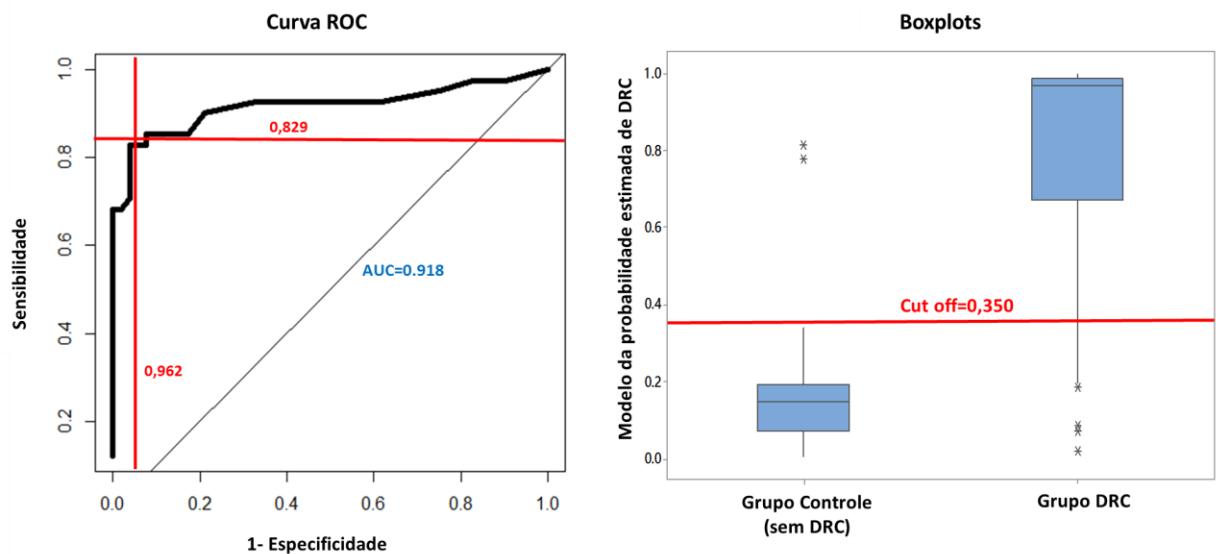


Figura 15: Curva ROC e boxplots de probabilidade estimada de DRC do modelo de regressão logística com biomarcadores de ativação plaquetária (GP11a, CD40L, e P-selectina) e RFG.

AUC: área sob a curva.

Para os marcadores endoteliais, o modelo final manteve os parâmetros suPAR, o FVW, o VCAM ($p=0,51$ no teste de bondade de ajuste de Hosmer-Lemeshow). Este modelo estima a probabilidade de um paciente ser doente por meio da equação ajustada:

$$\pi = [1 + e^{-(12,88 + 0,00506x + 0,00783y + 0,00284z)}]^{-1} \text{ (Eq. 2),}$$

onde x é o valor de VCAM, y é o valor de suPAR, z é o FVW. Por esta equação, um paciente seria classificado como “potencial doente” para valores altos de π .

Como demonstrado na Figura 16, o boxplot desta probabilidade calculada mostra que essa foi marcadamente mais elevada nos pacientes com DRC. A curva ROC mostra que este modelo tem alta capacidade preditiva (área sob a curva ROC igual a 0,964). O melhor ponto de corte (*cut-off*) foi $\pi > 0,575$, que gerou uma classificação com sensibilidade igual a 0,921 e especificidade igual a 0,968.

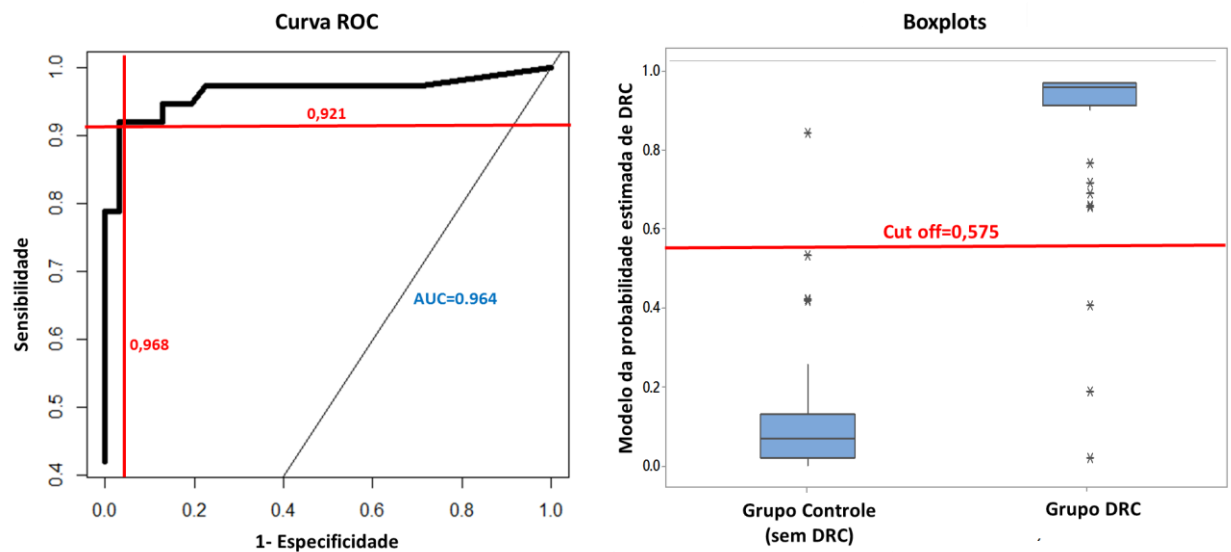


Figura 16: Curva ROC e boxplots de probabilidade estimada de DRC do modelo de regressão logística com biomarcadores de ativação endotelial (suPAR e FWV) e RFG.

AUC: área sob a curva.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas 95 crianças e adolescentes, sendo 43 portadoras de DRC e 52 crianças e adolescentes saudáveis, pareados por idade e sexo com os pacientes (grupo controle).

As crianças e adolescentes com DRC foram distribuídas em grupos de acordo com a etiologia da DRC: Glomerulopatias, CAKUT e outras etiologias. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os biomarcadores avaliados no presente estudo. Dessa forma, foi possível verificar que as etiologias não foram relevantes para originar diferenças nas moléculas estudadas.

6.1 Características clínico-laboratoriais dos pacientes pediátricos com DRC

A análise percentual dos 43 pacientes pediátricos com DRC em estágio avançado pré-diálise evidenciou que 9 (20,9%) eram portadores de glomerulopatias, 26 (62,4%) portadores de CAKUT e 8 (14,8%) portadoras de DRC por etiologias distintas de glomerulopatias ou CAKUT.

Em concordância com outros estudos na literatura, no presente estudo foi obtida maior porcentagem de crianças portadoras de CAKUT em relação às outras etiologias da DRC ^{2; 4; 31}. Dados semelhantes, relativos à frequência das glomerulopatias e de CAKUT na Unidade de Nefrologia Pediátrica do HC/UFG, foram obtidos para a população americana em 2008 ² e também para a população pediátrica brasileira em diálise crônica em 2015 ³⁶.

Dentre os portadores de CAKUT, o refluxo vesicoureteral foi a malformação mais comum, tendo sido diagnosticado em 7 crianças (16,2%). Esse dado está de acordo com outro estudo, realizado com levantamento de dados entre 1969 e 2002 nessa mesma Unidade de Nefrologia Pediátrica, que incluiu as crianças e adolescentes com o mesmo perfil clínico-laboratorial dos integrantes do presente estudo ¹⁴⁰. A segunda causa mais frequente de CAKUT foi a válvula de uretra posterior, diagnosticada em 6 pacientes (13,9%).

Com relação ao gênero dos pacientes com DRC, houve maior ocorrência da doença no gênero masculino, com um percentual de 60,5%. O percentual de meninos por etiologia da doença foi 73% para os pacientes com CAKUT, 60% para glomerulopatias, 25% para os pacientes com outras etiologias. A maior porcentagem de participantes do gênero masculino está de acordo com outros relatos da literatura e, provavelmente, reflete a maior incidência de CAKUT em meninos ^{2; 4}. Dados da população pediátrica brasileira em diálise crônica revelaram uma prevalência de 52,5% de meninos e, também, maior percentual de meninos com CAKUT. As alterações genéticas relacionadas ao CAKUT ainda não são capazes de explicar a diversidade fenotípica das malformações^{141; 142}.

A mediana da idade dos pacientes com DRC do estudo foi de 14 (10,0-15,0) anos. A mediana dos percentis de altura e peso para os pacientes com DRC foram 15,5 e 10,0, e para as crianças saudáveis foram 70,5 e 75,5. O retardo do crescimento, que resulta em baixa estatura, é relatado na população pediátrica com DRC ⁴⁴. No conjunto, 32,5% dos pacientes com DRC apresentavam altura inferior ao percentil 5 para gênero e idade, indicando baixa estatura. É possível inferir a magnitude desses percentuais pela comparação com o grupo-controle, no qual apenas 3,8% das crianças e adolescentes apresentavam baixa estatura.

O retardo no crescimento de crianças e adolescentes com DRC está associado a vários fatores, principalmente por anormalidades do eixo GH-sistema IGF (hormônio de crescimento, fatores de crescimento insulina-símile ou *insulin-like growth factors*), prematuridade, acidose metabólica crônica, uso de corticosteroides, dieta inadequada e às perdas de massa muscular e óssea ¹⁴³. A acidose e a uremia podem contribuir para o retardo no crescimento por atuar no eixo GH-IGF, reduzindo a secreção do GH e os níveis de IGF-1. Além disso, a acidose causa resistência aos efeitos anabólicos do GH, suprime a síntese de albumina e promove o catabolismo proteico ¹⁴⁴.

A hipertensão constitui uma comorbidade frequente, tanto em adultos quanto na população pediátrica com DRC, e em muitos casos contribui para a progressão da doença ¹⁴⁵. Dos 43 pacientes com DRC do estudo, 31 (72,1%) utilizavam algum tipo de medicamento hipotensor e 11 (25,5%) apresentaram, no último atendimento médico, nível pressórico (sistólico ou diastólico) superior ao percentil 95 recomendado por idade, gênero e altura. Considerando a definição de hipertensão como nível pressórico (sistólico ou diastólico) superior ao percentil 95, recomendado por idade, gênero e altura, no último atendimento médico e/ou uso de medicamento hipotensor,

72,1% (n=31) dos pacientes pediátricos avaliados eram considerados hipertensos. De forma semelhante, um estudo coorte *Chronic Kidney Disease in Children Study* (CKiD), realizado nos Estados Unidos e no Canadá, revelou que 47% das crianças eram hipertensas e 64% faziam uso algum medicamento hipotensor¹⁴³.

A *Kidney Disease Outcome Quality Initiative* (KDOQI) recomenda que a população pediátrica com DRC mantenha a pressão arterial inferior a 130/80mmHg ou ao percentil 95 para idade, gênero e altura, o que for menor, a menos que haja alguma recomendação médica específica ⁴⁴. Cabe ressaltar que, embora a hipertensão arterial não seja uma causa frequente de DRC em crianças, é uma comorbidade que usualmente acompanha a doença e acredita-se que tenha grande influência na sua progressão. Crianças hipertensas com DRC possuem risco elevado de progressão da doença em relação às não hipertensas ²⁷.

Admite-se que a progressão da DRC em pacientes hipertensos seja atribuída a diversos mecanismos inter-relacionados, especialmente o SRA. Esse sistema influencia a progressão da lesão renal principalmente pelo aumento da formação de angiotensina II no tecido renal. A produção local de angiotensina II induz vasoconstrição predominante da arteríola renal eferente, o que eleva a pressão intraglomerular e, conseqüentemente, desencadeia hiperfiltração, proteinúria e a liberação de marcadores de inflamação e fibrose. Esses mecanismos determinam um ciclo vicioso que promove a lesão renal progressiva. Dessa forma, medicamentos que atuam nesse sistema são amplamente recomendados no tratamento de pacientes hipertensos com DRC ^{145; 146}.

A ativação da via clássica do SRA, formada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina II e seu receptor do tipo 1 (AT₁), promove hipertensão sistêmica e no capilar glomerular, o que pode produzir lesão no endotélio vascular e no glomérulo. As ações pró-fibróticas e pró-inflamatórias diretas da angiotensina II e da aldosterona também podem promover lesões renais. Dessa forma, os medicamentos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os antagonistas do receptor AT₁ da angiotensina II (BRA) são utilizados também no tratamento complementar da DRC, não apenas para diminuir a incidência de lesão renal causada pela hipertensão, como também reduzir a proteinúria e assim retardar a perda de função renal ^{52; 53}. De fato, 2 (4,6%) das crianças com DRC avaliadas no presente estudo estavam em uso de BRA e 23 (52,5%) usavam IECA.

A mediana do RFG calculada para as crianças com DRC foi significativamente inferior à mediana da taxa calculada para as crianças saudáveis (40,3 e 110,8, respectivamente, $P < 0,0001$), como esperado. Sabe-se que com a deterioração da função renal, um número menor de néfrons fica responsável pela função dos rins, o que resulta em aumento da pressão de filtração glomerular e hiperfiltração. A hipertensão intraglomerular eleva a pressão de filtração e a proteinúria, o que predispõe à deposição de matriz mesangial, fibrose intersticial e glomerulosclerose, acelerando a progressão da DRC ^{147; 148}. Admite-se que diversas anormalidades clínicas e metabólicas acompanham a deterioração da função renal e, em geral, a redução da função renal está associada à gravidade e prevalência dessas alterações ¹⁴⁹.

No presente estudo, 6 das 43 crianças com DRC (13,9%), faziam tratamento com eritropoietina. Nesse, 11 crianças (20%) estavam em tratamento com sulfato ferroso. Do total de crianças com DRC, 18 (41,8%) apresentaram níveis de hemoglobina inferiores ao preconizado para idade e gênero, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no último exame laboratorial.

Com a progressão da DRC, frequentemente se instala a anemia, e sua investigação deve ser feita com rigor em todos os pacientes com RFG inferior a $60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$. A principal causa de anemia em pacientes com DRC é a redução dos níveis de eritropoietina, uma vez que o rim é o principal responsável pela síntese desse hormônio ⁴⁴. Outras causas podem ser a deficiência absoluta ou funcional de ferro, que está presente em 30% a 50% dos pacientes com DRC, perda sanguínea, hiperparatireoidismo, estado inflamatório, diminuição da meia-vida das hemácias, e deficiência de ácido fólico e/ou vitamina B12 ¹⁵⁰. Para a população pediátrica ainda não está definido qual o limiar do RFG que determina o declínio dos níveis de hemoglobina. Os critérios para a reposição com eritropoietina recombinante (epoetina alfa), estabelecidos pelo MS/ Brasil, são níveis de hemoglobina e hematócrito menores que 10mg/dL e 30% respectivamente, e em pacientes com DRC em estágios 3 a 5 ¹⁵¹. No entanto, sabe-se que as crianças seriam beneficiadas pelo uso antes desse limiar ¹⁵².

A avaliação da anemia em crianças com DRC assume grande importância pela associação dessa à limitação da atividade física e efeitos adversos sobre a qualidade de vida e aumento da mortalidade ¹⁵³. O estudo de Staples *et al.* ²⁷ revelou que crianças com registro de anemia possuíam um aumento de 52% do risco de progressão da

DRC em comparação com aquelas sem anemia. Admite-se que o tratamento de fatores de risco como anemia, hipoalbuminemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia, hipertensão e a baixa estatura ameniza a progressão da DRC na população pediátrica²⁷.

Das crianças com DRC avaliadas, 26 (60,4%) estavam em tratamento para acidose metabólica com bicarbonato de sódio. A acidose metabólica é outra comorbidade clínica observada com frequência em pacientes com DRC. Essa condição é consequente à redução da filtração glomerular, redução da excreção de hidrogênio e redução do gás carbônico (CO₂) plasmático total, em decorrência da perda da função renal. Isso pode afetar a mineralização óssea, inibir a atividade dos osteoblastos e estimular a ação dos osteoclastos, induzir o catabolismo de proteínas, inibir a absorção do cálcio obtido da dieta e limitar o crescimento da criança⁴⁴. Sabe-se que a acidose metabólica piora com a redução do RFG, contribuindo para a deficiência no crescimento em crianças, bem como a perda de massa óssea e muscular. A dieta suplementada com bicarbonato pode retardar a progressão da DRC¹⁵⁴.

Sabe-se que as dislipidemias constituem fatores de risco para ocorrência de doenças cardiovasculares na população geral e em adultos com DRC. Na população pediátrica, especialmente nas crianças afetadas por DRC, as evidências dessa associação são escassas devido ao tempo reduzido de acompanhamento em estudos observacionais e ensaios clínicos¹⁵⁵. No entanto, tem sido observado que nas síndromes nefróticas é comum o aparecimento das dislipidemias^{48; 54}. Admite-se que a dislipidemia na infância participe da patogênese da aterosclerose e que o processo aterosclerótico na DRC é acelerado pelo metabolismo lipídico alterado e outros fatores de risco aterogênico. Dessa forma, pacientes pediátricos com DRC têm risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares na idade adulta. A prevalência de hipercolesterolemia em crianças com DRC varia de 39 a 65%¹⁵⁵.

Dos 43 pacientes do presente estudo, 15 (34,9%) apresentaram colesterol total superior a 170mg/dL no último exame laboratorial. Dos pacientes avaliados, 13 (30,2%), apresentaram níveis de triglicerídeos superiores a 130mg/dL no último exame laboratorial. A *Kidney Disease Improving Global Outcomes - KDIGO* recomenda que o tratamento para hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia em crianças seja primeiramente realizado com restrição lipídica e orientação dietética, além do controle da obesidade com regimes de perda de peso, se necessário. A

restrição de gordura na dieta é segura em crianças, sem efeitos adversos no crescimento e desenvolvimento. No entanto, as dietas não devem ser utilizadas em todos os pacientes para não resultar em desequilíbrio nutricional. As causas secundárias de dislipidemias também devem ser tratadas antes da terapia com estatinas ¹⁵⁵.

6.2 Avaliação dos biomarcadores de ativação plaquetária P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa e CD40L

Sabe-se que a P-selectina é uma glicoproteína encontrada nos grânulos alfa plaquetários e expressa na membrana das plaquetas, sendo utilizada como marcador de ativação plaquetária. Quando ativadas, há distribuição da P-selectina para a superfície plaquetária, para a ligação a receptores de neutrófilos e monócitos, promovendo o recrutamento dessas células para os sítios inflamatórios¹⁵⁶.

No presente estudo, a expressão percentual de P-selectina nas plaquetas foi menor quando avaliados todos os pacientes com DRC em relação ao grupo-controle (Tab. 6, Fig. 9A). Van Bladel *et al.* ¹⁵⁷ também encontraram uma redução na expressão de P-selectina e uma baixa reatividade plaquetária, após estímulo com agonistas, em pacientes com DRC comparando-se a indivíduos saudáveis. Uma provável justificativa para a redução na expressão de P-selectina é a deficiência dos grânulos alfa, consequente ao estado urêmico característico da DRC ¹⁵⁷. Schoorl *et al.*¹⁵⁸ em um estudo da morfologia dos grânulos plaquetários detectaram um padrão anormal de grânulos alfa em pacientes com insuficiência renal, mostrando redução quantitativa e qualitativa desses, quando comparados a indivíduos saudáveis.

A ativação plaquetária estimula a translocação da GPIIb/IIIa para a membrana, aumentando a agregação das plaquetas ^{73; 96; 156}. A literatura sugere que o aumento da expressão de GPIIb/IIIa correlaciona-se com a ativação plaquetária, e pode ser útil para demonstrar a atividade pró-trombótica em algumas condições clínicas, como na angioplastia coronária, pré-eclâmpsia e doença falciforme ¹⁵⁹. No entanto, no presente estudo a expressão de GPIIb/IIIa (CD41a) não diferiu entre os grupos com DRC e controle (Tab. 6, Fig. 9B). Em concordância, Moal *et al.* ¹⁵⁶ também não obtiveram diferença na expressão de GPIIb/IIIa nas plaquetas de pacientes adultos com DRC em tratamento conservador e em hemodiálise, sem estímulo prévio das plaquetas,

como no presente estudo, comparando-se com indivíduos controle. Porém, após estímulo com agonistas como ADP, esses pesquisadores obtiveram uma expressão mais baixa de GPIIb/IIIa nos pacientes em relação ao controle saudável.

Kozek-Langenecker *et al.*¹⁶⁰ encontraram uma redução da expressão de GPIIb/IIIa em pacientes urêmicos, comparando a indivíduos saudáveis. Propuseram que essa redução resultou da ocupação desses receptores por proteínas adesivas antes da ativação plaquetária. Dessa forma, essas proteínas bloqueariam a ligação do fibrinogênio intacto às plaquetas após a estimulação, o que contribuiria para a disfunção plaquetária na DRC. Liani *et al.*¹⁶¹ avaliaram pacientes em hemodiálise com trombose de fístula e detectaram maior expressão de GPIb e GPIIb/IIIa. Concluíram que a ativação maior das plaquetas provavelmente contribuiu para a obstrução do acesso vascular.

No presente estudo, apesar de não ter sido obtida diferença para o complexo GPIIb/IIIa, comparando-se o grupo com DRC com o controle, a expressão de GPIIIa foi menor no grupo com DRC (Tab.6, Fig. 9C).

Sabe-se que a GPIIIa é uma glicoproteína transmembrana, integrina β_3 , expressa constitutivamente em plaquetas, megacariócitos, osteoclastos e endotélio. Essa GP associa-se à GPIIb para formar o complexo GPIIb/IIIa, o qual medeia a agregação entre as plaquetas ativadas, e ao CD51 para formar o complexo CD51/CD61, um receptor de vitronectina. Além disso, na lesão vascular a GPIIIa exerce outras funções, incluindo a ligação ao fibrinogênio, fibronectina, FvW, e trombospondina, para mediar o processo de adesão das plaquetas ao subendotélio^{162; 163; 164}. Uma vez que a GPIIIa atua em outros processos, não apenas na ligação à GPIIb, a expressão reduzida dessa, sem uma diminuição concomitante do complexo GPIIb/IIIa, permite inferir um comprometimento nas funções plaquetárias distintas da agregação entre as plaquetas.

No presente estudo, a redução da expressão de P-selectina e GPIIIa no grupo com DRC em relação ao controle permite inferir uma deficiência da ativação plaquetária nessa doença. Kyrle *et al.*¹⁶⁵ propuseram que a expressão reduzida tanto de P-selectina como de GPIIb/IIIa em seu estudo poderia ser decorrente do defeito na liberação dos grânulos alfa em situações de uremia, o que explicaria a menor expressão da P-selectina na DRC.

A expressão de CD40L não diferiu entre os grupos com DRC e controle (Tab. 6, Fig. 9D). O CD40L e seu receptor CD40, são moléculas co-estimulatórias da família

do fator de necrose tumoral (TNF) e têm um papel importante na modulação da resposta imune e a inflamação ¹⁶⁶. O CD40L plaquetário é um indutor potente de processos inflamatórios pró-aterogênicos e aumenta a interação entre as plaquetas, leucócitos e o endotélio. Além disso, o CD40L plaquetário altera a homeostasia de células T e sua resposta inflamatória, promovendo ainda mais aterogênese ¹⁶⁷. O CD40L é rapidamente expresso na superfície plaquetária após a estimulação. Uma vez expresso, ele é subsequentemente clivado em um período de minutos a horas, gerando fragmentos solúveis designados por sCD40L ¹⁶⁸. Estudos sobre a distribuição celular do CD40L indicam que 95% do CD40L circulantes é proveniente das plaquetas, o que sugere que o entendimento dos eventos estimuladores de plaquetas devem considerar a função biológica e patológica do CD40L. Sua forma solúvel (circulante), sCD40L, também tem sido avaliada no plasma como marcador de risco aterosclerótico. Malyszko *et al.* ¹⁶⁹ detectaram maior agregação plaquetária associada a níveis elevados de sCD40L em pacientes em tratamento dialítico, e propuseram que o sCD40L pode ser útil como biomarcador prognóstico de risco cardiovascular em pacientes com DRC em estágio final.

O resultado do presente estudo permite inferir que a expressão de CD40L nos pacientes com DRC não está alterada (em relação aos controles saudáveis) pela menor ativação plaquetária decorrente do estado urêmico observado nesses pacientes. Essa premissa é compatível com a menor expressão de P-selectina e GPIIIa em relação ao grupo-controle. No entanto, não se pode descartar a clivagem rápida desse receptor antes da fixação das plaquetas após a coleta do sangue (que foi feita em até duas horas). Dessa forma, a avaliação da forma solúvel do CD40L seria um melhor indicador de risco nos pacientes com DRC.

Analizados em conjunto, os resultados da expressão dos marcadores de ativação plaquetária em crianças e adolescentes com DRC, no presente estudo, sugerem uma redução da ativação das plaquetas, em relação ao grupo controle, apesar do perfil pró-inflamatório desses pacientes demonstrado em outros estudos^{10; 15; 54}. No entanto, não se pode descartar a interferência do fibrinogênio ou seus fragmentos na ativação plaquetária, ao bloquear os receptores de superfície.

6.3 Avaliação da formação de agregados plaquetas-monócitos (APM) e plaquetas-neutrófilos (APN)

A percentagem de APM foi maior no grupo com DRC em relação ao grupo-controle (Tab. 6, Fig. 10).

Sabe-se que a adesão de plaquetas ativadas por meio da P-selectina, GPIIb e GPIIb/IIIa ao endotélio vascular induz a expressão de mais moléculas de adesão, tais como VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, quimiocinas e metaloproteinases de matriz. Essas moléculas facilitam o recrutamento de leucócitos para o local da lesão vascular e formam os agregados de plaquetas-leucócitos (APL). As plaquetas se ligam ao receptor PSGL-1 nos leucócitos, por meio da P-selectina, e esses agregados induzem a produção de quimiocinas e citocinas, ativando mais leucócitos^{167; 170}.

Os APL constituem uma superfície de ancoragem para células inflamatórias, e secretam diferentes proteases que aumentam a adesão plaquetária dependente do FVW ¹⁷¹. As interações plaquetas-monócitos são importantes na regulação da ativação e secreção de IL1, CXCL8, CCL2 e fator tecidual pelos monócitos ¹³. Sabe-se que a ativação exacerbada de monócitos pode contribuir para a secreção elevada de quimiocinas no tecido renal, como demonstrado por Vianna *et al.* ¹⁵, que detectaram níveis urinários elevados de CCL2 em pacientes pediátricos com DRC em tratamento conservador, em comparação aos controles saudáveis.

Para a percentagem de APN, não houve diferença significativa entre os grupos (Tab. 6, Fig 10). Tem sido admitido que a avaliação de APM circulantes pode ser um indicador mais sensível de ativação plaquetária *in vivo* do que APN. Além de refletirem a ativação plaquetária, os APM têm também um papel relevante na indução da ativação de outras plaquetas e monócitos, a partir da expressão e secreção de citocinas, e ativação da cascata de coagulação ¹³. As plaquetas ligam-se aos neutrófilos em menor extensão do que aos monócitos, determinam a secreção de ativadores do endotélio e facilitam a estagnação dos neutrófilos nos pequenos vasos ¹⁷². Ahn *et al.* ¹⁷³ verificaram que em situações de *shear stress*, há um recrutamento preferencial de monócitos do que de neutrófilos pelas plaquetas ativadas para a formação de agregados.

Ashman *et al.* ¹⁷¹ avaliaram a percentagem de plaquetas-leucócitos (APM e APN) em pacientes em diálise peritoneal e hemodiálise, como um potencial fator de risco cardiovascular. Esses pesquisadores detectaram um aumento de APM nos

pacientes em estágio final da doença renal em relação ao grupo-controle, e associaram esses achados a um risco maior de doença cardiovascular. Sugeriram ainda que a percentagem de APM poderia determinar um mecanismo pelo qual os monócitos e plaquetas são ativados e promovem a aceleração da aterosclerose em pacientes urêmicos.

No presente estudo, contrariamente aos dados obtidos para avaliação de glicoproteínas de superfície plaquetária, a obtenção de percentagem elevada de APM sugere maior ativação plaquetária nos pacientes com DRC em relação ao controle. Sabe-se que a formação dos APL ocorre, inicialmente, pela ligação de P-selectina aos receptores PSGL-1 nos leucócitos. Um segundo evento de ligação da integrina Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) estabiliza o complexo, que é crucial para a permanência de APM na circulação ^{98; 174; 175}. Admite-se que, em presença de CD40L ou de fibrinogênio, a formação de APM se dá pela via da Mac-1, independente da participação das selectinas ^{174; 175}. Michelson *et al.* ¹³ propuseram que as plaquetas degranuladas podem perder P-selectina rapidamente, mas continuariam a funcionar sob forma de APM. Dessa forma, pode-se inferir que, como a formação de APM e ativação plaquetária ainda ocorre, apesar da baixa expressão de P-selectina e GPIIIa, podendo permanecer o risco cardiovascular nos pacientes pediátricos com DRC. Melhorar a redação! Está sem sentido!

6.4 Avaliação dos biomarcadores de ativação endotelial

6.4.1 sE-selectina, VEGF, sVCAM-1 e sICAM-1

As crianças e adolescentes com DRC apresentaram níveis plasmáticos elevados de sE-selectina em relação ao grupo-controle (Tab. 7, Fig.11A). Malatino *et al.* ¹⁷⁶ avaliaram os níveis plasmáticos de sE-selectina em pacientes com DRC em estágio final e também encontraram níveis significativamente elevados em relação a indivíduos saudáveis. Esses pesquisadores demonstraram, por meio da curva de Kaplan-Meier, que a sE-selectina constitui um fator de risco independente de mortalidade e risco cardiovascular fatal e não fatal nesses pacientes. Stam *et al.* ¹⁷⁷ verificaram que o grau de disfunção renal foi associado aos marcadores de disfunção endotelial e de atividade inflamatória: FVW, PCR, sICAM-1, sVCAM-1, tPA, PAI-1 e

sE-selectina. Ito *et al.*¹⁷⁸ demonstraram que as toxinas urêmicas estimulam a expressão de sE-selectina e o stress oxidativo *in vitro* e *in vivo* em células endoteliais e, portanto, promovem maior interação entre os leucócitos e o endotélio. Estes investigadores sugeriram a ação das toxinas urêmicas na promoção da inflamação vascular em pacientes com disfunção renal.

Em relação ao VEGF, também foram obtidos níveis elevados nos pacientes pediátricos com DRC em relação aos controles (Tab. 7, Fig.11B). Em concordância, Pawlak *et al.*⁷⁴ verificaram que pacientes com DRC apresentaram níveis plasmáticos elevados de VEGF que correlacionaram com o grau da disfunção renal. Kolseth *et al.*¹⁷⁹ investigaram mediadores inflamatórios, moléculas de adesão e marcadores de disfunção endotelial em pacientes com e sem nefropatia diabética e encontraram níveis plasmáticos elevados de VEGF e outros mediadores nos pacientes com nefropatia. Ressaltaram a importância da inflamação e da disfunção endotelial nos pacientes com o RFG reduzido.

Sabe-se que o VEGF é uma proteína multifuncional capaz de estimular a proliferação e diferenciação, bem como inibir a apoptose de células endoteliais, aumentar a permeabilidade vascular, mediar a vasodilatação dependente do endotélio, promover a quimiotaxia de monócitos e a expressão de moléculas de adesão^{110; 180}. Nos rins, esse fator de crescimento é produzido pelos podócitos. A regulação de sua sinalização é necessária para o desenvolvimento e manutenção da barreira de filtração glomerular e regulação adequada da proliferação do endotélio glomerular na angiogênese. Nos glomérulos normais, um estreito equilíbrio é mantido entre as isoformas de VEGF produzidas pelos podócitos, e os receptores de VEGF (VEGFR), expressos pelo endotélio glomerular, células mesangiais e podócitos. A doença renal ocorre quando esse equilíbrio homeostático é perturbado, resultando na sinalização inadequada de VEGF/ VEGFR, promovendo lesão da estrutura glomerular, tubular e comprometimento da filtração¹⁸¹.

Os níveis plasmáticos de sICAM-1 também foram maiores na DRC em relação aos controles (Tab. 7, Fig.11C). Upadhyay *et al.*¹⁸² avaliaram diversos biomarcadores inflamatórios e endoteliais e verificaram níveis elevados de sICAM-1, correlacionados à redução da função renal e ao maior grau de albuminúria. Paradoxalmente, Chen *et al.*¹⁸³ não obtiveram aumento de sICAM-1 nos pacientes com DRC em relação aos controles. Stenvinkel *et al.*¹⁰³ sugeriram que os níveis de sICAM-1 seriam fatores preditores independentes de mortalidade nos pacientes com DRC e em

transplantados renais, com prognóstico de mortalidade e com o risco cardiovascular, independentes da função renal. Tumor *et al.*¹⁸⁴ observaram que a toxina urêmica sulfato de indoxil aumentou a expressão endotelial de ICAM-1 e da quimiocina CCL2, e sugeriram mais uma ação dessas toxinas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes com DRC.

Os níveis plasmáticos de sVCAM-1 também foram mais elevados na DRC no presente estudo (Tab.7, Fig.11D). Wang *et al.*¹⁸⁵ comprovaram, pela curva de Kaplan-Meyer, que o sVCAM-1 apresentou associação forte com o risco de evento cardiovascular fatal em pacientes em diálise peritoneal. Esses pesquisadores detectaram, ainda, uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de sVCAM-1 e a função renal residual.

Moléculas de adesão como a E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 orientam o processo de adesão e migração de leucócitos ao espaço subendotelial, o que é fundamental na formação das lesões ateroscleróticas¹⁸³. Sabe-se que a disfunção endotelial e a inflamação crônica, dois fenômenos importantes na aterogênese, estão presentes na doença renal terminal¹⁷⁷. Apesar das condições clínicas e considerando que os quimioatraentes distintos induzem à expressão distinta desses receptores¹⁰⁵, os resultados do presente estudo mostraram um comportamento semelhante dos níveis de sE-selectina, VEGF, sVCAM-1 e sICAM-1, sendo mais elevados nos grupos com DRC em relação ao controle, o que sugere maior ativação endotelial nos pacientes pediátricos com DRC em estágios avançados pré-dialíticos.

Em concordância com os resultados do presente estudo, Stenvinkel *et al.*¹⁰³ encontraram níveis plasmáticos elevados de sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina em adultos com DRC em pré-diálise e em diálise, quando comparados a indivíduos saudáveis. Houve correlação com o processo inflamatório (avaliado pelos níveis elevados de PCR), com o risco de doenças cardiovasculares e com o grau de subnutrição. Chen *et al.*¹⁸³ também encontraram níveis plasmáticos elevados de sVCAM-1, FVW, sE-selectina em adultos com DRC em estágios pré-diálise em relação aos controles. Os níveis de sVCAM-1 foram associados à redução do RFG e ao grau de albuminúria, os de sE-selectina foram associados à elevação da albuminúria e os de FVW, à redução do RFG.

6.4.2 Receptor solúvel de uPA (suPAR)

Os níveis plasmáticos de suPAR foram mais elevados nos pacientes com DRC em relação aos controles (Tab.8, Fig.12A).

Wei *et al.*¹¹⁷ obtiveram níveis plasmáticos elevados de suPAR em pacientes com GESF primária, mas não em um grupo com outras doenças glomerulares. Relataram que os níveis elevados pré-transplante aumentaram o risco de recorrência de GESF após transplante renal. Apesar da literatura indicar que o suPAR possa ser um marcador de GESF, no presente estudo, os resultados não diferenciaram glomerulopatias de outras etiologias (resultados não apresentados neste estudo).

Em concordância, Bock *et al.*¹⁸⁶ mostraram que os níveis suPAR não foram diferentes em crianças com DRC de origem glomerular ou não-glomerulares em relação aos controles saudáveis. Esses pesquisadores sugeriram que, ao contrário dos dados obtidos por Wei *et al.*¹¹⁷, o suPAR não é um bom indicador para síndrome nefrótica primária, com baixo poder diagnóstico. No presente estudo, foi obtida correlação negativa dos níveis de suPAR e o RFG nos pacientes com DRC, resultados concordantes com o estudo de Bock *et al.*¹⁸⁶.

Sabe-se que, em condições fisiológicas, o suPAR é encontrado em níveis reduzidos na circulação e participa da mobilização de neutrófilos e de células-tronco, estando envolvido em processos de adesão celular, diferenciação, proliferação e migração¹⁸⁷. Sever *et al.*¹⁸⁸ questionaram se a elevação do suPAR é consequente à inflamação sistêmica e ativação imune, uma vez que os níveis plasmáticos podem estar aumentados em uma variedade de doenças que não são primariamente associadas com proteinúria, tais como hemoglobinúria paroxística noturna, doenças infecciosas como HIV-1, sepse, infecções bacterianas ou virais no sistema nervoso central, bem como em doenças malignas.

Schlöndorff *et al.*¹⁸⁹ questionaram o valor o suPAR como marcador de GESF, uma vez que níveis elevados desse ocorrem em cerca de metade de todos os casos de crianças e adultos com síndrome nefrótica ou outras doenças renais com proteinúria, não distinguindo, de forma confiável, as GESF primárias e secundárias ou GESF e outras doenças glomerulares. Segundo esses pesquisadores, os níveis plasmáticos de suPAR não correlacionam consistentemente com o grau de proteinúria e correlacionam inversamente com a função renal em todas as doenças renais. No entanto, no presente estudo, não foi encontrada correlação do suPAR com o RFG.

Schlöndorff *et al.*¹⁸⁹ relatou que níveis plasmáticos de suPAR se correlacionam, com níveis elevados de PCR, como um indicador de inflamação sistêmica.

6.4.3 Fator de von Willebrand e ADAMTS13

Os níveis de FVW foram mais elevados nos pacientes com DRC, comparando-se aos controles, enquanto os níveis de ADAMTS13 não diferiram entre os grupos (Tab.8, Fig. 12B e 12C).

Sabendo-se que a ação protrombótica dos multímeros de FVW dependem de sua clivagem pela ADAMTS13, no presente estudo, foi avaliada a relação entre níveis de FVW e ADAMTS13. Os pacientes com DRC apresentaram valores maiores da relação FVW:ADAMTS13, comparando-se ao grupo controle. Esse resultado permite inferir que, apesar dos níveis inalterados de ADAMTS13, há exacerbação da coagulação nos pacientes com DRC e consequente risco de ocorrência de eventos trombóticos pela elevação do FVW. Corroborando com essa hipótese, os níveis de dímero D (D-Di), um marcador de hipercoagulabilidade e fibrinólise, foram determinados em um estudo anterior nos mesmos participantes do presente estudo¹⁹⁰, e foram encontrados níveis maiores de D-Di para os pacientes com DRC em relação ao controle (grupo DRC com mediana de 343,7ng/mL; amplitude interquartil IQ=329,9 *versus* mediana de 191ng/mL; IQ=158,4 para controle, P=0,0029)¹⁹⁰.

Sedaghat *et al.*¹³², em uma coorte envolvendo pacientes com DRC, verificaram um aumento da relação FVW:ADAMTS13 (atividade) em relação aos controles. Esse aumento estava associado à rápida deterioração da função renal, resultante do ambiente pró-trombótico, que contribui para a progressão da doença renal¹³².

O grupo de pesquisa em Hemostasia da Faculdade de Farmácia/UFMG vem investigando o FVW e ADAMTS13 em diversas formas de doenças renais.

Rios *et al.*⁹ avaliaram níveis de ADAMTS13 e de FVW em pacientes submetidos à hemodiálise, com e sem complicação trombótica do acesso vascular. Os níveis do FVW foram significativamente maiores e os de ADAMTS13 significativamente menores nos pacientes, quando comparados ao grupo-controle e não diferiram comparando-se os pacientes com e sem trombose do acesso vascular.

Mota *et al.*¹⁹¹ investigaram os níveis de FVW, ADAMTS13, trombomodulina e D-Di em pacientes transplantados renais e encontraram associação desses marcadores com os níveis de creatinina e com a função do enxerto. Verificaram que

os níveis de ADAMTS13 e D-Di estavam relacionados à disfunção renal tardia pós-transplante.

Rios *et al.*¹⁹² compararam os níveis plasmáticos de ADAMTS13 e FVW em quatro pacientes antes e após o transplante renal bem-sucedido e verificaram aumento dos níveis de ADAMTS13 pós-transplante. Esses dados permitiram inferir que o rim pode ter um papel importante na síntese de ADAMTS13 ou no seu metabolismo, como anteriormente aventado por Manea *et al.*¹²⁹. A redução correspondente dos níveis de FVW foi observada apenas em dois dos quatro pacientes. Os pesquisadores admitiram que uma possível razão para a não redução dos níveis de FVW foi a ocorrência de inflamação, que está associada ao um aumento dos níveis do fator VIII (proteína de fase aguda) e, consequentemente, do seu carreador, o FVW¹⁹².

Domingueti *et al.*¹⁹³ demonstraram que os níveis de FVW e de ADAMTS13 se apresentaram elevados em pacientes diabéticos com disfunção renal leve e grave em comparação com o grupo-controle. Os níveis de FVW e ADAMTS13 foram associados ao grau da disfunção renal nos pacientes com diabetes tipo 1.

Embora a avaliação da inflamação não tenha sido investigada no presente estudo, outros estudos revelaram aumento das citocinas pró-inflamatórias nos pacientes pediátricos com DRC^{15; 54} e associação de marcadores inflamatórios e de coagulação com a progressão da DRC¹⁹⁴. Sabe-se que as citocinas inflamatórias podem induzir a liberação de FVW e, possivelmente, reduzir a atividade da ADAMTS13. Domingueti *et al.*¹⁹⁵ sugeriram que a inflamação crônica em baixo grau presente em pacientes com DRC pode ser, pelo menos parcialmente, responsável pela ligação entre a nefropatia diabética e alto risco de eventos cardiovasculares.

Chen *et al.*¹⁸³ obtiveram aumento dos níveis de FVW, sE-selectina, sVCAM-1 em pacientes com DRC e ressaltaram múltiplas vias da disfunção endotelial, que resultaria no aumento desses marcadores no plasma, e aumentaria o risco cardiovascular nesses pacientes.

6.5 Avaliação do uso dos medicamentos antagonistas do sistema renina-angiotensina (SRA)

No presente estudo, os níveis de FVW e sE-selectina foram maiores nos pacientes não-tratados em relação aos pacientes em terapia com bloqueadores/antagonistas da via clássica do SRA, IECA e BRA (Tab. 9).

Liu *et al.*¹⁹⁶ demonstraram que o uso de BRA em pacientes hipertensos promoveu a redução nos níveis de FVW em relação ao período anterior ao tratamento. Em outro estudo, Liu *et al.*¹⁹⁷, observaram que a angiotensina II induziu uma regulação positiva da expressão de sE-selectina e sVCAM-1 em células endoteliais microvasculares. Em pacientes em hemodiálise, o ramipril (um IECA), promoveu uma regulação da função endotelial, medida pela redução dos níveis de FVW, e o valsartan (um BRA) induziu efeitos anti-inflamatórios¹⁹⁸.

Sabe-se que o SRA participa das funções renais, hepáticas, do endotélio vascular, córtex adrenal, e contra regulam a função endócrina cardíaca. A hipertensão sistêmica e no capilar glomerular são mantidas, o que pode induzir a lesão glomerular e do endotélio vascular, causando disfunção renal e doença aterosclerótica vascular. As ações pró-inflamatórias e pró-fibróticas diretas da angiotensina II e da aldosterona podem também promover a lesão renal. A maioria dos efeitos adversos associados com a angiotensina II é mediada pela sua ligação aos receptores AT₁^{52; 53}.

A utilização dos antagonistas do SRA promove efeitos protetores aos rins, reduzindo a perda de proteínas e da pressão no capilar glomerular, inibindo a liberação de moléculas pró-inflamatórias, diminuindo a matriz extracelular e a proliferação de células mesangiais. Os benefícios dos IECA e BRA nas doenças renais podem ser decorrentes, pelo menos em parte, da ativação da chamada via contra regulatório do SRA, formada pela enzima homóloga da ECA denominada ECA2, pela angiotensina-(1-7) e por seu receptor Mas^{199; 200}. A elevação dos níveis de angiotensina-(1-7) decorrente do tratamento com IECA ou BRA pode desencadear vasodilatação, ações anti-inflamatórias, antifibróticas e antiproliferativas, inibindo significativamente a lesão aterosclerótica precoce^{146; 199}. Sabe-se que, em pacientes com hipertensão ou diabetes, os IECA melhoram a função endotelial e hemostática^{50; 201}. Os IECA podem promover a restauração dos níveis fisiológicos do FVW, contribuindo para a cardioproteção¹³⁷.

No presente estudo, a redução de FVW e E-selectina nos pacientes em uso dos antagonistas do SRA sugerem uma proteção endotelial conferida por esses medicamentos, bem como a proteção glomerular nesses pacientes.

Os níveis de D-Di obtidos anteriormente nos pacientes do presente estudo que não faziam uso de antagonistas do SRA foram maiores que no grupo controle, o que evidencia um estado de hipercoagulabilidade ou hiperfibrinólise, possivelmente decorrente da maior ativação endotelial nesses pacientes ¹⁹⁰.

6.6 Correlações entre os biomarcadores avaliados

A análise de correlação entre os biomarcadores plaquetários evidenciou múltiplas correlações entre os marcadores de expressão plaquetárias. O RFG apresentou correlações negativas com os APM e o FVW, indicando maior produção desses com a perda da função renal. O RFG apresentou correlações positivas com GPIIIa e P-Selectina, indicando que a perda da função renal gerou menor expressão dos marcadores de superfície, provavelmente devido à redução de grânulos de plaquetas em pacientes urêmicos ¹⁵⁸.

Os APM tiveram correlação negativa também com GPIIIa e P-selectina. Esse resultado corrobora com a suposição de que a formação dos agregados plaquetas-monócitos pode ocorrer por meio de outros receptores que não a P-selectina ¹⁷⁴.

No presente estudo, foram obtidas correlações entre receptores P-selectina, GPIIIa, GPIIb/IIIa e CD40L. Mesmo não tendo sido encontradas diferenças na expressão da GPIIb/IIIa e CD40L, comparando-se os pacientes e controles (Tab. 6), a análise de correlação evidenciou que há associação na expressão desses marcadores.

Em relação aos biomarcadores de ativação endotelial, todos os marcadores apresentaram correlação negativa com o RFG e também apresentaram múltiplas correlações positivas entre si. O FVW apresentou correlação positiva com sVCAM, suPAR e VEGF, podendo ser reforçada a possibilidade do FVW ser um indicador de ativação endotelial ²⁰².

Em concordância com o presente estudo, Chen *et al.* ¹⁸³ também detectaram que os marcadores sICAM, sVCAM, FVW e sE-selectina que estavam correlacionados entre si. Esses pesquisadores relacionaram as alterações dos biomarcadores

endoteliais a um maior risco de DRC. No estudo de Stam *et al.*¹⁷⁷, com pacientes com DRC em estágios pré-diálise e terminal, a disfunção renal determinada pela depuração de creatinina foi associada fortemente a biomarcadores de disfunção endotelial e inflamatórios, dentre eles FVW e sVCAM-1 e sICAM-1.

6.7 Análise dos modelos de regressão logística

Os dois modelos de regressão logística com os biomarcadores plaquetários e endoteliais e o RFG foram capazes de diferenciar os pacientes com DRC e o controle saudável, embora essa diferenciação não constituísse objetivo do estudo, uma vez que o diagnóstico da DRC está bem estabelecido na literatura e na prática clínica^{1; 42}. Esses modelos foram utilizados para mostrar que há uma relação sensível e específica do estado de ativação plaquetário e do estado de ativação endotelial nos pacientes pediátricos com DRC, pela determinação dos biomarcadores avaliados.

As sensibilidades e as especificidades elevadas tanto para os biomarcadores de ativação plaquetária (GPIIb/IIIa, CD40L e P-selectina) quanto para os marcadores endoteliais (suPAR, FVW) e as curvas ROC obtidas (Fig. 15 e 16) nesses dois modelos de regressão demonstraram uma relação importante com o RFG e com a DRC, ou seja, pode-se identificar que a disfunção plaquetária e a ativação endotelial estão associadas à DRC nos pacientes pediátricos. Essa associação pode levar a uma hipercoagulabilidade precoce nesses pacientes e a um possível risco cardiovascular futuro.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande relevância desse estudo foi evidenciar disfunções plaquetárias e endoteliais nas crianças e adolescentes com DRC, que não possuíam outros fatores de risco para essas alterações, a não ser aqueles inerentes à própria doença renal. Os pacientes avaliados ainda não sofreram influência da diálise, sabidamente indutora de diversos distúrbios hemostáticos. As disfunções plaquetárias e endoteliais podem levar a um estado de hipercoagulabilidade e, dessa forma, promover o risco cardiovascular. Na população adulta com DRC, há inúmeros fatores de risco que se confundem na determinação da progressão da aterosclerose e risco cardiovascular, mas na população pediátrica, selecionada com os critérios rigorosamente estabelecidos, provavelmente apenas a DRC foi capaz de justificar tais alterações de início bastante precoce.

Os resultados obtidos nesse estudo atestam as dificuldades no desenvolvimento de pesquisas sobre doenças multifatoriais, principalmente em pacientes pediátricos. A importância da DRC em crianças e adolescentes justifica os esforços para uma melhor compreensão dos diversos aspectos da doença, o que pode impactar em medidas terapêuticas para aumentar a sobrevida e a qualidade de vida desses pacientes.

O presente estudo representa, ainda, uma contribuição relevante para a literatura sobre o tema, uma vez que fornece informações sobre os estágios pré-dialíticos da DRC em crianças e adolescentes.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Houve evidências de disfunção plaquetária e ativação endotelial nas crianças e adolescentes com DRC pré-dialítica.
- As alterações encontradas estão presentes precocemente na população pediátrica e são decorrentes da doença renal crônica, independentemente de sua etiologia.
- As alterações dos marcadores de função plaquetária e endotelial e os níveis de FVW e ADAMTS13 nas crianças e adolescentes com DRC em estágios pré-dialíticos indicam um estado de hipercoagulabilidade nesses pacientes.
- Nos pacientes pediátricos avaliados, a etiologia da DRC (malformações congênitas, glomerulopatias ou outras) não mostrou associação com a alteração dos biomarcadores hemostáticos, de disfunção plaquetária e endotelial.
- Houve correlação entre a expressão dos biomarcadores plaquetários e também entre a produção dos marcadores de ativação endotelial.
- A redução do RFG foi associada à menor expressão dos receptores plaquetários, à maior formação de APM e aos maiores níveis de marcadores endoteliais.
- Os biomarcadores de ativação plaquetária e endotelial, quando avaliados em conjunto por meio da regressão logística, mostraram relação com a DRC e com o RFG.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- A não determinação da atividade da enzima ADAMTS13 neste estudo constitui uma limitação, uma vez que a presença do antígeno ADAMTS13 não necessariamente corresponde à atividade dessa enzima. Cumpre ressaltar, que, ainda assim, foi possível detectar que nos estágios mais avançados da DRC há um maior desequilíbrio entre os níveis de FVW e ADAMTS13.
- O desenho transversal e o uso de uma amostra de conveniência dificultam a homogeneidade entre os grupos selecionados. Quando os pacientes pediátricos do estudo foram distribuídos de acordo com a etiologia da DRC, os subgrupos obtidos tiveram número reduzido de participantes, não sendo possível uma análise com poder estatístico. Apesar disso, foi possível detectar diferenças relevantes entre os estágios da DRC pré-dialítica em relação ao de crianças e adolescentes sem a doença renal.

10 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

- Determinar os níveis plasmáticos dos biomarcadores endoteliais e plaquetários ao longo da progressão da DRC, associando-se à avaliação clínica e laboratorial das crianças.
- Determinar a atividade da ADAMTS13, o nível de citocinas pró-inflamatórias nos pacientes pediátricos do presente estudo e correlacionar com os marcadores de função plaquetária e endotelial avaliados e com a relação FVW:ADAMTS13.
- Acompanhar os pacientes em uso dos medicamentos antagonistas do SRA e determinar biomarcadores plasmáticos dessa inibição, para se avaliar o grau de proteção glomerular, e correlacionar com os biomarcadores investigados no presente estudo.
- Determinar, em um estudo longitudinal, os marcadores hemostáticos no desenvolvimento do risco cardiovascular ou da taxa de sobrevivência dos pacientes pediátricos com DRC.
- Acompanhar os principais desfechos clínicos relacionados à disfunção endotelial e plaquetária das crianças e adolescentes com DRC que participaram do presente estudo.
- Avaliar maior número de crianças com DRC por diversas etiologias para confirmar se as alterações da função endotelial e plaquetária não estão realmente associadas à etiologia e sim à evolução clínica da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 KDIGO, Kidney Disease: Improving Global Outcomes. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int Suppl**, v. 3, n. 1, p. 1-150, 2013.
- 2 HARAMBAT, J. et al. Epidemiology of chronic kidney disease in children. **Pediatr Nephrol**, v. 27, n. 3, p. 363-73, Mar 2012. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713524> >.
- 3 BECHERUCCI, F. et al. Chronic kidney disease in children. **Clin Kidney J**, v. 9, n. 4, p. 583-91, Aug 2016. ISSN 2048-8505. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27478602> >.
- 4 WARADY, B. A.; CHADHA, V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. **Pediatr Nephrol**, v. 22, n. 12, p. 1999-2009, Dec 2007. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310363> >.
- 5 MOREIRA, J. M. et al. Anxiety, depression, resilience and quality of life in children and adolescents with pre-dialysis chronic kidney disease. **Pediatr Nephrol**, v. 30, n. 12, p. 2153-62, Dec 2015. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210984> >.
- 6 SOARES, C. M. et al. Clinical outcome of children with chronic kidney disease in a pre-dialysis interdisciplinary program. **Pediatr Nephrol**, v. 23, n. 11, p. 2039-46, Nov 2008. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18560903> >.
- 7 CERQUEIRA, D. C. et al. A predictive model of progression of CKD to ESRD in a predialysis pediatric interdisciplinary program. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 9, n. 4, p. 728-35, Apr 2014. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24458086> >.
- 8 SOARES, C. M. et al. Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, n. 3, p. 848-55, Mar 2009. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840891> >.
- 9 RIOS, D. R. et al. Hemostatic changes in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 3-4, p. 135-9, Feb 2010. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945449> >.
- 10 VIANNA, H. R. et al. [Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines]. **J Bras Nefrol**, v. 33, n. 3, p. 351-64, 2011 Jul-Sep 2011. ISSN 2175-8239. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042353> >.
- 11 OBEIDAT, M.; BALLERMANN, B. J. Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 9, p. 964-72, May 2012. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465480> >.
- 12 MARGETIC, S. Inflammation and haemostasis. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 22, n. 1, p. 49-62, 2012. ISSN 1330-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384519> >.

- 13 MICHELSON, A. D. et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 104, n. 13, p. 1533-7, Sep 2001. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11571248> >.
- 14 DE GROOT, R. et al. Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5609-16, May 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234142> >.
- 15 VIANNA, H. R. et al. Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases. **Pediatr Nephrol**, v. 28, n. 3, p. 463-9, Mar 2013. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23161207> >.
- 16 SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.
- 17 COCKCROFT, D. W.; GAULT, M. H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **Nephron**, v. 16, n. 1, p. 31-41, 1976. ISSN 0028-2766. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1244564> >.
- 18 LEVEY, A. S. et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann Intern Med**, v. 130, n. 6, p. 461-70, Mar 1999. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075613> >.
- 19 _____. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney Int**, v. 67, n. 6, p. 2089-100, Jun 2005. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882252> >.
- 20 MORAES, M. C. et al. Plasmaférese como tratamento de glomerulosclerose segmentar focal (GESF) recorrentes após transplante renal. Relato de caso e revisão de literatura. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 193-197, 2007.
- 21 EDDY, A. A. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. **Thromb Haemost**, v. 101, n. 4, p. 656-64, Apr 2009. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350108> >.
- 22 SBN. **CENSO BRASILEIRO DE DIÁLISE, 2013**. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2013.
- 23 NISHIDA, M. et al. MMP-2 inhibition reduces renal macrophage infiltration with increased fibrosis in UUO. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 354, n. 1, p. 133-9, Mar 2007. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210124> >.
- 24 WIGGINS, J. E. et al. NFkappaB promotes inflammation, coagulation, and fibrosis in the aging glomerulus. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 4, p. 587-97, Apr 2010. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150534> >.
- 25 TEIXEIRA, C. G. et al. Impact of chronic kidney disease on quality of life, lung function, and functional capacity. **J Pediatr (Rio J)**, v. 90, n. 6, p. 580-6, Jun 2014. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24950475> >.

- 26 PARK, K. S. et al. Quality of life in children with end-stage renal disease based on a PedsQL ESRD module. **Pediatr Nephrol**, v. 27, n. 12, p. 2293-300, Dec 2012. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832667> >.
- 27 STAPLES, A. O. et al. Association between clinical risk factors and progression of chronic kidney disease in children. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 5, n. 12, p. 2172-9, Dec 2010. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813855> >.
- 28 HAHN, H. Genetics of kidney development: pathogenesis of renal anomalies. **Korean J Pediatr**, v. 53, n. 7, p. 729-34, Jul 2010. ISSN 2092-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189947> >.
- 29 YOSYPIV, I. V. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a genetic disorder? **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 909083, 2012. ISSN 2090-2158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685656> >.
- 30 SOARES, C. M. B. et al. Doença renal crônica em pediatria - Programa Interdisciplinar de Abordagem Pré-dialítica. **Rev Med Minas Gerais**, v. 18, n. 4, Supl 1, p. S90-S97, 2008.
- 31 ARDISSINO, G. et al. Epidemiology of chronic renal failure in children: data from the Italkid project. **Pediatrics**, v. 111, n. 4 Pt 1, p. e382-7, Apr 2003. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12671156> >.
- 32 COLLINS, A. J. et al. Excerpts from the US Renal Data System 2009 Annual Data Report. **Am J Kidney Dis**, v. 55, n. 1 Suppl 1, p. S1-420, A6-7, Jan 2010. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20082919> >.
- 33 HARAMBAT, J. et al. Lessons learned from the ESPN/ERA-EDTA Registry. **Pediatr Nephrol**, Oct 2015. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498279> >.
- 34 CHESNAYE, N. et al. Demographics of paediatric renal replacement therapy in Europe: a report of the ESPN/ERA-EDTA registry. **Pediatr Nephrol**, v. 29, n. 12, p. 2403-10, Dec 2014. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25039018> >.
- 35 DELEAU, J. et al. Chronic renal failure in children: an epidemiological survey in Lorraine (France) 1975-1990. **Pediatr Nephrol**, v. 8, n. 4, p. 472-6, Aug 1994. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7947040> >.
- 36 KONSTANTYNER, T. et al. Pediatric Chronic Dialysis in Brazil: Epidemiology and Regional Inequalities. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135649, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26285019> >.
- 37 NOGUEIRA PCK, F. L., CAMARGO MF, LEÃO ER, BENNINGHOVEN JRCS, GONÇALVES NZ, PEREIRA L, SESSO RC. Prevalência estimada da doença renal crônica terminal em crianças no Estado de São Paulo. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 4, p. 443-449, 2011.
- 38 CHADHA, V.; WARADY, B. A. Epidemiology of pediatric chronic kidney disease. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 12, n. 4, p. 343-52, Oct 2005. ISSN 1548-5595. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198273> >.

- 39 DELANEY, M. P. **TIETZ: fundamentos de química clínica. Função Renal e Doença**, cap. 34. In BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R; BRUNS, D.E. (Ed) 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, , p. 647-670. 2008.
- 40 SCHWARTZ, G. J. et al. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. **Pediatrics**, v. 58, n. 2, p. 259-63, Aug 1976. ISSN 0031-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/951142> >.
- 41 SCHWARTZ, G. J.; WORK, D. F. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 11, p. 1832-43, Nov 2009. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820136> >.
- 42 SCHWARTZ, G. J. et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 3, p. 629-37, Mar 2009. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158356> >.
- 43 HOGG, R. J. et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. **Pediatrics**, v. 111, n. 6 Pt 1, p. 1416-21, Jun 2003. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12777562> >.
- 44 NKF. NATIONAL KIDNEY FOUNDATION- K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Am J Kidney Dis**, v. 39, n. 2 Suppl 1, p. S1-266, Feb 2002. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904577> >.
- 45 ASSOCIATION, L. A. P. N.; STUDY, L. A. P. R. T. C. Latin American Registry of Pediatric Renal Transplantation 2004-2008. **Pediatr Transplant**, v. 14, n. 6, p. 701-8, Sep 2010. ISSN 1399-3046. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525000> >.
- 46 ZORZO, R. A. **Perfil clínico-epidemiológico de 121 crianças e adolescentes com doença renal crônica: 22 anos de experiência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**. 2008. 101p (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, RIBEIRÃO PRETO.
- 47 YEE, J. Treatment of nephrotic syndrome: retrospection. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 21, n. 2, p. 115-8, Mar 2014. ISSN 1548-5609. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24602460> >.
- 48 BECK, L. H.; SALANT, D. J. Glomerular and tubulointerstitial diseases. **Prim Care**, v. 35, n. 2, p. 265-96, vi, Jun 2008. ISSN 0095-4543. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486716> >.
- 49 VIAZZI, F. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade in chronic kidney disease: current strategies and a look ahead. **Intern Emerg Med**, v. 11, n. 5, p. 627-35, Aug 2016. ISSN 1970-9366. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984204> >.
- 50 SHEN, J. et al. Protection against death and renal failure by renin-angiotensin system blockers in patients with diabetes and kidney disease. **J Renin Angiotensin**

- Aldosterone Syst**, v. 17, n. 3, Jul 2016. ISSN 1752-8976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27377659> >.
- 51 STOJILJKOVIC, L.; BEHNIA, R. Role of renin angiotensin system inhibitors in cardiovascular and renal protection: a lesson from clinical trials. **Curr Pharm Des**, v. 13, n. 13, p. 1335-45, 2007. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506719> >.
 - 52 BREWSTER, U. C.; PERAZELLA, M. A. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. **Am J Med**, v. 116, n. 4, p. 263-72, Feb 2004. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969655> >.
 - 53 EMDIN, M. et al. Biomarkers of activation of renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure: how useful, how feasible? **Clin Chim Acta**, v. 443, p. 85-93, Mar 2015. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445411> >.
 - 54 SOUTO, M. F. et al. Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. **Pediatr Res**, v. 64, n. 6, p. 637-42, Dec 2008. ISSN 1530-0447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18679168> >.
 - 55 WARADY, B. A. et al. Predictors of Rapid Progression of Glomerular and Nonglomerular Kidney Disease in Children and Adolescents: The Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) Cohort. **Am J Kidney Dis**, v. 65, n. 6, p. 878-88, Jun 2015. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25799137> >.
 - 56 ARORA, R.; SRIVASTAVA, R. N. Complications of nephrotic syndrome in children. **Apollo medicine**, v. 4, n. 2, p. 130-134, 2007.
 - 57 WONG, G. et al. Health and wealth in children and adolescents with chronic kidney disease (K-CAD study). **BMC Public Health**, v. 14, p. 307, 2014. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708535> >.
 - 58 WÜHL, E. et al. Strict blood-pressure control and progression of renal failure in children. **N Engl J Med**, v. 361, n. 17, p. 1639-50, Oct 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846849> >.
 - 59 ARDISSINO, G. et al. Proteinuria as a predictor of disease progression in children with hypodysplastic nephropathy. Data from the Ital Kid Project. **Pediatr Nephrol**, v. 19, n. 2, p. 172-7, Feb 2004. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673629> >.
 - 60 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Diretrizes Clínicas para o Cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único de Saúde/ Ministério da Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 37p. 2014.
 - 61 CASTRO, H. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.
 - 62 SANTORO, D. et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure. **J Ren Nutr**, v. 20, n. 5 Suppl, p. S103-8, Sep 2010. ISSN 1532-8503. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797556> >.

- 63 LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, grupo GEN, 2006. 710
- 64 BOWEN, D. J. von Willebrand Factor Proteolysis by ADAMTS13. **Journal of Coagulation Disorders**, 2009.
- 65 PROJAHN, D.; KOENEN, R. R. Platelets: key players in vascular inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 6, p. 1167-75, Dec 2012. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923486> >.
- 66 FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações., v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.
- 67 HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **J Thromb Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, 2003 Aug-Oct 2003. ISSN 0929-5305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760207> >.
- 68 FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 34, n. 3/4, p. 229-237, 2001.
- 69 ADAMS, M. J. et al. Hypercoagulability in chronic kidney disease is associated with coagulation activation but not endothelial function. **Thromb Res**, v. 123, n. 2, p. 374-80, 2008. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486198> >.
- 70 PAVORD, S.; MYERS, B. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease. **Blood Rev**, v. 25, n. 6, p. 271-8, Nov 2011. ISSN 1532-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21872374> >.
- 71 FLISER, D. et al. The dysfunctional endothelium in CKD and in cardiovascular disease: mapping the origin(s) of cardiovascular problems in CKD and of kidney disease in cardiovascular conditions for a research agenda. **Kidney Int Suppl (2011)**, v. 1, n. 1, p. 6-9, Jun 2011. ISSN 2157-1724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25018895> >.
- 72 LANDRAY, M. J. et al. Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study. **Am J Kidney Dis**, v. 43, n. 2, p. 244-53, Feb 2004. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14750089> >.
- 73 OKUMURA, M. et al. Role for thromboxane A2 from glomerular thrombi in nephropathy with type 2 diabetic rats. **Life Sci**, v. 72, n. 24, p. 2695-705, May 2003. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12679187> >.
- 74 PAWLAK, K. et al. Vascular endothelial growth factor and uPA/suPAR system in early and advanced chronic kidney disease patients: a new link between angiogenesis and hyperfibrinolysis? **Transl Res**, v. 160, n. 5, p. 346-54, Nov 2012. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683425> >.
- 75 AL-SAADY, N. M. et al. Monocyte expression of tissue factor and adhesion molecules: the link with accelerated coronary artery disease in patients with chronic renal failure. **Heart**, v. 81, n. 2, p. 134-40, Feb 1999. ISSN 1355-6037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922347> >.

- 76 HAGIWARA, H. et al. Expression of type-1 plasminogen activator inhibitor in the kidney of diabetic rat models. **Thromb Res**, v. 111, n. 4-5, p. 301-9, 2003. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693179> >.
- 77 LEE, H. S. Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. **Cell Tissue Res**, v. 347, n. 1, p. 129-40, Jan 2012. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21541658> >.
- 78 DUSSE, L. M. et al. Pre-eclampsia: relationship between coagulation, fibrinolysis and inflammation. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 1-2, p. 17-21, Jan 2011. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888809> >.
- 79 KAWANAMI, D. et al. Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF- κ B signaling pathway activation in vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 411, n. 4, p. 798-803, Aug 2011. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787749> >.
- 80 PETÄJÄ, J. Inflammation and coagulation. An overview. **Thromb Res**, v. 127 Suppl 2, p. S34-7, Jan 2011. ISSN 1879-2472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193113> >.
- 81 DONATO, A. J. et al. Aging is associated with greater nuclear NF kappa B, reduced I kappa B alpha, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. **Aging Cell**, v. 7, n. 6, p. 805-12, Dec 2008. ISSN 1474-9726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782346> >.
- 82 MAY, A. E.; SEIZER, P.; GAWAZ, M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 3, p. s5-10, Mar 2008. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174454> >.
- 83 CHU, A. J. Tissue factor mediates inflammation. **Arch Biochem Biophys**, v. 440, n. 2, p. 123-32, Aug 2005. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16036212> >.
- 84 HOU, L. et al. The protease-activated receptors and their cellular expression and function in blood-related cells. **Br J Haematol**, v. 101, n. 1, p. 1-9, Apr 1998. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576174> >.
- 85 COUGHLIN, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 258-64, Sep 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001069> >.
- 86 LEVI, M.; VAN DER POLL, T.; BÜLLER, H. R. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. **Circulation**, v. 109, n. 22, p. 2698-704, Jun 2004. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184294> >.
- 87 WENZEL, U. O.; ABBOUD, H. E. Chemokines and renal disease. **Am J Kidney Dis**, v. 26, n. 6, p. 982-94, Dec 1995. ISSN 0272-6386. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503075> >.
- 88 WAGHABI, M. C. **Fisiopatologia da fibrose cardíaca chagásica: papel de TGF-Beta**. Rio de Janeiro; s.n; jul.12, xiii, 87 p, 2004.
- 89 FANG, S. et al. Dual action of TGF- β induces vascular growth in vivo through recruitment of angiogenic VEGF-producing hematopoietic effector cells.

- Angiogenesis**, v. 15, n. 3, p. 511-9, Sep 2012. ISSN 1573-7209. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581517> >.
- 90 GERSZTEN, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 718-23, Apr 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227295> >.
- 91 DEMETZ, G.; OTT, I. The Interface between Inflammation and Coagulation in Cardiovascular Disease. **Int J Inflam**, v. 2012, p. 860301, 2012. ISSN 2042-0099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518344> >.
- 92 VENTURINELLI, M. L. et al. Platelet activation in different clinical forms of the coronary artery disease (role of P-selectin and others platelet markers in stable and unstable angina). **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 4, p. 446-50, Oct 2006. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128313> >.
- 93 KATO, N. et al. The E-selectin ligand basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 7, p. 1565-76, Jul 2009. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443639> >.
- 94 ISHIKAWA, T. et al. Appearance of WBC-platelet complex in acute ischemic stroke, predominantly in atherothrombotic infarction. **J Atheroscler Thromb**, v. 19, n. 5, p. 494-501, 2012. ISSN 1880-3873. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659534> >.
- 95 TENAGLIA, A. N. et al. Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. **Am J Cardiol**, v. 79, n. 6, p. 742-7, Mar 1997. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9070552> >.
- 96 BLANN, A. D. et al. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. **Thromb Haemost**, v. 77, n. 6, p. 1077-80, Jun 1997. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241735> >.
- 97 ATALAR, E. et al. Increased plasma levels of soluble selectins in patients with unstable angina. **Int J Cardiol**, v. 78, n. 1, p. 69-73, Mar 2001. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259814> >.
- 98 DA COSTA MARTINS, P. A. et al. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 3, p. 499-507, Mar 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415171> >.
- 99 GAWAZ, M. P. et al. Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. **Kidney Int**, v. 46, n. 2, p. 489-95, Aug 1994. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7526025> >.
- 100 KAWABATA, K. et al. Platelet GPIIb/IIIa is activated and platelet-leukocyte coaggregates formed in vivo during hemodialysis. **Nephron**, v. 90, n. 4, p. 391-400, Apr 2002. ISSN 0028-2766. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11961397> >.

- 101 STACH, K. et al. Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. **Cardiol J**, v. 19, n. 1, p. 20-8, 2012. ISSN 1897-5593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22298164> >.
- 102 MAJUMDER, B. et al. Improved accuracy and reproducibility of enumeration of platelet-monocyte complexes through use of doublet-discriminator strategy. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 82, n. 6, p. 353-9, Nov 2012. ISSN 1552-4957. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915375> >.
- 103 STENVINKEL, P. et al. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, n. 10, p. 1624-30, Oct 2000. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007832> >.
- 104 CONNOLLY, G. M. et al. Elevated soluble cellular adhesion molecules are associated with increased mortality in a prospective cohort of renal transplant recipients. **BMC Nephrol**, v. 12, p. 23, 2011. ISSN 1471-2369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600046> >.
- 105 CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2068-101, Oct 1994. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522621> >.
- 106 NEUFELD, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J**, v. 13, n. 1, p. 9-22, Jan 1999. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872925> >.
- 107 PENG, W. et al. Prediction of subclinical renal allograft rejection by vascular endothelial growth factor in serum and urine. **J Nephrol**, v. 21, n. 4, p. 535-42, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 1121-8428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18651543> >.
- 108 WHITTLE, C. et al. Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. **Clin Sci (Lond)**, v. 97, n. 3, p. 303-12, Sep 1999. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10464055> >.
- 109 BAILEY, E. et al. Vascular endothelial growth factor mRNA expression in minimal change, membranous, and diabetic nephropathy demonstrated by non-isotopic in situ hybridisation. **J Clin Pathol**, v. 52, n. 10, p. 735-8, Oct 1999. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10674029> >.
- 110 FERRARA, N.; GERBER, H. P. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. **Acta Haematol**, v. 106, n. 4, p. 148-56, 2001. ISSN 0001-5792. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815711> >.
- 111 BATTINELLI, E. M.; MARKENS, B. A.; ITALIANO, J. E. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1359-69, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680800> >.
- 112 BORENSZTAJN, K. et al. FXa-induced intracellular signaling links coagulation to neoangiogenesis: potential implications for fibrosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793,

- n. 5, p. 798-805, May 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339215> >.
- 113 BACKES, Y. et al. Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review. **Intensive Care Med**, v. 38, n. 9, p. 1418-28, Sep 2012. ISSN 1432-1238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22706919> >.
- 114 CHAVAKIS, T. et al. Release of soluble urokinase receptor from vascular cells. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 2, p. 686-93, Aug 2001. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522023> >.
- 115 MAZZIERI, R.; BLASI, F. The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. **Thromb Haemost**, v. 93, n. 4, p. 641-6, Apr 2005. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15841307> >.
- 116 PLIYEV, B. K.; MENSHIKOV, M. Y. Release of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) by activated neutrophils in rheumatoid arthritis. **Inflammation**, v. 33, n. 1, p. 1-9, Feb 2010. ISSN 1573-2576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756998> >.
- 117 WEI, C. et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Med**, v. 17, n. 8, p. 952-60, Aug 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804539> >.
- 118 PARIKH, S. M. Circulating mediators of focal segmental glomerulosclerosis: soluble urokinase plasminogen activator receptor in context. **Am J Kidney Dis**, v. 59, n. 3, p. 336-9, Mar 2012. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033283> >.
- 119 KOBAYASHI, T. et al. ADAMTS13 related markers and von Willebrand factor in plasma from patients with thrombotic microangiopathy (TMA). **Thromb Res**, v. 121, n. 6, p. 849-54, 2008. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900666> >.
- 120 RIOS, D. R. et al. Hemodialysis vascular access thrombosis: The role of factor V Leiden, prothrombin gene mutation and ABO blood groups. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 5-6, p. 425-9, Feb 2011. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070754> >.
- 121 SCHETTERT, I. T. et al. Association between ADAMTS13 polymorphisms and risk of cardiovascular events in chronic coronary disease. **Thromb Res**, v. 125, n. 1, p. 61-6, Jan 2010. ISSN 1879-2472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427680> >.
- 122 SONNEVELD, M. A.; DE MAAT, M. P.; LEEBEEK, F. W. Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis. **Blood Rev**, v. 28, n. 4, p. 167-78, Jul 2014. ISSN 1532-1681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825749> >.
- 123 TANIGUCHI, S. et al. Association between reduced ADAMTS13 and diabetic nephropathy. **Thromb Res**, v. 125, n. 6, p. e310-6, Jun 2010. ISSN 1879-2472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307901> >.

- 124 BONGERS, T. **ADAMTS13 in Arterial Thrombosis**. Rotterdam / Netherland: Department of Hematology, Erasmus University Medical Center. 160p, 2010.
- 125 LEE, M. et al. ADAMTS13 promotes angiogenesis and modulates VEGF-induced angiogenesis. **Microvasc Res**, v. 84, n. 2, p. 109-15, Sep 2012. ISSN 1095-9319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22626948> >.
- 126 WADA, H. et al. Increased levels of vascular endothelial cell markers in thrombotic thrombocytopenic purpura. **Am J Hematol**, v. 44, n. 2, p. 101-5, Oct 1993. ISSN 0361-8609. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8266913> >.
- 127 TAKAGI, M. et al. Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 5, n. 5, p. 713-7, Oct 1994. ISSN 0957-5235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7865676> >.
- 128 ALPOIM, P. N. et al. ADAMTS13, FVIII, von Willebrand factor, ABO blood group assessment in preeclampsia. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 23-24, p. 2162-6, Nov 2011. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840304> >.
- 129 MANEA, M. et al. Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells. **Pediatr Nephrol**, v. 25, n. 1, p. 87-96, Jan 2010. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644711> >.
- 130 TATI, R. et al. Phenotypic expression of ADAMTS13 in glomerular endothelial cells. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21587, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720563> >.
- 131 ZAFRANI, L. et al. Acute renal failure is prevalent in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with low plasma ADAMTS13 activity. **J Thromb Haemost**, v. 13, n. 3, p. 380-9, Mar 2015. ISSN 1538-7836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25523333> >.
- 132 SEDAGHAT, S. et al. von Willebrand Factor, ADAMTS13 Activity, and Decline in Kidney Function: A Population-Based Cohort Study. **Am J Kidney Dis**, Aug 2016. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497525> >.
- 133 FUKUSHIMA, H. et al. Ratio of von Willebrand factor propeptide to ADAMTS13 is associated with severity of sepsis. **Shock**, v. 39, n. 5, p. 409-14, May 2013. ISSN 1540-0514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481506> >.
- 134 KOBAYASHI, S. et al. Increased von Willebrand Factor to ADAMTS13 ratio as a predictor of thrombotic complications following a major hepatectomy. **Arch Surg**, v. 147, n. 10, p. 909-17, Oct 2012. ISSN 1538-3644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23117828> >.
- 135 HUGENHOLTZ, G. C. et al. An unbalance between von Willebrand factor and ADAMTS13 in acute liver failure: implications for hemostasis and clinical outcome. **Hepatology**, v. 58, n. 2, p. 752-61, Aug 2013. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468040> >.
- 136 QU, L. et al. Assessment of the Diagnostic Value of Plasma Levels, Activities, and Their Ratios of von Willebrand Factor and ADAMTS13 in Patients with Cerebral Infarction. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 22, n. 3, p. 252-9, Apr 2016. ISSN 1938-2723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25916953> >.

- 137 RURALI, E. et al. ADAMTS13 predicts renal and cardiovascular events in type 2 diabetic patients and response to therapy. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3599-609, Oct 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23733198> >.
- 138 NAKAYAMA, T. et al. Endothelial von Willebrand factor release due to eNOS deficiency predisposes to thrombotic microangiopathy in mouse aging kidney. **Am J Pathol**, v. 176, n. 5, p. 2198-208, May 2010. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363914> >.
- 139 FREITAS, L. G. **Inovações Metodológicas Em Hematologia Clínica: Uso Da Citometria De Fluxo No Estudo Da Ativação Plaquetária Na Pré-Eclâmpsia**. 2012. 161 (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO). FACULDADE DE FARMÁCIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, BELO HORIZONTE.
- 140 DINIZ, J. S. S. et al. 30 Anos de Experiência em Nefrologia Pediátrica: um Estudo Descritivo. **J Bras Nefrol**, v. XXVII, n. 4, p. 201-206, 2005.
- 141 MIZUNO, R. Increase in male fetal deaths in Japan and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **Reprod Toxicol**, v. 30, n. 3, p. 405-8, Nov 2010. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493248> >.
- 142 REIS, G. S. et al. Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **J Pediatr (Rio J)**, v. 90, n. 1, p. 58-64, 2014 Jan-Feb 2014. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131739> >.
- 143 FURTH, S. L. et al. Metabolic abnormalities, cardiovascular disease risk factors, and GFR decline in children with chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, n. 9, p. 2132-40, Sep 2011. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21841064> >.
- 144 OLIVEIRA, J. C. D. E. A. Baixa estatura na doença renal crônica: fisiopatologia e tratamento com hormônio de crescimento. **São Paulo: Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 5, p. 783-791, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302008000500010&lng=en&nrm=iso >.
- 145 FLYNN, J. T.; TULLUS, K. Severe hypertension in children and adolescents: pathophysiology and treatment. **Pediatr Nephrol**, v. 24, n. 6, p. 1101-12, Jun 2009. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18839219> >.
- 146 SIMÕES E SILVA, A. C.; FLYNN, J. T. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. **Pediatr Nephrol**, v. 27, n. 10, p. 1835-45, Oct 2012. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21947887> >.
- 147 HARRIS, R. C.; NEILSON, E. G. Toward a unified theory of renal progression. **Annu Rev Med**, v. 57, p. 365-80, 2006. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409155> >.
- 148 KOLVEK, G. et al. Solitary functioning kidney in children - a follow-up study. **Kidney Blood Press Res**, v. 39, n. 4, p. 272-8, 2014. ISSN 1423-0143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25171427> >.

- 149 MACEDO, C. S.; RIYUZO, M. C.; BASTOS, H. D. [Renal scars in children with primary vesicoureteral reflux]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 79, n. 4, p. 355-62, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0021-7557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513136> >.
- 150 ABENSUR, H. Deficiência de ferro na doença renal crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, n. 2, p. 95-98, 2010.
- 151 BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria Nº 226, DE 10 DE MAIO DE 2010.** 2010.
- 152 GARCIA, C. D.; BANDEIRA, M. D. F. S. Recomendações para Tratamento da Anemia no Paciente Pediátrico. **J. Bras. Nefrol**, v. 29, p. 27-32, 2007.
- 153 FADROWSKI, J. J. et al. Hemoglobin decline in children with chronic kidney disease: baseline results from the chronic kidney disease in children prospective cohort study. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, n. 2, p. 457-62, Mar 2008. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235140> >.
- 154 DE BRITO-ASHURST, I. et al. Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 9, p. 2075-84, Sep 2009. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608703> >.
- 155 ISN, International Society Of Nephrology. **KDIGO Clinical Practice Guideline for Lipid Management in Chronic Kidney Disease.** volume 3: 259-305 p. 2013.
- 156 MOAL, V. et al. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 9, p. 1834-41, Sep 2003. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937232> >.
- 157 VAN BLADEL, E. R. et al. Platelets of patients with chronic kidney disease demonstrate deficient platelet reactivity in vitro. **BMC Nephrol**, v. 13, p. 127, 2012. ISSN 1471-2369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020133> >.
- 158 SCHOORL, M.; NUBÉ, M. J.; BARTELS, P. C. Coagulation activation, depletion of platelet granules and endothelial integrity in case of uraemia and haemodialysis treatment. **BMC Nephrol**, v. 14, p. 72, 2013. ISSN 1471-2369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537104> >.
- 159 TOMER, A. Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 18, n. 2, p. 172-7, 2004 Apr-Jun 2004. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471223> >.
- 160 KOZEK-LANGENECKER, S. A. et al. Fibrinogen fragments and platelet dysfunction in uremia. **Kidney Int**, v. 56, n. 1, p. 299-305, Jul 1999. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411706> >.
- 161 LIANI, M. et al. Arteriovenous fistula obstruction and expression of platelet receptors for von Willebrand factor and for fibrinogen (glycoproteins GPIb and GPIIb/IIIa) in hemodialysis patients. **Int J Artif Organs**, v. 19, n. 8, p. 451-4, Aug 1996. ISSN 0391-3988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8841843> >.

- 162 MICHELSON, A. D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. **Blood**, v. 87, n. 12, p. 4925-36, Jun 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8652804> >.
- 163 DELGADO, A. V. et al. Antibodies against human cell receptors, CD36, CD41a, and CD62P crossreact with porcine platelets. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 56, n. 1, p. 62-7, Nov 2003. ISSN 1552-4949. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14582138> >.
- 164 DI MINNO, G. et al. Glanzmann's thrombasthenia (defective platelet integrin alphaIIb-beta3): proposals for management between evidence and open issues. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 6, p. 1157-64, Dec 2009. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967146> >.
- 165 KYRLE, P. A. et al. Evidence for an increased generation of prostacyclin in the microvasculature and an impairment of the platelet alpha-granule release in chronic renal failure. **Thromb Haemost**, v. 60, n. 2, p. 205-8, Oct 1988. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2975407> >.
- 166 SCHÖNBECK, U.; LIBBY, P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. **Cell Mol Life Sci**, v. 58, n. 1, p. 4-43, Jan 2001. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229815> >.
- 167 LIEVENS, D. et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4317-27, Nov 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705757> >.
- 168 ANDRÉ, P. et al. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, n. 8, p. 896-9, Aug 2002. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12186789> >.
- 169 MALYSZKO, J. et al. Increased soluble CD40L levels are reduced by long-term simvastatin treatment in peritoneally dialyzed patients. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 15, n. 6, p. 463-7, Sep 2004. ISSN 0957-5235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311154> >.
- 170 SCHÖNBECK, U. et al. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. **Circulation**, v. 104, n. 19, p. 2266-8, Nov 2001. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696462> >.
- 171 ASHMAN, N. et al. Increased platelet-monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 10, p. 2088-96, Oct 2003. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679485> >.
- 172 PANASIUK, A. et al. Blood platelet and monocyte activations and relation to stages of liver cirrhosis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 18, p. 2754-8, May 2005. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884116> >.
- 173 AHN, K. C. et al. Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 329, n. 1, p. 345-55, Apr 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721313> >.
- 174 PATKO, Z. et al. Roles of Mac-1 and glycoprotein IIb/IIIa integrins in leukocyte-platelet aggregate formation: stabilization by Mac-1 and inhibition by GpIIb/IIIa blockers.

- Platelets**, v. 23, n. 5, p. 368-75, 2012. ISSN 1369-1635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22671289> >.
- 175 PATKÓ, Z. et al. Elevation of monocyte-platelet aggregates is an early marker of type 2 diabetes. **Interv Med Appl Sci**, v. 4, n. 4, p. 181-5, Dec 2012. ISSN 2061-1617. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24265874> >.
- 176 MALATINO, L. S. et al. Circulating E-selectin as a risk marker in patients with end-stage renal disease. **J Intern Med**, v. 262, n. 4, p. 479-87, Oct 2007. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875185> >.
- 177 STAM, F. et al. Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 5, p. 892-8, May 2003. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686661> >.
- 178 ITO, S. et al. Indoxyl sulfate induces leukocyte-endothelial interactions through up-regulation of E-selectin. **J Biol Chem**, v. 285, n. 50, p. 38869-75, Dec 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937831> >.
- 179 KOLSETH, I. B. et al. Increased levels of inflammatory mediators and proinflammatory monocytes in patients with type I diabetes mellitus and nephropathy. **J Diabetes Complications**, Jul 2016. ISSN 1873-460X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27452162> >.
- 180 FERRARA, N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. **Curr Opin Biotechnol**, v. 11, n. 6, p. 617-24, Dec 2000. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102799> >.
- 181 LOGUE, O. C. et al. Therapeutic angiogenesis by vascular endothelial growth factor supplementation for treatment of renal disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 25, n. 5, p. 404-9, Sep 2016. ISSN 1473-6543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27367910> >.
- 182 UPADHYAY, A. et al. Inflammation, kidney function and albuminuria in the Framingham Offspring cohort. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 3, p. 920-6, Mar 2011. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682604> >.
- 183 CHEN, J. et al. Interrelationship of Multiple Endothelial Dysfunction Biomarkers with Chronic Kidney Disease. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132047, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132137> >.
- 184 TUMUR, Z. et al. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **Am J Nephrol**, v. 31, n. 5, p. 435-41, 2010. ISSN 1421-9670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20389059> >.
- 185 WANG, A. Y. et al. Circulating soluble vascular cell adhesion molecule 1: relationships with residual renal function, cardiac hypertrophy, and outcome of peritoneal dialysis patients. **Am J Kidney Dis**, v. 45, n. 4, p. 715-29, Apr 2005. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806475> >.
- 186 BOCK, M. E. et al. Serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor levels and idiopathic FSGS in children: a single-center report. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 8,

- n. 8, p. 1304-11, Aug 2013. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620441> >.
- 187 BLASI, F.; CARMELIET, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 12, p. 932-43, Dec 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461559> >.
- 188 SEVER, S. et al. Is there clinical value in measuring suPAR levels in FSGS? **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 8, n. 8, p. 1273-5, Aug 2013. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886567> >.
- 189 SCHLÖNDORFF, D. Are serum suPAR determinations by current ELISA methodology reliable diagnostic biomarkers for FSGS? **Kidney Int**, v. 85, n. 3, p. 499-501, Mar 2014. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583981> >.
- 190 SOUSA, L. P. N. **Doença renal crônica na infância (até 18 anos): avaliação da hemostasia, do stress oxidativo e implicações clínicas**. 2012. 164 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Farmácia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 191 MOTA, A. P. et al. Hemostatic Parameters according to Renal Function and Time after Transplantation in Brazilian Renal Transplanted Patients. **Dis Markers**, v. 2015, p. 472750, 2015. ISSN 1875-8630. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26229221> >.
- 192 RIOS, D. R. et al. ADAMTS13 and von Willebrand factor assessment before and after kidney transplantation. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 23-24, p. 2353-4, Nov 2011. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910980> >.
- 193 DOMINGUETI, C. P. et al. Von Willebrand Factor, ADAMTS13 and D-Dimer Are Correlated with Different Levels of Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132784, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168189> >.
- 194 MUSLIMOVIC, A. et al. Inflammatory Markers and Procoagulants in Chronic Renal Disease Stages 1-4. **Med Arch**, v. 69, n. 5, p. 307-10, Oct 2015. ISSN 0350-199X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26622082> >.
- 195 DOMINGUETI, C. P. et al. Association of Haemostatic and Inflammatory Biomarkers with Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. **J Diabetes Res**, v. 2016, p. 2315260, 2016. ISSN 2314-6753. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26770985> >.
- 196 LIU, J. et al. Effects of losartan on fibrinolytic parameters and von Willebrand factor in Chinese subjects with hypertension: a comparative study versus atenolol. **J Int Med Res**, v. 37, n. 3, p. 595-600, 2009 May-Jun 2009. ISSN 0300-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589241> >.
- 197 LIU, H. Q. et al. Effect of compound EXP-2528 on angiotensin II-induced E-selectin and VCAM-1 expression in rat brain microvascular endothelial cells in vitro. **Yao Xue Xue Bao**, v. 42, n. 8, p. 822-7, Aug 2007. ISSN 0513-4870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17944228> >.
- 198 GAMBOA, J. L. et al. Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin-receptor blockade on inflammation during hemodialysis. **J Am Soc**

Nephrol, v. 23, n. 2, p. 334-42, Feb 2012. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158433> >.

- 199 SIMÕES E SILVA, A. C.; TEIXEIRA, M. M. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. **Pharmacol Res**, v. 107, p. 154-62, May 2016. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26995300> >.
- 200 SIMÕES E SILVA, A. C. et al. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 3, p. 477-92, Jun 2013. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23488800> >.
- 201 ITO, A. et al. Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. **Jpn Circ J**, v. 65, n. 9, p. 775-8, Sep 2001. ISSN 0047-1828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11548874> >.
- 202 MANNUCCI, P. M. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, n. 9, p. 1359-62, Sep 1998. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743222> >.

ANEXO 1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG

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

Projeto: CAAE –07513513.9.0000.5149

Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse
Departamento de Produtos Farmacêuticos
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de maio de 2013, o projeto de pesquisa intitulado **"Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

**ANEXO 2 ANUÊNCIA DO DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA PEDIÁTRICA DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG**



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Unidade de Nefrologia Pediátrica - PED

UFMG

Belo Horizonte, 07 de março de 2013

Declaro para os devidos fins que a pesquisa intitulada “DOENÇA RENAL CRÔNICA NA INFÂNCIA: AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA, DO ESTRESSE OXIDATIVO E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS” será realizada na Unidade de Nefrologia Pediátrica, com total anuência da coordenação da Unidade.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita de Eduardo Araújo de Oliveira.

Eduardo Araújo de Oliveira
Prof Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina - UFMG
Coordenador da Unidade de Nefrologia Pediátrica
Hospital das Clínicas da UFMG

APÊNDICE 1 TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para os responsáveis por crianças saudáveis na faixa etária inferior a 7 anos - GRUPO CONTROLE)
PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas”

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, precisamos também fazer os exames de coagulação em crianças saudáveis como é o caso do seu(ua) filho(a). Dessa forma, gostaríamos de pedir sua autorização para colhemos 12mL dele(a), uma única vez.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

A participação de seu(ua) filho(a) neste estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios. O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo.

Caso você não queira dar sua autorização, não haverá nenhum problema.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você estiver de acordo, por favor, assine este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^aLuci Maria Sant’Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Morais e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____ responsável pela criança _____, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em permitir a participação da mesma.

Confirmo que a seleção desta criança foi feita de forma voluntária e que assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do responsável _____ ID: _____

Assinatura do pesquisado _____

Belo Horizonte, de _____ 201__



Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para participantes saudáveis na faixa etária de 7 a 12 anos e seus responsáveis - GRUPO CONTROLE)

PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas”

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, precisamos também fazer os exames de coagulação em crianças saudáveis como é o caso do seu(ua) filho(a). Dessa forma, gostaríamos de pedir sua autorização, bem como a dele(a) para colhermos 12mL de sangue, uma única vez. Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

A participação de seu(ua) filho(a) neste estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios. O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo.

Caso você ou ele(a) não queiram dar a autorização, não haverá nenhum problema.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa vocês deverão entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você e seu(ua) filho(a) estiverem de acordo, por favor, assinem este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^a Luci Maria Sant’Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Moraes e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____, responsável por _____, bem como ele(a), entendemos tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordamos em participar da mesma. Confirmamos que a seleção deste participante foi feita de forma voluntária e que assinamos e recebemos uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do responsável _____ ID: _____

Assinatura do participante _____ ID: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, de _____ 201__



Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para os participantes saudáveis na faixa etária de 13 a 18 anos - GRUPO CONTROLE)
PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas”

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, precisamos também fazer os exames de coagulação em crianças e adolescentes saudáveis, como é o seu caso. Dessa forma, gostaríamos de pedir sua autorização para colhermos 12mL de sangue, uma única vez. Seus pais ou responsáveis também assinarão um termo de autorização.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

A sua participação neste estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios. O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo.

Caso você não queira dar sua autorização, não haverá nenhum problema.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa vocês deverão entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você estiver de acordo, por favor, assine este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^a Luci Maria Sant'Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Moraes e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____ entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar da mesma.

Confirmo que a seleção deste participante foi feita de forma voluntária e que assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do participante _____ ID: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, de _____ de 201__



**Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas**

Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para os responsáveis pelos
participantes saudáveis na faixa etária de 13 a 18 anos - GRUPO CONTROLE)
PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia,
do estresse oxidativo e implicações clínicas”**

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, precisamos também fazer os exames de coagulação em crianças e adolescentes saudáveis, como é o caso do seu(ua) filho(a). Dessa forma, gostaríamos de pedir sua autorização, bem como a dele(a), para colhermos 12mL de sangue, uma única vez.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

A participação de seu(ua) filho(a) neste estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios. O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo.

Caso você ou ele(a) não queiram dar a autorização, não haverá nenhum problema.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa vocês deverão entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você e seu(ua) filho(a) estiverem de acordo, por favor, assine este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^a Luci Maria Sant'Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Moraes e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____ responsável por
_____, bem como ele(a), entendemos tudo que
foi explicado sobre essa pesquisa e concordamos em participar da mesma.

Confirmamos que a seleção deste participante foi feita de forma voluntária e que assinamos e recebemos uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do responsável _____ ID: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, de _____ de 201__



**Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(para crianças com doença renal crônica na faixa inferior a 7 anos e seus responsáveis)**

PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas”

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, gostaríamos de pedir sua autorização para colhermos 12mL de sangue de seu(ua) filho(a), uma única vez, para fazer os exames de coagulação.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

A participação de seu(ua) filho(a) no estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios. O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo.

Caso você não queira dar a autorização, não haverá nenhum comprometimento ao atendimento e tratamento seu(ua) filho(a) no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você e seu(ua) filho(a) estiverem de acordo, por favor, assinem este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^a Luci Maria Sant’Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Moraes e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____ responsável pela criança _____, portadora de doença renal, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em permitir a participação da mesma.

Confirmo que a seleção desta criança foi feita de forma voluntária e que assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do responsável _____ ID: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, de _____ de 201__



**Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(para crianças com doença renal crônica na faixa etária de 7 a 12 anos e seus responsáveis)**

PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas”

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, gostaríamos de pedir sua autorização e de seu(ua) filho(a) para colhermos 12mL de sangue desse, uma única vez, para fazer os exames de coagulação. Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo. A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios. Caso você ou seu(ua) filho(a) não queiram dar a autorização, não haverá nenhum comprometimento ao atendimento e tratamento desse no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você e seu(ua) filho(a) estiverem de acordo, por favor, assinem este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^aLuci Maria Sant’Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Morais e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____ responsável pelo paciente _____, portador de doença renal, bem como ele (a), entendemos tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordamos em participar da mesma. Confirmamos que a seleção deste paciente foi feita de forma voluntária e que assinamos e recebemos uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do responsável _____ ID: _____

Assinatura do paciente _____ ID: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, de _____ de 201__



**Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(para participantes com doença renal crônica na faixa etária de 13 a 18 anos)

PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas”

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, gostaríamos de pedir sua autorização para colhermos 12mL de seu sangue, uma única vez, para fazer os exames de coagulação. Seus pais ou responsáveis também assinarão um termo de autorização.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo. A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios.

Caso você não queira dar a autorização, não haverá nenhum comprometimento no seu atendimento e tratamento no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você e seu(ua) filho(a) estiverem de acordo, por favor, assinem este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^a Luci Maria Sant’Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Morais e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____, portador de doença renal, entendemos tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar da mesma. Confirmando que a seleção deste paciente foi feita de forma voluntária e que assinamos e recebemos uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do paciente _____ ID: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, de _____ de 201__



Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(para os responsáveis pelos participantes com doença renal crônica na faixa etária de
13 a 18 anos)

PROJETO DE PESQUISA: “Doença renal crônica na infância: avaliação da hemostasia, do estresse oxidativo e implicações clínicas”

Prezado (a) Sr(a),

Estamos desenvolvendo uma pesquisa na Faculdade de Farmácia e no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos a coagulação do sangue em crianças com doença renal. Alguns estudos mostram que as doenças renais podem estar associadas a alterações da coagulação e este estudo visa avaliar isto nas crianças atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para realizar este estudo, gostaríamos de pedir sua autorização e de seu(ua) filho(a) para colhermos 12mL de sangue desse, uma única vez, para fazer os exames de coagulação.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente e serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

O nome e os resultados dos exames dos participantes do estudo serão mantidos em segredo. A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhum pagamento ou benefícios.

Caso você ou seu(ua) filho(a) não queiram dar a autorização, não haverá nenhum comprometimento ao atendimento e tratamento desse no Hospital das Clínicas da UFMG.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Se você e seu(ua) filho(a) estiverem de acordo, por favor, assinem este termo de compromisso.

Professores responsáveis:

Dr^a Ana Cristina Simões e Silva – Telefone – 3409-9640

Dr^aLuci Maria Sant’Ana Dusse – Telefone: 3409-6880

Doutoranda Rívia Mara Moraes e Silva – Telefone – 3409-6900

Mestranda Letícia Parreiras Nunes Sousa – 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Tel.: 3409.4592

Eu, _____ responsável pelo paciente
_____, portador de doença renal, bem como ele
(a), entendemos tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordamos em participar da mesma. Confirmamos que a seleção deste paciente foi feita de forma voluntária e que assinamos e recebemos uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do responsável _____ ID: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, de _____ de 201__

APÊNDICE 2 FICHA CLÍNICA

FICHA CLÍNICA

PROJETO DE PESQUISA: “DOENÇA RENAL CRÔNICA NA INFÂNCIA: AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA, DO ESTRESSE OXIDATIVO E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS”

Data da coleta: _____
 Grupo: _____ Participante nº: _____

1. Identificação

Nome: _____
 Registro Same: _____ Registro Grim: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____
 Endereço: Rua/Avenida _____ N° _____ Complemento: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____
 CEP: _____ Estado: _____
 Telefone: () _____ E-mail: _____
 Nome do pai ou responsável: _____
 Gênero: ☐ masculino ☐ feminino
 Cor: ☐ branco ☐ negro ☐ pardo ☐ amarelo ☐ índio

Idade início acompanhamento: _____ Data início acompanhamento: _____
 Peso no início acompanhamento: _____ Kg Estatura no início acompanhamento: _____ m
 Índice nutricional: _____

Qual o tipo de DRC diagnosticada? ☐ GESF ☐ CAKUT ☐ outra: _____

2. Achados clínicos iniciais e associados ao diagnóstico

- | | |
|---|--|
| ☐ Edema | ☐ Lipidúria/lipemia |
| ☐ Hipertensão | ☐ Náuseas e vômitos |
| ☐ Hematúria | ☐ Alterações do jato urinário |
| ☐ Proteinúria | ☐ Disúria |
| ☐ Déficit do crescimento | ☐ Polaciúria |
| ☐ ITU | ☐ Oligoanúria/anúria |
| ☐ Palidez | ☐ Dor lombar |
| ☐ Anormalidades ósseas | ☐ Manifestações urêmicas |
| ☐ Alterações estado mental | ☐ Outros (especificar) |

RFG (mL/min/1,73m²) ao diagnóstico e atual:

- ☐ IRC leve (50-89)
☐ IRC moderada (30-59)
☐ IRC grave (15-29)
☐ Doença renal terminal (<15 ou diálise)

3. Etiologia

- | • Data do diagnóstico: _____ | • Diagnóstico | • Terapêutica instaurada |
|---|--|--------------------------|
| ☐ Glomerulopatias (especificar) | ☐ | ☐ |
| ☐ Doença renal cística | ☐ SHU | ☐ |
| ☐ Doenças hereditárias/congênicas | ☐ Doença vascular renal | ☐ |
| ☐ Nefropatia do refluxo | ☐ Nefrite intersticial/tubulopatias (especificar) | ☐ |
| ☐ Nefropatias obstrutivas | ☐ Bexiga neurogênica | ☐ |
| ☐ Doenças sistêmicas (especificar) | ☐ Indeterminada | ☐ |
| ☐ Pielonefrite | ☐ Outras (especificar): | |

4. Tratamento:

Uso de imunossupressores

- ☐ Prednisona
☐ Ciclofosfamida
☐ Ciclosporina
☐ Micofenolato

☐ Outros

Tratamentos extra imunossupressão

- ☐ Tratamento da HA (evolução)
☐ Tratamento da proteinúria (evolução)
☐ Outros

Esquema final/atual: _____

Medicamento: _____ Dose: _____ Uso: ☐ diário ☐ semanal ☐ mensal
 Medicamento: _____ Dose: _____ Uso: ☐ diário ☐ semanal ☐ mensal
 Medicamento: _____ Dose: _____ Uso: ☐ diário ☐ semanal ☐ mensal
 Medicamento: _____ Dose: _____ Uso: ☐ diário ☐ semanal ☐ mensal

Adesão ao tratamento : () sim ou () não; motivo:

- ☐ Diálise: sim não
 Data de início: _____
 Características TRS (tipo/tempo): _____

5. Fatores de Risco

- ☐ Antecedente familiar de hipertensão primária
☐ Antecedente familiar de hipertensão secundária (especificar causa): _____
☐ Antecedente de doença renal hereditária ou não (especificar qual): _____
☐ Diabetes
☐ Episódio anterior de IRA
☐ Antecedentes de doenças imunológicas (especificar)

Possui outra(s) doença(s) além da DRC? ☐ SIM ☐ NÃO . Se SIM, qual(is)? _____

Possui histórico de trombose? _____

Algum familiar já teve trombose/ infarto? _____ Grau de parentesco: _____

Teve alguma doença infecciosa ou inflamatória nas últimas 3 semanas? ☐ SIM ☐ NÃO. Se SIM, quando? _____

6. Resultados exames imagem

7. Resultados de BRPC:

8. Exames laboratoriais:

Datas						
Resultados:						
Hemoglobina						
Hematócrito						
Uréia						
Creatinina						
Ácido úrico						
Albumina						
Triglicérides						
Colesterol Total						
LDL						
HDL						
Glicemia jejum						
Fosfato						

Na ⁺						
K ⁺						
Ca ⁺						
Cl ⁻						
Mg ⁺²						
Aldosterona						
Atividade renina						
Sedimento urinário:						
Elementos anormais						
Cilindros						
Proteinúria						
pH sanguíneo						
HCO ³⁻						
PTH						
FA						
Clearance de creatinina						
PT / albumina						
Ácido úrico						
PA						

Responsável pelo preenchimento: _____ Data: ____/____/____

GRUPO CONTROLE - Coeficiente r (Spearman)																
	D-DI	PAI-1	APN	APM	GPIIbIIIa	GPIIIa	CD40L	P-Selectina	ICAM	VCAM	Upar	e-Selectina	VEGF	ADAMTS13	FvW	FVW:ADAMTS13
RFG	0,3618	-0,0249	0,0023	-0,1316	-0,3036	-0,0708	0,0158	-0,0389	0,0327	0,1754	0,0589	0,2145	-0,1576	0,0431	-0,0851	-0,0554
D-DI		-0,1448	-0,0723	-0,1395	0,1279	0,2601	0,2179	0,1991	0,1631	0,2182	0,0474	0,0425	0,0628	0,1915	0,0363	-0,0336
PAI-1			-0,1640	-0,0430	0,0222	0,0327	-0,0334	0,0289	-0,0205	0,1649	0,1671	0,0527	0,3080	-0,1395	-0,1702	0,0303
APN				0,0585	-0,2369	0,1132	0,1936	0,0284	0,0911	0,0756	-0,2668	0,2357	0,0306	-0,0260	-0,0119	0,0222
APM					0,2598	-0,0010	-0,0919	-0,3324	-0,3108	0,0524	-0,4110	-0,2136	-0,0732	-0,0478	0,3545	0,1529
GPIIbIIIa					0,3599	0,2363	0,2921	0,2528	0,4065	0,0960	0,0581	0,4150	0,2633	-0,1976	-0,3044	
GPIIIa						0,6522	0,4695	0,2871	0,3222	0,1202	0,2548	0,0343	0,1589	-0,1157	-0,1524	
CD40L							0,6909	0,4020	0,3901	0,0678	0,3106	0,0301	0,2319	-0,2578	-0,4018	
P-Selectina								0,4308	0,2805	0,1067	0,2718	0,1843	0,2674	-0,3315	-0,4303	
ICAM									0,4010	0,2216	0,4073	0,1496	-0,1036	-0,5622	-0,3857	
VCAM										0,4867	0,5335	-0,0103	0,0980	-0,1935	-0,1617	
Upar											0,4024	-0,0867	0,1206	-0,1121	-0,0012	
e-Selectina												-0,2529	-0,0601	-0,2524	-0,1347	
VEGF													-0,0696	-0,1274	-0,0522	
ADAMTS13														-0,1133	-0,6020	
FvW															0,7726	
GRUPO CONTROLE - Nível de significância p																
	D-DI	PAI-1	APN	APM	GPIIbIIIa	GPIIIa	CD40L	P-Selectina	ICAM	VCAM	Upar	e-Selectina	VEGF	ADAMTS13	FvW	FVW:ADAMTS13
RFG	0,0495	0,8960	0,9869	0,3523	0,0286	0,6180	0,9117	0,7841	0,8615	0,3452	0,7531	0,2465	0,3971	0,8177	0,6490	0,7670
D-DI		0,4451	0,7041	0,4621	0,5005	0,1652	0,2474	0,2914	0,3892	0,2466	0,8036	0,8236	0,7418	0,3106	0,8491	0,8601
PAI-1			0,3865	0,8217	0,9071	0,8638	0,8610	0,8794	0,9145	0,3840	0,3775	0,7820	0,0978	0,4622	0,3685	0,8739
APN				0,6805	0,0908	0,4244	0,1691	0,8418	0,6258	0,6860	0,1469	0,2018	0,8704	0,8895	0,9494	0,9057
APM					0,0629	0,9945	0,5170	0,0161	0,0888	0,7794	0,0216	0,2487	0,6955	0,7985	0,0503	0,4116
GPIIbIIIa						0,0088	0,0917	0,0356	0,1699	0,0233	0,6076	0,7564	0,0203	0,1524	0,2867	0,0959
GPIIIa						0,0000	0,0004	0,1173	0,0771	0,5197	0,1665	0,8547	0,3933	0,5353	0,4130	
CD40L							0,0000	0,0250	0,0301	0,7172	0,0890	0,8725	0,2093	0,1615	0,0251	
P-Selectina								0,0155	0,1264	0,5679	0,1391	0,3209	0,1459	0,0685	0,0157	
ICAM									0,0254	0,2309	0,0230	0,4217	0,5790	0,0010	0,0321	
VCAM										0,0055	0,0020	0,9562	0,6000	0,2968	0,3848	
Upar												0,0248	0,5182	0,5483	0,9948	
e-Selectina													0,1699	0,7482	0,1707	0,4701
VEGF														0,7100	0,4945	0,7802
ADAMTS13															0,5439	0,0003
FvW																0,0000

GRUPO DRC - Coeficiente r (Spearman)																
	D-DI	PAI-1	APN	APM	GPiIbIIla	GPiIIa	CD40L	P-Selectina	ICAM	VCAM	Upar	e-Selectina	VEGF	ADAMTS13	FvW	FVW:ADAMTS13
RFG	0,2819	0,1569	0,1490	-0,1721	-0,0473	0,0424	0,1031	0,0700	0,1475	0,0910	0,2098	0,0126	0,2167	0,1068	0,1188	0,0491
D-DI		0,0054	0,4110	-0,0606	0,0690	0,0469	0,2184	0,1837	-0,0139	0,0988	0,3216	0,4424	0,1850	-0,0883	0,0616	0,0683
PAI-1			0,1276	-0,2963	-0,0808	-0,0915	-0,1427	0,0476	-0,0378	-0,4857	-0,3851	-0,0927	0,0200	-0,1859	-0,0301	0,1135
APN				0,0789	0,1540	0,0065	0,2013	0,2016	0,2255	0,2556	0,3151	0,1433	0,0949	-0,1830	-0,1460	0,0668
APM					-0,0019	-0,1396	0,0762	-0,1982	0,2868	0,4669	0,3546	0,1305	0,1722	-0,0329	-0,0933	-0,0215
GPiIbIIla						0,5317	0,2135	0,3029	-0,2373	-0,2020	0,0344	-0,1072	-0,2236	0,2557	-0,1565	-0,2949
GPiIIa							0,3481	0,5873	-0,2229	0,0654	0,0174	-0,0314	-0,2070	0,5379	-0,0068	-0,3988
CD40L								0,4572	-0,1311	-0,0333	0,1026	0,0770	-0,0096	0,1910	-0,0758	-0,1945
P-Selectina									0,0491	0,0287	-0,0578	0,0583	-0,2313	0,3514	0,0486	-0,1550
ICAM										0,3686	0,3126	0,1203	0,1286	-0,1597	0,0719	0,1912
VCAM											0,5297	0,2866	0,1049	0,1045	0,0977	0,0142
Upar												0,2960	0,3848	0,0327	-0,0872	-0,1079
e-Selectina													0,0835	-0,1899	0,0310	0,0490
VEGF														-0,1918	0,0868	0,2450
ADAMTS13															0,1277	-0,5504
FvW																0,7100
GRUPO DRC - Nível de significância p																
	D-DI	PAI-1	APN	APM	GPiIbIIla	GPiIIa	CD40L	P-Selectina	ICAM	VCAM	Upar	e-Selectina	VEGF	ADAMTS13	FvW	FVW:ADAMTS13
RFG	0,0910	0,3536	0,3653	0,2820	0,7720	0,7950	0,5211	0,6638	0,3838	0,5920	0,2126	0,9412	0,1977	0,5292	0,4838	0,7730
D-DI		0,9745	0,0128	0,7176	0,6849	0,7826	0,1877	0,2695	0,9340	0,5551	0,0490	0,0054	0,2661	0,5980	0,7133	0,6838
PAI-1			0,4585	0,0709	0,6343	0,5901	0,3928	0,7766	0,8220	0,0020	0,0170	0,5800	0,9050	0,2638	0,8577	0,4976
APN				0,6240	0,3429	0,9684	0,2069	0,2062	0,1861	0,1324	0,0612	0,4046	0,5821	0,2853	0,3957	0,6987
APM					0,9902	0,3780	0,6270	0,2027	0,0809	0,0031	0,0290	0,4349	0,3013	0,8446	0,5776	0,8983
GPiIbIIla						0,0003	0,1746	0,0512	0,1573	0,2306	0,8399	0,5279	0,1835	0,1266	0,3551	0,0764
GPiIIa							0,0239	0,0000	0,1849	0,7004	0,9185	0,8536	0,2190	0,0006	0,9683	0,0145
CD40L								0,0021	0,4327	0,8428	0,5397	0,6457	0,9542	0,2506	0,6509	0,2420
P-Selectina									0,7696	0,8643	0,7304	0,7280	0,1623	0,0305	0,7721	0,3529
ICAM										0,0228	0,0560	0,4721	0,4417	0,3383	0,6680	0,2503
VCAM											0,0006	0,0811	0,5307	0,5324	0,5595	0,9324
Upar												0,0712	0,0170	0,8454	0,6026	0,5191
e-Selectina													0,6182	0,2536	0,8536	0,7701
VEGF														0,2486	0,6045	0,1382
ADAMTS13															0,4448	0,0003
FvW																0,0000