

Relação dos níveis de hemoglobina com desfechos em transplante renal de doador falecido: um estudo de coorte retrospectivo

Relationship of hemoglobin levels with outcomes in deceased donor kidney transplant: a retrospective cohort study

Autores

Beatriz Moreira Silva¹ 
 Flavia Hosana Macedo¹ 
 Enzo Eiji Miyasato Hayano¹ 
 Suzeli Germano¹ 
 Isabella Ferreira Ribeiro¹ 
 Carolina Azze Franco² 
 Lucio Requião^{1,3} 
 José Medina-Pestana^{1,3} 
 Miguel Angelo Goes^{1,3} 

¹Universidade Federal de São Paulo, Divisão de Nefrologia, São Paulo, SP, Brasil.

²Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

³Universidade Federal de São Paulo, Hospital do Rim, São Paulo, SP, Brasil.

Data de submissão: 03/02/2023.

Data de aprovação: 03/11/2023.

Data de publicação: 26/01/2024.

Correspondência para:

Beatriz Moreira Silva.
 E-mail: beatriz.moreiras@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2023-0014pt>

RESUMO

Introdução: A anemia é frequente em pacientes submetidos à terapia substitutiva para insuficiência renal. A anemia nos períodos pré e pós-transplante pode estar relacionada aos desfechos do transplante renal. Portanto, o presente estudo buscou avaliar a relação entre anemia, função retardada do enxerto (FRE), disfunção crônica do enxerto renal (DCE) e óbito por qualquer causa após transplante renal de doador falecido. **Métodos:** Este foi um estudo retrospectivo com 206 pacientes transplantados renais de doadores falecidos. Analisamos dados demográficos de doadores falecidos e pacientes transplantados renais. Além disso, comparamos parâmetros bioquímicos, status de anemia e medicamentos entre os grupos FRE e não-FRE. Posteriormente, realizamos uma análise multivariada. Também avaliamos desfechos, como DCE em um ano e óbito em dez anos. **Resultados:** Observamos menor frequência de concentração de hemoglobina (Hb) pré-transplante, mas maior frequência de creatinina sérica do doador e transfusão de hemácias no período de uma semana após o transplante no grupo FRE. Além disso, houve associação independente entre a concentração de Hb antes do transplante e a FRE [OR 0,252; IC 95%: 0,159–0,401; $p < 0,001$]. Houve também associação entre a concentração de Hb após seis meses de transplante renal e ambos, DCE [OR 0,798; IC95%: 0,687–0,926; $p = 0,003$] e óbito por qualquer causa. **Conclusão:** Encontrou-se uma associação entre anemia pré-transplante e FRE e entre anemia seis meses após o transplante e ambos, DCE e óbito por qualquer causa. Assim, a anemia antes ou após o transplante afeta os desfechos de pacientes que foram submetidos a transplante renal de doador falecido.

ABSTRACT

Introduction: Anemia is frequent in patients undergoing replacement therapy for kidney failure. Anemia in the pre and post-transplantation period might be related to kidney transplant outcomes. The current study therefore sought to assess the relationship between anemia, delayed allograft function (DGF), chronic kidney allograft dysfunction (CAD), and death from any cause following kidney transplantation from a deceased donor. **Methods:** This was a retrospective study with 206 kidney transplant patients of deceased donors. We analyzed deceased donors' and kidney transplant patients' demographic data. Moreover, we compared biochemical parameters, anemia status, and medicines between DGF and non-DGF groups. Afterward, we performed a multivariate analysis. We also evaluated outcomes, such as CAD within one year and death in ten years. **Results:** We observed a lower frequency of pre-transplant hemoglobin concentration (Hb) but higher frequency of donor-serum creatinine and red blood transfusion within one week after transplantation in the group with DGF. In addition, there was an independent association between Hb concentration before transplantation and DGF [OR 0.252, 95%CI: 0.159–0.401; $p < 0.001$]. There was also an association between Hb concentration after six months of kidney transplantation and both CAD [OR 0.798, 95% CI: 0.687–0.926; $p = 0.003$] and death from any cause. **Conclusion:** An association was found between pre-transplantation anemia and DGF and between anemia six months after transplantation and both CAD and death by any cause. Thus, anemia before or after transplantation affects the outcomes for patients who have undergone kidney transplantation from a deceased donor.



Descritores: Anemia; Doador Falecido; Transplante de Rim; Função Retardada do Aloenxerto; Disfunção Crônica do Enxerto Renal.

Keywords: Anemia; Deceased Donor; Kidney Transplantation; Delayed Allograft Function; Chronic Kidney Allograft Dysfunction.

INTRODUÇÃO

A anemia e a doença cardiovascular são frequentes e estão relacionadas a complicações em pacientes com insuficiência renal (IR) em terapia substitutiva (TS). A doença cardiovascular é a principal causa de óbito em pacientes com IRTS^{1,2}. A anemia em pacientes com IRTS é multifatorial, mas causada principalmente pela produção insuficiente de eritropoietina (EPO)³. Outros fatores relacionados à diminuição da TFG, como deficiência de ferro, estresse oxidativo, inflamação, solutos urêmicos e toxinas, podem contribuir para a anemia relacionada à DRC²⁻⁶.

Portanto, a maioria dos pacientes com IRTS necessita de um agente estimulador da eritropoiese (AEE). Outros ainda precisam de transfusão de hemácias para o tratamento da anemia^{7,8}. O transplante renal pode restaurar a função renal, incluindo a produção de EPO. Portanto, o transplante renal pode aumentar a sobrevida e a qualidade de vida⁸. A função retardada do aloenxerto (FRE) está associada ao tempo de isquemia fria e a outros fatores clínicos^{5,6}. A FRE é o diagnóstico clínico quando o paciente ainda precisa de diálise na primeira semana após o TR, afetando negativamente a sobrevida do aloenxerto a curto e longo prazo^{6,7}.

A disfunção crônica do enxerto renal (DCE) é uma entidade clínica definida como um aumento lento da creatinina devido à diminuição progressiva da função renal com hipertensão e proteinúria associadas⁸. A DCE está associada à FRE, rejeição aguda e anemia⁸⁻¹¹. Além disso, é caracterizada por deterioração morfológica, que ocorre pelo menos de 3 a 6 meses e, geralmente, um ano após o transplante, na ausência de rejeição aguda ativa, toxicidade medicamentosa, doença vascular renal ou outras doenças renais⁸⁻¹⁰. Tais alterações no aloenxerto exigem biópsia renal percutânea quando há proteinúria inexplicada ou aumento da creatinina sérica. Além disso, a DCE é a doença renal mais crítica em longo prazo após o transplante renal e é uma condição histopatológica

disfuncional estabelecida. Pode se manifestar com espessamento intimal, espessamento da parede capilar glomerular, fibrose intersticial crônica e atrofia tubular no aloenxerto renal. A DCE não tem terapia específica e é mediada por diversos mecanismos, mas requer terapia de suporte^{9,10}.

Além disso, a anemia pode ocorrer após o transplante renal, com uma prevalência maior logo após o transplante^{11,12}. As principais causas de anemia no início do período pós-transplante incluem perda de sangue relacionada à cirurgia, desnutrição, medicamentos e hidratação excessiva, drogas imunossupressoras, inflamação, produção inadequada e resistência à eritropoietina (EPO)¹³⁻¹⁹. Portanto, verificamos se as concentrações de hemoglobina (Hb) pré e pós-transplante estão associadas à FRE, DCE e óbito por qualquer causa em receptores de transplante renal de doador falecido.

MÉTODOS

DESENHO DO ESTUDO E PACIENTES

Este foi um estudo de coorte observacional retrospectivo que incluiu todos os pacientes que receberam um transplante renal de doador falecido entre 1º de janeiro de 2008 e 31 de dezembro de 2008 e que preencheram os critérios de inclusão: idade ≥ 18 anos, tendo recebido um órgão de doador com creatinina $\leq 5,0$ mg/dL, independentemente da idade. Os critérios de exclusão foram: estar em diálise peritoneal nos dois meses anteriores ao transplante, gestantes, transplante de múltiplos órgãos, apresentar doença neurológica avançada ou condição psiquiátrica, perda de acompanhamento, falecimento dentro de 28 dias do transplante e não atingir ou não manter níveis séricos adequados de inibidores de calcineurina. A censura ocorreu na data do óbito, perda do enxerto ou fim do acompanhamento.

O estudo verificou possíveis associações entre níveis de hemoglobina pré-transplante,

pós-transplante imediato e seis meses pós-transplante e FRE, DCE e óbito por qualquer causa.

Todos os receptores de transplante renal receberam indução de imunossupressão com 1 g de metilprednisolona no intraoperatório e timoglobulina no período pós-operatório imediato por 2 ± 1 dias.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (30942614.9.0000.5505/2014) e realizado de acordo com a legislação nacional específica, as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa local, as diretrizes da Declaração de Helsinque e a Declaração de Istambul^{20,21}. O consentimento informado foi dispensado devido à natureza observacional retrospectiva e ao fato de as informações serem anônimas e não identificadas.

VARIÁVEIS DE INTERESSE

Para os receptores, as variáveis de interesse foram idade, sexo, comorbidades, etiologia da doença renal crônica (DRC) e os seguintes dados basais: pressão arterial média e uso de agentes anti-hipertensivos; nível de glicose no sangue; creatinina sérica; paratormônio, níveis de cálcio iônico, concentração de Hb, status de ferro, registro de transfusão de hemácias, medicamentos; uso de agentes estimuladores da eritropoiese (AEE) e suplementação de ferro. Os doadores foram separados em doadores padrão e doadores com critérios expandidos. Para doadores falecidos, as variáveis foram idade, nível final de creatinina sérica, tempo de isquemia fria (TIF), Índice de Risco do Doador Renal (KDRI, do inglês *Kidney Donor Risk Index*), Índice de Perfil do Doador Renal (KDPI, do inglês *Kidney Donor Profile Index*)²²⁻²⁷, e tipo de doador estratificado em critérios padrão ou expandidos²⁸.

As variáveis pré-transplante foram: sexo, idade, diabetes mellitus, hipertensão, pressão arterial média (PAM), creatinina, hemoglobina, ferro sérico, saturação de transferrina, ferritina, leucócitos e plaquetas. Após o transplante, todos os pacientes do estudo seguiram o protocolo institucional de 2008 para imunossupressão de receptores de doadores falecidos com metilprednisolona e timoglobulina intravenosas. A terapia de manutenção para esses receptores envolveu três classes de agentes imunossupressores orais, prednisona como corticosteroide, associada a um agente antimetabólito, como azatioprina ou micofenolato. O terceiro

componente imunossupressor consistia em um inibidor de calcineurina, ciclosporina ou tacrolimus, que apresenta potencial de nefrotoxicidade. Assim, a equipe do nefrologista avaliou cuidadosamente o nível sérico alvo de manutenção para os inibidores de calcineurina após o transplante renal de doadores falecidos com critérios expandidos ou lesão renal aguda. Os níveis séricos alvo de manutenção para a ciclosporina estão entre 100 e 300 ng/mL e para o tacrolimus estão entre 8 e 12 ng/mL. Todos os receptores de rins de doadores falecidos com critérios expandidos tiveram o tacrolimus introduzido tardiamente para minimizar os riscos de influência da nefrotoxicidade. Consideramos as seguintes variáveis: tempo em terapia de indução (em dias), necessidade de diálise ou transfusão de hemácias dentro de sete dias e episódios de rejeição aguda. Também analisamos a creatinina sérica do grupo FRE (3 meses; 91 ± 12 dias) e do grupo não-FRE (3 meses, 92 ± 11 dias), a concentração de Hb e a creatinina sérica após o transplante renal do grupo FRE (6 meses; 184 ± 19 dias) e do grupo não-FRE (6 meses; 179 ± 15 dias).

Em seguida, a equação CKD-EPI foi utilizada para estimar a função renal²⁹⁻³¹. Além disso, um aumento de 15 a 20% na creatinina sérica em relação ao valor basal sugere disfunção do enxerto renal, justificando a avaliação por ultrassom do aloenxerto e, possivelmente, uma biópsia do aloenxerto renal, conforme o protocolo da instituição hospitalar³².

DESFECHOS

Analisamos três desfechos diferentes em três momentos: FRE em uma semana após o transplante, DCE em um ano após o transplante e óbito por qualquer causa em até dez anos após o transplante renal.

DEFINIÇÕES

Consideramos FRE quando os pacientes com transplante renal de doador falecido necessitam de diálise nos primeiros sete dias após o TR^{9,10}. A DCE foi definida como uma disfunção renal progressiva com alteração morfológica em uma biópsia de aloenxerto renal ocorrendo dentro de 3 a 12 meses após o transplante na ausência de rejeição aguda ativa, toxicidade medicamentosa ou doença vascular renal¹⁵⁻¹⁷. Mesmo assim, definimos rejeição aguda quando a creatinina sérica aumentou, o que foi

confirmado com uma biópsia do enxerto renal²⁴. Por fim, a anemia foi definida como um nível de hemoglobina <13,0 g/dL para homens e mulheres na pós-menopausa ou <12,0 g/dL para mulheres na pré-menopausa^{3,33-36}.

Rins de doadores com critérios expandidos (DCE) são rins de doadores com idade ≥60 anos ou de doadores com idade ≥50 anos que atendam a pelo menos duas das seguintes condições: creatinina sérica >1,5, óbito devido a acidente vascular cerebral ou histórico de hipertensão. Utilizamos dois índices para avaliar o perfil do doador falecido. Os rins com escores KDPI ≥85 compartilham características de doador semelhantes às dos rins de DCE, e KDPIs ≤60 são categorizados como de baixo risco e alta qualidade³⁷. O KDRI é uma ferramenta para avaliar a sobrevida do enxerto após transplantes³⁸. A doença renal crônica (DRC) é caracterizada por lesão renal ou por uma taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) inferior a 60 mL/min/1,73 m² persistente por três meses ou mais, independentemente da causa subjacente³⁹.

O estudo verificou possíveis associações dos níveis de hemoglobina pré-transplante, imediatamente após o transplante e seis meses pós-transplante com FRE, DCE e óbito por qualquer causa.

Por fim, os pacientes seguiram o protocolo imunossupressor da instituição.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis contínuas com distribuição normal são reportadas como média ± DP, enquanto as variáveis com distribuição não normal foram submetidas à conversão logarítmica. O teste de Kolmogorov-Smirnov para uma amostra verificou a normalidade das distribuições.

Os dados categóricos são relatados como porcentagens. Realizamos a correlação de Pearson para duas variáveis. Em seguida, estratificamos os pacientes em FRE e não-FRE de acordo com o diagnóstico. Os dados categóricos foram comparados pelo teste qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher. Em seguida, as variáveis associadas à probabilidade de FRE foram incluídas nas análises multivariadas por regressão logística, com a exclusão retroativa das variáveis preditivas. Todas as variáveis que apresentaram um valor de $p \leq 0,10$ na análise univariada foram incluídas na modelagem multivariada.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os testes bicaudais resultaram em um $p < 0,05$. O programa de software estatístico SPSS (versão 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

RESULTADOS

Foram analisados duzentos e seis pacientes com base nos critérios de inclusão e exclusão (Figura 1).

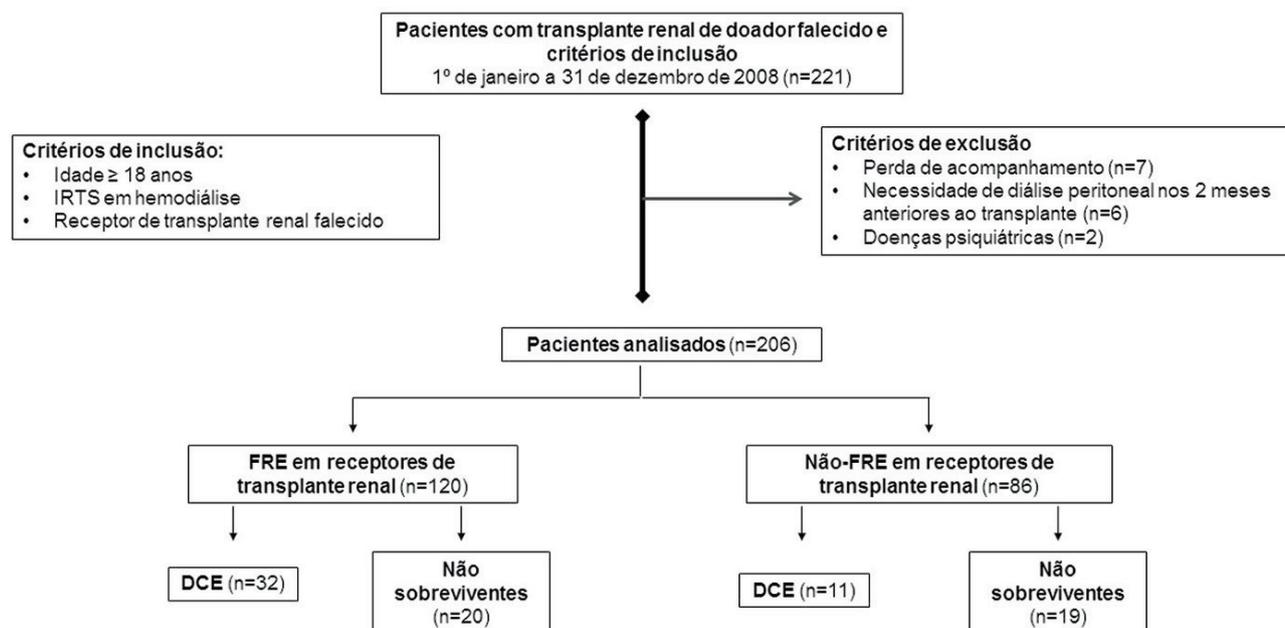


Figura 1. Diagrama de fluxo dos participantes. IRTS: insuficiência renal em terapia substitutiva; FRE: função retardada do enxerto; não-FRE: função não retardada do enxerto renal; DCE: disfunção crônica do enxerto.

Dos 206 pacientes, vinte e cinco (12,1%) eram de doadores expandidos. Todos os pacientes do estudo com transplante renal de doador falecido para imunossupressão de manutenção utilizaram inibidores de calcineurina e corticosteroides. Dois pacientes do presente estudo não estavam em uso de medicamentos antiproliferativos. Mesmo assim, 204 pacientes transplantados renais do estudo usaram azatioprina ou micofenolato. Além disso, observamos que 120 pacientes (58,2%) desenvolveram FRE. Assim, foi possível comparar dois grupos, FRE e não-FRE. A doação de rim a partir de um doador com critério expandido foi observada em 9 pacientes (10,5%) no grupo não-FRE e em 16 pacientes (13,3%; $p = 0,53$) no grupo FRE. O tempo médio da coleta de sangue para avaliar a creatinina sérica após três meses do transplante renal foi de 92 ± 11 dias no grupo não-FRE e 91 ± 12 dias no grupo FRE ($p = 0,37$). Enquanto a amostra sanguínea para analisar a concentração de Hb e de creatinina sérica após seis meses de transplante renal foi de 179 ± 15 dias para o grupo não-FRE e 184 ± 19 dias para o grupo FRE ($p = 0,08$).

Todos os pacientes no grupo FRE necessitaram de hemodiálise na primeira semana após o transplante renal. A duração da necessidade de hemodiálise após o transplante renal foi de $10,5 \pm 5,3$ dias. No grupo FRE, cinco pacientes (4,2%) haviam sido submetidos a transplante renal anteriormente, enquanto três pacientes (3,5%) no grupo não-FRE haviam sido submetidos a transplante renal anteriormente ($p = 0,80$). Não observamos diferenças nos níveis séricos de cálcio iônico ($1,34 \pm 0,50$; $1,29 \pm 0,11$; $p = 0,46$) ou de paratormônio ($496 \pm 59,4$; $405 \pm 71,4$; $p = 0,33$) entre os grupos FRE e não-FRE, respectivamente, no início do estudo.

Os pacientes usaram um agente estimulador da eritropoiese com a última dose dentro de 72 horas antes do transplante renal (107 [89,2%]; 72 [83,7%]; $p = 0,25$; nos grupos FRE e não-FRE, respectivamente). Todos os pacientes em uso de um agente estimulador da eritropoiese também fizeram uso de suplementação de ferro. Um paciente em cada grupo, FRE e não-FRE, não utilizou medicamentos antiproliferativos. Assim, observamos alguns pacientes que receberam azatioprina (34 [28,3%]; 41 [47,7%]; $p = 0,02$), enquanto houve alguns pacientes em uso de micofenolato (85 [70,8%]; 44 [51,2%]; $p = 0,02$, nos grupos FRE e não-FRE, respectivamente).

Os doadores falecidos eram mais velhos e apresentaram creatinina sérica mais elevada no grupo FRE em comparação com o grupo não-FRE (Tabela 1). Houve uma concentração mais baixa de Hb no período pré-transplante no grupo FRE (Tabela 2). O diabetes mellitus foi a principal causa de IR (47 [39,2%]; 34 [9,5%]; $p = 0,41$). A hipertensão arterial foi a causa de IR (23 [19,2%]; 16 [18,6%]; $p = 0,44$). Não encontramos diferença nos níveis séricos de PTH entre os grupos FRE ($495 \pm 59,4$ pg/mL) e não-FRE ($405 \pm 71,4$ pg/mL; $p = 0,33$) (Tabela 3).

Além disso, os receptores de TR do grupo FRE receberam doses semanais mais elevadas de eritropoietina humana recombinante no período pré-transplante (7483 ± 4185 U/semana) do que os pacientes do grupo não-FRE (6500 ± 4098 ; $p = 0,09$). Além disso, houve uma maior necessidade de transfusão de hemácias na primeira semana após o transplante renal no grupo que evoluiu com FRE (23 [19,2%]) do que nos pacientes que não progrediram para FRE (6 [6,9%]; $p = 0,01$).

Também constatamos que a concentração de Hb pré-transplante do receptor renal foi a única variável

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS DO DOADOR E DESFECHO PRECOCE DO RECEPTOR (FRE)

	FRE (n = 120)	Não-FRE (n = 86)	p
Doador com critério expandido (%)	16 (13,3)	9 (10,5)	0,53
Idade do doador (anos)	45 ± 13	42 ± 15	0,08
Creatinina sérica do doador (mg/d/L)*	$1,7 \pm 0,67$	$1,4 \pm 0,42$	<0,001
TIF (h)	$27,1 \pm 6,2$	$27,1 \pm 17,1$	0,99
KDPI	$58,6 \pm 25,5$	$52,2 \pm 29,8$	0,10
KDRI	$1,15 \pm 0,35$	$1,12 \pm 0,39$	0,49

Os dados são relatados como número (porcentagem) ou média e DP. FRE: função retardada do enxerto; *transformação logarítmica para análise estatística; TIF: tempo de isquemia fria; KDPI, índice de perfil do doador renal; KDRI: índice de risco do doador renal.

independentemente associada à FRE. O modelo também incluiu idade do doador, creatinina sérica do doador, KDPI, uma dose de um agente estimulador da eritropoiese usado pelo receptor na semana anterior ao transplante renal e a necessidade de transfusão de hemácias na primeira semana após o transplante renal (Tabela 2).

Além disso, houve uma frequência maior de pacientes receptores renais que usaram micofenolato em terapia imunossupressora de manutenção no grupo FRE em comparação com o grupo não-FRE (85 [70,8%]; 49 [58,3%]; $p = 0,03$).

Não houve diferença na frequência de doadores com critérios expandidos entre o grupo FRE e o grupo não-FRE, incluindo rins de doadores expandidos (16 [13,3%]; 9 [10,5%]; $p = 0,53$). Não houve maior frequência de rejeição aguda durante o acompanhamento no grupo FRE em comparação com o grupo não-FRE (26 [21,7%]; 16 [18,6%]; $p = 0,59$). Dos 206 receptores de transplante renal de doador falecido, quarenta e três pacientes (20,9%) desenvolveram DCE após $4,7 \pm 2,4$ anos do transplante renal. Destes, 32 pacientes (74,4%) estavam no grupo FRE, e 11 estavam no grupo

TABELA 2 REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA COM FUNÇÃO RETARDADA DO ENXERTO RENAL COMO VARIÁVEL DE RESPOSTA E SEUS PREDITORES

FRE vs. não-FRE	OR	IC 95% para OR		Valor de p
		Inferior	Superior	
Hb pré-transplante (g/dL) [#]	0,252	0,159	0,401	<0,001
Creatinina sérica do doador (mg/dL) [#]	2,038	0,919	4,518	0,08
Idade do doador (anos)	1,002	0,950	1,057	0,37
Transfusão de hemácias (%)	1,609	0,541	4,771	0,39
Dose de rHuEPO (U)/semana [#]	1,001	0,998	1,002	0,68
KDPI (%)	0,999	0,974	1,024	0,91

$R^2 = 0,709$; Modelo ($p = 0,02$); *transformação logarítmica para análise estatística; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; FRE: função retardada do enxerto; Hb: hemoglobina; Transfusão de hemácias: transfusão de hemácias na primeira semana pós-transplante; KDPI: índice de perfil do doador renal.

TABELA 3 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS PRÉ-TRANSPLANTE

Variáveis	FRE (n = 120)	Não-FRE (n = 86)	p
Sexo (%)	F-39 (32,5) M-81 (67,5)	F-37 (43,1) M-49 (56,9)	0,13
Idade (anos)	47 ± 11	49 ± 12	0,17
Diabetes mellitus (%)	47 (39,2)	34 (39,5)	0,41
Hipertensão (%)	23 (19,2)	16 (18,6)	0,44
PAM (mmHg)	75,1 ± 10,3	78,3 ± 12,9	0,12
Creatinina (mg/dL)[#]	10,7 ± 7,8	9,7 ± 6,9	0,52
Hb (g/dL)[#]	11,8 ± 0,8	12,9 ± 1,0	<0,001
Fe (µg/dL)	83,5 ± 29,4	77,5 ± 9,32	0,85
Saturação de transferrina (%)	42,7 ± 4,1	46,5 ± 12,1	0,91
Ferritina (µg/L)	837 ± 229	1344 ± 513	0,43
Leucócitos (células/µL)	8113 ± 3135	7821 ± 3099	0,52
Plaquetas (×10⁵ células/µL)	1,9 ± 0,53	2,13 ± 0,15	0,65
PTH pg/mL	495 ± 59,4	405 ± 71,4 pg/ml	0,33

Os dados são relatados como número (porcentagem) ou média e DP. FRE: função retardada do enxerto; *transformação logarítmica para análise estatística; PAM: pressão arterial média; Hb: hemoglobina; Fe: ferro sérico.

não-FRE (25,5%; $p = 0,02$). Houve uma frequência maior de rejeição aguda em pacientes com DCE (17 [39,5%], 25 [15,3%]; $p < 0,001$). Também observamos que doses mais elevadas de agente estimulador da eritropoiese foram utilizadas antes do TR (Tabela 2) em pacientes com DCE. Não houve diferença na taxa de filtração glomerular estimada após três meses de transplante renal entre pacientes que evoluíram com e sem DCE ($43,3 \pm 25,1$; $48,9 \pm 20,7$ mL/min; $p = 0,17$, respectivamente). No entanto, observou-se uma taxa de filtração glomerular estimada mais baixa após seis meses de transplante renal em pacientes com DCE em comparação com aqueles sem DCE ($48,3 \pm 25,5$; $60,5 \pm 20,3$ mL/min; $p = 0,002$). Também encontramos uma menor concentração de Hb após seis meses de TR em pacientes com DCE, quando comparados a pacientes sem DCE ($12,0 \pm 2,4$; $13,3 \pm 2,3$ g/dL; $p = 0,002$) durante o período do estudo. Observamos uma correlação positiva entre a taxa de filtração glomerular estimada e a Hb após seis meses de transplante ($r = 0,49$; $p < 0,001$). Houve também associação da concentração de Hb seis meses após o transplante renal com a DCE [OR 0,798; IC 95%: 0,687–0,926; $p = 0,003$].

Trinta e nove pacientes (18,9%) evoluíram para óbito por qualquer causa após $2,5 \pm 0,3$ anos do transplante renal de doador falecido. Houve menor concentração de Hb tanto no pré-transplante ($11,7 \pm 0,6$; $12,4 \pm 1,1$ g/dL; $p = 0,05$) e após seis meses do transplante renal ($12,1 \pm 2,6$ g/dL; $13,2 \pm 2,2$ g/dL; $p = 0,04$) em pacientes que faleceram durante o período de acompanhamento. Observamos também uma associação da concentração de Hb seis meses após o transplante renal com óbito por qualquer causa em ambos os grupos [OR 0,833; IC 95%: 0,705–0,984; $p = 0,03$]. Portanto, observamos que a frequência de óbito por qualquer causa foi de 17,4% no grupo não = FRE, enquanto no grupo FRE foi de 20% ($p = 0,64$). FRE e DCE não tiveram associação com o óbito por qualquer causa.

DISCUSSÃO

O achado mais significativo do estudo foi a associação entre anemia e FRE, DCE e óbito por qualquer causa. Além disso, houve menor concentração de Hb pré-transplante e maior necessidade de transfusão de hemácias dentro da primeira semana após o transplante renal em pacientes que evoluíram com FRE. Ademais, a análise de regressão mostrou uma

associação independente da concentração de Hb pré-transplante com a FRE.

Assim, pacientes com transplante renal de doador falecido tiveram 75% menos chances de desenvolver FRE quando a concentração de Hb aumentou em um g/dL acima de 12 g/dL.

Os resultados do presente estudo diferem dos de outra pesquisa com receptores de transplante renal publicada por Na et al.³⁵ Os autores observaram que a concentração de Hb pré-transplante esteve significativamente associada à função do aloenxerto renal dentro de um ano após o transplante renal. No entanto, não houve associação entre a concentração de Hb pré-transplante e a FRE. Por outro lado, nossos dados estão alinhados com os resultados publicados por Molnar et al.³⁶ Eles relataram fatores de anemia relacionados à IRTS antes de transplantes renais associados à FRE. Concentrações de Hb, doses elevadas de agentes estimuladores da eritropoiese e transfusão de hemácias foram relacionadas à FRE em seu relato.

Um número significativamente maior de pacientes no grupo FRE recebeu micofenolato como agente antiproliferativo. Os medicamentos antiproliferativos também desempenham um papel na patogênese da anemia pós-transplante⁴⁰. Além disso, as evidências demonstram que o hiperparatireoidismo está associado à anemia na DRC e na IRTS⁴¹. No entanto, no presente estudo, não houve diferença nos níveis séricos do paratormônio basal entre os pacientes que evoluíram com FRE e aqueles que não evoluíram com FRE. Houve também uma frequência maior de rejeição aguda nos pacientes que evoluíram com FRE.

O presente estudo demonstrou que pacientes com DCE apresentaram anemia no período pré-transplante e necessitaram de uma dose maior de AEE. Isso indica que são necessárias doses mais elevadas de AEE para tratar a anemia antes do transplante renal. Também descobrimos que pacientes com DCE que tinham concentrações mais baixas de Hb após seis meses de transplante renal apresentaram menor função do aloenxerto renal.

Esses achados sugerem que a menor concentração de Hb após seis meses na DCE se deve à menor síntese de EPO, maior inflamação ou retenção de solutos urêmicos devido à menor TFG^{3–6,12}. De acordo com outros estudos, os pacientes que não sobreviveram apresentaram concentrações mais baixas de hemoglobina seis meses após o transplante renal^{12,19}.

Assim, o presente estudo demonstrou que pacientes com IRTS e anemia foram associados a desfechos após o TR, tais como FRE, DCE e óbito por qualquer causa.

A anemia pode contribuir para danos crônicos ao aloenxerto, limitando o fornecimento de oxigênio aos tecidos, especialmente na área tubulointersticial^{42,43}. Dessa forma, Cassis et al.⁴³ publicaram uma pesquisa com um modelo animal em que os efeitos da eritropoietina pós-transplante foram associados à preservação do aloenxerto renal pelo aumento da expressão de fatores angiogênicos, regulação positiva da p-Akt e fatores antiapoptóticos da Bcl-2. Por outro lado, Elliott et al.⁴⁴ publicaram uma metanálise sobre o tratamento de anemia com AEEs em pacientes renais, na qual não foi constatada nenhuma redução na FRE ou melhora na sobrevida do enxerto em um ano após o TR.

Além disso, a anemia é comum em pacientes após o TR, com uma prevalência de 20 a 51% em vários momentos após o transplante^{8,11-14,45}. O presente estudo verificou que a diminuição da concentração de Hb após seis meses de TR também foi associada à DCE e ao óbito por qualquer causa. Além disso, Gafter-Gvili et al.⁴⁶ observaram que a anemia no início do pós-transplante em receptores de TR esteve associada ao óbito por qualquer causa, à redução da sobrevida do enxerto e ao declínio da função do aloenxerto. Além disso, a associação com o óbito esteve relacionada à gravidade da anemia. Nosso estudo encontrou uma relação inversa entre a taxa de filtração glomerular estimada e a concentração de Hb após seis meses de TR. Embora Iwamoto et al.⁴⁷ tenham observado uma correlação significativa entre a anemia pós-transplante e a função do aloenxerto renal, o prognóstico da função do enxerto renal foi pior em pacientes com níveis de Hb ≤ 11 g/dL. Okumi et al.¹⁴ também observaram uma relação entre redução da função do enxerto renal e anemia após o transplante renal.

Por fim, independentemente dos fatores que contribuem para a anemia na doença renal^{3-6,48}, alguns fatores relacionados à anemia foram associados a desfechos como FRE, DCE e óbito no transplante renal com doador falecido. Esses achados podem ajudar na interpretação e no manejo dos desfechos desses pacientes; consequentemente, os testes de anemia podem auxiliar os nefrologistas na tomada de decisões durante o tratamento.

Embora intrigante, este estudo apresentou algumas limitações. Primeiro, este foi um estudo de coorte retrospectivo com um pequeno número de pacientes com transplantes renais de doador falecido. Em segundo lugar, nosso estudo foi realizado em um único centro e não houve intervenção dos pesquisadores. Por fim, o estudo não exclui a possibilidade de viés, já que a anemia é frequente nesses pacientes. Apesar dessas limitações, o presente estudo é consistente com outros estudos^{11,13,14,46} e aumenta a conscientização sobre a anemia pré e pós-transplante de rins de doadores falecidos. São necessários estudos adicionais sobre esse tema para compreender a relação entre anemia e os desfechos do transplante renal.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo envolvendo pacientes com transplante renal de doadores falecidos encontrou uma relação significativa entre anemia pré-transplante e FRE. Além disso, a anemia pós-transplante esteve relacionada tanto à DCE quanto ao óbito por qualquer causa. Portanto, deve-se dar mais atenção à anemia pré e pós-transplante renal de doador falecido com marcadores de exames de sangue para anemia que possam facilitar a tomada de decisões sobre as complicações do tratamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os pacientes, profissionais e técnicos do Hospital do Rim e professores médicos da Divisão de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo que participaram deste estudo. Agradecemos ao Professor Nestor Schor (*in memoriam*) por seu apoio e consideração.

DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os dados que sustentam os achados deste estudo estão disponíveis no figshare (10.6084/m9.figshare.20563206).

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

FHM, EEMH, SG, CAF, IFR, JMP, LR e MAG participaram da coleta de dados, da preparação dos gráficos e da análise e interpretação dos dados. MAG, CAF, BMS e LR realizaram a análise estatística. JMP, LR e MAG conceberam e desenharam o estudo. BMS, LR e MAG redigiram o manuscrito. JMP, LR e MAG supervisionaram o estudo. Todos os autores

revisaram criticamente o manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

- Anderson AH, Xie D, Wang X, Baudier RL, Orlandi P, Appel LJ, et al. Novel risk factors for progression of diabetic and nondiabetic CKD: findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) study. *Am J Kidney Dis.* 2021;77(1):56–73. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.07.011>.
- Greenberg KI, Choi MJ. Hemodialysis Emergencies: core Curriculum 2021. *Am J Kidney Dis.* 2021;77(5):796–809. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.11.024>. PubMed PMID: 33771393.
- Chiloff DM, Almeida DC, Dalboni MA, Canziani ME, George SK, Morsi AM, et al. Soluble Fas affects erythropoiesis in vitro and acts as a potential predictor of erythropoiesis-stimulating agent therapy in patients with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020;318(4):F861–9. doi: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00433.2019>. PubMed PMID: 32003597.
- Rocha LA, Barreto DV, Barreto FC, Dias CB, Moysés R, Silva MR, et al. Serum ferritin level remains a reliable marker of bone marrow iron stores evaluated by histomorphometry in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(1):105–9. doi: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.01630408>. PubMed PMID: 18842949.
- Bandach I, Segev Y, Landau D. Experimental modulation of Interleukin 1 shows its key role in chronic kidney disease progression and anemia. *Sci Rep.* 2021;11(1):6288. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-85778-2>. PubMed PMID: 33737665.
- Wojtaszek E, Oldakowska-Jedynak U, Kwiatkowska M, Glogowski T, Malyszko J. Uremic toxins, oxidative stress, atherosclerosis in chronic kidney disease, and kidney transplantation. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:6651367. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2021/6651367>. PubMed PMID: 33628373.
- Fishbane S, Singh B, Kumbhat S, Wisemandle WA, Martin NE. Intravenous epoetin alfa-epbx versus epoetin alfa for treatment of anemia in end-stage kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(8):1204–14. doi: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.11631017>. PubMed PMID: 29921734.
- Gafter-Gvili A, Gafter U. Posttransplantation anemia in kidney transplant recipients. *Acta Haematol.* 2019;142(1):37–43. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000496140>. PubMed PMID: 30970356.
- Pravisan R, Bacarani U, Langiano N, Meroi F, Avital I, Bove T, et al. Predictive value of intraoperative doppler flowmetry for delayed graft function in kidney transplantation: a pilot study. *Transplant Proc.* 2020;52(5):1556–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2020.02.049>. PubMed PMID: 32229046.
- Rolak S, Djamali A, Mandelbrot DA, Muth BL, Jorgenson MR, Zhong W, et al. Outcomes of delayed graft function in kidney transplant recipients stratified by histologic biopsy findings. *Transplant Proc.* 2021;53(5):1462–9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2021.01.012>. PubMed PMID: 33579551.
- Poesen R, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanrenterghem Y, Monbaliu D, et al. Prevalence and determinants of anemia in the immediate postkidney transplant period. *Transpl Int.* 2011;24(12):1208–15. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01340.x>. PubMed PMID: 21929730.
- Imamović G, Zerem E, Omerović S, Osmanović E, Hodžić E. The possible role of early post-transplant inflammation in later anemia in kidney transplant recipients. *Bosn J Basic Med Sci.* 2009;9(4):307–12. doi: <http://dx.doi.org/10.17305/bjbm.2009.2786>. PubMed PMID: 20001997.
- Goldman S, Schechter A, Steinmetz T, Agur T, Shepshelovich D, Gafer-Gvili A, et al. Absence of hemoglobin increase is associated with reduced graft survival after kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2022;36(5):e14602. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.14602>. PubMed PMID: 35073452.
- Okumi M, Okabe Y, Unagami K, Kakuta Y, Iizuka J, Takagi T, et al. The interaction between post-transplant anemia and allograft function in kidney transplantation: The Japan Academic Consortium of Kidney Transplantation-II study. *Clin Exp Nephrol.* 2019;23(8):1066–75. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10157-019-01737-2>. PubMed PMID: 31020441.
- Wang Z, Yang H, Suo C, Wei J, Tan R, Gu M. Application of ultrasound elastography for chronic allograft dysfunction in kidney transplantation. *J Ultrasound Med.* 2017;36(9):1759–69. <http://dx.doi.org/10.1002/jum.14221>. PubMed PMID: 28503746.
- Ferreira AC, Viana H, Carvalho F, Pinto JR, Galvão MJ, Nolasco F, et al. Chronic allograft dysfunction-is there a treatment? *Transplant Proc.* 2009;41(3):874–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.01.052>. PubMed PMID: 19376376.
- Boratynska M, Wakulenko A, Klinger M, Szyber P. Chronic allograft dysfunction in kidney transplant recipients: long-term single-center study. *Transplant Proc.* 2014;46(8):2673–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.09.058>. PubMed PMID: 25380892.
- Gafter-Gvili A, Cohen E, Avni T, Grossman A, Vidal L, Garty M, et al. Predicting the emergence of anemia – A large cohort study. *Eur J Intern Med.* 2015;26(5):338–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.04.010>. PubMed PMID: 25912821.
- Majernikova M, Rosenberger J, Prihodova L, Jarcuskova M, Roland R, Groothoff JW, et al. Posttransplant anemia as a prognostic factor of mortality in kidney-transplant recipients. *BioMed Res Int.* 2017;2017:6987240. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6987240>. PubMed PMID: 28401160.
- World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191–4. doi: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.281053>. PubMed PMID: 24141714.
- International Summit on Transplant Tourism and Organ Trafficking. The Declaration of Istanbul on Organ Trafficking and Transplant Tourism. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(5):1227–31. doi: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.03320708>. PubMed PMID: 18701611.
- Doshi MD, Reese PP, Hall IE, Schröppel B, Ficek J, Formica RN, et al. Utility of applying quality assessment tools for kidneys with KDPI ≥ 80 . *Transplantation.* 2017;101(6):1125–33. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0000000000001388>. PubMed PMID: 27490414.
- Klair T, Gregg A, Phair J, Kayler LK. Outcomes of adult dual kidney transplants by KDRI in the United States. *Am J Transplant.* 2013;13(9):2433–40. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12383>. PubMed PMID: 23919381.
- Cooper JE. Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(3):430–8. doi: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.11991019>. PubMed PMID: 32066593.
- Chen SS, Pankratz VS, Litvinovich I, Al-Odat RT, Unruh ML, Ng YH. Expanded criteria donor kidneys with kidney donor profile index $\leq 85\%$: are we doing enough to counsel our patients? *Transplant Proc.* 2020;52(1):54–60. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.11.005>. PubMed PMID: 31901324.
- Jadlowiec CC, Hanna WA, Ninan J, Ryan MS, Das DM, Smith M, et al. Transplant outcomes using kidneys from

- high KDPI acute kidney injury donors. *Clin Transplant*. 2021;35(5):e14279. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.14279>. PubMed PMID: 33690907.
27. Zens TJ, Danobeitia JS, Levenson G, Chlebeck PJ, Zitur LJ, Redfield RR, et al. The impact of kidney donor profile index on delayed graft function and transplant outcomes: a single-center analysis. *Clin Transplant*. 2018;32(3):e13190. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.13190>. PubMed PMID: 29314286.
 28. Park WY, Choi MS, Kim YS, Choi BS, Park CW, Yang CW, et al. Impact of acute kidney injury in expanded criteria deceased donors on post-transplant clinical outcomes: multicenter cohort study. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):39. <http://dx.doi.org/10.1186/s12882-019-1225-1>. PubMed PMID: 30717699.
 29. Argani H. Expanded criteria donors. *Exp Clin Transplant*. 2022;20(Suppl 4):13–9. doi: <http://dx.doi.org/10.6002/ect.DonorSymp.2022.L13>. PubMed PMID: 36018014.
 30. Borštnar Š, Lindič J, Ležaič L, Sočan A, Godnov U, Kovač D. Estimation of glomerular filtration rate based on dry lean body mass in kidney transplant recipients. *Clin Nephrol*. 2019;92(6):287–92. doi: <http://dx.doi.org/10.5414/CN109882>. PubMed PMID: 31587755.
 31. Masson I, Flamant M, Maillard N, Rule AD, Vrtovnik F, Peraldi MN, et al. MDRD versus CKD-EPI equation to estimate glomerular filtration rate in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2013;95(10):1211–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e318288caa6>. PubMed PMID: 23511243.
 32. Tsai SF, Chen CH, Shu KH, Cheng CH, Yu TM, Chuang YW, et al. Current safety of renal allograft biopsy with indication in adult recipients: an observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(6):e2816. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000002816>. PubMed PMID: 26871853.
 33. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Notice. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(4):279–335. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/kisup.2012.37>.
 34. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutr*. 2009;12(4):444–54. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S1368980008002401>. PubMed PMID: 18498676.
 35. Na N, Hong LQ, Miao B, Hua XF, Huang ZY. Effect of pre-transplantation hemoglobin concentration on prognosis of renal transplant recipients. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(8):1213–6. PubMed PMID: 21542999.
 36. Molnar MZ, Kovcsdy CP, Rosivall L, Bunnapradist S, Hoshino J, Streja E, et al. Associations of pre-transplant anemia management with post-transplant delayed graft function in kidney transplant recipients. *Clin Transplant*. 2012;26(5):782–91. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0012.2012.01598.x>. PubMed PMID: 22443414.
 37. Zens TJ, Danobeitia JS, Levenson G, Chlebeck PJ, Zitur LJ, Redfield RR, et al. The impact of kidney donor profile index on delayed graft function and transplant outcomes: A single-center analysis. *Clin Transplant*. 2018;32(3):e13190. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.13190>. PubMed PMID: 29314286.
 38. Vaidya SR, Aeddula NR. Chronic renal failure. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
 39. Klair T, Gregg A, Phair J, Kayler LK. Outcomes of adult dual kidney transplants by KDRI in the United States. *Am J Transplant*. 2013;13(9):2433–40. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12383>. PubMed PMID: 23919381.
 40. Vanreenterghem Y. Anemia after kidney transplantation. *Transplantation*. 2009;87(9):1265–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a170b7>. PubMed PMID: 19424022.
 41. Weir MR. Managing anemia across the stages of kidney disease in those hyporesponsive to erythropoiesis-stimulating agents. *Am J Nephrol*. 2021;52(6):450–66. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000516901>. PubMed PMID: 34280923.
 42. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(1):17–25. doi: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2005070757>. PubMed PMID: 16291837.
 43. Cassis P, Gallon L, Benigni A, Mister M, Pezzotta A, Solini S, et al. Erythropoietin, but not the correction of anemia alone, protects from chronic kidney allograft injury. *Kidney Int*. 2012;81(9):903–18. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.473>. PubMed PMID: 22318420.
 44. Elliott S, Tomita D, Endre Z. Erythropoiesis stimulating agents and reno-protection: a meta-analysis. *BMC Nephrol*. 2017;18(1):14. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s12882-017-0438-4>. PubMed PMID: 28077085.
 45. Bamgbola OF. Spectrum of anemia after kidney transplantation: pathophysiology and therapeutic implications. *Clin Transplant*. 2016;30(10):1185–94. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.12813>. PubMed PMID: 27428164.
 46. Gafter-Gvili A, Ayalon-Dangur I, Cooper L, Shochat T, Rahamimov R, Gafter U, et al. Posttransplantation anemia in kidney transplant recipients: a retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(32):e7735. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000007735>. PubMed PMID: 28796058.
 47. Iwamoto H, Nakamura Y, Konno O, Hama K, Yokoyama T, Kihara Y, et al. Correlation between post kidney transplant anemia and kidney graft function. *Transplant Proc*. 2014;46(2):496–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.12.043>. PubMed PMID: 24655998.
 48. Lee DJ, Fragata J, Pestana JO, Draibe S, Canziani ME, Cendoroglo M, et al. Erythropoietin resistance in end-stage renal disease patient with gastric antral vascular ectasia. *J Bras Nefrol*. 2015;37(2):271–4. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20150042>. PubMed PMID: 26154650.