

José Vitor Oliveira Sereno

# MINIMIZAÇÃO DA NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA CICLOSPORINA A ATRAVÉS DE PROTOCOLOS DE CONVERSÃO PARA SIROLIMUS – MECANISMOS E BIOMARCADORES NUM MODELO ANIMAL EM RATOS

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde no Ramo de Ciências Biomédicas orientada pelos Prof. Doutor Frederico Teixeira e Doutor Flávio Reis apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



José Vitor Oliveira Sereno

**Minimização da nefrotoxicidade  
induzida pela Ciclosporina A através de  
protocolos de conversão para Sirolimus**

– Mecanismos e biomarcadores num modelo animal em rato

Coimbra 2014





Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, no ramo de Ciências Biomédicas.

Trabalho experimental realizado no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, sob a orientação do Professor Doutor Frederico Teixeira e do Doutor Flávio Reis.



**Parte do conteúdo científico da presente tese encontra-se publicada nos seguintes artigos em revistas científicas com arbitragem**

**José Sereno**, Paulo Rodrigues-Santos, Helena Vala, Belmiro Parada, Rui Alves, Edite Teixeira-Lemos, Petronila Rocha-Pereira, Frederico Teixeira, Flávio Reis. Different pathways and biomarkers of acute and chronic cyclosporine-induced nephrotoxicity in a rat model – focus on overexpression of mTOR and Mki67. *Portuguese Journal of Nephrology and Hypertension* 2013; 27(3):197-208.

**José Sereno**, Paulo Rodrigues-Santos, Helena Vala, Petronila Rocha-Pereira, Rui Alves, João Fernandes, Alice Santos-Silva, Eugénia Carvalho, Frederico Teixeira, Flávio Reis. Transition from cyclosporine-induced renal dysfunction to nephrotoxicity in an in vivo rat model. *International Journal of Molecular Science* 2014; 15(5):8979-8997.

**José Sereno**, Belmiro Parada, Paulo Rodrigues-Santos, Patricia Lopes, Eugénia Carvalho, Helena Vala, Edite Teixeira-Lemos, Rui Alves, Arnaldo Figueiredo, Alfredo Mota, Frederico Teixeira, Flávio Reis. Serum and renal tissue markers of nephropathy in rats under immunosuppressive therapy: cyclosporine versus sirolimus. *Transplantation Proceedings* 2013; 45(3):1149-1156.

**José Sereno**, Ana Marta Romão, Belmiro Parada, Patricia Lopes, Eugénia Carvalho, Frederico Teixeira, Flávio Reis. Cardiorenal benefits of early versus late cyclosporine to sirolimus conversion in a rat model. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 2012; 3(2):143-148.

**José Sereno**, Sara Nunes, Paulo Rodrigues-Santos, Helena Vala, Petronila Rocha-Pereira, João Fernandes, Alice Santos-Silva, Frederico Teixeira, and Flávio Reis. Conversion to Sirolimus Ameliorates Cyclosporine-Induced Nephropathy in the Rat: Focus on Serum, Urine, Gene, and Protein Renal Expression Biomarkers. *BioMed Research International* 2014; Article ID 576929, 17 pages.

**Outra parte do conteúdo científico encontra-se submetida para publicação:**

**José Sereno**, Helena Vala, Sara Nunes, Petronila Rocha-Pereira, Eugénia Carvalho, Rui Alves, Frederico Teixeira, Flávio Reis. Cyclosporine A-induced nephrotoxicity is ameliorated by dose reduction and conversion to sirolimus in the rat.





**Parte do trabalho apresentado nesta tese recebeu as seguintes distinções/prémios:**

- Bolsa para melhor projecto de investigação, atribuída pelo Grupo de Investigação Fundamental e Translacional da Sociedade Portuguesa de Diabetologia. *Cyclosporin A to Sirolimus conversion in transplantation immunotherapy – evaluation of drug-induced insulin resistance, hypertension and nephrotoxicity in an animal model.* Eugénia Carvalho, Patricia Lopes, Flávio Reis e **José Sereno**. Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Diabetologia, 1 Abril 2011, Tomar.
- Prémio para melhor comunicação em investigação básica apresentada na 1ª Reunião Conjunta da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação (SPHM) e o Núcleo de Biologia Vasculiar da Sociedade Portuguesa de Angiologia e Cirurgia Vasculiar (SPACV), como a melhor comunicação em Investigação Básica. *Cyclosporin-induced nephrotoxicity is attenuated with replacement for sirolimus – focus on oxidative stress, inflammation, proliferation and Angiogenesis.* **José Sereno**, Ana M. Romão, Belmiro Parada, Cristina Mega, Helena Vala, Edite Teixeira de Lemos, Frederico Teixeira, Flávio Reis. Reunião Científica Conjunta SPHM/SPACV. 31 de Março 2012, Lisboa, Portugal.
- Prémio para melhor comunicação oral na área de “Health Surveillance”, atribuído pelo Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. *Conversion from cyclosporine to sirolimus ameliorates nephropathy in an animal model.* **José Sereno**, Belmiro Parada, Margarida Teixeira, Paulo Rodrigues-Santos, Helena Vala, Edite Teixeira-Lemos, Frederico Teixeira, Flávio Reis. Conferência CEF 2012, 25 de Setembro 2012, Coimbra, Portugal.



## **AGRADECIMENTOS**

### **Ao Senhor Professor Doutor Frederico Teixeira,**

Manifesto o meu sentido agradecimento por me ter recebido e facultado os meios necessários à realização deste trabalho. Quero também agradecer os valiosos ensinamentos e críticas sempre construtivas no decorrer do trabalho experimental e escrita desta tese, que me motivaram sempre na esperança da obtenção de melhores métodos de trabalho.

### **Ao Senhor Doutor Flávio Reis,**

Quero expressar o mais sincero e muito especial agradecimento pelos valiosos ensinamentos prestados desde que decidi iniciar esta aventura consigo. Ao longo destes anos, fez-me crescer como investigador, criticando e motivando quando era necessário. Deu-me liberdade e apoio para desenvolver a parte experimental, mas sempre guiando-me na busca de mais e melhores resultados. Adicionalmente, também me fez crescer como homem, na tomada de decisões importantes que se vieram a tornar muito relevantes a nível profissional e pessoal. Uma vez mais, um sincero agradecimento aos momentos passados e pela confiança depositada em mim.

### **À esposa Karina e à filha Matilde,**

Que dizer da pessoa que nunca deixou de estar a meu lado, que nunca deixou de acreditar em mim, que sempre me apoiou?! Não foram fáceis os longos dias de separação na recta final, mas de exemplo servem para os demais desafios que nos baterão à porta. Obrigado pela coragem demonstrada e pela força que transmites. À minha filha, hoje com 15 meses, obrigado pelo tempo que me fizeste ganhar em alegria a cada sorriso e brincadeira que me deste.

**Aos meus Pais**

Quero agradecer a enorme paciência e o grande incentivo. Agradecer pelas palavras sempre encorajadoras, pela sua dedicação, pelo grandioso exemplo de trabalho que me transmitem para nunca desistir... Enfim, for tudo!!!

**Aos meus irmãos,**

Quero agradecer pelo exemplo de vida, de sacrifício e sua força de vontade que inspiram quem os rodeia. Obrigado pela amizade e companheirismo.

**Ao Senhor Dr. Belmiro Parada,**

Quero expor o meu obrigado pelo enorme apoio e pela passagem de conhecimento da prática clínica que fez valorizar e inovar a parte experimental. Obrigado pelas sugestões que vieram a revelar-se muito importantes.

**À Senhora Doutora Edite Teixeira de Lemos**

O meu obrigado pela incansável vontade de ensinar e ajudar na realização deste projecto e pela amizade fundada.

**Aos colegas e amigos**

Em especial à Patrícia Garrido e à Filipa Melo, que iniciaram este percurso ao mesmo tempo, o meu sincero agradecimento pelo apoio prestado, pelas longas horas no laboratório e gabinete que tanto fundamentaram a criação de uma amizade. Agradeço também à Sara Nunes, à Sandra Ribeiro e ao João Fernandes pelo apoio e bons momentos passados.

**À minha família,**

Obrigado pelo carinho e motivação.



**A todos os que colaboraram de forma relevante para esta tese de doutoramento,**  
 Nomeadamente à Professora Doutora Alice Santos-Silva, à Professora Doutora Helena Vala, à Professora Doutora Petronila Rocha Pereira, ao Professor Doutor Rui Pinto, ao Professor Doutor Rui Alves e ao Dr. Paulo Santos, por todo o empenho, disponibilidade e o aporte científico que trouxeram a este trabalho.

Finalmente, quero agradecer às diversas instituições que me deram o suporte logístico e financeiro durante estes anos, nomeadamente à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, ao IBILI (Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida) e à Fundação para a Ciência e Tecnologia, POPH ().

**Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através de:**

- Bolsa de doutoramento individual com a referência SFRH/BD/63962/2009, financiada pelo POPH-QREN;
- Projecto Estratégico (PEst-C/SAU/UI3282/2011) e COMPETE.





---

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	I
ÍNDICE GERAL .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS .....	XIV
RESUMO.....	XXIII
ABSTRACT .....	XXIX

### PARTE A - INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

CAPÍTULO I – Da insuficiência renal ao transplante .....	35
1. Dinâmica renal e principais funções .....	5
2. A doença renal crónica terminal .....	9
2.1. Definição e princípios fisiopatológicos da doença renal aguda e crónica ....	9
2.2. Epidemiologia da doença renal crónica terminal em Portugal e no Mundo	12
2.3. A terapêutica renal de substituição em Portugal.....	12
3. A transplantação e a terapêutica imunossupressora .....	15
3.1. A problemática da rejeição do enxerto .....	15
3.2. A importância da terapêutica imunossupressora – principais grupos .....	16
3.3. Monitorização da rejeição .....	18
CAPÍTULO II - A nefrotoxicidade induzida pelos inibidores da calcineurina .....	21
1. Os inibidores da calcineurina: enfoque na Ciclosporina A .....	23
1.1. Mecanismos de acção imunossupressora.....	23

---

1.2. Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da CsA e implicações no equilíbrio imunossupressão - toxicidade .....	25
1.3. Principais efeitos secundários da Ciclosporina A .....	28
2. A nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina: resenha .....	30
2.1. A nefrotoxicidade aguda induzida pela CsA .....	30
2.2. A nefrotoxicidade crónica induzida pela CsA.....	33
3. Estratégias para minimização da nefrotoxicidade induzida pela Ciclosporina A35	
3.1. Protocolo de imunossupressão sem uso de CNIs .....	36
3.2. Redução da dose .....	38
3.3. Conversão para outros agentes imunossupressores.....	39
CAPÍTULO III - Inibidores da mTOR: solução para a nefrotoxicidade dos CNIs?.....	41
1. Mecanismo de acção, aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos dos inibidores da mTOR .....	43
2. Efeitos secundários do Sirolimus.....	47
3. Substituição da Ciclosporina A por Sirolimus .....	52
4. Principais desafios da actualidade e necessidade de melhores biomarcadores	57
4.1. Marcadores tradicionais .....	58
4.2. Marcadores emergentes .....	65
CAPÍTULO IV - Objectivo geral e objectivos específicos .....	71
PARTE B - PARTE EXPERIMENTAL .....	75
CAPÍTULO V – Material e métodos .....	77
1. Modelo animal e fármacos .....	79
2. Pressão arterial, frequência cardíaca e concentração sanguínea de CsA.....	79
3. Colheita e preparação das amostras.....	80
4. Contagem de subpopulação de linfócitos T por citometria de fluxo .....	80
5. Análise hematológica e bioquímica .....	81
5.1. Parâmetros hematológicos.....	81



---

5.2. Parâmetros bioquímicos em soro .....	82
5.3. Parâmetros avaliados na urina de 24 horas .....	82
6. Peroxidação lipídica no soro, no rim e na urina de 24 horas .....	83
7. Expressão génica renal por RT-qPCR .....	83
7.1. Isolamento do ARN total .....	83
7.3. Quantificação relativa da expressão génica .....	84
8. Avaliação histomorfológica do rim .....	85
8.1. Fixação do tecido e coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E) .....	85
8.2. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) .....	86
8.3. Coloração com tricrómio de Masson .....	86
8.4. Análise de lesões .....	87
9. Avaliação da expressão de proteínas no rim por imunohistoquímica .....	88
10. Avaliação dos níveis de NGAL no soro e na urina .....	89
11. Análise estatística .....	89
CAPÍTULO VI – Transição de disfunção renal induzida pela Ciclosporina para nefrotoxicidade – Biomarcadores clássicos versus emergentes .....	
1. Introdução .....	93
2. Modelo animal .....	95
3. Resultados .....	96
3.1. Monitorização do peso corporal .....	96
3.2. Concentração sanguínea de ciclosporina, activação de linfócitos T e dados hematológicos .....	96
3.3. A ciclosporina A induz hiperglicemia e dislipidemia .....	97
3.4. A hipertensão e a taquicardia induzidas pela ciclosporina são agravadas ao longo do tempo .....	99
3.5. Da disfunção renal à nefropatia - biomarcadores de transição .....	100
3.6. Análise histomorfológica do tecido renal .....	101

---

3.7. Expressão génica renal de marcadores de proliferação, fibrose, inflamação e angiogénese .....	104
3.8. Expressão proteica de mTOR no rim por imunohistoquímica .....	106
4. Discussão .....	108
5. Bibliografia .....	116
CAPÍTULO VII – A conversão para Sirolimus melhora a nefropatia induzida pela Ciclosporina – Biomarcadores em soro, urina e rim (genes e proteínas) .....	
1. Introdução .....	127
2. Modelo animal.....	130
3. Resultados .....	131
3.1. Concentração sanguínea dos fármacos .....	131
3.2. Monitorização do peso corporal .....	131
3.3. Dados bioquímicos e hematológicos .....	132
3.4. Pressão arterial e frequência cardíaca e peroxidação lipídica no tecido cardíaco.....	134
3.5. Avaliação histomorfológica no rim e marcação de colagénio.....	135
3.6. Avaliação da nefrotoxicidade através marcadores de soro, urina e no tecido renal.....	140
3.7. Marcadores séricos de inflamação, proliferação e angiogénese .....	143
3.8. Expressão génica no rim de marcadores de proliferação, fibrose, inflamação e angiogénese .....	145
3.9. Expressão proteica no rim por imunohistoquímica .....	147
4. Discussão .....	150
5. Bibliografia .....	160
CAPÍTULO VIII – Impacto renal de um protocolo de redução da dose de Ciclosporina A e posterior conversão para Sirolimus.....	
1. Introdução .....	169
2. Modelo animal.....	171

---

3. Resultados .....	172
3.1. Monitorização do peso corporal .....	172
3.2. Pressão arterial e frequência cardíaca .....	173
3.3. Perfil glicémico, insulinémico e lipídico.....	174
3.4. Avaliação da nefrotoxicidade através de marcadores no soro, urina e tecido renal.....	175
3.5. A lipocalina gelatinase associada a neutrófilos (NGAL) como um hipotético biomarcador de nefrotoxicidade após a redução da dose de CsA e posterior conversão para SRL .....	177
3.6. Avaliação histomorfológica no rim .....	179
3.7. Deposição de colagénio em estruturas renais .....	182
3.8. Expressão proteica no rim por imunohistoquímica .....	185
4. Discussão .....	190
5. Bibliografia .....	199
CAPÍTULO IX – Comentários finais e Conclusões.....	205
1. Comentários finais .....	207
2. Conclusões .....	217
CAPÍTULO X - Bibliografia.....	219

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da unidade funcional do rim, o nefrónio .....	6
<b>Figura 2.</b> Efeitos da função renal em vários processos homeostáticos essenciais que se desenvolvem em cooperação com outros órgãos e tecidos .....	8
<b>Figura 3.</b> Escalões para diagnóstico e prognóstico da doença renal crónica em função da taxa de filtração glomerular e da albuminúria.....	11
<b>Figura 4.</b> Informação estatística da terapêutica renal de substituição em Portugal. ...	13
<b>Figura 5.</b> Evolução da taxa de sobrevida do enxerto ao longo das décadas 80, 90 e 2000 em Portugal .....	15
<b>Figura 6.</b> Vias de sinalização da activação das células T e os 3 locais de bloqueio de sinalização.....	24
<b>Figura 7.</b> Estrutura química dos inibidores da mTOR: sirolimus e everolimus .....	43
<b>Figura 8.</b> Vias de sinalização da mTOR e respectivas actividades e inibições .....	45
<b>Figura 9.</b> Só a perda substancial de biomassa renal leva a uma falta de funcionalidade renal .....	64
<b>Figura 10.</b> Hipotéticos biomarcadores urinários e associação com a área do nefrónio .....	66
<b>Figura 11.</b> Diagrama ilustrativo dos grupos em estudo e protocolo dos tratamentos: tratamento de curto prazo (3 semanas) e longo prazo (9 semanas). .....	95
<b>Figura 12.</b> Conteúdo de linfócitos T (A) e percentagem de CD4 <sup>+</sup> (B) e CD8 <sup>+</sup> (C) activados nos tratamentos de curto e de longo prazo .....	97
<b>Figura 13.</b> Perfil lipídico, glicémico e insulínico.....	99
<b>Figura 14.</b> Pressão arterial e frequência cardíaca. ....	100
<b>Figura 15.</b> Marcadores séricos, urinários e tecidulares de (dis)função renal. ....	101
<b>Figura 16.</b> Avaliação histomorfológica das lesões renais após 9 semanas .....	103
<b>Figura 17.</b> Expressão genética (ARNm) de marcadores de proliferação no rim .....	105



---

<b>Figura 18.</b> Expressão genética (ARNm) de marcadores de inflamação e angiogénese no rim.. .....	106
<b>Figura 19.</b> Expressão da proteína mTOR no rim. ....	107
<b>Figura 20.</b> Diagrama ilustrativo dos grupos em estudo e protocolo dos tratamentos	131
<b>Figura 21.</b> Evolução do peso corporal durante as 9 semanas de tratamento .....	132
<b>Figura 22.</b> Marcadores de cardiotoxicidade.....	135
<b>Figura 23.</b> Avaliação semi-quantitativa das lesões vasculares, glomerulares e tubulointersticiais .....	138
<b>Figura 24.</b> Score global das lesões vasculares, glomerulares e tubulointersticiais. ..	139
<b>Figura 25.</b> Marcadores séricos, urinários e tecidulares de função renal. ....	141
<b>Figura 26.</b> Quantificação de NGAL em soro e em urina e sua correlação, como marcador de toxicidade renal.....	143
<b>Figura 27.</b> Marcadores séricos de inflamação, proliferação e angiogénese .....	144
<b>Figura 28.</b> Expressão génica (ARN) no rim de mediadores de proliferação, fibrose, inflamação e angiogénese .....	146
<b>Figura 29.</b> Expressão proteica no rim por marcação imunohistoquímica.....	148
<b>Figura 30.</b> Expressão proteica no rim por marcação imunohistoquímica.....	149
<b>Figura 31.</b> Diagrama ilustrativo da distribuição dos animais pelos 3 grupos ao longo das 9 semanas de tratamentos.....	172
<b>Figura 32.</b> Evolução do peso corporal, frequência cardíaca e pressões arteriais .....	173
<b>Figura 33.</b> Perfil lipídico, glicémico e insulínico.....	174
<b>Figura 34.</b> Marcadores séricos, urinários e tecidulares de função renal .....	177
<b>Figura 35.</b> Quantificação de NGAL em soro e em urina e sua correlação, como marcador de toxicidade renal.....	178
<b>Figura 36.</b> Avaliação semi-quantitativa das lesões vasculares, glomerulares e tubulointersticiais .....	182
<b>Figura 37.</b> Microfotografias da coloração de tricrómio de Masson representativas dos grupos em estudo .....	184

<b>Figura 38.</b> Expressão proteica no rim por imunohistoquímica .....	186
<b>Figura 39.</b> Expressão proteica no rim por imunohistoquímica .....	187
<b>Figura 40.</b> Expressão proteica no rim por imunohistoquímica .....	188
<b>Figura 41.</b> Expressão proteica no rim por imunohistoquímica .....	189
<b>Figura 42.</b> Diagrama ilustrativo das vias de sinalização activadas e patologias renais promovidas pelos tratamentos curto e longo de CsA. ....	210
<b>Figura 43.</b> Diagrama ilustrativo das alterações moleculares e estruturais, e possíveis biomarcadores, promovidas pelos tratamentos de CsA (3 e 9 semanas) e pelo protocolo de conversão de CsA para SRL. ....	213
<b>Figura 44.</b> Esquema ilustrativo do impacto renal provocado por uma terapia contínua com baixa dose de CsA em comparação com um protocolo de redução da dose de CsA (30 mg para 5 mg) e posterior conversão para SRL. ....	216

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados bioquímicos e hematológicos dos tratamentos de curto e longo prazo com CsA versus controlos. ....	98
<b>Tabela 2.</b> Dados bioquímicos e hematológicos após 9 semanas de tratamento .....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

$\mu\text{M}$  – Micromolar

ABCB1 – Proteína de ligação à adenosina-trifosfato B1, *ATP binding cassette B1*

ADA – *American Diabetes Association*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AFE – Atraso na função do enxerto

AGEs – Produtos de glicação

AKIN – *Acute Kidney Injury Network*

AKT – Proteína cinase B

ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro

ATP – Adenosina trifosfato

AUC – Área sob da curva

Bcl-2 – Linfoma tipo 2 das células B, *B-cell lymphoma 2*

C – Carbono

C2 – Concentração 2 horas após a toma

$\text{Ca}^{2+}$  – Catião cálcio

cADN – Ácido desoxirribonucleico complementar

CB – Cápsula de Bowman

CD – Conjunto de diferenciação

CD40L – Membro da família do receptor do factor de necrose tumoral

CK - Creatina cinase

$C_{\text{max}}$  – Concentração máxima

CMV – Citomegalovírus

CNIs – Inibidores da calcineurina

CNRQ – *Calibrated normalized relative quantities*

- COX-1 – Ciclooxygenase 1
- COX-2 – Ciclooxygenase 2
- CS – Esteróides
- CsA – Ciclosporina A
- CT - Colesterol total
- CTGF – Factor de crescimento do tecido conjuntivo
- CYP3A5 – Membro do complexo enzimático do citocromo P450
- Cyr61 – Indutor angiogénico rico em cisteína 61
- DP – Diálise peritoneal
- DRC – Doença renal crónica
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EIF4EBP1 – Iniciação da tradução eucariótica de ligação à proteína factor 1
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- EVL – Everolimus
- FC – Frequência cardíaca
- FDA - *Food and Drug Administration*
- FIM – Factor inibitório de migração
- FITC – Isotiocianato fluoresceína
- FKBP – FK506-binding protein
- FOXP3 – *Forkhead box P3*
- FSH – Hormona folículo-estimulante
- GBs – Glóbulos brancos
- GST- $\alpha$  – Glutathione S-transferase alfa
- GVs – Glóbulos vermelhos
- H&E – Hematoxilina e eosina
- Hb – Hemoglobina
- HCT – Hematócrito
- HD – Hemodiálise

- HDL – Lipoproteínas de alta densidade
- HGF – Factor de crescimento dos hepatócitos
- HGM – Hemoglobina globular média
- HLA-G – antígeno G humano de leucócitos
- HRP/DAB – *Horseradish peroxidase/3, 3'-diaminobenzidine*
- hsCRP – Proteína C reactiva de alta sensibilidade
- IFTA – Fibrose intersticial e atrofia tubular
- IGF-1 – Factor de crescimento semelhante à insulina -1
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$
- IL-2 – Interleucina 2
- IL-4 $\alpha$  – Interleucina 4 $\alpha$
- IL-7 – Interleucina 7
- IL-7R – Receptor da interleucina 7
- IRA – Insuficiência renal aguda
- KDIGO – *Kidney disease improving global outcomes*
- Kim-1 – Molécula-1 de lesão renal
- L-FABP – Proteína de ligação de ácidos gordos do tipo do fígado
- LH – Hormona luteínica
- LRA – lesão renal aguda
- MAT – Microangiopatia trombótica
- MBG – Membrana basal do glomérulo
- MDA - Malondialdeído
- MG<sup>2+</sup> – Catião magnésio
- MHC – Complexo maior de histocompatibilidade
- MKi-67 – Antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67
- MMF – Micofenolato mofetil
- mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1 – Complexo 1 alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC2 – Complexo 2 alvo da rapamicina em mamíferos

mTORi – Inibidores do alvo da rapamicina em mamíferos

NaCl – Cloreto de sódio

NAG – N-acetil- $\beta$ -(D)-glucosaminidase

NFAT - Factor nuclear das células T activadas

NFAT – Factor nuclear de activação células T

NF- $\kappa\beta$  – Factor nuclear kappa Beta-1

NGAL - Lipocalina gelatinase associada a neutrófilos

NHE-3 – Permutador de sódio e hidrogénio tipo 3

NK – Células *Natural killer*

nm – Nanómetros

NO – Monóxido de azoto

NODAT – Aparecimento de diabetes mellitus *de novo* após o transplante

p53 – Proteína p53, *protein p53*

PAD – Pressão artéria diastólica

PAS – Ácido periódico de Schiff

PAS – Pressão artéria sistólica

PBS - Solução salina de fosfato tamponado

PC – Peso corporal

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR – Proteína C reactiva

PCT - Plaquetócrito

PE – Ficoeritrina

PerCP – *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*

PKC – Proteína cinase C

PLT – Plaquetas

QIC – Quantificação imunohistoquímica

- RBP – Proteína de ligação ao retinol; IL-18, interleucina-18
- RDW – Distribuição da largura dos glóbulos vermelhos
- Red+Conv – Redução + Conversão
- RIFLE – *Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage kidney disease*
- RPA-1 – Antígeno papilar renal 1
- RSC – Rejeição subclínica
- RT-qPCR – *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*
- SBF – Soro fetal de bovino
- SHU-MAT – Síndrome hemolítico urémico - microangiopatia trombótica
- SRA – Sistema renina angiotensina
- SRL – Sirolimus
- Tac - Tacrolimus
- TBA – Ácido tiobarbitúrico
- TBARs – Espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico
- TFF-3 – Factor urinário trefoil 3
- TFG – Taxa de filtração glomerular
- TGF- $\beta_1$  – Factor de crescimento transformante beta-1
- TGO – Transaminase glutâmico oxalacética
- TGP – Transaminase glutâmico pirúvica
- TGs – Triglicerídeos
- Th – Células auxiliaadoras
- Timp-1 – Inibidor da metaloproteinase-1
- TLRs – Receptores *Toll-like*
- TNF- $\alpha$  – Factor de necrose tumoral alfa
- Tregs – Células T reguladoras
- TRS – Terapêutica renal de substituição
- TSC1 – Tuberous sclerosis 1
- TSC2 – Tuberous sclerosis 2



TXRs – Transplantes renais

VEGF – Factor de crescimento de células endoteliais vasculares

$\alpha$ -SMA – Actina- $\alpha$  do músculo liso



# RESUMO



---

## Resumo

A ciclosporina A (CsA) é um agente imunossupressor pertencente ao grupo dos inibidores da calcineurina que revolucionou a transplantação de órgão devido à grande capacidade para prevenir a rejeição do enxerto, continuando a ser fundamental na terapêutica imunossupressora. Porém, a sua utilização clínica está associada ao desenvolvimento de efeitos secundários graves, incluindo a nefrotoxicidade, que parece ser dependente da duração da exposição ao fármaco. As estratégias de minimização de efeitos adversos baseiam-se sobretudo na redução da dose e na conversão para outros fármacos aparentemente menos nefrotóxicos, como o sirolimus (SRL), um inibidor do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Neste trabalho pretendeu-se estudar alguns aspectos-chave que permanecem por elucidar: (1) os mecanismos moleculares e os biomarcadores subjacentes à transição de disfunção renal induzida pela CsA para nefrotoxicidade e (2) o impacto renal de dois protocolos de conversão de CsA para SRL, baseando a avaliação em marcadores séricos, urinários e em tecido renal.

Para tal, foram desenhados protocolos experimentais (em rato wistar) de 3, 6 e 9 semanas de duração, incluindo grupos tratados com concentrações clinicamente relevantes de CsA e de SRL, comparativamente a ratos controlo (veículo), em esquemas de tratamento que incluíam grupos de CsA e de SRL, e grupos de conversão de CsA para SRL, um deles efectuado após redução inicial da dose de CsA. Foram analisados os seguintes parâmetros: pressão arterial e frequência cardíaca; dados bioquímicos séricos e urinários, incluindo níveis de creatinina e ureia, suas depurações e taxa de filtração glomerular (TFG); peroxidação lipídica no rim e respectiva depuração; marcadores clássicos e emergentes de função/lesão renal em soro, urina e em tecido renal (genes e proteínas, por RT-qPCR e imunohistoquímica, respectivamente). As lesões renais foram avaliadas através de colorações de hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff e tricrómio de Masson.

No tratamento de curto prazo com CsA, os níveis de creatinina e ureia aumentaram e a depuração diminuiu, acompanhados por uma redução da TFG. Apesar de somente causar lesões renais ligeiras ou insignificantes em algumas das estruturas, induziu um aumento da expressão de ARNm de *PCNA*, *TGF- $\beta$* , *NF- $\kappa\beta$*  e *p53* no tecido renal. No tratamento de longo prazo, os dados de disfunção renal foram acompanhados por lesões glomerulares e tubulointersticiais, com notável aumento da expressão gênica renal de *mTOR* e *MKi-67* e sobre-expressão da proteína mTOR. Para além disso, os níveis de *TGF- $\beta$*  e *IL-7* no soro aumentaram, assim como a depuração de MDA, e verificou-se uma expressão proteica aumentada de *TGF- $\beta$*  e mTOR no tecido renal. Os ratos tratados com SRL apresentaram proteinúria e aumento de NGAL (no soro e na urina) como os melhores marcadores de impacto (“toxicidade”) renal. No protocolo que testou a redução da dose de CsA seguida de conversão para SRL, após as primeiras 3 semanas de CsA (dose mais elevada, 30 mg/kg peso/dia), os animais apresentaram perda de peso, hipertensão, taquicardia, aumento dos níveis séricos de colesterol não-HDL, glicose, triglicéridos, creatinina e ureia, acompanhados por redução da TFG e do conteúdo sérico de insulina. Adicionalmente, verificou-se um aumento da expressão renal de CTGF, Kim-1, mTOR, *NF- $\kappa\beta$*  e *TGF- $\beta$ <sub>1</sub>*, acompanhado por amplo dano renal, incluindo arterioesclerose, hiperemia, esclerose nodular, hialinização do pólo vascular e espessamento da cápsula de Bowman, para além de calcificação tubular, formação de cilindros hialinos e desenvolvimento de fibrose intersticial. Três semanas após a redução da dose de CsA para 5mg/kg peso/dia, os resultados indicaram uma melhoria da função renal e das lesões vasculares e glomerulares, mas sem desagravamento significativo das alterações tubulointersticiais. Durante as últimas 3 semanas, com a conversão para SRL (1 mg/kg peso/dia), apesar da hiperglicemia, hipertrigliceridemia e aumento do conteúdo sérico e urinário de NGAL, o dano renal promovido pela CsA foi substancialmente melhorado, como constatado através dos resultados de marcadores

em soro e urina, mas em particular devido à redução da expressão proteica renal de CTGF, mTOR, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ <sub>1</sub> e PCNA.

Em conclusão, a transição de disfunção renal induzida pela CsA para nefrotoxicidade é acompanhada por uma modificação de mecanismos moleculares e de biomarcadores, sendo o mTOR uma proteína-chave para a evolução da lesão renal. A conversão para SRL impede a evolução do dano renal induzida pela CsA, podendo o impacto renal desta substituição ser acompanhado pelos níveis de NGAL em soro e urina, que parece ser um biomarcador interessante para monitorizar a conversão. Finalmente, a nefrotoxicidade induzida pela CsA é muito dependente da dose e do tempo de exposição, sendo a redução da dose de CsA e subsequente conversão para SRL, se realizada antes de lesões graves, notoriamente importantes na preservação da função e da estrutura renal.

(Tese redigida sem recurso ao novo acordo ortográfico)





# **ABSTRACT**



---

**Abstract**

Cyclosporin A (CsA) is an immunosuppressive agent that belongs to calcineurin inhibitors (CNIs) group, and revolutionized organ transplant due to the great ability to prevent graft rejection; CNIs remain the cornerstone of immunosuppressive therapy. However, the clinical use of CsA is associated with the development of serious side-effects, including nephrotoxicity, which seems to depend on the duration of drug exposure. Strategies to minimize the adverse effects are mainly based on dose reduction and conversion to other seemingly less nephrotoxic drugs, such as sirolimus (SRL), an inhibitor of mammalian target of rapamycin (mTOR). In this work we intended to study some key aspects that remain to be elucidated: (1) the molecular mechanisms and biomarkers underlying the transition from renal dysfunction induced by CsA to nephrotoxicity and (2) the renal impact of two protocols of conversion from CsA to SRL, focusing on serum, urinary and renal tissue markers.

Experimental protocols were designed (Wistar rats) with 3,6 and 9 weeks duration, including groups treated with clinically relevant concentrations of CsA and SRL, compared with control rats (vehicle), in treatment regimens that included groups of CsA, SRL and conversion from CsA to SRL, one of them made after previous CsA dose reduction. The following parameters were analyzed: blood pressure and heart rate; serum and urinary biochemical data, including creatinine and urea clearances and glomerular filtration rate (GFR); kidney lipid peroxidation and its clearance; classical and emerging biomarkers of kidney function were accessed in serum, urine and renal tissue (genes and proteins by RT-qPCR and immunohistochemistry, respectively). Renal lesions were evaluated by hematoxylin & eosin, periodic acid-Schiff and Masson's trichrome staining.

In the short-term treatment with CsA, the levels of urea and creatinine increased and their clearances decreased, accompanied by reduction of GFR. Although only slight (or insignificant) renal lesions in some kidney structures were found in the CsA-

treated rats, increased mRNA expression of *PCNA*, *TGF- $\beta$* , *Tp53* and *NF- $\kappa$  $\beta$*  in renal tissue was found. In the long-term CsA treatment, the data of renal dysfunction were accompanied by glomerular and tubulointerstitial lesions, with remarkable increase in renal gene expression of mTOR and MKi-67, together with overexpression of mTOR protein. In addition, serum *TGF- $\beta$*  and IL-7 levels increased, as well as MDA clearance, and there was an augmented content of *TGF- $\beta$*  and mTOR protein expression in the renal tissue. Rats treated with SRL in the long-term treatment presented proteinuria and increased NGAL (in serum and urine) as the best markers of kidney impact ("toxicity"). In the protocol designed to test CsA dose reduction followed by conversion to SRL, after the first 3 weeks of CsA highest dose (30 mg/kg/day) treatment, the animals presented weight loss, hypertension, tachycardia, increased serum levels of non-HDL cholesterol, glucose, triglycerides, creatinine and urea, as well as reduction of GFR and serum insulin contents. Additionally, there was an increased renal expression of CTGF, Kim-1, mTOR, *NF- $\kappa$  $\beta$*  and *TGF- $\beta$* , accompanied by extensive kidney damage, including arteriosclerosis, hyperemia, nodular sclerosis, vascular pole hyalinization and thickening of the Bowman capsule, in addition to tubular calcification, formation of hyaline cylinders and development of interstitial fibrosis. Three weeks after dose reduction of CsA to 5 mg/kg/day, the results indicated an improvement in renal function and vascular and glomerular lesions, but without significant amelioration of tubulointerstitial damage. During the last 3 weeks, after conversion to SRL (1 mg/kg/day), despite hyperglycemia, hypertriglyceridemia and increased serum and urinary NGAL contents, renal damage promoted by the two CsA doses was substantially improved, as confirmed by the results of serum and urine markers, in particular by the reduction in renal protein expression of CTGF, mTOR, *NF- $\kappa$  $\beta$* , *TGF- $\beta$*  and PCNA.

To conclude, the transition from renal dysfunction induced by CsA to nephrotoxicity is accompanied by modification of molecular mechanisms and biomarkers, being mTOR

a key protein for development of renal injury. The conversion to SRL prevents the development of renal damage induced by CsA and this effect might be better accompanied by serum and urine NGAL levels, which seems to be an interesting biomarker to monitor the conversion protocol. Finally, CsA-induced nephrotoxicity is notoriously dependent on dose and duration of exposure, being CsA dose reduction and subsequent conversion to SRL, if performed before notoriously damage, important measures to preserve renal function and prevent nephrotoxicity.



# Parte A

Introdução geral e  
objectivos





# **CAPÍTULO I**

**Da insuficiência renal ao transplante**

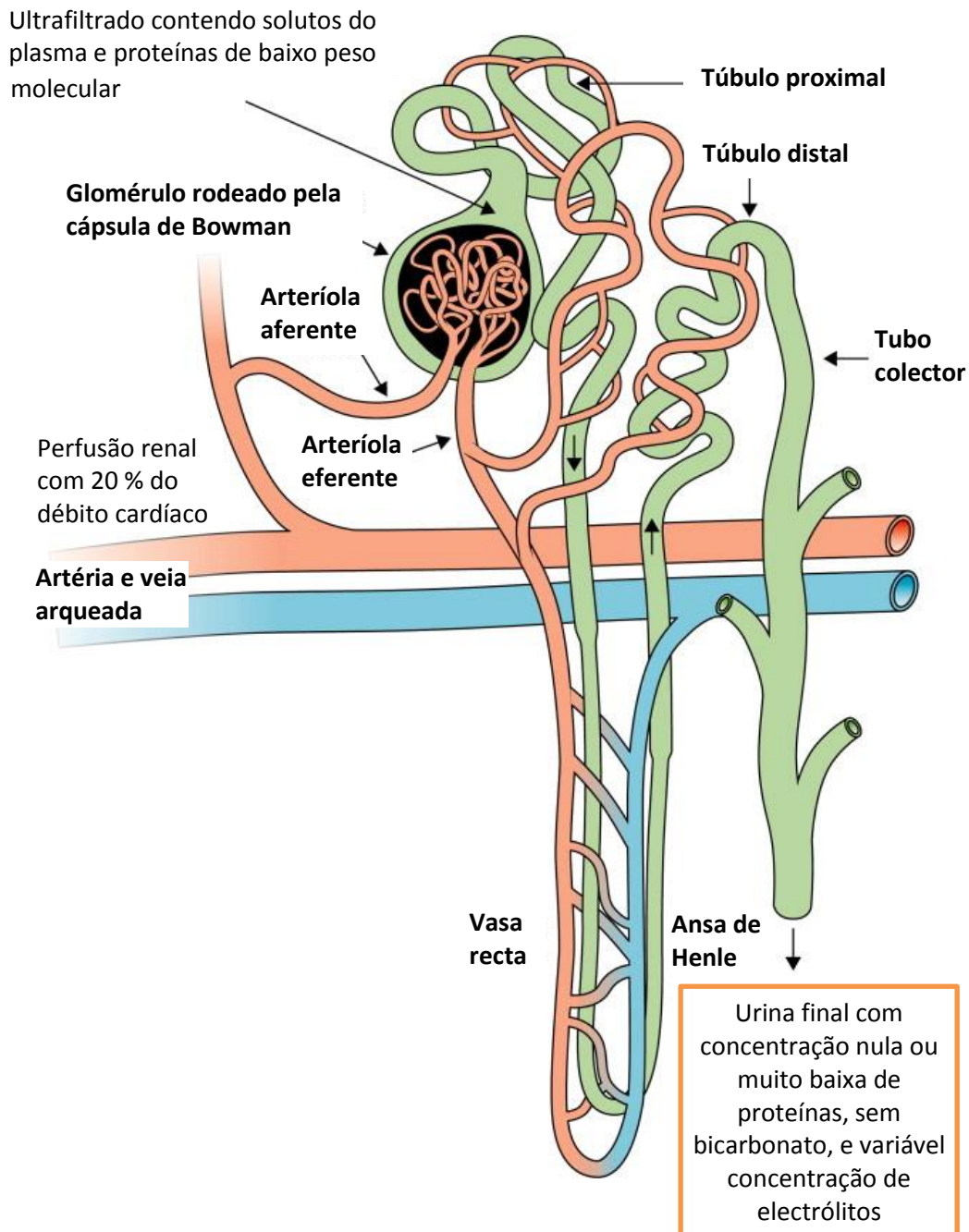


## 1. Dinâmica renal e principais funções

Cada rim contém cerca de 1 milhão de nefrónios funcionais, constituídos por vários tipos de células especializadas provenientes de linhagens embriológicas distintas. Cada nefrónio é constituído por um corpo filtrante, o glomérulo, e por um túbulo longo, caracterizado por vários segmentos diferenciados. As partes finais destes túbulos são interligados para formar os canais de recolha (tubos colectores), que se abrem para a pélvis renal (Figura 1).

Os princípios básicos da fisiologia renal passam pelo desempenho das funções do rim em excretar, metabolizar e sintetizar. Os rins são perfundidos com cerca de 20% do débito cardíaco produzindo cerca de 180 L de filtrado, dos quais apenas cerca de 1,5 L são eliminados pela urina, em virtude de o restante filtrado ser reabsorvido pelos túbulos. Esta elevada actividade funcional torna o rim um dos órgãos mais expostos a hipotéticas agressões, tornando-o muito sensível a alterações funcionais e estruturais [Eckardt et al., 2013].

A barreira de filtração glomerular é constituída pelas células endoteliais fenestradas, uma membrana basal e uma camada de células altamente diferenciadas, chamadas podócitos [Haraldsson et al., 2008]. A barreira de filtração é permeável à água, a solutos de pequena dimensão e a proteínas de baixo peso molecular (60-70 kDa), mas a grande maioria das proteínas do plasma não são filtradas, especialmente se são carregadas negativamente. Ao longo dos segmentos tubulares do nefrónio, o ultrafiltrado sofre uma série de alterações, com reabsorção quase total de proteínas de baixo peso molecular, de solutos e de água, e secreção de uma proteína chamada uromodulina (proteína Tamm-Horsfall) e eliminação do excesso de potássio, ácidos e bases (Figura 1) [Brown et al., 2012]. Qualquer perturbação na hemodinâmica ou na estrutura glomerular pode resultar numa taxa de filtração glomerular (TFG) alterada, levando à passagem de proteínas para a urina, que são dois sinais clássicos de doença renal.



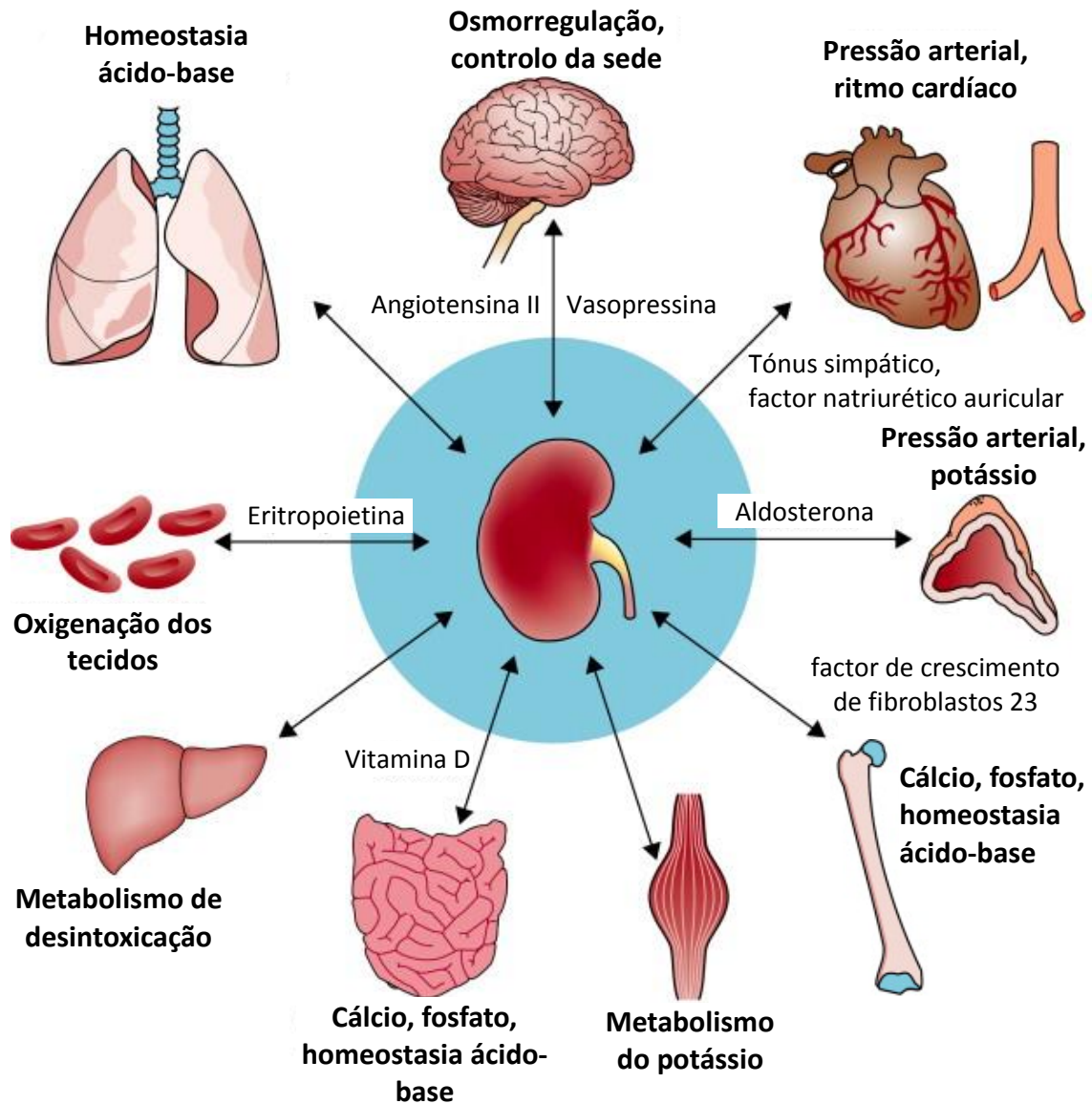
**Figura 1.** Estrutura da unidade funcional do rim, o nefrônio. Adaptado de Eckardt et al. (2013).

Os processos que afectam a composição da urina são mediados por sistemas de transporte polarizados que estão nas células epiteliais dos túbulos. O túbulo proximal reabsorve a maior parte (cerca de dois terços) de solutos e água filtrada. Para além disso, as células que revestem estes túbulos possuem receptores multi-

ligandos envolvidos na captação endocítica de proteínas filtradas, nas quais se incluem hormonas, vitaminas e enzimas. Esta absorção densa de proteínas desempenha um papel importante na depuração metabólica, na homeostasia hormonal e na conservação de vitaminas essenciais (vitamina A, D e B12), e fornece um meio livre de proteínas nas células que revestem os segmentos do túbulo distal [Christensen et al., 2009]. As moléculas orgânicas e os metabolitos de fármacos são segregados para a urina através de transportadores específicos localizados na última parte do túbulo proximal.

Os segmentos tubulares que formam a ansa de Henle criam um ambiente hipertónico na medula, necessário para concentrar a urina, e mediar a reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sob o controlo do receptor sensível a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  [Ferrè et al., 2012]. Células epiteliais especializadas e localizadas na junção entre o membro ascendente da ansa de Henle e o túbulo distal detectam a concentração de NaCl tubular e interagem com as células granulares que contêm renina nas arteríolas aferentes para regular o fluxo sanguíneo glomerular através de um mecanismo de feedback, chamado tubuloglomerular [Singh e Thomson, 2010]. O túbulo distal e os canais de colheita são responsáveis pela concentração de aldosterona e de vasopressina e regulam a composição final da urina, assim como vários processos de transporte tubular [Reilly e Ellison, 2000], podendo ser alvo de fármacos específicos, incluindo diuréticos, calcimiméticos e inibidores de reabsorção da glucose, mais recentemente desenvolvidos [Shah et al., 2012].

O facto de o rim ter funções excretoras, metabólicas e endócrinas faz com que medie interacções essenciais com vários órgãos, sustentando uma série de funções vitais, incluindo a regulação da água corporal e da sede, a pressão arterial, a ventilação respiratória, a metabolização de fármacos, o equilíbrio de potássio, a eritropoiese, o metabolismo do cálcio e do fosfato e a homeostasia ácido-base (Figura 2).



**Figura 2.** Efeitos da função renal em vários processos homeostáticos essenciais que se desenvolvem em cooperação com outros órgãos e tecidos. Adaptado de Eckardt et al. (2013).

A regulação da excreção de NaCl, que é fundamental para controlar o volume de fluido extracelular e a pressão arterial, é influenciada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, o péptido natriurético auricular, o sistema nervoso simpático e, ainda que em menor escala, pela hormona vasopressina [Stockand, 2010]. A regulação do teor de água no corpo (osmorregulação) envolve a acção da

vasopressina no transporte de água mediado pela aquaporina [Schrier, 2008; Bourque, 2008]. Adicionalmente, o rim também é o principal “sensor” do oxigénio sistémico, visto ter um papel fundamental na regulação da eritropoietina, uma hormona fundamental para o desenvolvimento dos eritrócitos [Gleadle, 2009].

Para além do controlo da homeostasia do corpo, o rim também está envolvido na protecção imune. As células dendríticas e os macrófagos, que formam uma rede no interstício renal, contribuem para a imunidade inata e adaptativa e são cada vez mais reconhecidas pelo seu papel de “vigia” contra a lesão renal e a infecção [Teteris et al., 2011]. As células epiteliais dos túbulos renais também expressam receptores *Toll-like* (TLRs), incluindo o TLR4 do sistema imune inato, que podem estar envolvidos no desencadeamento de uma resposta imune inata às infecções virais e bacterianas ou ao stresse isquémico [Smith, 2009].

## **2. A doença renal crónica terminal**

### **2.1. Definição e princípios fisiopatológicos da doença renal aguda e crónica**

A lesão renal aguda, também chamada insuficiência renal aguda, pode ter variadas origens e continua associada a uma alta mortalidade em doentes em estado crítico, apesar dos significativos avanços técnicos ao nível da terapêutica, nomeadamente da terapia renal de substituição, incluindo a diálise [Brar et al., 2008]. Uma análise compreendida entre Janeiro de 1970 e Dezembro de 2004 revelou que apesar do progresso técnico na gestão da insuficiência renal aguda, a taxa de mortalidade manteve-se praticamente inalterada [Ympa et al., 2005]. Mais recentemente, e de forma notável, a investigação básica em modelos animais têm

contribuído para o conhecimento da patogénese da insuficiência renal aguda, abrindo novos caminhos para maior sucesso das abordagens terapêuticas [Nguyen e Devarajan, 2008].

A doença renal crónica (DRC) e a lesão renal aguda podem ser detectadas, e a sua prevalência e prognóstico têm sido estudada. No entanto, os critérios de avaliação da função e estrutura renal continuam a evoluir, bem como as definições de doença renal crónica e de lesão renal aguda que vão sofrendo actualização ao longo dos tempos.

A KDIGO (*Kidney disease improving global outcomes*) desenvolveu novas directrizes para a lesão renal aguda, reconhecendo que o prognóstico da insuficiência renal aguda não tinha sido melhorado nas últimas décadas, apesar das melhorias substanciais nos cuidados intensivos e métodos de diálise. Foi aceite que pequenas diminuições na taxa de filtração glomerular não são graves o suficiente para serem classificadas como insuficiência renal aguda [KDIGO, 2012]. As directrizes da lesão renal aguda centram-se nas mudanças da creatinina sérica ou redução da produção de urina como manifestações de lesão directa no rim. Ao contrário da doença renal crónica, os marcadores de lesão não estão incluídos na definição de insuficiência renal aguda, mas existe uma investigação intensiva por biomarcadores urinários que precedem a redução na taxa de filtração glomerular (por exemplo, uma molécula de lesão renal, a lipocalina gelatinase associada a neutrófilos e a interleucina 18) que pode vir a permitir uma identificação mais precoce e o tratamento mais eficaz [Lameire et al., 2013; Chawla e Kellum, 2012].

As primeiras directrizes KDIGO para a doença renal crónica, estabelecidas em 2002, resultaram da crescente incidência e prevalência de insuficiência renal crónica, dos altos custo da doença e do tardio encaminhamento dos doentes para os nefrologistas [National Kidney Foundation, 2002]. As recomendações foram centradas na estimativa da taxa de filtração glomerular a partir da creatinina sérica e na determinação de marcadores de lesão renal (principalmente a albuminúria). Uma série



de esforços internacionais conduziram à padronização de equações mais precisas para estimar a taxa de filtração glomerular [Levey et al., 2006; Levey et al., 2009]. Posteriormente, a cistatina C foi adicionada como uma variável para estimar a taxa de filtração glomerular e ajudar no prognóstico, levando a avanços na detecção e classificação da doença renal crónica [Peralta et al., 2011; Inker et al., 2012]. Em 2013, a KDIGO publicou uma actualização das directrizes anteriores da doença renal crónica [Matsushita et al., 2010; Levey et al., 2011], conjugando a albuminúria com a taxa de filtração glomerular para definir os diferentes estadios, reconhecendo assim a importância da albuminúria no diagnóstico e prognóstico da doença renal [Levey e Coresh, 2012; Gansevoort et al., 2013] (Figura 3).

			Descrição dos estadios da albuminúria (mg/g)				
			A1		A2	A3	
Estadios da taxa de filtração glomerular (ml/min)			Ótima e ligeiramente presente		Alta	Muito alta e nefrotico	
			<10	10-29	30-299	300-1999	>2000
<b>G1</b>	Ótima e ligeiramente alta	>105					
		90-104					
<b>G2</b>	Ligeira	75-89					
		60-74					
<b>G3a</b>	Ligeira / moderada	45-59					
<b>G3b</b>	Moderada a severa	30-44					
<b>G4</b>	Severa	15-29					
<b>G5</b>	Falha renal	<15					

**Figura 3.** Escalões para diagnóstico e prognóstico da doença renal crónica em função da taxa de filtração glomerular e da albuminúria. Adaptado de Levey e Coresh (2012).

## **2.2. Epidemiologia da doença renal crónica terminal em Portugal e no Mundo**

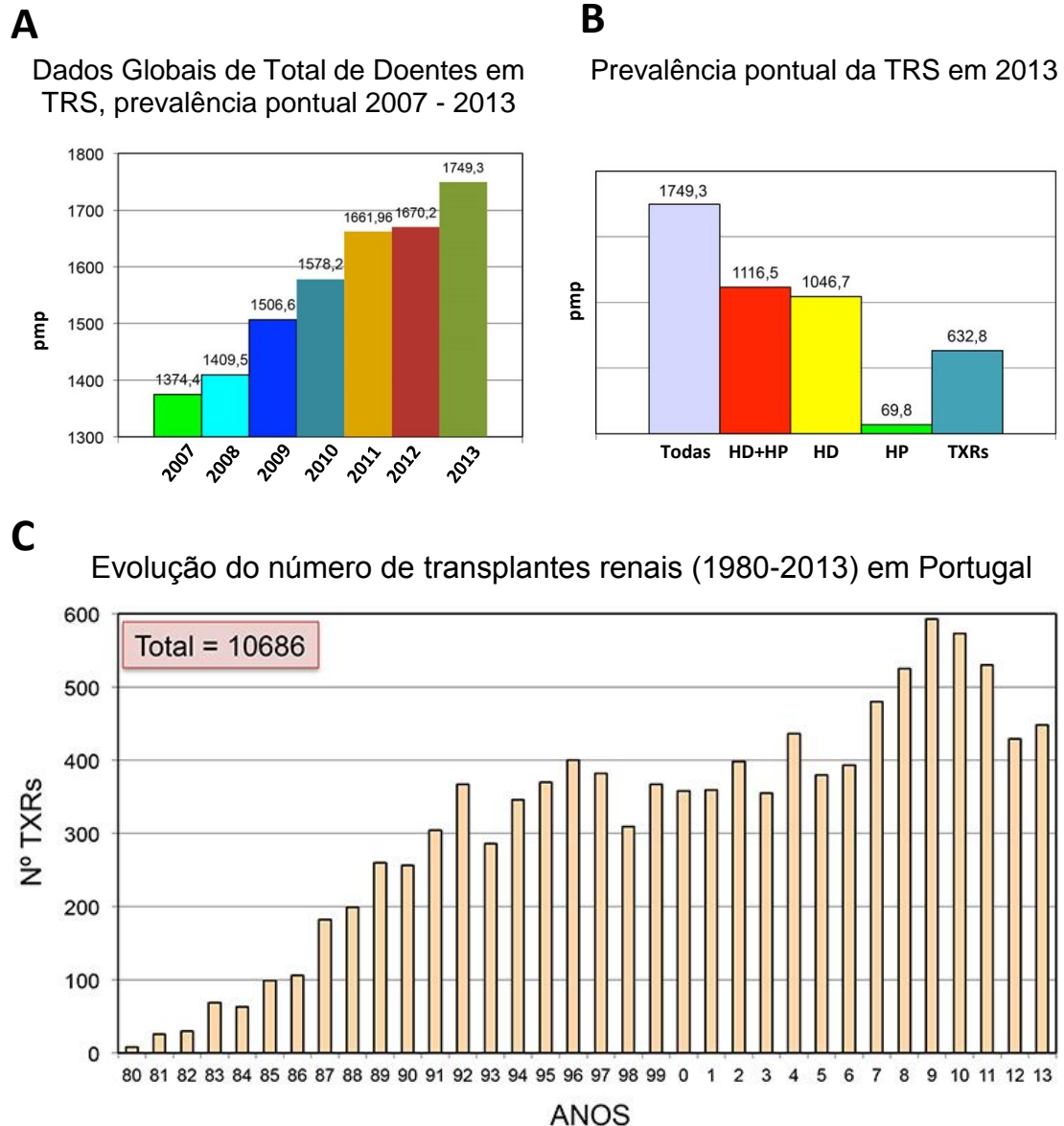
A doença renal crónica, é hoje reconhecida como um importante problema de saúde pública mundial. A prevalência da doença renal crónica tem aumentado ao longo dos anos e está fortemente relacionada com o envelhecimento, sendo mais prevalente entre as mulheres [Coresh, 2007; Zhang, 2008; Nagata, 2010; Van Pottelberg, 2011] e os afro-americanos [Muntner, 2011].

Uma revisão sistemática de estudos populacionais confirmou que a DRC é tão comum como a diabetes mellitus na população em geral tem vindo a aumentar os esforços para promover um diagnóstico mais precoce da DRC, de forma a reduzir a progressão da doença [Levey, 2007; Cusumano, 2008]. Sem os cuidados adequados, a DRC origina complicações graves, incluindo o aumento do risco de doenças cardiovasculares e, em última instância, insuficiência renal crónica terminal com necessidade de terapêutica renal de substituição (diálise ou transplantação) e mesmo morte [Levey, 2007].

Em Portugal, à semelhança do que se regista mundialmente, estima-se que a incidência de insuficiência renal crónica vai continuar a aumentar nas próximas décadas, fruto do aumento de outro tipo de patologias que também afectam o rim, como é o caso da diabetes mellitus (causa de > 30 % dos doentes insuficientes renais).

## **2.3. A terapêutica renal de substituição em Portugal**

Em 2010, a maioria dos doentes com insuficiência renal crónica tinha como tratamento de substituição a hemodiálise (HD) em conjunto com diálise peritoneal (DP), sendo que apenas um pequeno número de doentes estava a realizar apenas diálise peritoneal (Figura 4A e 4B).



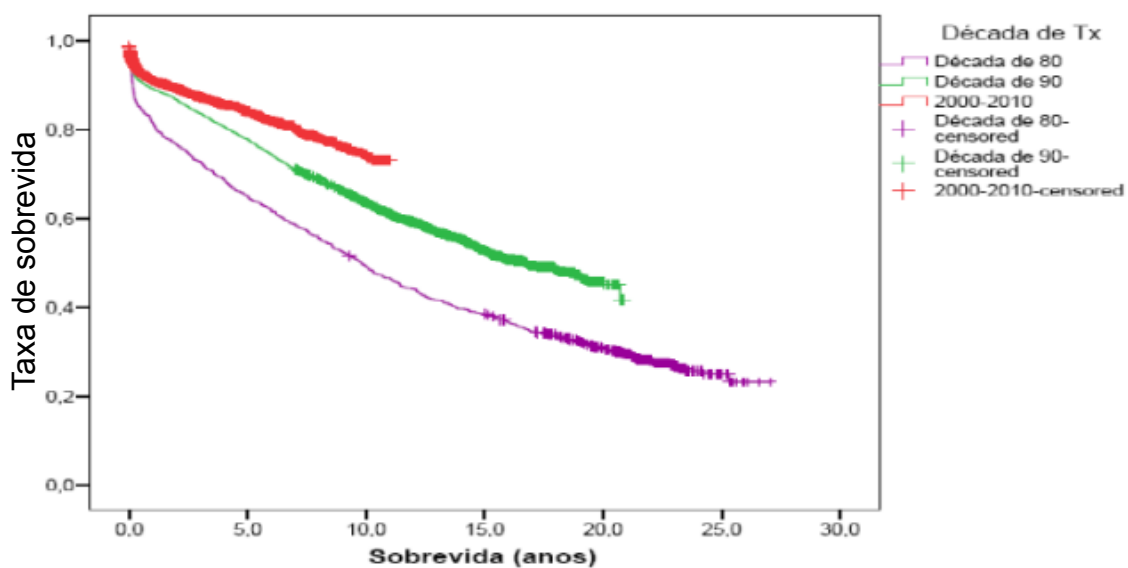
**Figura 4.** Informação estatística da terapêutica renal de substituição em Portugal. A, dados Globais de Total de Doentes em TRS, prevalência pontual 2007 – 2013; B, prevalência pontual da terapêutica renal de substituição em 2013; C, Evolução do número de transplantes renais em Portugal (1980-2013). TRS, terapêutica renal de substituição; TXRs, transplantes renais. Fonte: Sociedade Portuguesa de Nefrologia.

Em comparação com a diálise, o transplante renal reduz a incapacidade e melhora a função renal e a qualidade de vida, proporcionando uma expectativa de vida mais prolongada, com a vantagem adicional de ser menos dispendiosa que a diálise [Port et al., 1993; Evans et al., 1985; Eggers, 1988]. Dados de 2008 referem que

547.982 residentes nos Estados Unidos foram tratados para a doença renal em estadio terminal e 17.413 foram transplantados. Segundo dados de 2009, os custos anuais para o tratamento de um doente em hemodiálise são quase o triplo dos necessários para um indivíduo transplantado (National kidney and urologic diseases information Clearinghouse, acedido em 2014).

O primeiro transplante renal em Portugal foi feito a 20 de Julho de 1969 em Coimbra, pelo médico e Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Linhares Furtado, entre dois dadores vivos. Um levantamento estatístico realizado pela Sociedade Portuguesa de Transplantação mostra que desde o início da década de 80 o número de transplantes no nosso país tem aumentado de forma muito significativa, principalmente desde o ano 1986, quando se começou a usar uma terapêutica mais eficaz na prevenção da rejeição aguda. Desde esse ano, o número de transplantes aumentou de 100 para mais de 500 (em 2010), traduzindo-se num total de 9279 transplantes renais realizados no nosso país nas últimas três décadas, verificando-se uma prevalência também crescente do número de transplantes renais por habitante (Figura 4C) [Sociedade Portuguesa de Transplantação, 2014].

### Sobrevida do enxerto ao longo das décadas



Sobrevida	1 ano	5 anos	10 anos	15 anos	20 anos
Década de 80	81,2 %	64,9 %	49,1 %	38,3 %	30,6 %
Década de 90	89,3 %	77,8 %	63,4 %	52,6 %	45,1 %
2000-2010	91,0 %	84,2 %	74,1 %	*	*

**Figura 5.** Evolução da taxa de sobrevida do enxerto ao longo das décadas 80, 90 e 2000 em Portugal. Fonte: Sociedade Portuguesa de Transplantação. \* Dados não disponíveis.

Ao longo das últimas 3 décadas tem-se verificado uma melhoria significativa na taxa de sobrevivência do enxerto (Figura 5), o que se traduz também numa melhor taxa de sobrevida do doente e qualidade de vida. Na década de 80, 90 e anos 2000 registou-se uma taxa de sobrevivência aos 10 anos de 75,5%, 82,9% e 88,4%, respectivamente. Adicionalmente, verificaram-se valores mínimos da taxa de rejeição aguda (7,4% em 2010), que se associam a uma melhoria significativa da eficácia da terapêutica imunossupressora [Sociedade Portuguesa de transplantação, 2014].

### 3. A transplantação e a terapêutica imunossupressora

#### 3.1. A problemática da rejeição do enxerto

O reconhecimento da célula T pelo antigénio é o evento primário e central que conduz a uma cascata de situações que resultam na rejeição do órgão transplantado. As células T são monoespecíficas na medida em que reconhecem apenas um único antigénio peptídico apresentado no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As moléculas do MHC são complexos de péptidos, expressos sobre a superfície de uma variedade de células imunes. As células T

reconhecem porções de antígenos de proteínas que foram fragmentados em péptidos ligados a moléculas de MHC. Há pelo menos duas vias distintas, mas não necessariamente eliminatórias, de auto-reconhecimento, as vias directas e indirectas, que geram diferentes conjuntos de clones de células T alo-específicas. Na via directa, as células T do hospedeiro reconhecem moléculas de alo-MHC intactas na superfície do antígeno de células apresentadoras de dador. Na via indirecta, as células T reconhecem o alo-antígeno apresentados como peptídeos, por células apresentadoras de antígenos do hospedeiro [Heeger, 2003]. Após o alo-reconhecimento pelas células T, estas são activadas, decorrendo em seguida uma série de eventos bioquímicos dentro do citoplasma da célula. A activação destas vias leva a um aumento acentuado e sustentado do cálcio livre intracelular que promove a formação de complexos cálcio-calmodulina, activando um número de mediadores, incluindo a fosfatase calcineurina. A calcineurina desfosforila o NFAT (factor nuclear das células T activadas) citoplasmático, permitindo a sua translocação para o núcleo, onde se liga à sequência promotora do gene da interleucina-2 (IL-2) estimulando a transcrição do seu ARNm. Esta citocina pró-inflamatória é fundamental para a maturação dos linfócitos T, essenciais ao processo imunológico [Wesselborg et al., 1996; Le moine et al., 2002].

### **3.2. A importância da terapêutica imunossupressora – principais grupos**

As taxas de sobrevivência de doentes e a viabilidade do enxerto após o transplante renal têm aumentado drasticamente nos últimos anos, o que se deve principalmente a melhorias cirúrgicas, da terapêutica imunossupressora e da assistência médica pós-transplante. O principal objectivo da farmacoterapia no pós-transplante é a prevenção da rejeição do enxerto a longo prazo e a sobrevida do

paciente, mantendo as complicações e efeitos adversos ao mínimo atingível. A introdução de agentes imunossupressores mais potentes e a associação de novas combinações reduziu a frequência de rejeição aguda, apesar de taxas de incidência de infecções pós-transplante ainda preocupantes [Ponticelli, 2007]. Os especialistas em transplante procuram há vários anos melhorias dos protocolos que possam reduzir a incidência de infecções e minimizar os efeitos adversos. Actualmente, a maioria dos regimes imunossupressores são baseados na combinação de inibidores da calcineurina (CNIs, incluindo a ciclosporina e o tacrolimus) com agentes antiproliferativos (azatioprina ou micofenolato) e esteróides (prednisona). No entanto, os CNIs podem causar nefrotoxicidade e outros efeitos adversos que podem não só afectar a qualidade de vida, mas também a sobrevida do enxerto e a expectativa de vida dos doentes transplantados. Estes aspectos serão discutidos de forma mais detalhada nos capítulos seguintes. Nos últimos anos, dois novos agentes imunossupressores associados à inibição do alvo da rapamicina em mamíferos foram disponibilizados, sirolimus (SRL) e everolimus (EVL). Estes agentes têm igualmente uma forte capacidade imunossupressora, parecem ser menos nefrotóxicos, e têm características adicionais também importantes, tais como a inibição de infecção por citomegalovírus (CMV), bem como actividade antiproliferativa [Eisen et al., 2003; Webster et al., 2006; Dowling et al., 2009]. Estas características tornam estes agentes possíveis candidatos para substituir e/ou reduzir a dosagem dos inibidores da calcineurina no pós-transplante renal. O desafio passa por desenvolver regimes imunossupressores que permitem a redução da dose dos fármacos, desde que a imunossupressão seja assegurada e as taxas aceitáveis de rejeição aguda se mantenham inalteradas [Ponticelli, 2007]. Actualmente, é usado o balanço entre as vantagens e desvantagens para determinar a escolha do regime, existindo um conjunto de factores a ter em conta no momento de decidir a estratégia imunossupressora adaptada a cada doente.

Os agentes de indução são tipicamente os anticorpos (globulinas anti-linfócitos) ou os antagonistas dos receptores da interleucina-2 (basiliximab). As cinco classes de medicamentos que compõem actualmente os regimes de manutenção incluem: os inibidores da calcineurina (ciclosporina e tacrolimus), os inibidores da mTOR (sirolimus e everolimus), os agentes antiproliferativos (azatioprina e micofenilato mofetil), os bloqueadores de co-estimulação (belatacept) e os corticosteróides (prednisona).

Segundo as directrizes da prática clínica KDIGO, é sugerido que os tratamentos de primeira linha devem incluir os agentes de indução (basiliximab para doentes de baixo risco e um anticorpo para doentes de alto risco) em conjunto com a imunossupressão de manutenção, incluindo ciclosporina ou tacrolimus e micofenolato [(KDIGO) Transplant Work Group, 2009].

Outra área em foco na terapêutica associada ao transplante é o tratamento de rejeição humoral. Historicamente, o tratamento tem sido difícil e pouco estudado. A rejeição humoral é normalmente tratada através de imunoglobulina, o rituximab e a plasmaferese intravenosa [Hardinger e Brennan, 2013].

### **3.3. Monitorização da rejeição**

A eficácia dos medicamentos imunossupressores na terapia de manutenção tem sido uma questão central no sucesso do transplante renal, sendo que a escolha do tratamento imunossupressor mais adequado ainda é bastante complexa [Almeida, 2013].

A monitorização terapêutica é um factor determinante na sobrevivência do enxerto, uma vez que pode ajudar a manter a prevenção da rejeição e também a minimizar alguns dos efeitos secundários. No entanto, a monitorização não pode ser padronizada para determinados tipos populacionais, havendo vários factores que influenciam directamente a farmacocinética destes fármacos.



A monitorização imunológica pode ajudar a identificar doentes com baixo risco de rejeição do transplante e assim permitir que a imunossupressão seja ajustada da forma mais adequada nesses doentes mais "tolerantes". A CsA é um dos fármacos que necessita de constante vigilância, especialmente por causar nefrotoxicidade aguda (reversível) e crónica (podendo ser irreversível). Em contraste, esta terapia deve ser mantida se o doente for de alto risco de rejeição. A determinação de ARNm da FOXP3 na urina é um teste não invasivo, sendo este um possível biomarcador da eficácia de longo prazo no pós-transplante e, em particular, o risco de rejeição aguda imediatamente após o transplante renal [Muthukumar et al., 2005].

Outros marcadores foram identificados em biopsias renais de transplante, alguns correspondentes à rejeição, como os depósitos do complemento C4D, a expressão de marcadores de activação, como o receptor de IL-2, a transferrina, ou a expressão de marcadores de citotoxicidade, tais como a granzima A/B, a perforina e o factor de necrose tumoral alfa [Brouard et al, 2008]. Outros potenciais marcadores expressos pelos linfócitos T regulatórios ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) correspondem ao estado de tolerância.

Utilizando a citometria de fluxo, verificou-se um aumento de células T  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  no sangue periférico de receptores hepáticos operacionalmente tolerantes, associados a um aumento de células T periféricas  $\gamma\delta$  [Martinez-Llordella et al., 2007], sendo que estes resultados também foram confirmados em receptores de transplante renal [Brouard et al., 2007]. No entanto, a situação é frequentemente mais complicado, porque o FoxP3 é um marcador comum de tolerância e pode ser expresso durante a activação das células T citotóxicas de alogénico, introduzindo alguma confusão na análise. Os polimorfismos específicos de vários genes (como a interleucina-10, TGF- $\beta$ , o receptor da IL-4 $\alpha$  e o interferon- $\gamma$ ) foram sugeridos como tendo associação com a rejeição em casos de re-transplante [Mytilineos et al., 2004]. HLA-G, uma molécula imunomoduladora expressa durante a tolerância feto-maternal e que contribui para a tolerância fetal, também tem sido doseada no soro e em biópsias

de enxerto de doentes transplantados hepáticos e renais, podendo correlacionar-se com um menor risco de rejeições agudas [Creput et al., 2003].

# **CAPÍTULO II**

**A nefrotoxicidade induzida pelos  
inibidores da calcineurina**



## 1. Os inibidores da calcineurina: enfoque na Ciclosporina A

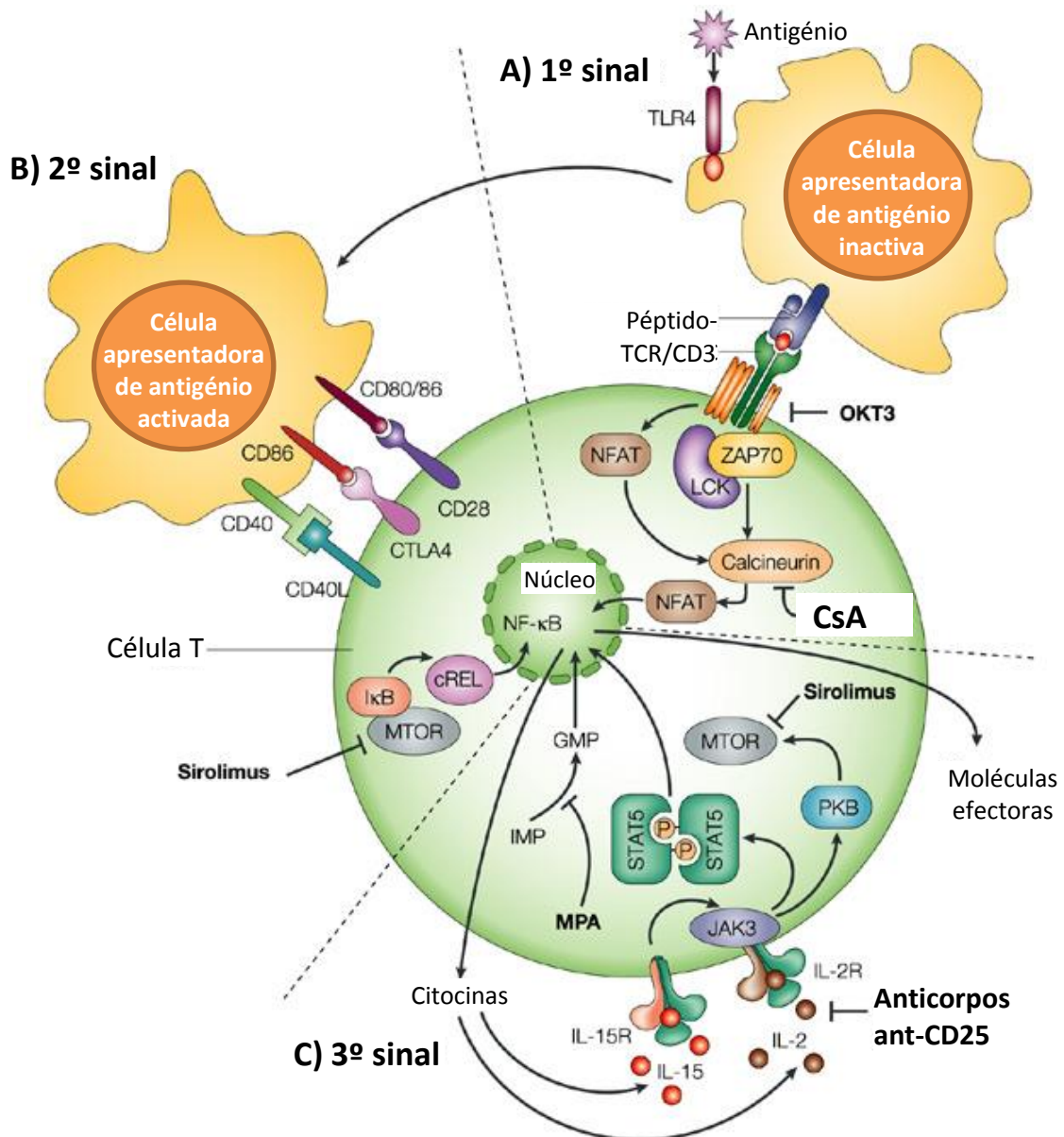
Pertencem ao grupo dos inibidores da calcineurina a ciclosporina A (CsA) e o tacrolimus (Tac). A ciclosporina é um péptido cíclico lipofílico de 11 aminoácidos, enquanto o tacrolimus é um antibiótico macrólido. Ambos os fármacos foram isolados a partir de fungos e possuem efeitos inibidores semelhantes sobre células do sistema imunitário [de Mare-Bredemeijer e Metselaar, 2012]. A forte componente imunossupressora da ciclosporina, observada em ensaios prévios, levou a que fosse testada em 1982 pela primeira vez num transplante [Starzl et al., 1981], sendo aprovada em 1983 como agente terapêutico para a prevenção da rejeição do enxerto em transplante renal [Kahan, 1989]. O tacrolimus foi descoberto em 1984, começando a ser usado na transplantação na década de 90.

A utilização clínica da CsA foi depois expandida para transplantes de coração, fígado, pulmão, e transplantes de órgãos múltiplos, bem como para o tratamento de certas doenças auto-imunes, tais como a psoríase, a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistémico, entre outras [Paziana et al., 2013].

### 1.1. Mecanismos de acção imunossupressora

Apesar da CsA e Tac diferirem na estrutura molecular e características de ligação intracelular, as propriedades imunossupressoras de ambas resultam da inibição da calcineurina [Issa et al., 2013]. Tanto a ciclosporina como o tacrolimus ligam-se a imunofilinas (ciclofilina e *FK506-binding protein* [FKBP], respectivamente), formando um complexo que se liga à fosfatase calcineurina. Este complexo inibe a desfosforilação catalizada pela calcineurina, permitindo a translocação do factor nuclear das células T activadas (NFATc) para o núcleo. O NFATc é necessário para a transcrição da interleucina-2 (IL-2) e de outras citocinas associadas à diferenciação e crescimento dos linfócitos T, como o factor de necrose tumoral alfa, a interleucina-3, a

interleucina-4, o CD40L (membro da família do receptor do factor de necrose tumoral), o factor estimulante de células granulócitas e macrófagos, e o interferão gama [Hancock et al., 2000]. Por fim, a produção da citocina pró-inflamatória IL-2 é reduzida e a proliferação dos linfócitos é inibida, resultando na redução da resposta imunitária e prevenção da rejeição do enxerto (Figura 6).



**Figura 6.** Vias de sinalização da activação das células T e os 3 locais de bloqueio de sinalização. Adaptado de Kahan. (2003).

A CsA provoca alguma supressão da imunidade humoral, mas é sobretudo eficaz contra mecanismos imunes dependentes das células T, como os subjacentes à rejeição de transplantes. A ciclosporina também aumenta a expressão de TGF- $\beta$ , um potente inibidor da proliferação de células T estimulada pela IL-2 e formação de linfócitos T citotóxicos.

### **1.2. Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da CsA e implicações no equilíbrio imunossupressão - toxicidade**

O facto de a CsA ter uma janela terapêutica muito estreita deve ser tido em grande consideração no sentido de manter o equilíbrio correcto entre a eficácia e a toxicidade, o que normalmente é conseguido através da monitorização dos níveis do fármaco dentro dos intervalos considerados mais seguros [Kershner e Fitzsimmons, 1996]. A CsA exhibe elevada variabilidade inter- e intra-individual em termos farmacocinéticos que resulta de variações na sua absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. A absorção intestinal é variável e influenciada pela ingestão de alimentos e por aspectos étnicos. A CsA é distribuída principalmente após ligação aos eritrócitos, mas também se encontra ligadas às proteínas plasmáticas. É principalmente metabolizada no fígado, pelas isoenzimas 3A presentes no sistema enzimático citocromo P450 e os seus metabolitos são principalmente eliminados na bÍlis, sendo que menos de 5% é excretado na urina. A farmacocinética é largamente influenciada por outros fármacos (por exemplo, os antibióticos macrólidos, os bloqueadores dos canais de cálcio, os antifúngicos, etc), bem como por polimorfismos genéticos em enzimas do sistema CYP3A5 (discutidos abaixo).

As concentrações mínimas dos CNIs são rotineiramente verificadas, com o intuito de ajustar a dose com a finalidade de evitar a nefrotoxicidade. Os níveis sanguíneos de ciclosporina são estabelecidos por rotina após 12 horas da toma ( $C_0$ ). No entanto, a correlação entre os níveis de  $C_0$  e a exposição total, medida em área

sob a curva concentração-tempo (AUC das 0 às 12 horas), é relativamente parca em informação. A medição dos níveis de CsA duas horas após a administração ( $C_2$ ) correlaciona-se mais estreitamente com a exposição [Canadian Neoral Renal Transplantation Study Group, 2001; International Neoral Renal Transplantation Study Group, 2002; Knight e Morris, 2007], mas o uso de  $C_2$  na prática clínica de rotina é complicada. Para além disso, não há estudos conclusivos que mostrem o benefício significativo de medições  $C_2$  em relação ao  $C_0$  na prevenção da rejeição ou toxicidade [Krejci et al., 2010].

Transportadores e enzimas metabolizadoras do fármaco podem causar maior variabilidade interindividual na farmacocinética [Hesselink et al., 2010]. O transportador de fármacos com ligação adenosina-trifosfato e proteína B1 (ABCB1), responsável pelo transporte de fármacos do citoplasma para a superfície da célula e em seguida para o espaço extracelular, encontra-se mais proeminente na borda das células epiteliais dos túbulos proximais dos rins humanos. Foi demonstrado que o genótipo de ABCB1 e a expressão da glicoproteína P em células epiteliais dos túbulos renais determinam a susceptibilidade ao dano tubulointersticial crónico nos rins transplantados [Naesens et al., 2009]. O ABCB1 é sobrerregulado com a exposição à CsA, o que provavelmente serve como um mecanismo de protecção contra a exposição ao fármaco. Por outro lado, a menor expressão de ABCB1 demonstrou ser um factor de risco para as alterações histológicas crónicas em doentes transplantados renais e tratados com inibidores da calcineurina sendo que, adicionalmente, a expressão intrarenal reduzida de CYP3A5 em biopsias renais pode ser um factor de risco para desenvolvimento de nefrotoxicidade neste tipo de doentes [Joy et al., 2007; Naesens et al., 2009]. Por outro lado, alguns estudos não conseguiram demonstrar uma correlação entre a sobrevivência do enxerto e o genótipo de ABCB1 ou a associação do genótipo CYP3A5 e nefrotoxicidade mediada por CNIs [Bandur et al., 2008; Quteineh et al., 2008]. Em geral, e até ao momento, os dados disponíveis sobre este assunto permanecem por deslindar.

---



A monitorização precisa dos níveis de CsA parece não ser suficiente para impedir a nefrotoxicidade crónica. Uma das possíveis razões é o facto de que em alguns locais do enxerto renal a concentração de CsA não tem correspondência com os níveis sistémicos, sendo muito mais alta [Iwasaki et al., 1998; Halloran et al., 1999]. Podder e colegas documentaram locais de maiores concentrações de CsA correlacionados significativamente com a redução da função e o desenvolvimento histológico de lesões renais, com evidentes sinais de nefrotoxicidade [Podder et al., 2001]. Outros estudos avaliaram a expressão e função da glicoproteína-P no tecido renal e a sua associação à nefrotoxicidade. Este transportador é expresso na membrana apical das células epiteliais tubulares e é a principal proteína responsável pela excreção de CsA [Saeki et al., 1993]. Demonstrou-se que a sobre-regulação induzida pela ciclosporina na glicoproteína-P é indirectamente proporcional à incidência de arteriolar hialinose, fibrose intersticial e fibrose periglomerular [del Moral et al., 1997]. Por outro lado, se a expressão ou função desta proteína é reduzida verifica-se uma acumulação de CsA no tecido renal. Foi descrito que um único polimorfismo no nucleótido ABCB1 (MDR1) no rim do dador relacionado com a presença do alelo T na posição 3435, afecta a expressão e função da glicoproteína-P e esta se associa com o desenvolvimento de nefrotoxicidade crónica induzida pela CsA [Hauser et al., 2005].

Estudos destinados à avaliação dos efeitos biológicos dos metabolitos da CsA concentraram-se principalmente nas suas características imunossupressoras, muito pouco se sabendo sobre os seus efeitos tóxicos. Roby e colegas demonstraram num modelo de rato que os níveis sanguíneos de metabolitos da CsA excedem significativamente os níveis do fármaco e vários desses metabolitos reduzem a taxa de filtração glomerular e levam a vacuolização tubular [Copeland et al., 1990; Roby e Shaw, 1993]. Num estudo realizado em receptores de transplante de fígado, detectou-se uma associação positiva entre a disfunção renal e os níveis de CsA e dos seus metabolitos no sangue [Christians et al., 1991]. No entanto, os efeitos destes

metabolitos na tubular função e expressão de TGF- $\beta$ , entre outros aspectos da nefrotoxicidade induzida pela CsA, são presentemente desconhecidos. Até ao momento, o conhecimento da reactividade dos metabolitos da CsA é insuficiente para atribuir um veredicto final sobre de que forma contribuem para o desenvolvimento da nefrotoxicidade. Os estudos devem ser centralizados nas medições dos níveis de CsA e dos seus metabolitos, não somente no sangue mas também em tecido renal.

### **1.3. Principais efeitos secundários da Ciclosporina A**

Uma vez que a inibição da calcineurina pelos CNIs não se limita às células do sistema imunitário, estes agentes causam alterações tóxicas para além dos efeitos imunossupressores. Com efeito, os potenciais efeitos nefrotóxicos dos CNIs parecem poder derivar de mecanismos independentes da inibição da calcineurina e da translocação do NFAT [Kung et al., 2001; Halloran et al., 1999; Issa et al., 2013].

A escolha entre o Tac e a CsA é em grande medida baseada nas preferências dos centros de transplante face ao perfil de eficácia dos dois fármacos, bem como ao perfil de segurança [Issa et al., 2013].

Entre os principais efeitos secundários da CsA estão a hipertensão arterial e a nefrotoxicidade. Face ao contexto desta dissertação, será abordado com maior detalhe esta última.

Enquanto a nefrotoxicidade aguda é um dado certo e adquirido da utilização dos CNIs, tem sido descrito nas últimas décadas que estes inibidores induzem nefrotoxicidade crónica que contribui para a perda do enxerto a longo prazo. Esta nefrotoxicidade caracteriza-se por uma deterioração progressiva e irreversível da função renal, descrita pela presença de fibrose intersticial, atrofia tubular, hialinose arteriolar e glomeruloesclerose. Os mecanismos que levam a nefrotoxicidade crónica dos CNIs têm sido abordados por diversos prismas, incluindo a nível molecular, farmacocinético e farmacogenético [Issa et al., 2013].

A nefrotoxicidade é um das mais graves complicações da utilização de CsA [Gonwa et al., 2001]. Por exemplo, nos primeiros 5 anos, os doentes transplantados hepáticos apresentam taxa de incidência de insuficiência renal crónica (IRC) elevada, estimando-se que 18% desenvolvam este efeito secundário. A Infecção por vírus da hepatite C, a diabetes mellitus e a hipertensão são factores de risco independentes para esta insuficiência renal [Ojo et al., 2003]. Para além disso, o risco de morte é pelo menos quatro vezes maior em pacientes que desenvolvem falência renal crónica [Flechner et al., 2007].

Para além da hipertensão arterial e da nefrotoxicidade, o uso terapêutico da CsA está associado a outros efeitos secundários. O uso prolongado dos inibidores da calcineurina tem sido associado a um maior risco de desenvolver cancro *de novo*. Um estudo de 2010, envolvendo 385 doentes transplantados, demonstrou 2,2 vezes maior incidência de cancro *de novo* em comparação com a população em geral. Mais ainda, as incidências cumulativas em 1, 5, 10 e 15 anos após o transplante de fígado foram de 2,9%, 10,5%, 19,4% e 33,6%, respectivamente [Tjon et al., 2010]. Adicionalmente, os CNIs estão relacionados com o aparecimento de diabetes mellitus após o transplante (NODAT). Está descrito que nos receptores de transplante de fígado o NODAT tem uma ocorrência de 2,5% a 25%, e de 2% a 53% de todos os transplantes de órgãos sólidos, incluindo o transplante renal [Montori et al., 2002; Davidson et al., 2003]. A variação na incidência pode ser em parte devido à falta de um acordo universal sobre a definição de NODAT, a duração do acompanhamento terapêutico, assim como a presença de factores de risco modificáveis e não modificáveis. Foi verificado que a incidência de NODAT após o transplante de fígado é maior nos tratamentos com tacrolimus do que com a CsA, ao fim de um ano. Porém, outros factores podem influenciar o aparecimento de NODAT, como a idade, o peso, a etnia, a história familiar e a hepatite C [Bodziak, 2009].

A utilização da CsA está ainda associada a outros efeitos, tais como a hiperplasia gengival, o hirsutismo, a hiperlipidémia (aumento de colesterol LDL e de triglicéridos) [Webster et al., 2005; Vincenti et al., 2007].

## **2. A nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina: resenha**

A utilização clínica de CsA está frequentemente associada ao desenvolvimento de nefrotoxicidade, que pode ser distinguida em aguda e crónica. A forma aguda é induzida hemodinamicamente e a disfunção renal é geralmente reversível. Os efeitos nefrotóxicos crónicos da CsA já se encontram associados a alterações irreversíveis, na forma de fibrose intersticial e atrofia tubular [Chapman e Nankivell, 2006]; estes eventos são considerados como sendo causas significativas da disfunção tardia dos rins transplantados.

### **2.1. A nefrotoxicidade aguda induzida pela CsA**

A maior parte dos dados sobre nefrotoxicidade aguda referem-se à CsA, mas acredita-se que os efeitos do tacrolimus sejam semelhantes. A nefrotoxicidade aguda tem por base sobretudo efeitos vasculares, mas também podem ser detectadas algumas alterações a nível tubular e ainda, mas mais raramente, sintomatologia semelhante ao síndrome hemolítico urémico - microangiopatia trombótica (SHU-MAT).

**Arteriopatia aguda** - A CsA induz vasoconstrição da arteríola aferente, causando um desequilíbrio entre agentes vasoconstritores (como a endotelina e o tromboxano) e vasodilatadores (como a prostaglandina E<sub>2</sub>, a prostaciclina, e o monóxido de azoto) e activação do sistema renina angiotensina [English et al., 1987; Laskow et al., 1990; Burdmann et al., 1990; Textor et al., 1995; Bobadilla e Gamba, 2007]. A vasoconstrição arteriolar induz uma diminuição aguda reversível da função

renal, assim como disfunção tubular, também aguda e reversível. A inibição da sinalização da calcineurina-NFAT pela CsA promove a expressão da COX-2, que gera vasoconstrição renal e também redução da taxa de filtração glomerular [Hoherl et al., 2002; Hoherl et al., 2004]. Esta vasoconstrição é dose-dependente e reversível [Andoh e Bennet, 1998; Mihatsch et al., 1998]. Os efeitos hemodinâmicos agudos resultantes da CsA estão associados às lesões histomorfológicas [Issa et al., 2013].

O sistema renina angiotensina (SRA) é activado por efeito directo da ciclosporina nas células justaglomerulares [Kurtz et al., 1988] e indirectamente pela indução de vasoconstrição arteriolar renal, diminuição dos factores vasodilatadores e aumento dos níveis de endotelina [Ruster e Wolf, 2006]. Para além disso, foi verificado por Lijima e colegas (2000) que células das arteríolas aferentes produzem renina como resultado da administração de CsA; esta activação do SRA intensifica as alterações hemodinâmicas, aumentando a produção de angiotensina II. A ciclosporina também causa aumento da formação de radicais livres, incluindo de anião superóxido, o que reduz a biodisponibilidade de NO [Zhong et al., 1988; Diederich et al., 1994; Navarro-Antolin et al., 2001]. Outro mecanismo pela qual a CsA contribui para a vasoconstrição renal é a alteração do equilíbrio vasomotor por efeito dos metabolitos do ácido araquidónico (eicosanóides) no sentido de um estado mais pró-vasoconstritor. O promotor para a codificação do gene da COX-2 contém locais específicos de ligação ao NFAT, que é considerado o principal estimulador da expressão da COX-2 [Sugimoto et al., 2001]. A inibição de actividade da calcineurina/NFAT reduz a expressão da COX-2, o que leva à redução da produção de prostaglandina E<sub>2</sub>, que suporta a vasoconstrição renal [Hoherl et al., 2002].

***Tubulopatia tóxica*** – A nefrotoxicidade aguda induzida pela CsA é frequentemente acompanhada de vacuolização do citoplasma tubular induzida pelo alargamento do retículo endoplasmático e multiplicação dos lisossomas [Mihatsch et al., 1985; Morozumi et al., 2004]. A vacuolização pode ser resultado da isquemia provocada pela vasoconstrição; no entanto, a possibilidade de danos estruturais e

alteração da função do retículo endoplasmático pela inibição da calcineurina nas células epiteliais tubulares não deve ser descartada. Neste contexto, tem sido demonstrado que a CsA induz stresse no retículo endoplasmático e estas alterações funcionais podem estar associados e danos das células tubulares (e células endoteliais) que contribuem para a diferenciação e morte celular por indução de proteínas pró-apoptóticas [Pallet et al., 2008; Han et al., 2008; Pallet et al., 2008; Bouvier et al., 2009]. Foi observado semelhante efeito com o tacrolimus em células tubulares [Du et al., 2009].

***Síndrome hemolítico urémico - microangiopatia trombótica (SHU-MAT)*** - A administração de ciclosporina e tacrolimus (menos frequentemente), representa um importante factor de risco para o desenvolvimento de síndrome hemolítico urémico - microangiopatia trombótica no pós-transplante, uma forma grave, mas felizmente uma doença vascular pouco frequente. Este síndrome é caracterizado patologicamente pela ocorrência em simultâneo de trombocitopenia (contagem de plaquetas inferior a  $150.000/\text{mm}^3$ ), anemia com sinais de hemólise microangiopática e lesão renal aguda evidenciada por hematúria, proteinúria ou aumento do nível sérico de creatinina. Podem também ocorrer disfunções neurológicas e hipertensão arterial, em diversos graus. O termo MAT (microangiopatia trombótica) define exactamente uma lesão histológica das arteríolas e capilares, que se caracteriza por engrossamento e inflamação da parede vascular, despreendimento de células endoteliais, preenchimento endotelial de proteínas e material de lise celular e presença de trombos de plaquetas, que vão obstruir os vasos. O principal mecanismo causador desta patologia é a vasoconstrição que leva a dano endotelial. A CsA induz hiper-agregação das plaquetas que contribui para a activação de factores pró-trombóticos [Franz et al., 1998; Ponticelli, 2007]. No entanto, verificou-se que a eliminação da ciclosporina com a conversão para tacrolimus ou a administração de sirolimus é geralmente uma medida terapêutica suficiente [Oyen et al., 2006; Bren et al., 2005]. Em casos mais graves, a plasmaferese, a administração de imunoglobulina intravenosa pode ser

necessária e, recentemente, o efeito aditivo de belatacept foi reportado como benéfico [Ashman et al., 2009].

## **2.2. A nefrotoxicidade crónica induzida pela CsA**

A nefrotoxicidade dependente da CsA depende da dose e do tempo de exposição, podendo causar mudanças reversíveis na hemodinâmica renal e/ou levar ao desenvolvimento de danos irreversíveis nas estruturas do parênquima. As alterações morfológicas crónicas mais descritas são hialinose arteriolar, atrofia tubular, fibrose intersticial, espessamento/fibrose da cápsula de Bowman e esclerose glomerular [Randhawa et al., 1993; Williamns e Haragsim, 2006]. A etiologia destas mudanças provavelmente envolve uma combinação de alterações hemodinâmicas, associadas a efeitos tóxicos directos sobre as células epiteliais tubulares.

**Arteriopatia crónica** - Um sinal característico de toxicidade crónica promovida pela CsA é a presença de depósitos hialinos irregulares focais ou circulares na média das arteríolas aferentes (hialinose arteriolar), que substitui as células musculares lisas necróticas. A causa desta lesão celular ainda não é clara, mas pode estar relacionada com o importante papel da calcineurina-NFAT nas células do músculo liso [Nieves-Cintrón et al., 2007]. Se os depósitos formados forem grandes podem causar um estreitamento hemodinâmico significativo do lúmen vascular com consequente isquémia do tecido renal [Mihatsch et al., 1998]. A hialinose arteriolar é geralmente considerada uma lesão irreversível; contudo, foi descrita a regressão completa de arteriopatia grave induzida pela CsA após a sua retirada ou redução da dose [Collins et al., 1992].

**Alterações tubulointersticiais crónicas** – A arteriopatia e o estreitamento do lúmen arteriolar podem também ser considerados como estando entre os principais contribuintes para o desenvolvimento de fibrose intersticial e de atrofia tubular após terapêutica com CsA. Os radicais livres e as espécies reactivas de oxigénio

produzidas são consequência da isquémia local, levando a apoptose celular e consequente lesão tubulointersticial [Zhong et al., 1988; Nieves-Cintrón et al., 2007]. Um factor molecular significativamente envolvido na progressão das alterações intersticiais crónicas é o aumento na produção de TGF- $\beta$  (factor de crescimento transformante beta). Este factor é estimulado, em parte, pela diminuição na libertação de NO e também pelo aumento da concentração local de angiotensina II [Shihab et al., 2000; Pichler et al., 1995]. O TGF- $\beta$  é um promotor do desenvolvimento da fibrose intersticial, inibindo a sua degradação e aumentando a produção de proteínas na matriz extracelular pela indução de transição do epitélio mesenquimal [Feldman et al., 2007; Hertig et al., 2008]. Para além disso, também está envolvido na progressão da patologia vascular crónica no enxerto [Viklický et al., 2003]. O papel do TGF- $\beta$  na patogénese crónica é suportada pelo facto de o seu bloqueio – por intermédio de anticorpos anti-TGF- $\beta$  – conduzir a uma melhoria morfológica da nefrotoxicidade e a uma estabilização da função renal num modelo animal [Ling et al., 2003]. A activação do SRA também contribui para a progressão das alterações tubulointersticiais crónicas. Para além do seu efeito directo na hemodinâmica que leva à estimulação da secreção de aldosterona, o que conduz a um agravamento na fibrose intersticial pelo aumento da produção de TGF- $\beta$ , promove a produção de espécies reactivas de oxigénio e inibição da degradação da matriz extracelular [Remuzzi et al., 2008].

**Alterações glomerulares crónicas** – As lesões glomerulares crónicas associadas ao tratamento com a CsA ocorrem como resultado de isquemia glomerular devido à hialinose arteriolar grave [Nankivell et al., 2003]. A esclerose glomerular global é a patologia mais comum, mas também ocorrem alterações fibrosas segmentares e focais causadas por hiperfiltração residual do glomérulo [Nankivell et al., 2004; Woolley et al., 1988]. Os distúrbios na homeostasia de iões, como a hipercalcemia, a hipomagnesemia, a hiperuricemia e a acidose metabólica hiperclorémica, ocorrem frequentemente como consequência de uma função tubular deficiente [Heering e Grabensee, 1991]. A hipercalcemia provocada pela inibição da



calcineurina refere-se em parte aos efeitos inibitórios sobre a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase nos túbulos colectores e à diminuição do número de receptores mineralocorticóide e acidose tubular distal [Lea et al., 1994; Younes-Ibrahim et al., 2003; Heering et al., 2004]. A ciclosporina também tem um efeito significativo sobre o metabolismo do magnésio. A diminuição da reabsorção de magnésio devido à redução de expressão da paracelina-1 nas células da membrana ascendente da ansa de henle, muitas vezes leva a hipomagnesemia grave, aumentando a possibilidade de desenvolvimento de fibrose intersticial crónica. Para além disso, a CsA é também um das principais causas de aparecimento de hiperuricemia no pós-transplante devido ao seu efeito inibidor sobre a secreção tubular de ácido úrico [Clive, 2000; Miura et al., 2002; Chang et al., 2007; Alexander et al., 2008].

### **3. Estratégias para minimização da nefrotoxicidade induzida pela Ciclosporina A**

A estratégia de manter o enxerto renal por um período cada vez longo é uma batalha que ainda não está ganha pela comunidade médica e científica.

O reconhecimento da existência e gravidade da nefrotoxicidade induzida pela CsA fez emergir a necessidade de adopção de medidas terapêuticas que visem a sua prevenção, o atraso no aparecimento ou a minimização. De entre as medidas terapêuticas devemos distinguir as que se centram em alterações dos protocolos de imunossupressão e as que abordam a própria nefrotoxicidade com fármacos potencialmente renoprotectores. Neste último plano incluem-se vários fármacos que têm vindo a ser empregues pelo seu potencial renoprotector e/ou vasodilatador/anti-hipertensor, incluindo bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima de conversão da angiotensina, vasodilatadores, dadores de NO, entre outros. Considerando o contexto específico deste trabalho, dar-se-á destaque às estratégias

relacionadas com as alterações dos protocolos de imunossupressão, focando 3 principais: 1 - evitar a utilização de CsA; 2 - redução da dose de CsA e 3 - Conversão para outros agentes imunossupressores, abordando sobretudo os inibidores da mTOR.

### **3.1. Protocolo de imunossupressão sem uso de CNIs**

Evitar os CNIs é a omissão completa destes fármacos num novo regime de imunossupressão de manutenção, enquanto minimização dos CNIs refere-se doses reduzidas destes fármacos de forma a limitar a sua nefrotoxicidade. Em 2006, Webster e colegas publicaram uma meta-análise em que avaliaram os inibidores da mTOR vs CNIs *de novo* em casos de transplante renal [Webster et al., 2006]. Um ano após o transplante, os níveis de creatinina foram significativamente menores nos pacientes tratados com mTORi. Outra meta-análise (Flechner et al., 2008) analisou a taxa de filtração glomerular de 2 anos em doentes transplantados renais que receberam imunossupressão, quer com base no SRL ou com base em CNIs: houve um benefício significativo em relação à TFG (14,94 mL/min) nos que receberam imunossupressão de base com SRL.

No entanto, outros estudos com protocolos livres de CNIs não mostram melhoras nos resultados de enxerto. O estudo ELITE-Symphony foi concebido para comparar a não utilização de CNIs e estratégias de minimização em doentes distribuídos por 4 grupos: baixa dose SRL, baixa dose de Tacrolimus, baixa dose de CsA e dose padrão de CsA [Ekberg et al., 2007]. A função do enxerto renal melhorou e as biópsias comprovaram existirem taxas de rejeição aguda significativamente menores no grupo de baixa dose de Tac em comparação com os outros grupos de tratamento. Para além disso, a sobrevida do enxerto foi maior com uma baixa dose de Tac em comparação com a dose padrão de CsA e uma dose baixa de SRL. Evitar os CNIs com baixa dose de SRL não mostrou melhoras na função renal, sendo que a

taxa de rejeição aguda, comprovada por biópsia, e a sobrevida do enxerto, foram significativamente piores do que com a baixa dose de Tac. Outros ensaios também demonstraram que os protocolos em se evitou o uso de CNIs não conferiram vantagens na TFG ou na histologia do enxerto, em doentes tratados com SRL [Larson et al., 2006; Dean et al., 2008]. Num estudo randomizado, Larson e colegas (2006) testaram dois protocolos completamente livres de CsA (SRL-MMF-prednisona em 81 pacientes) para outro inibidor da calcineurina (Tac-MMF-prednisona em 83 pacientes) como imunossupressão de manutenção, durante 33 meses. No 1º ano a sobrevida do enxerto foi idêntica nos dois grupos ( $P=0,95$ ). Adicionalmente, também não se verificou diferença na taxa de filtração glomerular entre os grupos Tac e SRL do 1º para o 2º ano. Curiosamente, houve diferenças tubulares, ou glomerulares durante este ano, pela classificação de Banff.

No Estudo Orion, Flechner e seus colegas (2011), dividiram os doentes em 3 grupos: SRL-Tac seguido de eliminação Tac às 13 semanas, SRL-MMF e Tac-MMF. O grupo SRL-MMF teve alta taxa de rejeição aguda comprovada por biópsia e foi descontinuado. Os regimes tendo como base o SRL foram associados a piores resultados em doentes transplantados renais.

É importante destacar que os doentes dos estudos de Larson e de Flechner apresentavam baixo risco imunológico e daí serem medicados com SRL e MMF. Contudo, nestes protocolos livres de CNIs, esta avaliação está sempre dependente do tipo de população. Na verdade, quando os regimes livres de CNIs são usados no contexto de população de maior risco, as taxas de rejeição e de tolerabilidade foram mais baixas com aqueles imunossupressores e regimes com CNIs evidenciaram maior sucesso [Srinivas et al., 2007]. Na verdade, Srinivas e colegas verificaram que a sobrevida do enxerto que proveio de doador falecido foi significativamente menor com o tratamento SRL-MMF, em comparação aos doentes com terapia Tac-MMF ou CsA-MMF, após 5 anos de transplante (64, 78 e 78%, respectivamente,  $P=0,001$ ).

### 3.2. Redução da dose

A manutenção da imunossupressão com inibidores da calcineurina por longos períodos, mesmo que em baixas doses, levam ao contínuo desenvolvimento da nefrotoxicidade. Evidências histológicas de lesões tubulointersticiais e glomerulares foram verificadas como irreversíveis, apesar da diminuição da dose de CNI, e levou ao declínio da função renal e do enxerto. A nefrotoxicidade ao fim de 10 anos é um dado universal, independentemente das lesões iniciais [Flechner et al., 2008]. Em suma, a nefrotoxicidade no transplante renal é uma preocupação significativa e parece ser progressiva ao longo do tempo quando a exposição aos CNIs é mantida, mesmo que haja redução da dose.

No estudo “*Reference*” foi avaliada a redução da dose de CsA, continuando com o MMF e a prednisona. Neste estudo, a redução da CsA em 50% conduziu a um aumento na depuração da creatinina em cerca de 11%, durante os primeiros 2 anos de investigação. Não houve episódios de rejeição aguda comprovada por biópsia [Frimat et al., 2006].

No ensaio CAESAR [Ekberg et al., 2007] foram avaliadas as estratégias de minimização e retirada do CNI por randomização de doentes em 3 grupos: baixas doses de CsA, CsA baixa dose com retirada antecipada, e dose padrão de CsA. A função do enxerto renal foi semelhante nos 3 grupos. No entanto, a taxa de rejeição aguda, comprovada por biópsia, foi mais elevada no grupo de retirada de CsA, mas não no grupo de baixa dose, acrescentando mais evidências práticas para a cautela, mesmo com a eliminação precoce do CNI. De notar que a maioria dos estudos com minimização da utilização de CNIs teve acompanhamento a curto prazo e, mais importante, tinha falta de dados de biópsias protocolares; por conseguinte, a quantificação da toxicidade histológica do CNI permanece indefinida (particularmente no que se refere a longo prazo). Os CNIs permanecem a espinha dorsal de imunossupressão actual e têm sido associados com excelente taxas de sobrevivência

do enxerto, apesar dos padrões de mudança nos regimes imunossupressores e o uso de rim proveniente de doadores de maior risco.

### **3.3. Conversão para outros agentes imunossupressores**

A retirada dos CNIs e substituição por SRL foi avaliada por vários estudos, com um misto de resultados. Os principais ensaios foram o estudo *CONCEPT* [Lebranchu et al., 2009], o estudo *Spare-the-Nephron* [Waid et al., 2011] e estudo *CONVERT* [Schena et al., 2009]. Na realidade, houve uma melhoria da função do enxerto renal no grupo de retirada do CNI, em contraste com os ensaios *CONCEPT* e *Spare-the-Nephron*, que não mostraram melhorias significativas na função do enxerto renal após 2 anos de conversão para SRL. No entanto, a retirada de CNI tardia no estudo *CONCEPT* foi realmente prejudicial nos destinatários com proteinúria. Para além disso, o estudo complementar pós-*CONCEPT* revelou que os resultados da conversão de CsA para SRL aos 3 meses pós-transplante do estudo *CONCEPT* foram mantidos [Lebranchu et al., 2011]. No entanto, havia mais proteinúria e diabetes mellitus *de novo* com o uso de SRL. No ensaio *CONVERT*, a retirada tardia do CNI não apresentou diferenças significativas de resultados em termos de segurança primária. No entanto, Mota e colegas (2004) apresentaram um estudo de retirada da ciclosporina precocemente em que os doentes apresentaram melhor função renal, confirmado por diagnóstico histológico 3 anos após o transplante renal.

Estes dados gerais serão abordados em maior detalhe no capítulo III.



# **CAPÍTULO III**

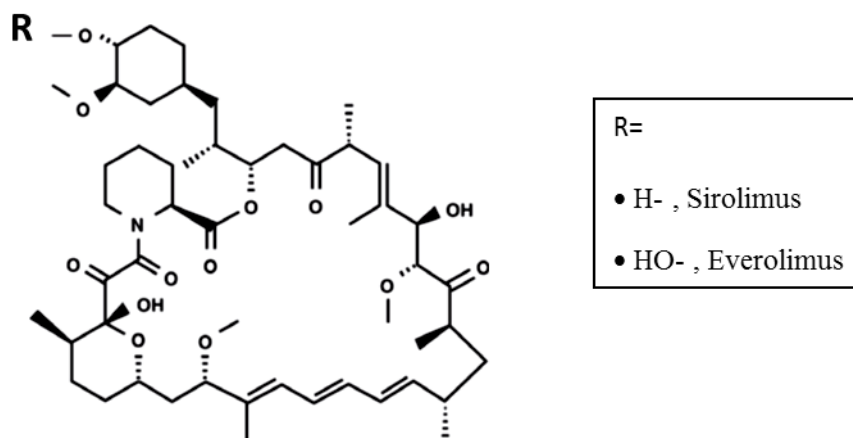
**Inibidores da mTOR: solução para a nefrotoxicidade dos CNI's?**





## 1. Mecanismo de acção, aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos dos inibidores da mTOR

A rapamicina, também conhecida na prática clínica como sirolimus (SRL), foi isolada e identificada como um potente metabolito antifúngico. Este macrólido, produzido pela *Streptomyces hygroscopicus*, inibe a proliferação celular e exibe actividade anticancerígena e imunossupressora [Wullschleger et al., 2006], devido à inibição do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). A proteína mTOR é um membro da família de cinase do inositol-3-fosfato que desempenha um papel fundamental na integração de diferentes sinais bioquímicos e de factores de crescimento, incluindo aminoácidos, glicose, ATP e insulina [Dann et al., 2007]. Em 1999, o SRL foi aprovado pela FDA para a prevenção da rejeição do enxerto renal [Miller, 1999]. Posteriormente, através da modificação da estrutura da rapamicina, nomeadamente da adição de um éster, um éter, ou um grupo fosfonato, surgiram 3 análogos, o tensirolimus, o everolimus, e o deferolimus, respectivamente (Figura 7). O SRL e o everolimus são utilizados principalmente como medicamentos imunossupressores no transplante, ainda que a possibilidade destes agentes inibidores da mTOR poderem actuar como anticancerígenos também esteja a ser testada, sendo que o tensirolimus é o mais promissor neste contexto.



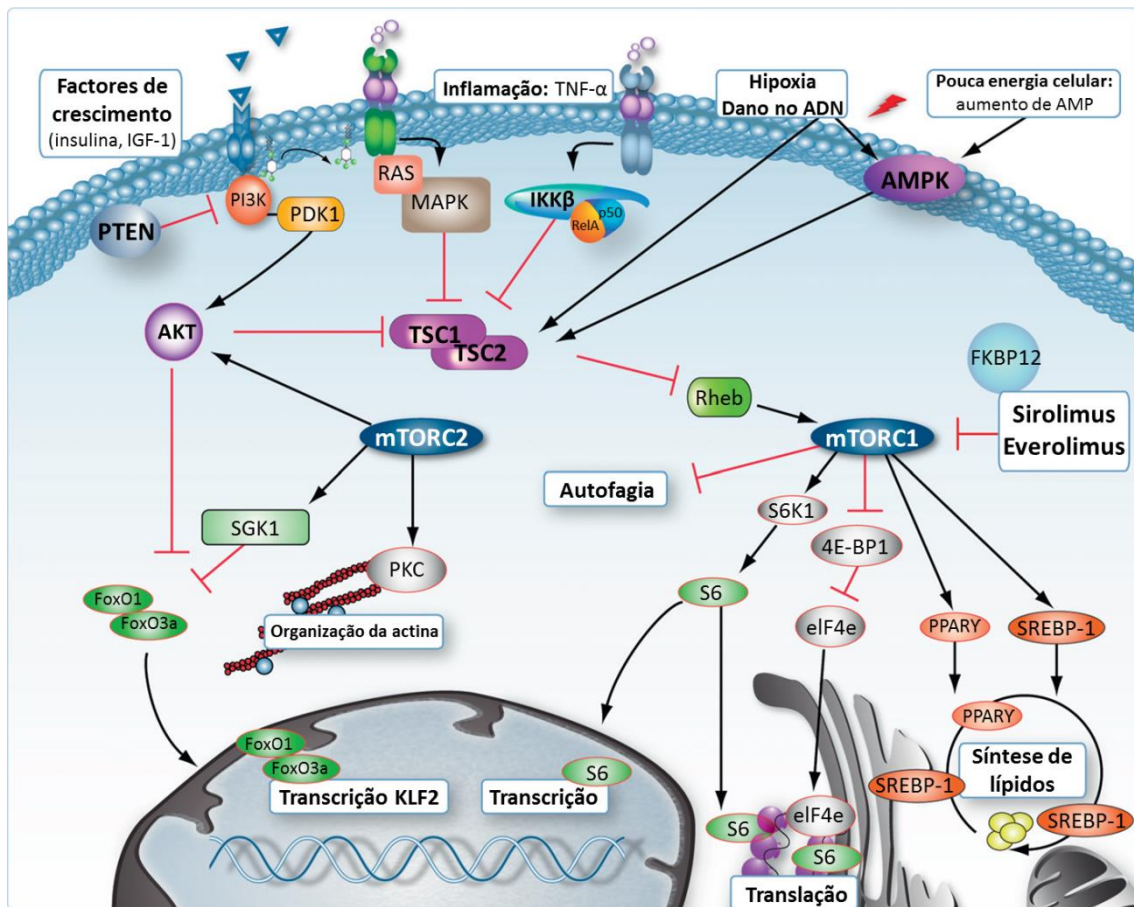
**Figura 7.** Estrutura química dos inibidores da mTOR: sirolimus e everolimus. Retirado de Kawahara et al. (2011).

A mTOR é uma proteína chave de sinalização envolvidas em diversas funções celulares, incluindo o metabolismo, o crescimento, a sobrevivência, o envelhecimento, a plasticidade sináptica e a memória celular. A inibição da mTOR ocorre após ligação da rapamicina à proteína FKBP12, bloqueando a progressão do ciclo celular da fase G1 para a S e causando a inibição da proliferação das células T [Halloran, 2004].

Como mostrado na Figura 8, a via da mTOR é activada por uma série de diferentes classes de estímulos. Há pelo menos dois complexos distintos da mTOR, o complexo mTOR 1 (mTORC1) e o complexo mTOR 2 (mTORC2), que têm funções e relações distintas com os mediadores seguintes [Weichhart e Säemann, 2009; Zoncu et al., 2011]. Sinais provenientes de factores de crescimento (como a insulina ou o factor de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1)), citocinas pró-estimuladoras, receptores *Toll-like* (TLR), níveis de energia celulares, hipoxia, stresse celular e danos no ADN, determinam a actividade do mTORC1 [Kawahara et al., 2011]. Estes sinais medeiam os seus efeitos através do complexo TSC1-TSC2, que é o principal regulador negativo do mTORC1. Uma vez activado, o mTORC1 promove a tradução do ARNm, estimulando a S6 cinase (S6K1) e inibindo a iniciação da tradução eucariótica de ligação à proteína factor 1 (EIF4EBP1). Por outro lado, o mTORC2 não é inibido directamente pela rapamicina, embora a administração de rapamicina a longo prazo perturbe a sua dinâmica em algumas células. O mTORC2 regula a dinâmica da actina no citoesqueleto através da proteína cinase C (PKC) (Figura 8).

Para além dos efeitos reguladores da mTOR na divisão celular, foi demonstrado recentemente que a mTOR também afecta o sistema de imunidade inata [Säemann et al., 2009]. A inibição da mTOR promove a inibição de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10, e aumenta a apresentação de antigénio (complexo MHC) através da autofagia de monócitos/macrófagos e células dendríticas. Para além disso, a mTOR regula a produção de interferão tipo 1 e a expressão de receptores de quimiocinas. Os inibidores da mTOR também bloqueiam a progressão do ciclo celular

da fase G1 para a S nas células *Natural killer* (NK), mas não afecta a produção de interferon- $\gamma$  nas linhas celulares primárias de NK [Thomson et al., 2009].



**Figura 8.** Vias de sinalização da mTOR e respectivas actividades e inibições. Adaptado de Kawahara et al. (2011).

A inibição da imunidade inata pelos inibidores da mTOR (mTORi) afecta a imunidade adaptativa via moléculas co-estimuladores e produtores de citocinas. Os mTORi provocam uma ligeira diminuição do timo, que está associada à diminuição na produção de células T [Thomson et al., 2009], pelo bloqueio do ciclo celular da fase G1 para a fase S, mesmo estimulados os linfócitos T pela IL-2. A rapamicina diminui fortemente a proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, embora não altere a proporção de células T CD4<sup>+</sup> positivas individuais que regulam positivamente a expressão FOXP3 no timo [Säemann et al., 2009; Thomson et al., 2009]. Adicionalmente, células T CD4<sup>+</sup> com um défice de mTOR diferenciam-se em células T reguladoras FOXP3<sup>+</sup> (Tregs) após a

estimulação, em comparação com as células T nativas. A diferenciação em células T auxiliaadoras-1 (Th1), Th2 ou Th17 é severamente inibida em células T CD4<sup>+</sup>, que não expressam a mTOR [Delgoffe et al., 2009].

Após administração oral, a rapamicina é absorvida rapidamente. A concentração máxima no plasma ( $C_{max}$ ) é atingida em 1 hora com a administração de uma dose única em indivíduos saudáveis e 2 em horas ( $t_{max}$ ) em doentes com transplante renal que receberam doses múltiplas [Zimmerman e Kahan, 1997; MacDonald et al., 2000]. A administração concomitante com alimentos gordurosos diminui a taxa de absorção; desta maneira o ( $C_{max}$ ) diminuiu 34%, o  $t_{max}$  é aumentado 3,5 vezes e a área sob a curva de concentração plasmática (AUC) também aumenta 35% em comparação com os valores obtidos em jejum [Zimmerman et al., 1999]. O tempo de meia vida do SRL é de aproximadamente 60h e é eliminado pelo fígado através do sistema citocromo microsomal P450-3A4 que, coincidentemente, é a mesma via metabólica utilizada para a metabolização da ciclosporina. Os fármacos que inibem ou competem com a actividade do sistema citocromo P450 podem significativamente prejudicar a acção de ambos e levar a um significativo aumento das concentrações sanguíneas [Everson, 2006]. A concentração de SRL atinge o seu estado estacionário ao fim de 5-7 dias de administração. Pode ser administrado com água ou sumo de fruta, excluindo sumo de toranja, pois pode alterar o metabolismo intestinal mediada pelo citocromo P450 3A4 (CYP 3A4) [Zimmerman e Kahan, 1997; Zimmerman et al., 1999; MacDonald et al., 2000]. O sirolimus sofre metabolismo oxidativo extenso no fígado, com reacções de desmetilação e de hidroxilação. Grande parte dos seus metabolitos tem uma semelhança com a molécula original, pelo que estes conservam parcialmente a actividade da molécula original [Leung et al., 1996].

O sirolimus é largamente distribuído nos elementos sanguíneos e a fracção livre no plasma é de cerca de 8%. Nos seres humanos está principalmente ligado à albumina do soro (97%), à glicoproteína- $\alpha$ 1 ácida e às lipoproteínas [MacDonald et al., 2000].

Relativamente à eliminação, após administração de uma dose única de sirolimus marcado com  $^{14}\text{C}$ , em indivíduos saudáveis, a maioria da radioactividade foi recuperada nas fezes ( $\pm 91,1\%$ ) e apenas aproximadamente 2,2% na urina.

## 2. Efeitos secundários do Sirolimus

Uma revisão retrospectiva de eventos adversos associados ao SRL em 175 pacientes demonstrou edema bilateral da perna (57,1%), dislipidemia (44%), dermatite (25,3%), úlceras orais (24,2%), dor nas articulações (23%), derrame pleural (16,5%), aumento da circunferência abdominal (5,5%), edema geral (5,5%), efusão pericárdica (5,5%), edema facial (2,2%) e edema das extremidades superiores (1,3%) [Montalbano et al., 2004].

Uma análise retrospectiva em 240 doentes com transplante hepático mostrou efeitos adversos semelhantes com o EVL [Saliba et al., 2011]. A contagem média de glóbulos brancos diminuiu significativamente e os níveis de triglicérides e de colesterol total aumentaram de forma significativa. O principal evento adverso foi a dislipidemia, a qual foi controlada através da redução da dose e adição de uma estatina [Bilbao et al., 2009].

Em doentes transplantados renais, a cicatrização de feridas e complicações pós-transplante foram abordados por Dean et al. (2004), num estudo prospectivo que comparou as taxas de complicações de cicatrização em dois protocolos de imunossupressão: SRL/MMF/CsA (n=64) vs Tac/MMF/CsA (n=59). A incidência de complicações foi de 8% no grupo Tac e 47% no grupo SRL ( $P<0,0001$ ). A percentagem de infecções em feridas superficiais e de hérnias incisionais foi significativamente maior no grupo SRL [Dean et al., 2004]. Num outro estudo, envolvendo 158 doentes com transplante renal, foram observados resultados idênticos [Valente et al., 2003].

Simon et al. (2004) conduziram um estudo em receptores de transplante renal a partir de um doador falecido (n=8319) para avaliar se a utilização de imunossupressão baseada em SRL estava associada ao desenvolvimento de atraso na função do enxerto (AFE) [Simon et al., 2004]. Do total da população em estudo, 361 pacientes receberam SRL, dos quais 98 (27,1%) apresentaram AFE, em comparação com os 22,5% obtidos em doentes que não receberam SRL. Nas análises multivariadas, o SRL foi associado a um aumento do risco de AFE. McTaggart et al. (2004) relataram resultados semelhantes.

Mahé e colegas (2005) realizaram uma avaliação sistemática em pele, mucosas, unhas e cabelos de 80 indivíduos que tinham sido sujeitos a transplante renal e estavam sob terapêutica imunossupressora à base de SRL, e encontraram doenças de pele frequentes nessa população. Setenta e nove doentes (99%) apresentaram eventos cutâneos adversos.

A ulceração aftosa é um efeito colateral relativamente comum ao SRL [Mahé et al., 2005]. Estas lesões das mucosas orais são muitas vezes dolorosas e debilitantes, e levam a uma redução da dose ou à descontinuação do SRL num número considerável de doentes. No entanto, Chuang e colegas (2007) relataram que a aplicação directa de clobetasol (esteróide) levou à rápida resolução das úlceras aftosas que se desenvolveram em doentes com transplante renal sob terapêutica imunossupressora baseada no uso de SRL.

Augustine e colegas (2008) estudaram a prevalência de anemia e eritrócitose no pós-transplante renal ou de pâncreas em 214 doentes tratados com SRL (n=87) ou MMF (n=127). Aos 12 meses, a prevalência de anemia foi de 31% com MMF e 57% com SRL ( $p < 0,001$ ). O SRL apareceu significativamente correlacionado com a diminuição da hemoglobina em todos os doentes e em doentes sem eritrócitose. Os mesmos autores relataram recentemente que a conversão de SRL para micofenolato de sódio levou a um aumento dos níveis de hemoglobina e uma diminuição da resistência à eritropoietina em receptores de transplante renal estáveis. O aumento na

hemoglobina pareceu ser independente da mudança da função renal ou alterações na sequestração de ferro [Augustine et al., 2008]. Por sua vez, Maiorano e colegas (2006) sugeriram que a anemia induzida pelo SRL é independente do efeito anti-proliferativo do fármaco e não apresenta características de anemia inflamatória. Isto pode ser devido à influência directa do SRL na homeostasia do ferro. Finalmente, Kim e colegas (2006) mostraram percentagem superior de microcitose eritrocitária sem anemia persistente em doentes transplantados renais tratados com SRL-MMF em comparação com os tratados com CsA-MMF.

Aboujaoude e colegas (2008) foram os primeiros a descrever três casos de linfodema resolvido ou melhorado com a descontinuação de SRL. Desde então, outros casos foram relatados [Desai et al, 2009]. Reconhece-se que esta associação pode levar à interrupção precoce de SRL.

A pneumonite intersticial é um efeito colateral do SRL ainda mal definido [Haydar et al., 2004]. Champion e colegas (2006) descreveram 24 doentes transplantados renais que desenvolveram pneumonia associada ao SRL. Os sintomas clínicos incluíram tosse, fadiga, febre e dispneia. O conteúdo broncoalveolar mostrou alveolite linfocítica (19 doentes), eosinofílica (3 doentes) ou hemorragia pulmonar (2 doentes). A redução da dose de SRL resultou em melhorias clínicas de forma transitória em 2 doentes, mas a descontinuação da terapêutica foi eventualmente necessária em todos os doentes, tendo recuperado completamente em 6 meses.

O impacto do SRL nas gónadas em doentes do sexo masculino foi recentemente revisto [Huyghe et al., 2007]. Verificou-se que os valores de testosterona foram significativamente mais baixos em 28 doentes tratados com SRL em comparação com 28 controlos não tratados com o fármaco. Para além disso, estes doentes apresentaram concentrações de testosterona que estavam abaixo dos valores normais de referência para os homens. Em contraste, as concentrações da hormona folículo-estimulante (FSH) e de hormona luteínica (LH) foram maiores, enquanto os níveis de prolactina permaneceram iguais. Isto sugeriu uma relação do SRL com a

supressão de testosterona [Fritsche et al., 2004]. Zuber e seus colegas (2008) descobriram que o SRL está associado a um prejuízo da espermatogênese e, como corolário, pode reduzir a fertilidade masculina. Portanto, os doentes tratados com SRL durante todo o período pós-transplante tiveram uma contagem total de espermatozóides significativamente reduzida em comparação com doentes que não receberam SRL, tendo ainda diminuído significativamente a proporção de espermatozóides móveis. Para além disso, a taxa de gravidez foi significativamente reduzida em doentes que receberam imunossupressão baseada em SRL. De seis doentes a quem o tratamento de SRL foi interrompido, apenas 3 apresentaram uma significativa melhoria nos parâmetros de esperma.

Kasike e seus colegas (2008) conduziram uma revisão sistemática de 17 ensaios clínicos randomizados que estudaram os níveis de colesterol e de triglicéridos em transplantados renais sujeitos a regimes imunossupressores com (versus sem) inibidores da mTOR. Todos os estudos, excepto um, relataram níveis mais elevados de colesterol e de triglicéridos, ou um aumento na prevalência de tratamento com agentes que diminuem a concentração de lípidos. Aproximadamente 60% dos doentes tratados com mTORi receberam agentes hipolipemiantes (duas vezes maior do que os controlos). Parecia haver pouca diferença entre a dislipidemia causada pelo SRL (14 ensaios). Dos 4 ensaios que avaliam as lipoproteínas, verificou-se que pelo menos parte do aumento no colesterol total com mTORi era devido ao aumento da lipoproteína de baixa densidade. Na ausência de ensaios clínicos específicos, esta dislipidemia deve ser gerida da mesma forma à dos doentes não transplantados de alto risco de desenvolver doença cardiovascular.

Teutonic e colegas (2005) investigaram os efeitos do SRL no metabolismo dos hidratos de carbono e verificaram que tanto a sensibilidade como a resposta à insulina diminuíram com esta terapêutica. De acordo com esses dados, outro estudo comparou diferentes combinações de terapias (Tac+SRL, Tac+MMF e CsA+SRL). A incidência de aparecimento de pré-diabetes depois do transplante (NODAT) foi



significativamente mais baixa no grupo sem SRL em comparação com os grupos que continham administração de SRL [Ciancio et al., 2006]. As principais características do NODAT são semelhantes à diabetes tipo 2, ou seja, diminuição da secreção de insulina e resistência periférica à insulina [Hagen, 2003; Hur et al., 2007]. A hiperglicemia ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de insulina pelas células- $\beta$  e a libertação de insulina para o tecido alvo [Chow et al., 2008]. O diagnóstico de NODAT baseia-se nos critérios da *American Diabetes Association* para o diagnóstico de diabetes tipo 2 [ADA, 2004; Chow e Li, 2008; Markell, 2004], tal como aprovado pelas *guidelines* internacionais [Davidson et al., 2003]. No entanto, alguns factores que levam ao aparecimento de NODAT podem estar já presentes antes do transplante. De facto, alguns doentes que eventualmente desenvolveram NODAT tinham anteriormente intolerância à glicose ou resistência à insulina [Chow e Li, 2008]. Acredita-se que os principais factores de risco para o desenvolvimento de NODAT são a história familiar de diabetes, a predisposição genética, o transplante, a hipertrigliceridemia, a obesidade, a idade avançada do receptor do transplante e a etnia [Montori et al., 2002; Vincenti et al., 2007; Luan et al., 2008; Guerra et al., 2012].

Os CNIs têm sido implicados como a principal causa de disfunção renal no pós-transplante. A utilização dos inibidores da mTOR poderá minimizar a doença renal crónica pós-transplante, apesar do conhecimento existente ser ainda insuficiente. Contudo, sabe-se que o aparecimento da proteinúria *de novo* associado ao SRL é um dos aspectos negativos e preocupantes da utilização deste fármaco nos doentes transplantados [Stephany et al., 2006; Neau-Cransac et al., 2009]. Os resultados de experiências com animais [Daniel et al., 2005; Vogelbacher et al., 2007] e os estudos clínicos [Dittrich et al., 2004; Marti e Frey, 2005; Letavernier et al., 2005; Fervenza, 2004] sugerem que a presença de nefropatia crónica ou insuficiência renal pode aumentar o risco dos efeitos adversos do SRL e que a inibição do factor de crescimento de células endoteliais vasculares (VEGF) é importante para esses efeitos. Trabalhos recentes têm descrito um aumento da proteinúria em alguns doentes com

transplante renal com conversão de CNI para SRL. Estes estudos sugerem que a proteinúria aumenta principalmente em doentes com proteinúria prévia ou naqueles que têm lesões glomerulares avançadas. No entanto, alguns doentes tinham proteinúria mínima no início do estudo e, posteriormente, desenvolveram proteinúria nefrótica [Bumbea et al., 2005; Letavernier et al., 2005; Saurina et al., 2006; Ruiz et al., 2006; van den Akkher et al., 2006; Tomlanovich et al., 2007]. Alguns estudos descrevem o aparecimento de lesões glomerulares *de novo*, bem como, em alguns casos, lesões *de novo* segmentares e focais similares à glomeruloesclerose [Bumbea et al., 2005; Skhiri et al., 2005]. Apesar dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de proteinúria continuarem por elucidar, Letavernier e colegas (2007) apresentaram dados envolvendo a desregulação dos podócitos. Recentemente, num modelo animal em que a proteína mTOR se encontrava suprimida, verificou-se uma acumulação de vesículas autolisossómicas nos podócitos que potenciavam o aparecimento de proteinúria [Cinà et al., 2012] e a redução da actividade da AKT, afectando assim o citoesqueleto do podócito [Vassiliadis et al., 2011]. Para além disso, a nível tubulointerstitial, a inibição de mTOR usando rapamicina tem um papel no transporte de proteína, reduzindo a reabsorção tubular, o que contribui para o aumento dos níveis urinários [Straathof-Galema et al., 2006].

### 3. Substituição da Ciclosporina A por Sirolimus

Desde o aparecimento do SRL que uma questão-chave se colocou: poderão os inibidores da mTOR substituírem os inibidores da calcineurina num processo de manutenção da imunossupressão em doentes transplantados renais, assegurando a necessária capacidade de prevenção da rejeição do enxerto e reduzindo a nefrotoxicidade? Vários estudos ao longo da última década comparam os inibidores da mTOR com os inibidores da calcineurina. Contudo, são ainda escassos os estudos, e

insuficientes os dados, relativos à substituição de CsA por SRL, sobretudo a longo termo. No capítulo anterior, abordaram-se as principais estratégias para minimizar a nefrotoxicidade induzida pela CsA, com especial destaque para protocolos sem o uso de CNIs e de redução da dose. Nesta secção, descreve-se o principal protocolo, que consiste na substituição dos CNIs por inibidores da mTOR.

O primeiro estudo sobre a substituição precoce dos CNIs com rapamicina em regime de manutenção foi o *Rapamune Maintenance Regimen* (RMR). Este estudo incluiu 525 doentes transplantados renais, que receberam esteróides, CsA e SRL nos primeiros 3 meses após o transplante [Kreis et al., 2004]. Aos 3 meses  $\pm$  2 semanas, 215 doentes, escolhidos aleatoriamente, foram mantidos com a mesma imunossupressão tripla, enquanto nos restantes doentes foi retirada a CsA. Os resultados ao fim de 3 anos mostraram que a TFG foi significativamente melhor com o SRL (47,3 vs 59,4 ml/min,  $p < 0,001$ ). Estes dados foram acompanhados por uma tendência para uma melhor sobrevida do enxerto no grupo de SRL, apesar de um maior número de rejeições agudas verificadas por biopsia. Ao fim de 4 anos, a TFG e a pressão arterial média foram também melhores com o SRL, sendo que a função do enxerto no grupo SRL foi acompanhada por uma melhor avaliação histológica [Mota et al., 2004; Oberbauer et al., 2005]. No protocolo de biopsias foi avaliado o índice de dano crónico do aloenxerto (CADI), e os autores verificaram que todos os 6 componentes da pontuação CADI foram numericamente menores no grupo SRL em comparação com o grupo SRL-CsA. Para além disso, a inflamação e a atrofia tubular diminuíram significativamente no grupo SRL entre 12 e 36 meses.

Em dois estudos randomizados foi avaliada a retirada do CNI pela substituição por sirolimus aos 6 meses após o transplante. O primeiro estudo, *Spare the Nephron*, teve uma duração de 2 anos e incluiu 305 pacientes cuja imunossupressão inicial se baseou em CNI/MMF/CS (CS = esteróides) [Pearson et al., 2008]. Entre os 30 e os 180 dias após o transplante os doentes foram escolhidos aleatoriamente para 2 grupos: grupo que manteve o CNI e grupo de conversão para SRL (5-10 ng/mL). Dois

anos após a conversão, confirmou-se uma melhoria na TFG de 27,9% no grupo SRL em comparação com 11% no grupo controlo. As taxas de rejeição aguda (confirmadas por biópsia), morte e perda do enxerto foram semelhantes em ambos os grupos. De notar que não houve nenhuma alteração significativa na proteína urinária e na creatinina entre os dois grupos no período inferior a 2 anos.

O segundo estudo (*Concept*) incluiu 235 doentes com transplante renal [Lebranchu et al., 2009]. Todos os pacientes receberam indução com daclizumab para além de CsA/MMF/CS. Doze semanas após o transplante, os doentes foram aleatoriamente seleccionados: um grupo manteve a imunossupressão baseada na ciclosporina e outro passou a tomar SRL em vez de CsA. Em ambos os grupos, a administração de esteróides foi interrompida aos 8 meses após o transplante. Um ano depois, a TFG foi significativamente melhor no grupo SRL (68,9 ml/min), em comparação com o Grupo CsA (64,4 ml/min,  $p=0,017$ ). No entanto, a taxa de rejeição aguda aumentou significativamente no grupo SRL, e esta ocorreu principalmente após a retirada dos esteróides.

Noutros casos, foi testada a hipótese de realizar uma retirada mais tardia do CNI e fazer a manutenção da imunossupressão com SRL. Neste cenário, o CNI é retirado 6 meses após o transplante, principalmente por causa da nefrotoxicidade. O primeiro estudo randomizado publicado com a substituição do CNI tardiamente foi o de Stallone et al. (2005). Foram inseridos neste estudo 84 doentes transplantados renais que tinham sido receptores de enxerto de 12 a 36 meses e tinham níveis de creatinina sérica estáveis, mas nos quais a biópsia revelou nefropatia crónica do enxerto. Os doentes foram randomizados em 2 grupos: o grupo I recebeu uma redução de 40% na dose de CNI, e no grupo II foi retirado o CNI e substituído por SRL (concentração entre 6 e 10 ng/mL). Dois anos após a divisão em grupos, a taxa de sobrevivência do enxerto foi significativamente maior no grupo a tomar SRL. O seguimento por biópsia renal mostrou que as lesões aumentaram significativamente no grupo I, enquanto permaneceram estáveis no grupo II. Após 24 meses, as biópsias renais mostraram no

grupo I um aumento da expressão  $\alpha$ -SMA (actina- $\alpha$  do músculo liso) em contraste com uma redução drástica no grupo II. Este estudo mostrou que o SRL foi capaz de retardar a progressão de lesões no aloenxerto em doentes com transplante renal. Pontrelli e colegas (2008) avaliaram os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos benéficos do SRL na progressão da nefropatia, a nível glomerular e tubulointersticial. O estudo incorporou 18 doentes que receberam CNI e tinham nefropatia comprovada por biópsia e que depois foram distribuídos aleatoriamente para prosseguir com CNI ou substituído por SRL. Após 2 anos de tratamento, todos os doentes foram submetidos a uma segunda biópsia renal. O grupo SRL mostrou uma regressão significativa de lesões glomeruloescleróticas e apenas um aumento de 26% na fibrose intersticial, enquanto o grupo CNI mostrou progressão da glomeruloesclerose e um aumento de 112% na fibrose. A expressão do inibidor do activador do plasminogénio-1 (PAI-1) glomerular e tubulointersticial foi reduzida no grupo SRL mas não se alterou no grupo CNI.

Um terceiro estudo randomizado (designado de *CONVERT*) incorporou 830 doentes com transplante renal e com imunossupressão baseada num CNI. Ao fim de 6-120 meses após o transplante, foram randomizados para serem mantidos na mesma imunossupressão ou serem convertidos para SRL (8 e 20 ng/mL) [Schena et al., 2009]. A proteína urinária e a creatinina foram semelhantes no início do estudo, mas foram significativamente mais altas após a conversão para SRL. No entanto, as taxas de rejeição aguda, perda do enxerto e morte foram semelhantes entre os grupos. Kamar e colegas (2007) realizaram um estudo com 44 doentes com disfunção do enxerto renal que foram convertidos de CNI para SRL. Depois de um período de conversão de 6 meses, houve melhoria significativa na taxa de filtração glomerular e houve um aumento significativo da proteinúria. Num outro estudo de conversão envolvendo 43 transplantados renais com disfunção do enxerto os doentes foram convertidos ao fim de 4,5 anos após o transplante de um CNI para SRL [Bumbea et al., 2005]. A maioria destes doentes foram submetidos a uma biópsia renal antes da

conversão e cerca de 50% efectuaram uma biópsia 2 anos após a conversão. A média de acompanhamento no pós-conversão foi de  $27 \pm 1,5$  meses. Nesta altura, 58% dos doentes ainda estavam a receber imunossupressão baseada em SRL e nenhum tinha tido rejeição aguda. A depuração da creatinina aumentou significativamente em comparação com a linha de base, 28% dos doentes tinham desenvolvido significativa proteinúria *de novo*, ou seja,  $> 1$  g/dia, e 5 doentes tinham desenvolvido síndrome nefrótico *de novo*. Dois anos após a conversão não houve nenhuma mudança significativa na pontuação de Banff nas biópsias renais.

Em resumo, a partir destes estudos, estima-se que a conversão precoce do CNI como terapia de base na imunossupressão para inibidores da mTOR está associada à melhoria da função do enxerto, enquanto a conversão mais tardia poderá ser mais questionável. Nesta última estratégia, a função do enxerto renal pode ser melhorada desde que a conversão ocorra quando as lesões ainda são mínimas e reversíveis [Rostaing e Kamar, 2010].

Em Portugal, um estudo realizado por Farinha e colegas (2013) com um protocolo de conversão de CNIs para mTORi mostrou que apesar de pior prognóstico conferido pelas principais indicações para a conversão de inibidores de mTOR (malignidade ou disfunção crónica do enxerto) e idade mais avançada, não foi encontrada diferença no enxerto ou a sobrevida do paciente entre os 2 protocolos. No entanto, em doentes com baixo risco imunológico, o grupo mTOR (não houve separação de dados do SRL e do EVL) mostrou uma tendência de melhor sobrevida do enxerto ( $P=0,06$ ), acompanhado por menos casos de morte e menos perdas de enxerto renal.

#### **4. Principais desafios da actualidade e necessidade de melhores biomarcadores**

A ocorrência de sinais histológicos de rejeição aguda em pacientes com função estável do enxerto, uma condição denominada rejeição subclínica (RSC), tem sido bem descrita na literatura, com incidência relatada em biópsias protocolares realizados no primeiro 6 meses pós-transplante de cerca de 30%. Apesar de uma clara ligação entre a RSC e o posterior desenvolvimento da nefropatia crónica do enxerto não ter sido ainda provada, alguns estudos sugerem que a RSC leva à deterioração a longo prazo da função do enxerto, sendo que a intervenção precoce pode ser uma estratégia importante [Nankivell et al., 2001].

Um estudo recente descreveu uma correlação contínua para a rejeição aguda e rejeição quase instalada (*bordeline*), associando o grau de deficiência funcional do enxerto no momento da biópsia aos resultados ao final de 1 ano [Gwinner et al., 2005]. O uso de protocolo de biópsias para a detecção precoce do tratamento da rejeição aguda e *borderline* pode ser um factor importante para a preservação da função do enxerto a longo prazo. Assim, dos ensaios clínicos realizados em doentes com transplante renal ressalta a necessidade de usar marcadores substitutos da sobrevivência do enxerto a longo prazo.

As alterações histológicas nas biópsias de transplante fornecem a primeira evidência de dano no enxerto. De facto, alguns estudos têm mostrado que a nefrotoxicidade diagnosticada em protocolo de biópsias precoce é um preditor independente do resultado a longo prazo [Seron et al., 1997; Dimeny et al., 1995]. Para além disso, o valor preditivo da sobrevida do enxerto com lesões tubulointersticiais crónicas em biópsias protocolares foi correlacionado como superior em relação à taxa de rejeição aguda ou à creatinina sérica [Seron et al., 1997].

A recente introdução de biópsias protocolares em alguns centros para determinar a presença de nefrotoxicidade e a rejeição subclínica no enxerto renal

considerado estável deve ser vista como um importante passo na busca de se obterem melhores resultados no transplante a longo prazo. Os dados disponíveis sugerem que a detecção precoce e tratamento da nefrotoxicidade que não pode ser diagnosticada clinicamente beneficiará a função do enxerto a longo prazo. Adicionalmente, os relatórios indicam que as biópsias de protocolo são seguras e que a sua utilização é susceptível de melhorar o tratamento dos doentes transplantados renais. Para além disso, o uso de biópsias protocolares como uma variável de eficácia primária poderia muito bem tornar-se uma ferramenta útil na concepção de futuros estudos que visam prevenir a nefrotoxicidade. Apesar de a biópsia ser um método invasivo, traz uma vantagem sobre marcadores séricos e urinários muito grande, como diferenciar se a perda crónica da função renal é causada por razões imunológicas ou não imunológicas [Fuchs e Hewitt, 2011].

#### **4.1. Marcadores tradicionais**

O diagnóstico clínico de manifestação de nefrotoxicidade aguda induzida pela CsA é de difícil avaliação por ser assintomático. A verificação de alterações nos parâmetros bioquímicos de pelo menos 20% acima dos valores basais, acompanhada da presença de concentração de ciclosporina > 400 ng/ml, devem ser considerados como indicativos da possibilidade de insuficiência aguda da função do enxerto. Nestes casos, a redução da dose e a normalização dos níveis de CsA deve ser promovida para melhoria da função do enxerto. No caso de toxicidade aguda subclínica em enxertos com função muito boa, a única opção para a detecção é uma biópsia do rim transplantado. A biópsia é um meio essencial para determinar a nefrotoxicidade crónica e, ao mesmo tempo, fornece informações importantes sobre o grau de alterações irreversíveis das estruturas individuais do parênquima. Infelizmente, até ao momento, não existe outro procedimento não-invasivo ou marcador suficientemente sensível e específico disponível que seja capaz de diagnosticar e monitorizar a



toxicidade precoce da CsA. No início do período pós-transplante, a concentração de creatinina sérica não reflecte com precisão o grau de lesão no enxerto [Chapman et al., 2006], do mesmo modo que o aumento da contagem de células endoteliais CD146<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico não é específico como marcador de lesão vascular no enxerto [Woywodt et al., 2002].

A detecção de microalbuminúria é frequentemente usada como um indicador clínico de lesão renal. No entanto, a microalbuminúria é um marcador generalizado de disfunção endotelial sistémica e um preditor de risco independente da morbidade e mortalidade cardiovascular (Killackey, 2012).

No rim, o aparecimento de lesões nos túbulos proximais por acção de fármacos é um sinal primordial, em comparação com outras estruturas renais, uma vez que grande parte de xenobióticos é reabsorvida e excretada nesta zona renal. Para além dos testes urinários (por exemplo, a densidade da urina, a proteinúria e a microscopia de sedimento de urina), o azoto ureico (ureia) e a creatinina séricos são marcadores de patologia clínica tradicionais para a detecção de uma lesão renal. Contudo, não são marcadores muito específicos nem muito sensíveis, porque geralmente existe perda significativa da função e da massa renal antes do aumento de ureia ou de creatinina. Para além disso, os seus níveis são também afectados por uma série de outros parâmetros: a síntese e libertação de ureia para o sangue depende da ingestão de proteínas, do catabolismo e da função hepática, enquanto os níveis de creatinina sérica dependem da massa muscular, da idade e do grau de desidratação [Vinken et al., 2012].

Os parâmetros padrão em ensaios pré-clínicos e clínicos para a detecção e monitorização da função renal são a creatinina e a ureia séricas [Bateman et al., 1952; Delanghe e Speeckaert, 2011;]. Apesar de estabelecidos no século passado, ainda hoje considerados o "padrão ouro" na análise química-clínica minimamente invasiva. No entanto, estes dois parâmetros podem ser facilmente influenciados por muitas funções fisiológicas e mecanismos fisiopatológicos. Por exemplo, o nível de creatinina

sérica, um produto de degradação do tecido muscular, depende da idade, sexo, massa muscular e peso, sendo que também tem sido relatado que a hemorragia gastrointestinal pode conduzir a um aumento da creatinina sérica, sem qualquer impacto negativo sobre o rim. Adicionalmente, a ureia também aparece aumentada no soro em outros processos patológicos, como no decorrer de um aumento do catabolismo das proteínas.

A actual avaliação da função renal usa a creatinina sérica e o azoto ureico séricos como marcadores principais. Contudo, é sabido que apresentam uma baixa sensibilidade e especificidade para indicar alterações precoces, como as alterações agudas na função renal, e não diferenciam entre a função renal que é representada pelo número de nefrónios funcionais e a extensão da lesão activa como indicador de danos no rim [Mori e Nakao, 2007]. Há grandes limitações à utilização de creatinina para estimar a TFG. Pequenas alterações dos valores de creatinina, tipicamente vistas antes da lesão renal aguda, já reflectem quedas substanciais da TFG [Bellomo et al., 2004b]. Portanto, novos biomarcadores são necessárias para auxiliar no diagnóstico precoce, e também para servir em diversas outras finalidades, como por exemplo ajudar a identificar o local primário de lesões (glomérulos, túbulo proximal, túbulo distal, interstício e vasos sanguíneos).

Um dos desafios mais importantes é a identificação de marcadores biológicos para a previsão de resultado a longo prazo após o transplante. A lesão renal aguda depende de avaliação morfológica da biópsia do enxerto como o padrão principal. Infelizmente, dados histológicos da lesão tubular não diferenciam entre as suas possíveis etiologias, nem se correlacionam com a gravidade da lesão ou do prognóstico [Abulezz, 2008]. O interesse em melhorar as ferramentas de diagnóstico para a detecção precoce, tratamento imunológico e prognóstico da lesão no enxerto carece de avanços. Os marcadores de activação imunológica no sangue periférico (como o CD30 solúvel) e marcadores urinários da lesão imune (como a perforina e a granzima B) foram correlacionados com rejeição aguda. Para além disso, a expressão

renal de CD20 ou FOXP3 nas biópsias de enxerto está correlacionado com a resposta ao tratamento [Abulezz, 2008]. Um problema particular no transplante de rim é a necessidade de biomarcadores de lesão imune e não imune em diferentes períodos de tempo após o transplante [Abulezz, 2008].

No período imediato pós-operatório (0-30 dias), existe a necessidade de encontrar um biomarcador com as seguintes características: (1) prever o desenvolvimento retardado da função do enxerto e a sua gravidade; (2) indicar o decurso do transplante após o implante, ou seja, facilitar a escolha da indução, para além de “prever” o momento em que os inibidores de calcineurina devem ser evitados; (3) permitir a detecção precoce de lesão imunológica a fim de orientar o momento da biópsia; (4) contribuir para o diagnóstico morfológico ajudando no tipo e duração da terapia imunossupressora; (5) permitir a detecção precoce de toxicidade do fármaco e a indicação do seu curso (redução ou retirada). No segundo período de tempo (31-180 dias), a estabilização da função do enxerto e a redução gradual da imunossupressão são aspectos prioritários. As características do biomarcador “perfeito/desejado” nesta fase incluem com maior ênfase a detecção precoce de activação imunitária, a toxicidade do fármaco e a previsão do resultado da biópsia e o tipo de terapia indicada. O terceiro período de tempo, a longo prazo (> 180 dias), beneficiaria com a existência de um biomarcador de desenvolvimento precoce da fibrose tubulointersticial, ao longo da sua extensão e progressão, permitindo o auxílio ao diagnóstico e gestão imunológica, assim como de novas terapias para a nefropatia crónica [Abulezz, 2008].

Em toxicologia, os aspectos chave para avaliar o efeito de um composto num estudo pré-clínico (e identificar os órgãos-alvo) é a observação histopatológica. No rim, a área e intensidade da agressão renal podem ser observados directamente e assim caracterizados. Se a capacidade dos rins de filtrar o sangue é fortemente reduzida, os resíduos e o excesso de líquido pode acumular-se no corpo. A redução na capacidade de reabsorção do rim para componentes endógenos (por exemplo, pequenas

proteínas, açúcares e metabolitos) ou após um insulto renal pode conduzir ao aumento destes componentes na urina. Embora haja muitas formas de induzir lesão renal por fármacos, nem sempre os danos produzem sintomas até o final da agressão. Assim, está descrito que existem seis sinais de alerta gerais/tradicionais: (1) ureia e creatinina séricos fora dos valores considerados normais (valores de referência para ambos os parâmetros podem variar entre diferentes espécies e sexo); (2) taxa de filtração glomerular diminuída (<60%); (3) presença de sangue e proteínas na urina; (4) pressão arterial elevada; (5) micção mais frequente ou dolorosa; (6) transpiração das mãos e pés, inchaço ao redor dos olhos. Contudo, uma vez que estes sintomas não são específicos para a presença de lesão renal, e acontecem associados a perturbações em órgãos e doenças, não podem ser vistos como "marcadores" fiáveis e infalíveis da função renal.

Em ensaios clínicos são usados a creatinina, a TFG e o débito urinário, num esquema que tem em conta o risco, a lesão, a insuficiência e a perda renal, bem como a lesão renal terminal, definidos pelo RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage kidney disease*) e AKIN (*Acute Kidney Injury Network*).

Os marcadores urinários têm a grande desvantagem de serem muito mais influenciados pela toxicidade de outros órgãos do que os marcadores sanguíneos. As principais alterações nos parâmetros sanguíneos podem influenciar os marcadores analisados na urina. A glicose, por exemplo, em condições normais é 100% reabsorvida no túbulo contornado proximal; contudo, se a glicemia sobe, como ocorre na diabetes mellitus, a capacidade de transporte de reabsorção das células tubulares proximais está saturada e os níveis de glicose na urina aumentam. Para além disso, outros factores, como as dietas especiais ou outras condições fisiológicas/patológicas, podem influenciar directamente esses parâmetros.

A TFG é um valor calculado para descrever o fluxo de fluido filtrado pelo rim. Para estimar a TFG é tradicionalmente usada a taxa de depuração. A taxa de depuração da creatinina descreve o volume de plasma sanguíneo que é depurado da

creatinina por unidade de tempo. Esta fórmula é utilizada para estimar a taxa de filtração glomerular e para avaliar o modo como o rim processa um grande número de substâncias/fármacos. Os resultados podem ser usados para avaliar a função de excreção pelos rins, e servem de base para a classificação da insuficiência renal crónica. Também o doseamento dos medicamentos que são excretados principalmente através da urina se baseia na taxa de filtração glomerular ou na depuração de creatinina.

Na maioria dos casos, a determinação da TFG com base na medição de cistatina C fornece resultados comparáveis aos cálculos com base na creatinina. No entanto, em doentes seleccionados, tais como doentes com massa muscular reduzida [Uchida e Gotoh, 2002], crianças [Bokenkamp et al., 1998] e idosos [Fliser e Ritz, 2001], obtiveram-se melhores resultados usando a depuração da cistatina C em vez de depuração da creatinina. Esta molécula é também usada como um biomarcador aprovado de toxicidade urinária.

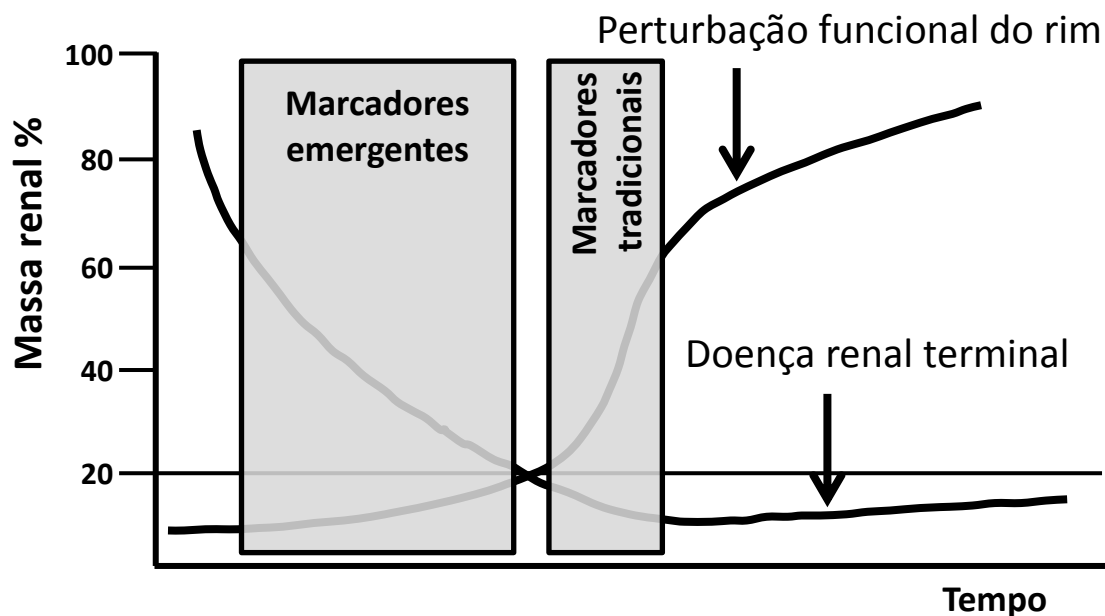
Um outro parâmetro usado associado com o dano renal é a excreção fraccionada de electrólitos, por exemplo sódio. Esta análise é focada em substâncias predominantemente secretadas pelas células tubulares e que podem levar a uma depuração maior do que a clearance da creatinina.

Em geral, estes valores obtidos por calculado podem ajudar a monitorizar a progressão do dano renal estabelecida. No entanto, a detecção precoce de um insulto e posterior desenvolvimento da nefrotoxicidade, ainda não é possível.

Os processos de doença crónica e/ou toxicidade a fármacos são caracterizadas por “sinais” silenciosos e progressivos e sintomas não específicos que, com as ferramentas de diagnóstico clínico atuais, muitas vezes permanecem sem ser detectadas em seus estádios iniciais [Stojnev et al., 2009]. A qualidade dos meios de diagnóstico é determinada pela sua sensibilidade e especificidade. Os marcadores moleculares químicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados em diagnósticos

clínicos, bem como para o estudo de fármacos em estudos pré-clínicos e clínicos, apresentam sensibilidade e especificidade baixas.

Por causa da grande capacidade do rim para compensar a perda de massa renal e para recuperar depois de ataque agudo, a sensibilidade de creatinina e ureia séricas é bastante reduzida. Observou-se que uma redução da funcionalidade renal ocorre apenas após cerca de dois terços da biomassa renal já ter sido perdido [Pfaller e Gstraunthaler, 1998]. A Figura 9 apresenta uma visão geral da correlação entre a perda de massa renal e os distúrbios da função renal esperados para os biomarcadores tradicionais e inovadores.

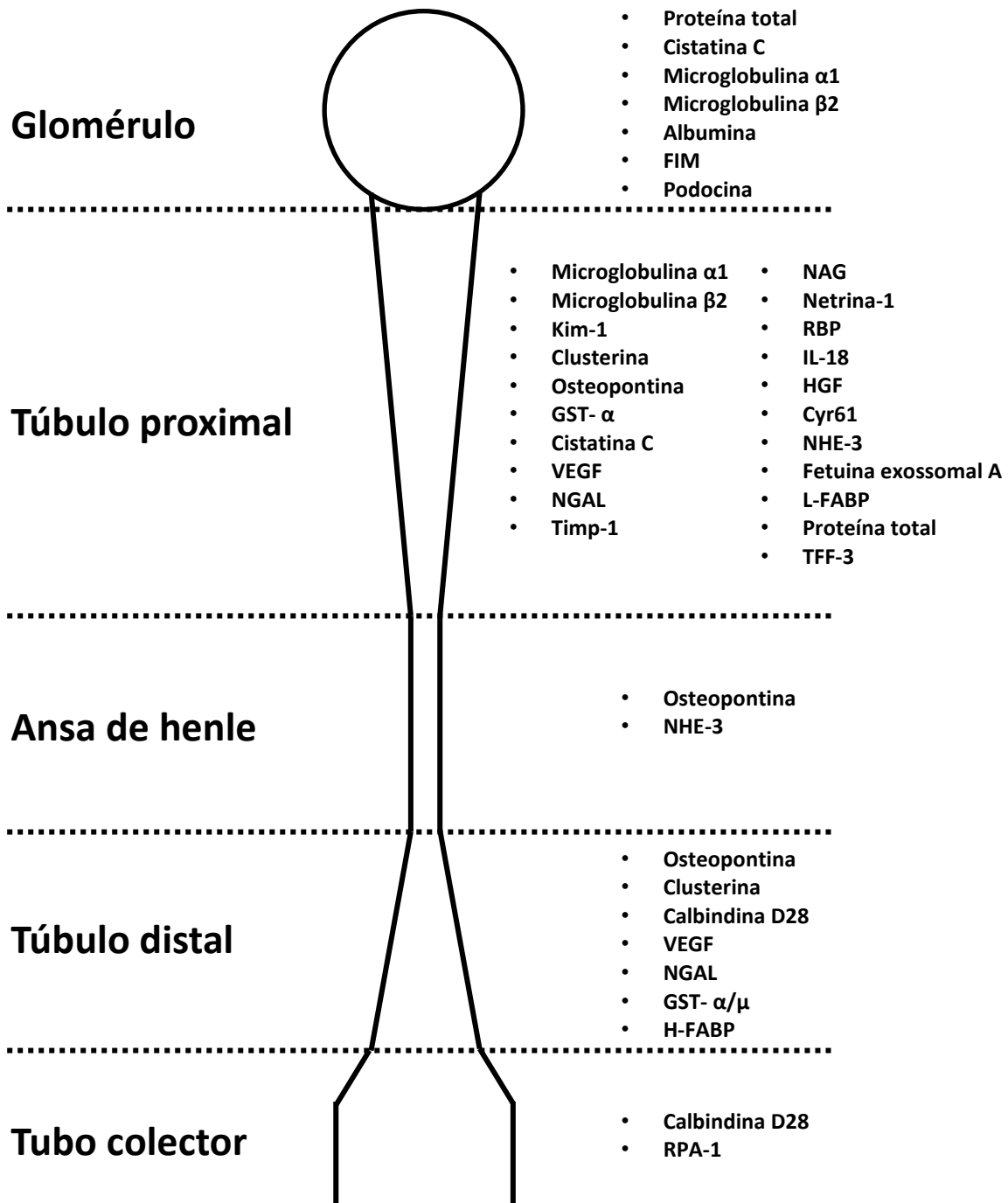


**Figura 9.** Só a perda substancial de biomassa renal leva a uma falta de funcionalidade renal. Os parâmetros clínico-químicos tradicionais, como a creatinina e ureia séricas, apenas são detectados na presença dessa diminuição da função renal. Os biomarcadores urinários novos são aceites para detectar lesão renal precoce, antes da lesão do tecido. Adaptado de Fuchs e Hewitt, 2011.

Assim, torna-se premente encontrar novos biomarcadores, que sejam capazes de detectar precocemente a doença renal, ou indicar a sua evolução e/ou efeito de fármacos.

## 4.2. Marcadores emergentes

Os biomarcadores de proteínas urinárias têm a grande vantagem de partirem de amostras não invasivas. Vários possíveis biomarcadores urinários foram detectados nos últimos anos, muitos mostrando bom poder de previsão, mesmo sendo em modelos animais e ainda não testados em humanos. A Figura 10 descreve alguns desses possíveis biomarcadores de disfunção/lesão renal e as regiões do nefrónio onde parecem ter maior relevância. Deve notar-se que a maioria dos marcadores de proteínas urinárias são preditivos simultaneamente para dano glomerular e tubular e raramente apenas para uma parte específica do nefrónio. Por exemplo, os biomarcadores para a ança de henle, como a osteopontina ou a isoforma 3 do transportador de sódio/hidrogénio (NHE-3), não são específicos para esta parte do nefrónio, nem se encontram ainda completamente caracterizados. Isto também é verdade para o túbulo distal, onde apenas a Clusterina e o factor urinário trefoil 3 (TFF-3), específico para dano tubular em geral, foram qualificados até o momento. Para o tubo colector apenas o antigénio papilar renal 1 (RPA-1) já está associado à nefrotoxicidade, e a Calbindina D28 está descrita como um potencial biomarcador. O glomérulo e o túbulo proximal são as áreas de nefrónio mais estudadas e com maior número de marcadores identificados, incluindo a Kim-1, a cistatina C e a albumina [Fuchs e Hewitt, 2011]. Ao longo dos últimos anos têm sido feitos esforços para melhorar a sensibilidade e especificidade destes e de outros biomarcadores para testes de nefrotoxicidade em ensaios pré-clínicos.



**Figura 10.** Hipotéticos biomarcadores urinários e associação com a área do nefrônio. FIM, factor inibitório de migração; kim-1, molécula de lesão renal; GST- $\alpha$ , glutathione S-transferase alfa; VEGF, factor de crescimento do endotélio vascular; NGAL, lipocalina gelatinase associada a neutrófilos; Timp-1, inibidor da metaloproteinase-1; NAG, N-acetil- $\beta$ -(D)-glucosaminidase; RBP, proteína de ligação ao retinol; IL-18, interleucina-18; HGF, factor de crescimento dos hepatócitos; Cyr61, indutor angiogénico rico em cisteína 61; L-FABP, proteína de ligação de ácidos gordos do tipo do fígado; TFF-3, factor *trefoil* 3; NHE-3, permutador de sódio e hidrogénio tipo 3; RPA-1, antigénio papilar renal tipo 1. Adaptado de Fuchs e Hewitt (2011).



A lipocalina gelatinase associada aos neutrófilos (NGAL) é uma proteína da família lipocalina e é expressa pelos neutrófilos e células epiteliais, incluindo aqueles do túbulo proximal. O NGAL foi identificado como um dos mais rápidos genes sobreexpressos em fases iniciais do rim pós-isquémia em rato [Supavekin et al., 2003], sendo detectado na primeira amostra de urina 2 horas após a isquémia e exibindo níveis aumentados e correlacionados com a duração da mesma. Para além disso, o NGAL foi amplamente detectado na urina de ratos com nefrotoxicidade induzida por cisplatina [Mishra et al., 2003]. Até agora, o NGAL foi investigado através de uma gama de diferentes situações clínicas de dano renal agudo. Numa meta-análise com 19 estudos, incluindo 2500 pacientes de estudos observacionais, foi avaliada a capacidade do NGAL como marcador de diagnóstico e prognóstico na doença renal aguda. A população incluiu adultos e crianças, e a amostra principal foi doença renal aguda após cirurgia cardíaca, depois da exposição a meios de contraste para angiografia coronária. O NGAL foi incluído na lista de possíveis biomarcadores de lesão renal aguda, em amostras de urina ou de plasma/soro. Infelizmente, a produção extra-renal de NGAL em resposta ao stresse sistémico pode aumentar a excreção urinária de NGAL na ausência de doença renal aguda [Haase et al., 2009]. Dados relativos à nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina em fases agudas e crónicas são escassos e devem merecer mais investigação.

A molécula de lesão renal tipo 1 (Kim-1) humana é uma glicoproteína transmembranar que não é detectável no tecido renal normal ou na urina, mas é expressa em níveis muito elevados em células epiteliais dos túbulos proximais em rins humanos e de roedores após a indução de lesão isquémica ou toxicológica. A Kim-1 (designada como Kim-1 em roedores e Kim-1 em seres humanos) foi detectada em concentração elevada no período 24-48 h no túbulo proximal do rim de rato após isquémia [Ichimura et al., De 1998]. Uma forma solúvel de Kim-1 humana pode foi detectada na urina de doentes com necrose tubular aguda e servir como um biomarcador útil para a lesão renal do túbulo proximal, facilitando o diagnóstico

precoce da doença e servindo também como um discriminador de diagnóstico ao longo do tempo [Han et al., 2002]. Adicionalmente, a alta expressão de Kim-1 urinária foi avaliada prospectivamente num estudo coorte de 201 doentes hospitalizados com lesão renal aguda, tendo sido verificada a possibilidade de existência de uma associação com o resultado clínico adverso (morte e necessidade de diálise) [Liangos et al., 2007]. Apesar da proteína Kim-1, ou a expressão do gene, não serem detectáveis no rim normal, após a lesão o ARNm da Kim-1 é rapidamente sintetizado e a proteína é gerada e localizada em concentrações muito elevadas na membrana apical do túbulo proximal. Há um certo número de características que pode tornar esta proteína um atraente biomarcador de lesão renal: (1) ausência de Kim-1 de expressão no rim normal; (2) a sua marcada sobreexpressão; (3) a inserção na membrana apical do túbulo proximal e (4) a sua persistência no epitélio da célula até à sua completa recuperação [Bonventre, 2009]. O facto de a Kim-1 ser rapidamente sintetizada pode abrir portas à monitorização da nefrotoxicidade aguda, mas ainda faltam estudos que comprovem esta associação com a CsA, assim como a relação da Kim-1 como um biomarcador a longo prazo da lesão renal crónica induzida pela CsA.

O factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) foi encontrado pela primeira vez em culturas de células endoteliais da veia umbilical humana e posteriormente descrito em muitos tipos diferentes de células, tais como células do túbulo proximal e fibroblastos do rim [Qi et al., 2005]. O CTGF é uma proteína com 38 kDa e faz parte de um grupo de proteínas que estão envolvidas na remodelação da matriz durante o desenvolvimento e em condições patológicas [Twigg et al., 2002; Brigstock, 2003]. O CTGF tem sido detectado no coração, no cérebro, na placenta, no pulmão, no fígado, no músculo, no rim, no pâncreas, e numa variedade de fluidos biológicos que podem servir como reservatório de CTGF humano [Gupta et al, 2000]. Em animais, o CTGF tem sido isolado em diversos tecidos de embriões de ratos e em várias células do sistema nervoso central de rato [Gupta et al., 2000]. O ARNm de CTGF e a proteína aumentam significativamente em tecidos com doenças fibróticas.

Sabe-se que na nefropatia diabética a expressão de CTGF está aumentada e correlaciona-se com o grau de albuminúria [Gilbert et al., 2003]. Adicionalmente, a hiperglicemia crónica (uma consequência da terapêutica imunossupressora), o TGF- $\beta$ , a tensão mecânica, e os AGEs (produtos de glicação - Advanced glycation end products) todos são capazes de induzir a expressão de CTGF em células tubulares renais [Twigg et al., 2002, Riser et al., 2000; Wahab et al, 2001; Qi et al., 2005]. No entanto, os mecanismos que são responsáveis pelas acções renais de CTGF ainda não estão totalmente elucidados. Porém, num modelo de roedor com fibrose crónica, a presença de CTGF é necessária, para além de TGF- $\beta$ , para induzir lesão persistente [Mori et al., 1999]. Isto levou à hipótese de que alguns dos efeitos pro-fibróticos do TGF- $\beta$  podem ser mediada pelo CTGF [Igarashi et al., 1993; Grotendorst et al., 1996], possivelmente através da ligação com o TGF- $\beta$  e elementos de resposta, com as proteínas *Smad*, envolvidas em vias de proliferação e crescimento [Grotendorst et al., 1996; Holmes et al., 2003]. No entanto, faltam de estudos que comprovem a correlação do CTGF com a disfunção renal e a lesão renal crónica induzida pela CsA.



# **CAPÍTULO IV**

Objectivo geral e objectivos específicos



O objectivo geral deste trabalho é o de avaliar o impacto renal de dois protocolos de conversão de CsA para SRL num modelo animal (rato), que tenham correspondência com a terapêutica imunossupressora usada em dois tipos de populações de transplantados renais: doentes de baixo e de alto risco imunológico, que terão, respectivamente, menor e maior propensão para episódios de rejeição aguda do enxerto. Será colocado maior enfoque na componente renal mas, reconhecendo que ela não está isolada de complicações em outros órgãos ou sistemas, abordar-se-ão igualmente outros aspectos relacionados com efeitos secundários cardíacos/cardiovasculares e perturbações do metabolismo glicídico e lipídico. Particular destaque será dado à identificação de vias moleculares e hipotéticos biomarcadores envolvidos na transição da disfunção renal induzida pela CsA para a nefrotoxicidade, centrando a análise em amostras de soro, urina e tecido renal (histologia e expressão génica).

Individualmente, os objectivos são:

1. Numa primeira fase, efectuar uma análise dos efeitos, *per se*, da terapêutica com CsA ao longo do tempo. Nesse sentido, será explorado um modelo animal com dois períodos de exposição a uma dose de manutenção de CsA (5 mg/dia/kg rato): um tratamento denominado de curto prazo, com a duração de 3 semanas, e outro de longo prazo, de 9 semanas. Desta forma, estudar-se-ão duas fases importantes na evolução da doença: (a) quando a disfunção renal ainda não se associa a alterações histológicas e (b) após o desenvolvimento de alterações estruturais (nefrotoxicidade – lesões moderadas a graves e irreversíveis). Para isso, e devido ao facto da CsA ter influência nas vias genéticas, serão avaliados mediadores genéticos associados à proliferação/fibrose, inflamação e angiogénese.

2. Seguidamente, clarificar a evolução da nefropatia num protocolo de conversão precoce de CsA (às 3 semanas) para SRL. Ou seja, elucidar se o SRL será capaz de reverter a disfunção renal encontrada num tratamento curto de CsA, ou se a nefrotoxicidade continua a evoluir, no mesmo perfil ou segundo moldes distintos. Serão testados biomarcadores tradicionais de disfunção/lesão renal, bem como outros considerados como emergentes.
3. Finalmente, testar-se-á um modelo de conversão de CsA para SRL, antecedido de um tratamento com alta dose de CsA. Mais pormenorizadamente, o protocolo experimental consistirá em administrar durante 3 semanas uma dose de ataque (similar à prática clínica no momento do transplante) de CsA (30 mg), seguindo-se uma redução da dose durante mais 3 semanas (5 mg – dose similar à de manutenção na prática clínica) e, finalmente, durante mais 3 semanas, a conversão para SRL (também em dose de manutenção – 1 mg). Nesta parte dar-se-á grande relevo à progressão da lesão renal e à correlação com hipotéticos biomarcadores renais em tecido, soro e urina.



# Parte B

## **Parte Experimental**



# **CAPÍTULO V**

## **Material e métodos**



## 1. Modelo animal e fármacos

Para este estudo foram adquiridos ratos Wistar machos (Charles River Lab. Inc, Barcelona, Espanha), com 11 semanas de idade, foram mantidos em ciclos de luz de 12h (noite/dia), com temperatura controlada ( $22.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ ), com ração de manutenção (IPM- R20, Leticia, Barcelona, Espanha) e acesso *ad libitum* a água e ração. De acordo com cada experiência os animais foram divididos nos diversos grupos, havendo sempre um grupo controlo como referencia. Os tratamentos foram realizados por sonda esofágica e o peso corporal foi monitorizado durante todo o período de tratamento. A Ciclosporina A (Sandimmun Neoral<sup>®</sup>) foi obtida a partir da Novartis Farma Produtos Farmacêuticos, SA (Sintra, Portugal) e o Sirolimus (1 mg/kg/dia de Rapamune<sup>®</sup>, Laboratórios Pfizer Lda., Lisboa, Portugal) foram preparados em sumo de laranja. As experiências nos animais foram realizadas de acordo com as Directivas do Conselho Europeu para a experimentação animal (2010/63/EU) e as autoridades nacionais, sendo o estudo aprovado pelo comité de ética local para estudos de investigação em animais. Os animais foram mantidos num biotério certificado, em gaiolas individuais ventiladas, com as medidas adequadas para o bem-estar animal e redução do sofrimento durante os procedimentos, incluindo enriquecimento ambiental e anestesia/analgesia. Em cada secção de resultados está descrito o protocolo animal realizado e o número de animais por grupo.

## 2. Pressão arterial, frequência cardíaca e concentração sanguínea de CsA

A pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial diastólica (PAD) e a frequência cardíaca (FC) foram avaliadas às 0, 3, 6 e 9 semanas, por um método não-invasivo na cauda, denominado "tail cuff", utilizando-se um esfigmomanómetro (LE 5001 Pressure meter, Leticia Scientific Instruments, Espanha). A concentração

sanguínea de ciclosporina foi avaliada por imunoensaio, utilizando equipamentos (Dimension<sup>®</sup> RxL, Siemens, Alemanha) e métodos automáticos (reagente Flex).

### **3. Colheita e preparação das amostras**

No dia do sacrifício, os ratos foram injectados intraperitonealmente com uma mistura de anestesia e relaxante muscular na proporção 2:1 (v:v) de 50 mg/ml de cetamina (Ketalar<sup>®</sup>, Parke-Davis, Pfizer Laboratories Lda, Seixal, Portugal) e 2,5% de clorpromazina (Largatil<sup>®</sup>, Rhône-Poulenc Rorer, laboratórios Vitória, Amadora, Portugal). As amostras de sangue foram imediatamente colhidas por punção venosa na veia jugular para tubos apropriados (BD vacutainer<sup>®</sup>) sem anticoagulante (para separação de soro) e com anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) para obtenção de plasma. Após essa recolha, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, e os rins foram imediatamente removidos, separados do tecido adiposo adjacente, pesados e armazenados. Uma porção foi guardada em reagente estabilizador de ARNm (ácido ribonucleico mensageiro) para as determinações de expressão génica, outra congelada em azoto líquido para ensaios de peroxidação lipídica e outra pré-fixada com formol para análise histopatológica e imunohistoquímica.

### **4. Contagem de subpopulação de linfócitos T por citometria de fluxo**

As amostras de sangue periférico frescas foram recolhidas em tubos *vacutainer* com EDTA. As células mononucleares foram isoladas das outras células do sangue por centrifugação de gradiente de densidade (Histopaque-1077 e -1119, Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal), seguido de 3 passos de lavagem com solução salina de

fosfato tamponado (PBS, pH=7,4) e com 3% (v/v) de soro fetal de bovino (SFB). Foram usados anticorpos contra CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), conjugados com FITC, PE ou PerCP, e ainda anticorpos do mesmo isótopo conjugado com fluorocromo como controlos negativos. Para a marcação das células mononucleares ( $\approx 1 \times 10^6$  células em 100  $\mu$ l de PBS contendo 3% (v/v) de soro fetal bovino e 0,1% de NaN<sub>3</sub>) procedeu-se à incubação com 1  $\mu$ g de anticorpo no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 min, seguindo-se 3 lavagens com solução tampão de fosfato suplementado com SFB a 3% (v/v); entre cada lavagem as amostras foram centrifugadas a 200 g durante 8 min, a 4 °C; 400  $\mu$ l de solução tampão de fosfato com 3% de SFB (v/v) foi finalmente adicionado a cada tubo. As amostras tratadas e os controlos foram analisados por citometria de fluxo no limite máximo de 1 hora. A análise de citometria de fluxo foi realizada num FACS Calibur (San Jose, CA, EUA) com base na aquisição de 20000 eventos. O leitor estava equipado com detectores frontais e laterais de dispersão da luz, enquanto para os três canais de fluorescência usados (FL-1, FL-2 e FL-3) foram criados detectores logarítmicos. Para as amostras, um controlo do anticorpo correspondente foi usado como padrão de células positivas/negativas. Todos os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR , EUA).

## 5. Análise hematológica e bioquímica

### 5.1. Parâmetros hematológicos

Vários parâmetros hematológicos foram medidos em sangue total colhido em EDTA, como anteriormente descrito, usando um contador automático (Coulter Counter<sup>®</sup>, Beckman Coulter Inc., CA, EUA): número de glóbulos vermelhos (GVs),

hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), hemoglobina globular média (HGM), distribuição da largura dos glóbulos vermelhos (RDW) e contagem de glóbulos brancos (GBs) e de plaquetas (PLT).

## 5.2. Parâmetros bioquímicos em soro

Os seguintes parâmetros bioquímicos foram avaliados no soro através de métodos e equipamentos automáticos validados (Hitachi 717, Roche Diagnostics Inc., MA, EUA): glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, creatina cinase (CK), transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), triglicerídeos (TGs), e colesterol total (CT). Os níveis séricos de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 2 (IL-2), factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e factor de crescimento transformante beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) foram medidos usando kits ELISA Quantikine ultra-sensíveis (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A proteína C reactiva de alta sensibilidade (hsCRP) foi detectada usando um kit de ELISA (Alfa Diagnostics International, San Antonio, EUA). A interleucina-7 (IL-7) foi medida num kit de ELISA obtido a partir da Wuhan EIAab Science Co (Wuhan, China).

## 5.3. Parâmetros avaliados na urina de 24 horas

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas durante 24 horas, recebendo água e comida *ad libitum*. As concentrações urinárias de creatinina, ureia e de proteína foram avaliadas em urinas de 24 horas (Cobas Integra 400 plus, Roche®, Amadora, Portugal), e foram medidos os volumes de urina para calcular a taxa de depuração da creatinina e ureia, assim como a taxa de filtração glomerular, de acordo com o descrito anteriormente [Pestel, 2007].



## 6. Peroxidação lipídica no soro, no rim e na urina de 24 horas

A peroxidação lipídica foi determinada avaliando a produção de malondialdeído (MDA) por intermédio do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) [Piloto, 2009]. Resumidamente: 100 µl de homogeneizado de tecido renal, soro ou urina (previamente centrifugado para remover partículas) foram incubadas durante 1 hora numa solução de TBA à temperatura ambiente e no escuro. De seguida, as amostras foram incubadas num banho a 90°C durante 60 minutos, sendo de seguida parada a reacção colocando os tubos em gelo. Neste ensaio, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA, sendo o produto final uma molécula que pode ser quantificada espectrofotometricamente a 532 nm (pigmento rosa). A concentração de MDA foi calculada em relação a uma curva de calibração utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo (intervalo: 0,1-83,5 µM) e os resultados foram expressos para o rim em µM/g de tecido e para o soro e urina em µM.

## 7. Expressão génica renal por RT-qPCR

### 7.1. Isolamento do ARN total

O rim foi armazenado após colheita na solução *RNA later*<sup>TM</sup> (Ambion, Austin, TX, EUA) para preservação do ARN. Para a extracção de ARN, foram pesados 10 mg de tecido, aos quais se adicionaram 450 µL de Tampão *RLT Lysis* para provocar a ruptura de tecido, homogeneizando-se durante 2 minutos a 30 Hz utilizando um homogeneizador de tecidos (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os lisados de rim foram processados de acordo com o protocolo do kit *RNeasy Mini*<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Alemanha). O ARN total foi diluído em 50 mL de água *RNase-free* (sem tratamento opcional com DNase). A fim de determinar a quantidade de ARN total extraído e

verificar a integridade do ARNm (RIN, RNA Integrity Number) as amostras foram analisadas usando o kit *6000 nano Chip*<sup>®</sup>, no analisador *Agilent Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Walbronn, Alemanha), munido de *software* especializado (2100 expert), de acordo com as instruções do fabricante. O rendimento de isolamento variou de 0,5 a 3 µg; Os valores de NIR entre 6,0-9,0 e a pureza (A260/A280) entre 1,8-2,0.

## 7.2. Transcrição reversa

O ARN foi transcrito de forma inversa com *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen, California, EUA). Uma micrograma de RNA total foi misturado com uma mistura de *2x First-Strand Reaction Mix e SuperScript™ III Enzyme Mix* (Oligo(dT) plus Random hexamers). As reacções foram realizadas no termociclador *Gene Amp PCR System 9600* (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), durante 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C. Os produtos de reacção foram em seguida digeridos com 1 µl (2 U) de RNase H durante 20 minutos a 37°C e, finalmente, o cADN foi eluído até um volume final de 50 µl e armazenadas as amostras a -20°C.

## 7.3. Quantificação relativa da expressão génica

A expressão de genes foi realizada utilizando o sistema *HT 7900 Sequence Detection* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Um passo de normalização precedeu a quantificação génica, usando o kit *geNorm Housekeeping Gene Selection* para *Rattus norvegicus* (Primer Design, Southampton, Reino Unido) e o software *geNorm* (Hospital Universitário de Ghent, Centro de Genética Médica, Ghent, Bélgica) para seleccionar os genes *housekeeping* ideais para este estudo [Vandesompele, 2002]. Em tempo real, as reacções de PCR decorreram com primers específicos e otimizados da *QuantiTect Primer* (Qiagen, Hilden, Alemanha) para *TGF-β<sub>1</sub>*

(QT00187796), *PCNA* (QT00178647), *mTOR* (QT00180586), *Mki-67* (QT00450786) e *Tp53* (QT00193522), como marcadores de proliferação; *VEGF-b* (QT01290163) como marcador de angiogénese; *IL-1 $\beta$*  (QT00181657), *NF-K $\beta$*  (QT01577975), *TNF- $\alpha$*  (QT00178717), *COX-1* (QT00187859), *COX-2* (QT00192934) e *PCR* (QT00391650) como marcadores de inflamação. Foram utilizados controlos endógenos: *desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato* (QT00199633), *actina beta* (QT00193473) e *topoisomerase I* (QT01820861), juntamente com o kit *QuantiTect SYBR Green PCR* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As reacções de RT-qPCR foram realizadas com: 100 ng de cDNA da amostra, os iniciadores (*primers*) (50-200 nM) e 1x *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*. Não foram realizadas reacções controlo para cada gene, de modo a assegurar a amplificação não inespecífica. As reacções foram realizadas com o seguinte perfil térmico: 10 minutos a 95°C, mais 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e por fim 1 minuto a 60°C. Os resultados de PCR em tempo real foram analisados com o software SDS 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e utilizado para quantificação o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [Livak, 2001]. Os resultados foram obtidos em CNRQ (*calibrated normalized relative quantities*) e convertidos em percentagem usando o grupo controlo como referência (1ª parte dos resultados).

## 8. Avaliação histomorfológica do rim

### 8.1. Fixação do tecido e coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E)

As amostras foram fixadas em cassetes preenchidas com cera de parafina num processo automático e foram realizados cortes de 4  $\mu$ m de espessura. Estes cortes

foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica.

### **8.2. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS)**

Foi usado ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliar e quantificar as lesões renais. Resumidamente, cortes de 4 µm de espessura foram imersos em água e, subsequentemente, tratados com uma solução aquosa de ácido periódico a 1%. Posteriormente, as amostras foram lavadas para remover quaisquer vestígios de ácido periódico, e finalmente tratadas com reagente de Schiff. Todas as amostras foram examinadas por microscopia de luz usando um microscópio *Zeiss (Modelo Axioplan 2)*. O grau de lesão visível por microscopia de luz foi avaliado por dois patologistas independentes que desconheciam a identificação das amostras.

### **8.3. Coloração com tricrómio de Masson**

Cortes de 4 µm de espessura foram desparafinados e hidratados com um gradiente decrescente de álcool (100%, 95%, 70%) e água destilada. Os cortes foram depois refixados numa solução de Bouin durante 1 hora a 56°C para melhorar a qualidade da coloração e depois passados em água corrente durante 5 a 10 minutos para remover a cor amarela. Foram de seguida colocados durante 10 minutos numa solução de hematoxilina férrica de Weigert, lavados em água corrente morna durante 10 minutos e, por fim, lavados em água destilada. Posteriormente foram corados na solução ácida *Biebrich scarlet-acid fuchsin* por 10 a 15 minutos e lavados em água destilada, incubados em solução de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico, 10 a 15 minutos, e transferidos directamente para solução de anilina azul por 5 a 10 minutos. De seguida foram lavados rapidamente em água destilada e colocados em solução de ácido acético a 1% durante 2 a 5 minutos, e lavados com água destilada. Finalmente

procedeu-se à rápida desidratação pela seguinte ordem: álcool etílico a 95%, álcool etílico absoluto e xilol, montando-se por fim em meio de montagem resinoso.

#### **8.4. Análise de lesões**

As lesões glomerulares foram avaliadas pela presença de expansão mesangial, espessamento da membrana basal de glomérulo, espessamento da cápsula de Bowman, esclerose nodular, glomeruloesclerose, atrofia glomerular e hialinose do pólo vascular. A nível tubulointersticial foi avaliada a presença de inflamação, a presença e número de cilindros hialinos, irregularidade da membrana tubular basal, calcificação tubular, e a associação de fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA). A calcificação tubular foi avaliada e classificada por um método semi-quantitativo. A avaliação das lesões vasculares foi concentrada na apreciação da presença de hialinose arteriolar, arterioesclerose e arterioloesclerose. Foi usada uma classificação semi-quantitativa, variando de normal (ou mínima) a grave (dano extensivo) para cada componente. A gravidade foi classificada como ausente/normal (grau 0), leve (grau 1), moderada (grau 2) e grave (grau 3). O grau foi definido qualitativamente de acordo com a extensão da lesão: normal (0%), leve (<25%) moderada (25-50%) grave (>50%). A pontuação final de cada amostra foi obtida pela pontuação média observada em cada glomérulo, nos campos microscópicos considerados. Quanto às lesões vasculares, a arteriosclerose foi pontuada da seguinte forma: 0, sem espessamento da túnica íntima; 1, se o espessamento da íntima era menor do que a espessura da túnica média; 2, se o espessamento da túnica íntima era maior que a espessura da túnica média, considerando a pior artéria do corte. Usando a marcação PAS, a classificação foi definida para a intensidade e extensão da coloração, que varia de 0 (sem coloração) a 3 (coloração intensa e extensa), respeitando a especificidade de tecido de pontuação, quando adequado.

## 9. Avaliação da expressão de proteínas no rim por imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada em cortes com 4  $\mu\text{m}$  de espessura na orientação sagital do rim, fixados em fixador de Bock e embutidos em parafina. As amostras foram processadas por técnicas de detecção imunológica indirecta com um kit de rato e coelho com detecção específica de HRP/DAB (Abcam, Cambridge, Reino Unido). O protocolo foi executado de acordo com as instruções do fabricante. Neste estudo, utilizaram-se os anticorpos primários para detecção do CTGF (diluição 1:100, ab6992; Abcam), TGF- $\beta$  (diluição 1:100, ab66043; Abcam), mTOR (diluição 1:250, 04-385; Millipore), NF- $\kappa\beta$  p50 (diluição 1:500, SC-114, Santa Cruz Biotechnology) e Kim-1 (diluição 1:14, AF3689, R&D Systems). Para a detecção da Kim-1 foi usado um anticorpo secundário de cabra (diluição 1:500, sc2771; Santa Cruz Biotechnology). Para identificar a proteína PCNA foi utilizado um kit padrão (93-1143, Invitrogen Corporation). A coloração foi quantificada utilizando uma escala semi-quantitativa (1-4) que avaliou a intensidade e a área de coloração. A intensidade foi classificada como muito baixa/não existente (1), de baixa intensidade (2), intensidade moderada (3) e alta (4); a área de coloração foi classificada como <25% (1), 25-50% (2), 50-75% (3) e >75% (4). Todas as lâminas foram visualizadas de forma independente por dois anatomopatologistas que desconheciam a identificação das amostras. Foi calculado um *score* de imunohistoquímica quantitativa (QIC).  $\text{QIC} = \% \text{ da área de coloração} \times \text{intensidade de coloração} \times 0,1$ .

## 10. Avaliação dos níveis de NGAL no soro e na urina

Os níveis de lipocalina gelatinase associada a neutrófilos (NGAL) foram avaliados num kit *ultra Quantikine kit ELISA* (BioPorto<sup>®</sup>, Dinamarca) no soro (1:10000) e na urina (1:20000).

## 11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *GraphPad Prism*<sup>®</sup> para Windows (versão 5.00). Os resultados são apresentados em médias  $\pm$  e.p.m (erro padrão da média). As comparações entre os grupos foram realizadas aplicando análise de variância de uma via (*ANOVA One-Way*), seguida do teste *Post hoc* de *Bonferroni*. A associação entre as variáveis foi analisada pelo teste de *Pearson* no “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) para Windows, versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Foram considerados estatisticamente significativos os valores de P inferior a 0,05.





# **CAPÍTULO VI**

## **Transição de disfunção renal induzida pela ciclosporina para nefrotoxicidade**

- Biomarcadores clássicos versus emergentes



## 1. Introdução

Os inibidores da calcineurina (CNIs), como a ciclosporina A (CsA), continuam a ser fármacos imunossupressores cruciais para prevenir a rejeição de órgão e tecidos transplantados, e desde a sua introdução na prática clínica assistiu-se a uma melhoria significativa na sobrevida do enxerto [Halloran et al., 2004; Colombo et al., 2011]. A CsA liga-se à ciclofilina e inibe a activação da calcineurina dependente de cálcio e calmodulina, inibindo assim a síntese e libertação de interleucina-2, impedindo a activação das células T [Picchianti-Diamanti et al., 2014]. No entanto, a utilização clínica da CsA é muitas vezes limitada pelos seus graves efeitos adversos, incluindo a nefrotoxicidade e a hipertensão arterial [Bremer et al., 2009; Chapman et al., 2011; Ponticelli et al., 2011]. A disfunção renal é um factor de risco independente para a perda do enxerto, sendo que a doença cardiovascular/cardiorenal é a principal causa de morte pós-transplante [Mange et al., 2000; Textor et al., 2000; Cattaneo et al., 2004];

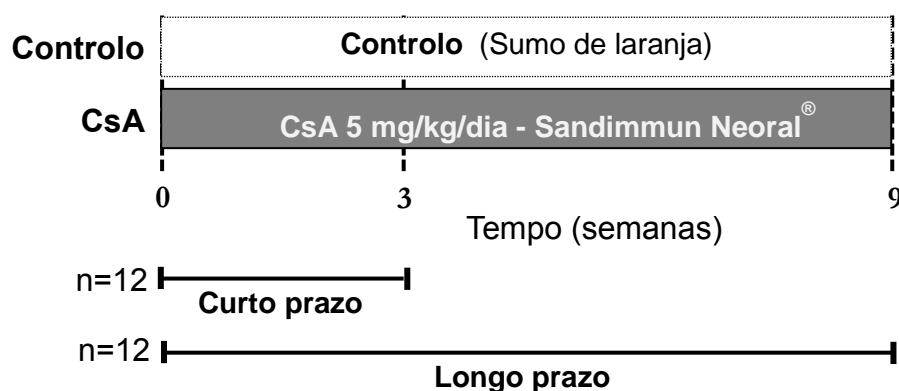
O reconhecimento destes efeitos adversos graves despertou o interesse em estratégias de minimização da toxicidade da CsA [Barbari et al., 2007]. A grande questão de hoje prende-se em encontrar protocolos de imunoterapia com um tempo mais adequado de exposição à CsA para posterior substituição por outros fármacos menos nefrotóxicos, sem comprometer o enxerto devido a um episódio de rejeição. As respostas a estas perguntas dependem, em grande medida, da caracterização precisa dos mecanismos e biomarcadores, subjacentes à transição da disfunção renal (alteração renal sem lesões evidentes ou ainda não significativas) para nefrotoxicidade crónica (lesões extensas e irreversíveis). Os estudos experimentais em modelos animais podem ser uma poderosa ferramenta para melhorar o conhecimento nesta área e auxiliar as práticas clínicas/terapêuticas.

Um diagnóstico mais precoce da nefropatia pode melhorar significativamente o prognóstico do doente, mas os estádios iniciais da nefrotoxicidade induzida pela CsA são muitas vezes assintomáticos, tornando o diagnóstico precoce difícil [O’Connell, 2011]. Actualmente, as técnicas de diagnóstico usadas para detectar a nefropatia induzida pela CsA parecem ser insatisfatórias, sendo que o principal foco da pesquisa passa pela identificação de indicadores precoces de doença. A nefropatia induzida por CsA parece estar relacionada com alterações nas vias de stresse oxidativo, de apoptose e de proliferação/fibrose [Pallet et al., 2008; Uz et al., 2008; Doh et al, 2013; Han et al., 2008; Luo et al., 2013; Xiao et al., 2013] putativamente moduladas pela influência que o fármaco tem sobre a expressão génica no tecido renal [Pallet et al., 2008; Martin-Martin et al., 2011; Berzal et al., 2012]. A avaliação da toxicidade da CsA baseia-se sobretudo em dados bioquímicos e histopatológicos, mas o perfil de transcrição génica pode vir a ser uma forma de detecção precisa e precoce, precedente à nefrotoxicidade crónica. Na verdade, as alterações de expressão génica podem melhorar a nossa compreensão sobre os mecanismos de toxicidade do fármaco [Jiang et al., 2007; Lesko et al., 2011].

Pretendeu-se iniciar este trabalho com o estudo de duas fases importantes na evolução da doença: (a) quando a disfunção renal ainda não se associa a alterações histológicas e (b) após o desenvolvimento de alterações estruturais (nefrotoxicidade – lesões moderadas a graves e irreversíveis). Esta parte A foi realizada com o intuito de identificar vias e hipotéticos biomarcadores envolvidos na transição da disfunção renal induzida pela CsA para nefrotoxicidade, num modelo animal. Para isso, foi realizado um tratamento curto (3 semanas) e outro longo (9 semanas) com CsA, e uma análise centrada em amostras de soro, urina e tecido renal (histologia e expressão génica).

## 2. Modelo animal

Vinte e quatro ratos Wistar machos (Charles River Lab. Inc, Barcelona, Espanha), com 11 semanas de idade, foram mantidos em ciclos de luz de 12h (noite/dia), com temperatura controlada ( $22.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ ), com ração de manutenção (IPM- R20, Leticia, Barcelona, Espanha) e acesso *ad libitum* a água e ração. Os animais foram divididos em dois modelos: tratamento de curta e de longa duração de CsA (5 mg/kg/dia), 3 e 9 semanas, respectivamente. Cada modelo tinha um grupo controlo (veículo: sumo de laranja) e outro CsA com 6 animais em cada grupo. Os tratamentos foram realizados por sonda esofágica e o peso corporal foi monitorizado durante todo o período de tratamento. A Ciclosporina A (Sandimmun Neoral<sup>®</sup>) foi obtida a partir da Novartis Farma Produtos Farmacêuticos, SA (Sintra, Portugal) e preparada em sumo de laranja (Figura 11). As experiências nos animais foram realizadas de acordo com as Directivas do Conselho Europeu para a experimentação animal (2010/63/EU) e as autoridades nacionais, sendo o estudo aprovado pelo comité de ética local para estudos de investigação em animais. Os animais foram mantidos num biotério certificado, em gaiolas individuais ventiladas, com as medidas adequadas para o bem-estar animal e redução do sofrimento durante os procedimentos, incluindo enriquecimento ambiental e anestesia/analgesia.



**Figura 11.** Diagrama ilustrativo dos grupos em estudo e protocolo dos tratamentos: tratamento de curto prazo (3 semanas) e longo prazo (9 semanas).

### 3. Resultados

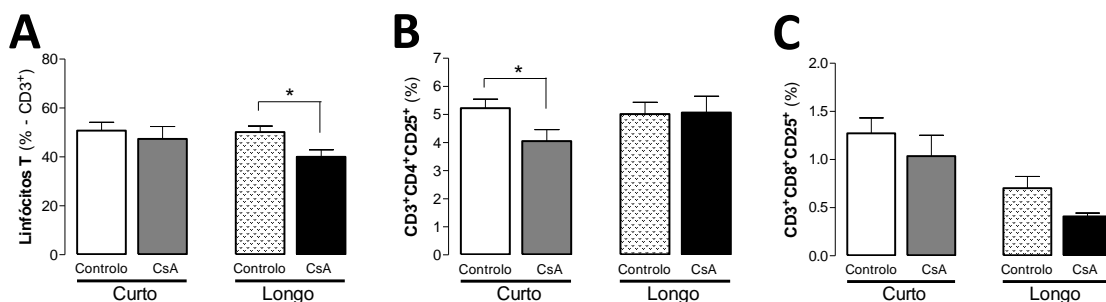
#### 3.1. Monitorização do peso corporal

O peso corporal (PC) foi monitorizado durante as 9 semanas de tratamentos. Os ratos tratados com CsA apresentaram um aumento significativo do peso ( $P < 0,01$ ), após 3 semanas de tratamento ( $382,20 \pm 12,24$  g,  $P < 0,01$ ), em comparação com os animais controlo ( $333,00 \pm 6,25$  g). No entanto, no final do tratamento crónico, foram registados valores semelhantes de peso corporal para os animais tratados com Ciclosporina ( $420,80 \pm 7,80$  g) e para os ratos controlo ( $398,00 \pm 8,61$  g).

#### 3.2. Concentração sanguínea de ciclosporina, activação de linfócitos T e dados hematológicos

A dose de ciclosporina usada no rato pretende reproduzir a concentração sanguínea de CsA “de vale” (segundo os trabalhos anteriores realizados no instituto [Reis et al., 1999]) encontrada em humanos sob terapia imunossupressora de manutenção deste composto. Com a dose de ciclosporina utilizada neste modelo de rato (5 mg/kg/dia) foram encontrados valores dentro da gama atingida em seres humanos ( $367,0 \pm 45,5$  ng/ml). A contagem de linfócitos T não foi alterada depois de 3 semanas de tratamento com CsA; no entanto, foi observada após 9 semanas uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) (Figura 12A), sendo acompanhada por um perfil semelhante no número de glóbulos brancos (Tabela 1). Quanto ao perfil de linfócitos T activados (CD25<sup>+</sup>), após 3 semanas de exposição com CsA os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tinham sido reduzidos de forma significativa ( $P < 0,05$ ), enquanto os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mostraram uma tendência para valores inferiores ( $P = 0,06$ ) após 9 semanas de tratamento com CsA (Figura 12B e 12C, respectivamente).

Relativamente ao perfil hematológico, o grupo tratado com CsA durante 3 semanas mostrou valores significativamente superiores de número de glóbulos vermelhos e valores inferiores de hemoglobina corpuscular média. Após o tratamento de longo prazo, os ratos tratados com CsA apresentavam um aumento de RDW ( $P < 0,001$ ) comparativamente aos respectivos controlo e reduzido número de plaquetas em relação ao grupo tratado com CsA por um curto período de tempo ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).



**Figura 12.** Conteúdo de linfócitos T (A) e percentagem de CD4<sup>+</sup> (B) e CD8<sup>+</sup> (C) activados nos tratamentos de curto e de longo prazo. Os valores são média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$  versus grupo controlo.

### 3.3. A ciclosporina A induz hiperglicemia e dislipidemia

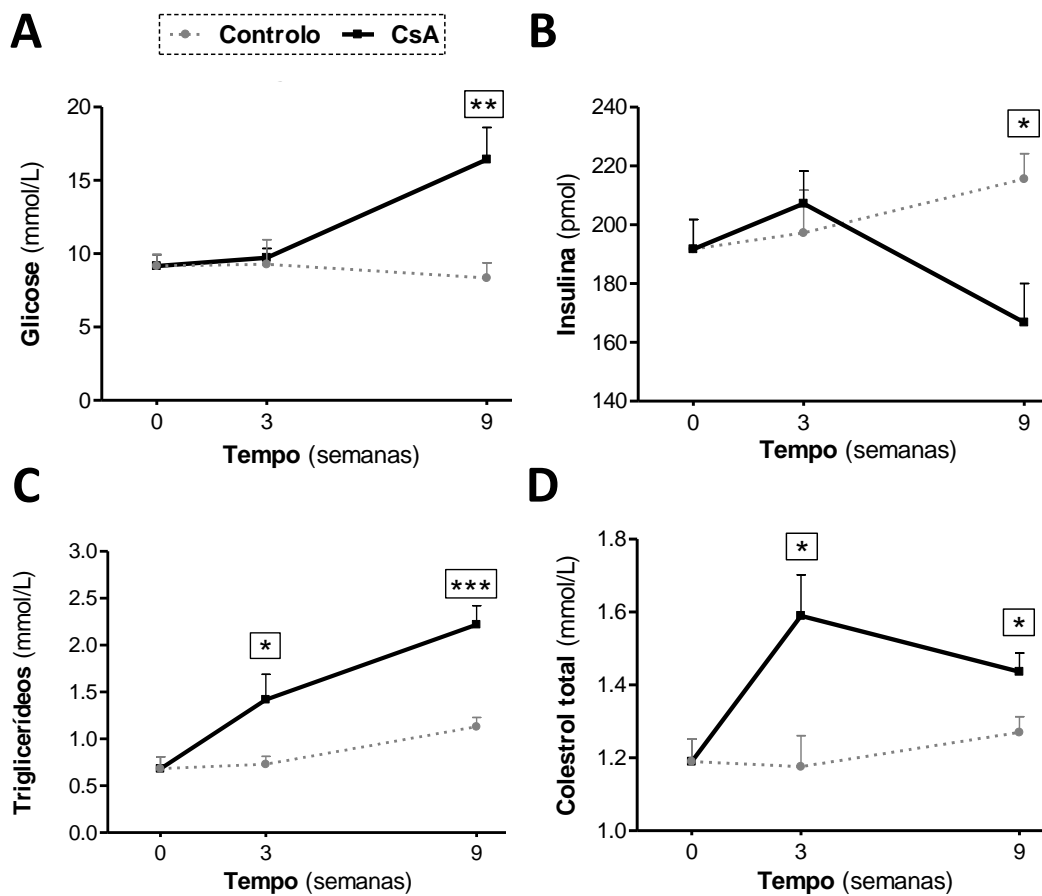
O tratamento de curto prazo com CsA produziu um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis séricos de triglicéridos e de colesterol total, sem alterações significativas nos níveis de glicose, creatina cinase, transaminase glutâmico oxalacética e transaminase glutâmico pirúvica (Figura 13 e Tabela 1). No entanto, o tratamento de longo termo de CsA induziu um aumento adicional da concentração de TGs, juntamente com uma tendência para um aumento dos valores de CK e TGO, versus o grupo controlo (Figura 12 e Tabela 1). Para além disso, a CsA promoveu um aumento significativo dos níveis de glucose ( $P < 0,001$ ) no tratamento prolongado, em contraste com uma diminuição significativa nos níveis de insulina (Figura 13).

**Tabela 1.** Dados bioquímicos e hematológicos dos tratamentos de curto e longo prazo com CsA versus controlos.

Parâmetros	Tratamento curto (3 semanas)		Tratamento longo (9 semanas)	
	Controlo (n=6)	CsA (n=6)	Controlo (n=6)	CsA (n=6)
<i>Dados bioquímicos</i>				
CK (mmol/L)	30,57 ± 8,41	16,62 ± 2,81	15,62 ± 2,81	51,09 ± 20,22
TGP (U/L)	36,00 ± 3,59	32,20 ± 1,69	38,17 ± 2,40	35,60 ± 3,33
TGO (U/L)	93,40 ± 13,38	65,40 ± 4,99	89,67 ± 3,99	138,60 ± 33,62
<i>Dados hematológicos</i>				
GVs (x10 <sup>12</sup> /L)	6,85 ± 0,18	7,39 ± 0,09 *	7,54 ± 0,12	7,84 ± 0,21
Hb (g/L)	13,70 ± 0,36	14,00 ± 0,08	14,15 ± 0,14	14,18 ± 0,30
HCT (%)	37,80 ± 1,10	38,28 ± 0,47	39,27 ± 0,58	38,85 ± 0,88
HGM (pg)	20,04 ± 0,42	18,96 ± 0,12 *	18,77 ± 0,15	18,13 ± 0,22 <sup>#</sup>
RDW (%)	13,66 ± 0,88	14,72 ± 0,49	14,33 ± 0,18	15,95 ± 0,25 <sup>***#</sup>
GBs (x10 <sup>9</sup> /L)	5,00 ± 0,75	5,22 ± 0,46	6,87 ± 0,79	3,88 ± 0,56 *
PLT (x10 <sup>9</sup> /L)	840,00 ± 55,00	874,60 ± 32,32	752,30 ± 30,69	711,30 ± 48,18 <sup>#</sup>

Valores em médias ± e.p.m; \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001 em relação ao grupo de controlo de cada um dos modelos; <sup>#</sup> P<0,05 versus o tratamento curto de CsA. CK, creatina cinase; TGO, transaminase glutâmico oxalacética; TGP, transaminase glutâmico pirúvica; GVs: glóbulos vermelhos; Hb hemoglobina; HCT, hematócrito; HGM, hemoglobina corpuscular média; RDW, distribuição da forma dos eritrócitos; GBs, glóbulos brancos; PLT, plaquetas.

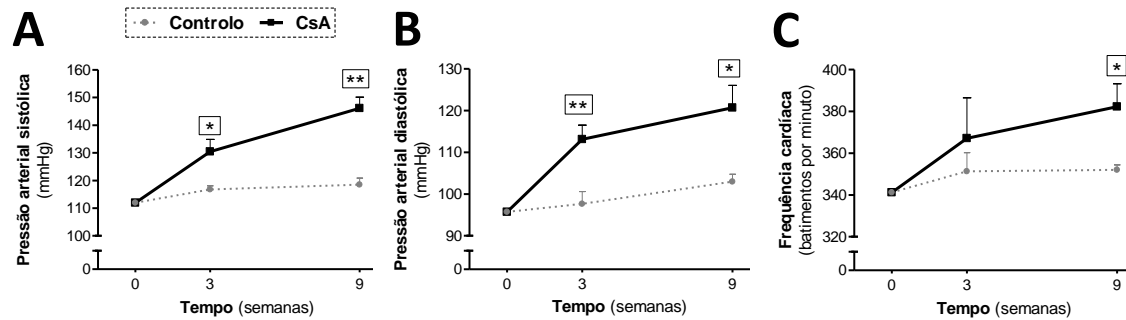




**Figura 13.** Perfil lipídico, glicémico e insulinémico. Concentração sérica de glicose (A), insulina (B), triglicédeos (C) e colesterol total (D) durante os tratamentos. Valores em médias  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao grupo controle.

### 3.4. A hipertensão e a taquicardia induzidas pela ciclosporina são agravadas ao longo do tempo

O tratamento com CsA induziu um aumento tanto da pressão arterial sistólica ( $P < 0,05$ ) como da diastólica ( $P < 0,01$ ) apenas após 3 semanas. O efeito foi ainda mais marcado após a terapia a longo prazo (Figura 14A e 14B). Perfil semelhante foi encontrado para a frequência cardíaca, com uma tendência para valores elevados após a exposição curta à CsA ( $P < 0,05$ ) e um agravamento com o aumento do tempo de exposição (Figura 14C).

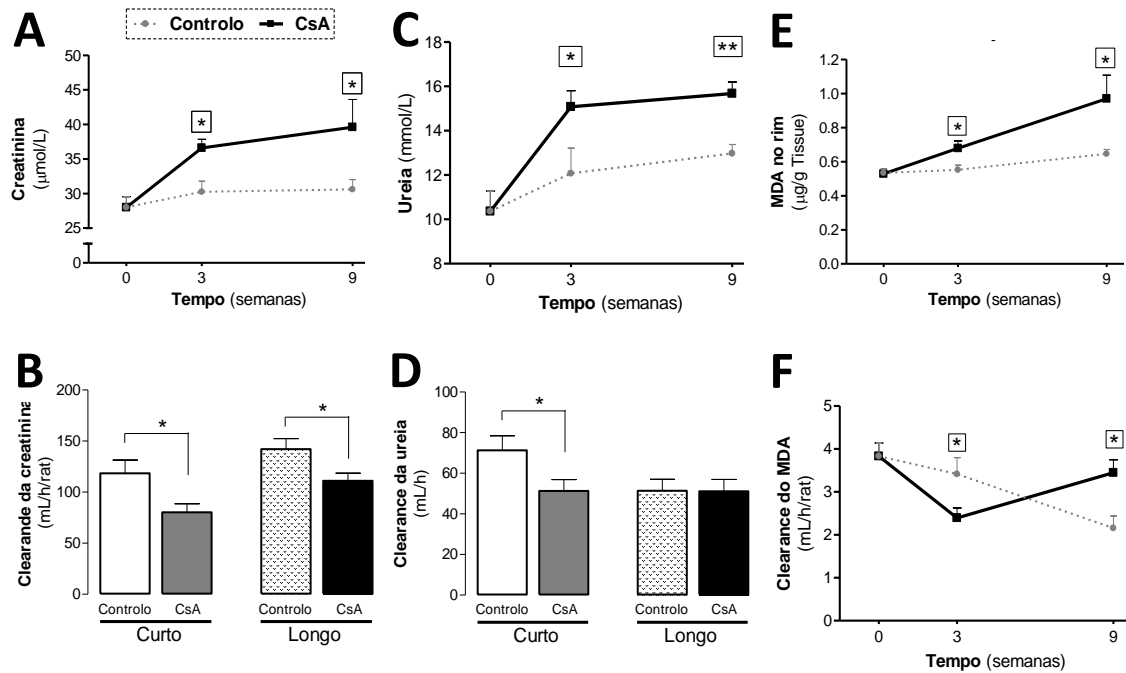


**Figura 14.** Pressão arterial e frequência cardíaca. Pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B) e frequência cardíaca (C) durante os tratamentos. Valores em média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao grupo controle.

### 3.5. Da disfunção renal à nefropatia - biomarcadores de transição

#### *Dados bioquímicos em soro, urina e tecido renal*

Os níveis séricos de creatinina e ureia aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ) no tratamento mais curto (3 semanas) de CsA, acompanhados por uma diminuição significativa das depurações de creatinina e de ureia ( $P < 0,05$ ) (Figura 15A a 15D). O tratamento com CsA a longo prazo promoveu um aumento adicional dos valores séricos de creatinina e de ureia, acompanhados por uma diminuição da depuração da creatinina ( $P < 0,05$ ) (Figura 15A a 15D). Adicionalmente, verificou-se uma redução da taxa de filtração glomerular após 3 semanas de tratamento ( $P < 0,05$ ). Para além disso, a CsA promoveu um aumento da peroxidação lipídica no tecido renal no modelo de curto prazo, com agravamento ao longo do tempo ( $P < 0,05$ ) (Figura 15E). Quanto à depuração do MDA, verificou-se um perfil antagónico, pois diminuiu no tratamento curto ( $P < 0,05$ ) e aumentou no tratamento longo (Figura 15E).



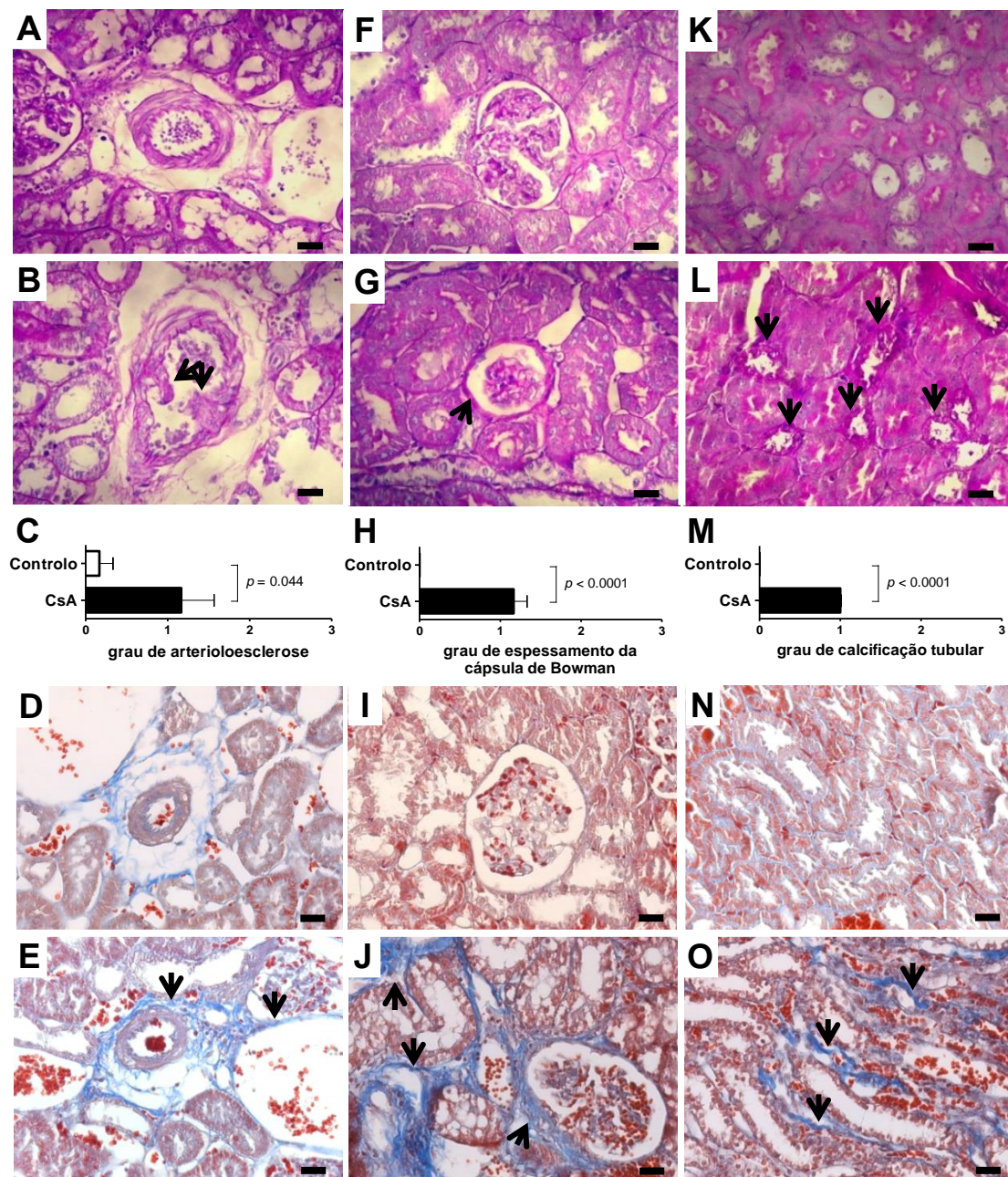
**Figura 15.** Marcadores séricos, urinários e tecidulares de (dis)função renal. Níveis séricos de creatinina (A) e sua depuração (B), níveis séricos de ureia (C) e sua depuração (D), concentração renal de MDA (E) e a sua depuração (F), durante os tratamentos. Valores em médias  $\pm$  e.p.m. \* P<0,05 e \*\* P<0,01 em relação ao grupo controle.

### 3.6. Análise histomorfológica do tecido renal

A lesão renal foi analisada a nível vascular, glomerular e tubular, através de cortes de rim corados com H&E e PAS. Apesar do aumento significativo de alguns marcadores da função renal, o tratamento com CsA a curto prazo não promoveu modificações morfológicas importantes no tecido renal em comparação com o grupo controle. No entanto, 9 semanas de exposição à CsA revelaram importantes mudanças estruturais no rim (vasos, glomérulos e túbulos), indicativas de evidente nefrotoxicidade. As principais alterações encontradas em comparação com o grupo controle estão representadas na Figura 16. Após exposição à CsA durante 9 semanas foi verificada a presença de hiperemia, vacuolização arteriolar e congestão vascular (aumento significativo em relação ao controle), sendo a arterioloesclerose a principal lesão vascular observada, em comparação com os rins dos animais controle (Figura

16B e 16A, respectivamente). Quanto às lesões glomerulares, os principais resultados ( $P < 0,05$ ) foram a presença de expansão mesangial, hialinose do pólo vascular e espessamento da cápsula de Bowman (representada na Figura 16G), em comparação com os rins de ratos controlo (Figura 16F). Para além de vacuolização tubular, outras lesões tubulares foram encontrados, incluindo a presença de cilindros hialinos, infiltrado inflamatório e calcificação tubular (representada na Figura 16L), versus o normal perfil nos túbulos dos ratos controlo (Figura 16K). As Figuras 16C, 16H, 16M mostram as diferenças estatisticamente significativas encontradas para arteriosclerose, espessamento da cápsula de Bowman e calcificação tubular nos rins dos animais tratados com CsA durante 9 semanas.

A fibrose renal foi avaliada utilizando a coloração de tricrómio de Masson. Nos rins de ratos tratados com veículo, a deposição de colagénio (cor azul) era rara nos glomérulos, e uma pequena quantidade de manchas apareceram junto da membrana tubular externa e em torno dos vasos (Figura 16I, 16N e 16D, respectivamente). Depois de 9 semanas de tratamento com CsA, foi detectada forte coloração azul em volta dos túbulos (no córtex e na medula), indicando a presença de fibrose tubulointersticial difundida (Figura 16O). A marcação azul em volta das cápsulas de Bowman (Figura 16J) é indicativa de deposição de colagénio que leva a um espessamento da própria cápsula com o decorrer do tempo. Para finalizar, em redor dos vasos a CsA também induziu a deposição de colagénio (Figura 16E).

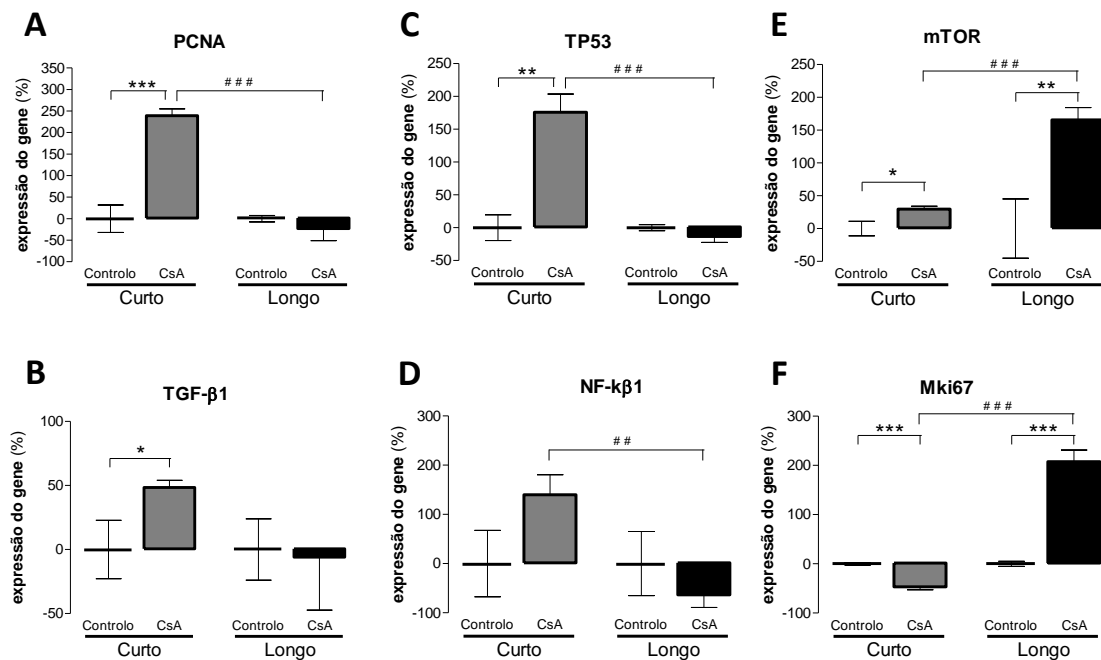


**Figura 16.** Avaliação histomorfológica das lesões renais após 9 semanas. Microfotografias representativas de secções histomorfológicas renais com coloração PAS para o grupo Controlo (A, F, K) e grupo tratado com CsA durante 9 semanas (B, G, L). A imagem A representa uma arteriola renal normal do grupo controlo e B representa arterioesclerose, presente em todos os ratos tratados com CsA. F e G mostram uma cápsula normal do grupo controlo e espessamento da cápsula de Bowman no grupo com CsA, respectivamente. K e L são imagens de túbulos normais e calcificação tubular nos ratos controlo e tratados com CsA, respectivamente. C, H e M representam o índice de cada lesão renal para os grupos controlo e CsA. Microfotografias da coloração de tricrómio de Masson representativas dos grupos Controlo (D, I, N) e CsA (E, J, O) no tratamento longo, mostrando o padrão de deposição de colagénio. A imagem E mostra arterioesclerose e deposição de colagénio em torno da arteriola e veia no rim; J e O representam a deposição de colagénio em torno da cápsula de Bowman e fibrose tubulointersticial, respectivamente. Cada barra representa 25  $\mu\text{m}$  de ampliação.

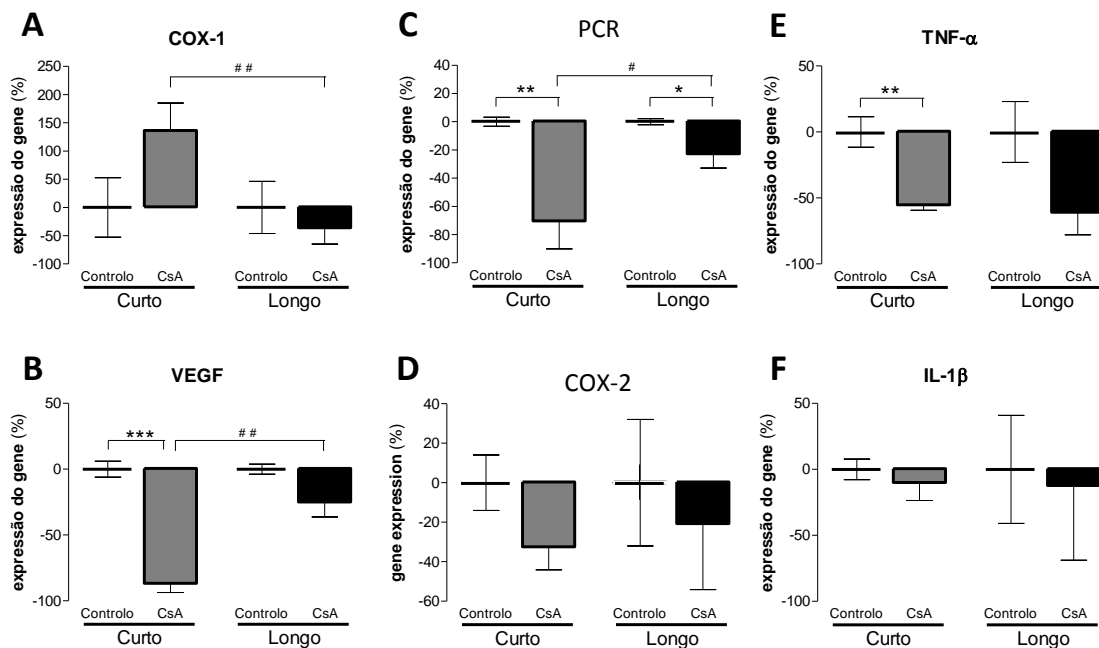
### **3.7. Expressão génica renal de marcadores de proliferação, fibrose, inflamação e angiogénese**

Foram avaliados vários marcadores de proliferação, de fibrose, de inflamação e de angiogénese em termos de expressão de ARNm em rim em ambos os modelos (tratamento curto e longo), em comparação com os respectivos controlos. Após 3 semanas de tratamento com CsA, foi encontrada uma sub-regulação significativa do antigénio identificado pelo anticorpo monoclonal de Ki67 (*MKi67*) (Figura 17F). Para além disso, verificou-se um aumento significativo da expressão de ARNm do antigénio nuclear de proliferação celular (*PCNA*), da proteína p53 (*TP53*), do factor de crescimento transformante beta-1 (*TGF- $\beta$ <sub>1</sub>*), do alvo para a rapamicina em mamífero (*mTOR*), acompanhados por uma tendência para aumento na expressão do factor nuclear kappa B (*NF-kB*) (Figura 17). Por outro lado, no tratamento com CsA a longo prazo, a expressão de *PCNA*, *TP53*, *TGF- $\beta$ <sub>1</sub>* e de *NF-kB* permaneceu inalterada versus o controlo. No entanto, e surpreendentemente, a expressão de ARNm de *MKi67* e de *mTOR* estava notavelmente aumentada em contraste com o que foi observado com a exposição de curto prazo à CsA (Figura 17E e 17F).

Relativamente aos marcadores de inflamação e de angiogénese, tanto a curto como a longo prazo, nos ratos tratados com CsA verificou-se uma diminuição da expressão de ARNm de ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2 (*COX-1* e *COX-2*), da proteína C reactiva (*PCR*), do factor de necrose tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ) e do factor de crescimento do endotelial vascular (*VEGF*) (Figura 18).



**Figura 17.** Expressão genética (ARNm) de marcadores de proliferação no rim. *PCNA* (A), *TGF-β<sub>1</sub>* (B), *TP53* (C), *NF-kβ1* (D), *mTOR* (E) e *Mki67* (F) para os grupos controlo e tratados com CsA, nos modelos de curto e longo prazo. Valores em médias de % do controlo ± e.p.m. \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001 versus o grupo de controlo de cada um dos modelos; ## P<0,01 e ### P<0,001 versus o modelo CsA de curta exposição. *Mki67*, antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67; *mTOR*, alvo da rapamicina em mamíferos; *NF-kβ1*, factor nuclear kappa Beta-1; *PCNA*, antígeno nuclear de proliferação celular; *TGF-β<sub>1</sub>*, factor de crescimento transformante beta-1; *TP53*, proteína p53.



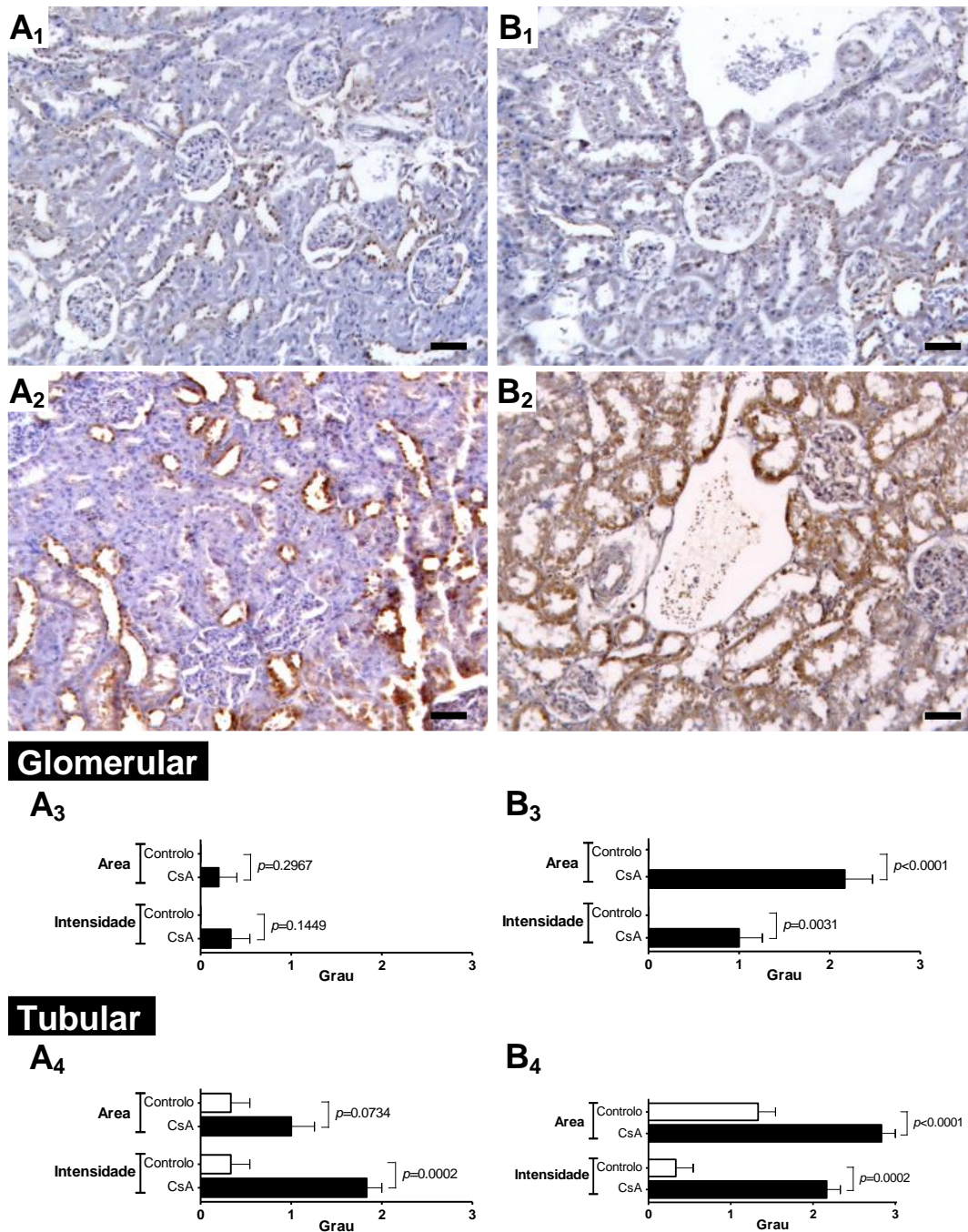
**Figura 18.** Expressão genética (ARNm) de marcadores de inflamação e angiogênese no rim. *COX-1* (A), *VEGF* (B), *PCR* (C), *COX-2* (D), *TNF-α* (E) e *IL-1β* (F) para os grupos controle e tratados com CsA, nos modelos de curto e longo prazo. Valores em função da média de porcentagem do controle  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  vs o grupo controle de cada um dos modelos; #  $P < 0,05$  e ##  $P < 0,01$  versus o modelo CsA de curta exposição. *COX-1*, ciclooxygenase-1; *COX-2*, ciclooxygenase-2; *PCR*, proteína C-reativa; *IL-1β*, interleucina 1 beta; *TNF-α*, factor de necrose tumoral alfa; *VEGF*, factor de crescimento do endotélio vascular.

### 3.8. Expressão proteica de mTOR no rim por imunohistoquímica

Em consonância com os resultados de ARN mensageiro, a expressão da proteína mTOR aumentou nos ratos tratados com CsA, havendo um aumento moderado após o tratamento a curto prazo, com uma área de coloração de 25% a 50% e intensidade grau 2 (Figura 19A4) na região tubular, sem significativa marcação de área e intensidade na região glomerular (Figura 19A3). Observou-se uma expressão mais pronunciada no tratamento com CsA a longo prazo, com >75% de área corada com marcação (grau 3) e um grau de intensidade 1 nos glomérulos (Figura 19B3) e com >75% de coloração (grau 3) e grau de intensidade 2 (Figura



C9B4) na região tubulointersticial, em comparação com os ratos do grupo controlo correspondente de 3 e 9 semanas (Figura 19A1 e 19B2).



**Figura 19.** Expressão da proteína mTOR no rim. Fotos de imunohistoquímica representativas do grupo controlo (**A1**, **B1**) e tratado com CsA (**A2**, **B2**), após os tratamentos de curto e longo prazo (3 e 9 semanas, respectivamente). Quantificação da área e intensidade de coloração na região glomerular (**A3**, **B3**) e na região tubulointersticial (**A4**, **B4**). Cada barra representa 50  $\mu$ m.

## 4. Discussão

A “gestão clínica” da nefropatia induzida pela CsA inclui actualmente estratégias terapêuticas de minimização da sua utilização ou substituição por outros medicamentos supostamente menos nefrotóxicos e que possam minimizar também a dislipidemia e a hipertensão arterial concomitantes. Apesar da procura contínua de terapias alternativas, os inibidores da calcineurina permanecem como os agentes imunossupressores mais utilizados e mais eficazes [Gasto net al., 2009]. De acordo com os dados de Sanchez-pozos e colegas (2010), 94% dos pacientes transplantados renais eram tratados com um inibidor da calcineurina, como terapia base da imunossupressão. A calcineurina é uma proteína fosfatase dependente da via  $Ca^{2+}$ /calmodulina que tem sido implicada na hipertrofia de vários tipos de células [Reddy et al., 2011]. Até que os mecanismos moleculares subjacentes à nefrotoxicidade induzida pela CsA estejam totalmente elucidados, a escolha do momento mais adequado para promover a substituição (conversão mais precoce ou tardia) por outro fármaco menos nefrotóxico, bem como a escolha de opções terapêuticas anti-hipertensores, permanecerão como opções mais ou menos empíricas que visam o controlo da pressão arterial, o acompanhamento dos efeitos secundários e a limitação de potenciais interferências com a imunossupressão por si só, sem capacidade para interferir especificamente com as causas exactas daqueles efeitos. Nestas condições, a insuficiência renal e o risco cardiovascular vão progredindo até às consequências mais graves: perda do enxerto e/ou evolução das complicações cardiovasculares, que poderão levar à morte. Nas últimas décadas tem havido uma clara mudança de atitude na terapêutica associada ao transplante, com especial atenção para a função renal a longo prazo e a melhoria da qualidade geral de vida. Neste contexto, a descoberta dos mecanismos moleculares subjacentes ao uso da

CsA por um período mais curto e/ou mais longo é essencial, e depende em grande parte de estudos experimentais, como o recurso a modelos animais.

Nesta fase do trabalho pretendemos contribuir para a elucidação dos mecanismos subjacentes à toxicidade induzida pela CsA em duas fases específicas importantes na evolução da doença: quando a função renal se encontra ligeiramente alterada mas ainda sem alterações histológicas (disfunção renal), e após o desenvolvimento de lesões estruturais em todas as regiões do rim (vasculares, glomerulares e tubulointersticiais), ou seja, na presença de nefropatia. Assim, esta parte do estudo teve como principal finalidade esclarecer as vias e identificar possíveis biomarcadores envolvidos na transição de disfunção renal induzida pela CsA para a nefrotoxicidade, num modelo animal de rim nativo. Para isso, criámos 2 tratamentos com a mesma dose, mas durações diferentes. No primeiro, ao qual chamámos tratamento “curto”, os animais foram sujeitos a terapia com CsA durante 3 semanas; no segundo, que designámos de tratamento “longo”, com uma exposição durante 9 semanas. No final dos tratamentos foram analisados soro, urina e amostras de tecido renal, para investigar marcadores bioquímicos, histopatológicos e de expressão génica e proteica, que possam ser possíveis candidatos para actuar como modeladores na evolução da nefropatia induzida pela CsA.

Ainda que este não seja um modelo com rins transplantados, podemos estimar indirectamente a actividade imunossupressora dos tratamentos com CsA com a dose usada através dos valores dos linfócitos T. Verificou-se que no tratamento curto os valores de leucócitos e de linfócitos T permaneceram inalterados, mas o conteúdo em linfócitos T  $CD4^+CD25^+$  – um marcador de células T auxiliares activadas – foi reduzido significativamente. Por outro lado, uma exposição longa à Ciclosporina provocou uma redução significativa no número de linfócitos T, com uma tendência para uma diminuição das células T citotóxicas activadas ( $CD8^+CD25^+$ ). Sabe-se que a ciclosporina é muito eficaz na inibição da produção de interleucina-2 (IL-2) – uma das

interleucinas responsáveis por amplificar as respostas das células T citotóxicas; neste caso particular, o tratamento diminuiu os níveis séricos de IL-2, o que está de acordo com os dados da literatura [Colombani et al., 1987; Mattila et al., 1996]. Estes resultados foram obtidos com uma dose de CsA que é capaz de originar uma concentração sanguínea de CsA “de vale” que mimetiza as concentrações obtidas na prática clínica para a imunoterapia pós-transplante com CsA de manutenção. Uma vez que a rejeição aguda do enxerto é uma das principais preocupações na gestão do doente transplantado, a conversão da ciclosporina para um outro fármaco, a fim de reduzir a nefrotoxicidade, só deve ser realizada assegurando que a rejeição é impedida. Os nossos dados apoiam a ideia de que uma exposição mais longa de CsA está associada a uma melhor eficácia imunossupressora, pelo menos quando analisada em termos de população de linfócitos T.

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que a mesma dose de CsA em ratos já promove alguns efeitos secundários graves, como hipertensão e dislipidemia, com apenas 2 semanas de tratamento [Reis, 1999; Reis, 2005]. O presente trabalho reforça estes dados, mostrando que os efeitos adversos foram agravados num tratamento a longo prazo, distinguindo-se a trigliceridemia e a hiperglicemia sugerindo, à semelhança de dados clínicos, um aumento do risco cardiovascular com o aumento da duração de exposição. Um perfil semelhante foi observado para o desenvolvimento de hipertensão e taquicardia, que também são agravados ao longo do tempo. Embora a taquicardia possa ser atribuída a uma sobreactivação do sistema nervoso simpático [Sander et al., 1996; Reis et al., 2005], os mecanismos subjacentes à hipertensão induzida pela ciclosporina têm sido descritos como multifactoriais. O aumento da pressão arterial sanguínea poderá estar associado a vários aspectos, nomeadamente a hiperreactividade plaquetar, redução da expressão e actividade de vasodilatadores, tais como o monóxido de azoto (NO) e a prostaciclina, e aumento da actividade das espécies vasoconstritoras, tais como a

endotelina-1, o tromboxano-A2, a serotonina ou a noradrenalina [Sander et al., 1996; Reis et al., 1999; Reis et al., 2000; Reis et al., 2007]. Para além disso, a activação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e o stresse oxidativo também foram identificados como contribuintes importantes para as alterações cardiovasculares subjacentes ao desenvolvimento de hipertensão arterial [Lassila et al., 2002; Reis et al., 2007]. No entanto, diversas linhas de evidência sugerem que o desequilíbrio vasomotor renal pode ser a principal origem da hipertensão arterial e da nefropatia [Varizi et al., 1998; Zhang et al., 2000]. Embora a nefrotoxicidade induzida pela CsA esteja a ser estudada há várias décadas, os mecanismos moleculares precisos continuam por ser totalmente elucidados e este problema permanece em aberto [Reis, 2010]. Na prática, esta continua a ser uma das principais preocupações na prática clínica em relação à imunoterapia no doente transplantado.

O mecanismo de acção da CsA está profundamente relacionado com a inibição de factores de transcrição, incluindo o NFAT, um factor de transcrição sensível à CsA e que está implicado na indução de genes de citoquinas e que é essencial para a expressão do gene da IL-2 e consequente formação e maturação de linfócitos T, necessários para a resposta imune [Rao et al., 1995]. As isoformas do NFAT não são unicamente específicas das células T e a inibição desta via pela CsA está na origem da toxicidade para além da sua característica primária, a imunossupressão [Liu et al., 2007]. No entanto, pouco se sabe ainda sobre a influência da exposição de CsA a curto versus longo prazo na expressão génica renal, particularmente de vários mediadores importantes de fibrose, de proliferação, de inflamação e de angiogénese, que são vias fundamentais na deterioração do tecido renal [Wang et al., 2010; Martinez-Garcia et al.; 2012; Stemmer et al., 2012]. Uma vez que a duração do tratamento com CsA se reflecte nos níveis da sua toxicidade, este estudo pretendeu contribuir para elucidar a influência dos tratamentos de curto e longo termo com CsA

na função e estrutura (lesão renal), recorrendo a marcadores clássicos e a mediadores emergentes, utilizando a expressão génica e proteica renal, dados séricos e urinários.

Quanto à caracterização bioquímica renal, constatámos que os marcadores séricos clássicos de disfunção renal (creatinina e ureia) já estão significativamente aumentados após 3 semanas de tratamento, registando-se um aumento adicional com a exposição prolongada de CsA. Variação semelhante foi encontrada para a peroxidação lipídica do tecido renal, bem como, e de particular relevância, em relação às lesões renais. Portanto, apesar do aumento da creatinina e ureia séricas após a terceira semana de terapia com CsA, acompanhado pela diminuição das taxas de depuração de creatinina, de ureia e de MDA (um marcador de peroxidação lipídica), bem como da taxa de filtração glomerular, apenas pequenas variações na estrutura renal foram identificadas (tecido ausente de lesões ou de grau insipiente). No entanto, após a exposição longa de CsA foram observadas lesões significativas a nível glomerular, tubular e vascular. Os marcadores renais utilizados na prática clínica (taxa de filtração glomerular, creatinina e ureia séricas e as suas taxas de depuração), foram confirmados com estando alterados neste estudo. Além disso, observou-se uma variação interessante dos níveis de MDA entre as 3 e as 9 semanas de tratamento com a CsA. O aumento significativo da depuração de MDA observado no nosso modelo levanta algumas questões. Em 1989, Knight e seus colegas detectaram níveis elevados de MDA na urina de doentes transplantados, mas os autores do estudo não foram capazes de identificar a causa destas observações, sugerindo que poderia surgir de: (a) peroxidação lipídica renal directamente relacionada com a terapia com ciclosporina/azatioprina, (b) aumento da peroxidação lipídica devido a uma resposta imunológica ao enxerto renal ou (c) uma combinação dessas possibilidades. Os nossos dados sugerem que a depuração do MDA pode ser um marcador de nefrotoxicidade da CsA, uma vez que o aumento desta medição coincide com o momento em que as primeiras lesões renais surgem de forma clara. Para além disso,

o stresse oxidativo pode promover a formação de uma variedade de mediadores vasoactivos [Garcia-Cohen et al., 2000] que podem afectar a função renal directamente, causando vasoconstrição renal, ou diminuindo o coeficiente de ultrafiltração capilar no glomérulo, reduzindo assim a taxa de filtração glomerular. As actuais técnicas de diagnóstico usadas para detectar a nefrotoxicidade da CsA são ainda insuficientes. A estimativa da TFG pode ser um indicador insensível, uma vez que depende de vários factores, incluindo a idade e factores sanguíneos. A creatinina e a ureia parecem ter um valor de diagnóstico pobre [Dieterle et al., 2010]. Para além disso, a relação entre a proteinúria e a nefrotoxicidade da CsA é algo complexa, o que limita a sua fiabilidade como indicador precoce de nefropatia [O'Connell et al., 2011]. A peroxidação lipídica surge como resultado da reacção de lípidos multi-insaturados com agentes oxidantes, promovendo o stresse oxidativo nas estruturas renais. O MDA urinário reflecte a presença de lesões renais, o que pode ser a causa ou a consequência de peroxidação lipídica. Portanto, a correlação entre a depuração de MDA e o grau de lesão renal pode ser uma boa estratégia para identificar a nefrotoxicidade precoce da CsA.

Em relação aos mecanismos moleculares envolvidos na disfunção renal observada no tratamento curto versus a nefrotoxicidade já patente no tratamento longo, alguns estudos sugerem que as lesões glomerulares e tubulares graves, incluindo a atrofia, a fibrose, a inflamação e a esclerose, estão ligadas a importantes mediadores, tais como um aumento da resposta inflamatória, com activação de  $\text{NF-}\kappa\beta$ , e um aumento da libertação de  $\text{TGF-}\beta_1$ , que medeia a nefropatia por processos de fibrose e apoptose das células renais [Naesens et al., 2009; Li et al., 2009; Park et al., 2010]. Versões antigas e mais actuais dos possíveis mecanismos têm sido sugeridas, mas a questão principal permanece ainda sem solução. No nosso modelo animal, o tratamento com o inibidor da calcineurina a curto prazo foi principalmente associado a uma sobre-regulação dos mediadores de fibrose e proliferação, a um aumento da

expressão dos genes *TGF-β<sub>1</sub>* e *PCNA*, acompanhados por um ligeiro aumento na expressão de *NF-κβ*, que tem sido identificado como sendo o mediador chave da inflamação e da fibrose [Li et al., 2009; Park et al., 2010]. Para além disso, estas alterações foram acompanhadas por uma possível resposta compensatória, uma vez que os marcadores de inflamação (incluindo a *COX-2*, o *TNF-α* e a *PCR*), assim como de proliferação celular (*Mki67*) e de angiogénese (*VEGF*), foram reprimidos, talvez responsáveis pela atenuação dos efeitos citotóxicos da exposição curta de CsA. A sobre-expressão de *NF-κβ* e de *TP53* pode ser incluída nesta resposta compensatória, uma vez que inibem a mTOR [Feng et al., 2005]. Não obstante, com a exposição prolongada à CsA, a nefrotoxicidade evoluiu, tal como demonstrado pelo quadro de alterações histológicas, facto que parece estar associado a outras vias moleculares e mediadores. Na verdade, houve uma sobre-expressão significativa de *Mki67*, ao contrário do que foi observado após o tratamento curto, o que sugere uma diminuição de respostas contra-reguladoras. Isto foi acompanhado por um aumento paralelo na expressão do gene e da proteína mTOR, uma proteína cinase serina/treonina importante na regulação do crescimento celular, proliferação, motilidade, sobrevivência celular, síntese de proteínas e transcrição de factores [Laplante et al., 2012]. Dados recentes referem que a restauração completa da morfologia e da função renal pode ocorrer após um episódio de lesão renal aguda induzida por lesão isquémica ou tóxica. A regeneração renal depende, em parte, da capacidade das restantes células viáveis tubulares para proliferar e restaurar o epitélio tubular lesionado [Li et al., 2009]. Como Lieberthal e colegas (2009) demonstraram, a mTOR desempenha um papel importante na mediação do processo de regeneração e recuperação, dependendo da extensão do dano renal. Para além disso, a actividade da mTOR é baixa ou ausente no rim normal, mas aumenta acentuadamente após lesão renal aguda. Adicionalmente, a inibição da mTOR tem sido associada com uma melhoria da fibrose renal, da glomeruloesclerose e da inflamação intersticial, tendo um



papel importante na recuperação da doença renal [Kramer et al., 2008; Lieberthal et al., 2009; Chen et al., 2012].

No que diz respeito à transplantação, os inibidores de mTOR têm sido utilizados para substituir os inibidores da calcineurina, por causa dos seus efeitos secundários serem “idealmente” reduzidos, incluindo a nefrotoxicidade [Campistol et al., 2005; Mota et al., 2005]. Os nossos resultados reforçam a ideia da substituição precoce de ciclosporina por inibidores de mTOR, não só porque a exposição prolongada à CsA é notoriamente mais deletéria, promovendo a deterioração renal estrutural, mas também porque a sobre-expressão da mTOR parece ser uma característica da exposição crónica à CsA. Muito recentemente, Luo e colegas (2013) demonstraram que a rapamicina tem um potencial menos fibrogénico do que a ciclosporina. Na presença de doença renal crónica, a rapamicina também retarda o aparecimento de insuficiência renal e mesmo a progressão da fibrose renal reduzindo a hipertrofia glomerular, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas e a inflamação intersticial [Park et al., 2010]. Assim, a detecção precoce de nefropatia induzida por CsA e a sua substituição por fármacos mais adequados – que parecem ser os inibidores de mTOR – vai reduzir muito o risco de nefropatia crónica do enxerto e melhorar os resultados em doentes transplantados.

Estudos futuros deverão centrar-se no impacto que terá um protocolo de conversão da CsA para o SRL em termos renais. Para além disso, é urgente identificar biomarcadores que auxiliem na monitorização pré e pós conversão, em amostras não invasivas e que tenham correlação com o que é verificado estruturalmente no rim, de forma a possibilitar a redução do risco de nefropatia crónica de alotransplante, melhorando assim os resultados em pacientes transplantados.

## 5. Bibliografia

Barbari AG, Stephan AG, Masri MA. Calcineurin inhibitor-free protocols: risks and benefits. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2007; 18(1):1-23.

Bazan-Perkins B, Bobadilla NA. Polymerized type I collagen reduces chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(7):2150-8.

Berzal S, Alique M, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Ramos AM. GSK3, snail, and adhesion molecule regulation by cyclosporine A in renal tubular cells. *Toxicol Sci* 2012; 127(2):425-37.

Bremer S, Vethe NT, Rootwelt H, Jørgensen PF, Stenstrøm J, Holdaas H, Midtvedt K, Bergan S. Mycophenolate pharmacokinetics and pharmacodynamics in belatacept treated renal allograft recipients - a pilot study. *J Transl Med* 2009; 7:64.

Campistol JM, Cockwell P, Diekmann F, Donati D, Guirado L, Herlenius G, Mousa D, Pratschke J, San Millán JC. Practical recommendations for the early use of m-TOR inhibitors (sirolimus) in renal transplantation. *Transpl Int* 2009; 22(7):681-7.

Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Remuzzi G. Nephrotoxic aspects of cyclosporine. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl):234S-239S.

Chapman JR. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity-lest we forget. *Am J Transplant* 2011; 11(4):693-7.

Chen G, Chen H, Wang C, Peng Y, Sun L, Liu H, Liu F. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts. *PLoS One* 2012; 7(3):e33626.

Colombani PM, Hess AD. T-lymphocyte inhibition by cyclosporine. Potential mechanisms of action. *Biochem Pharmacol* 1987; 36(22):3789-93.

Colombo D, Ammirati E. Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011; 25(4):493-504.

Dieterle F, Perentes E, Cordier A, Roth DR, Verdes P, Grenet O, Pantano S, Moulin P, Wahl D, Mahl A, End P, Staedtler F, Legay F, Carl K, Laurie D, Chibout SD, Vonderscher J, Maurer G. Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat Biotechnol* 2010; 28(5):463-9.

Doh KC, Lim SW, Piao SG, Jin L, Heo SB, Zheng YF, Bae SK, Hwang GH, Min KI, Chung BH, Yang CW. Ginseng treatment attenuates chronic cyclosporine nephropathy via reducing oxidative stress in an experimental mouse model. *Am J Nephrol* 2013; 37(5):421-33.

Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(23):8204-9.

Garcia-Cohen EC, Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodriguez-Martinez MA. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(1):75-81.

Gaston RS. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity: reflections on an evolving paradigm. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(12):2029-34.

Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351(26):2715-29.

Han SW, Li C, Ahn KO, Lim SW, Song HG, Jang YS, Cho YM, Jang YM, Ghee JY, Kim JY, Kim SH, Kim J, Kwon OJ, Yang CW. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* 2008; 28(5):707-14.

Jiang Y, Gerhold DL, Holder DJ, Figueroa DJ, Bailey WJ, Guan P, Skopek TR, Sistare FD, Sina JF. Diagnosis of drug-induced renal tubular toxicity using global gene expression profiles. *J Transl Med* 2007; 5:47.

Knight JA, Cheung AK, Pieper RK, Servilla K. Increased urinary lipoperoxide levels in renal transplant patients. *Ann Clin Lab Sci* 1989; 19(4):238-41.

Krämer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, Binder E, Loof T, Khadzhynov D, Kawachi H, Shimizu F, Diekmann F, Budde K, Neumayer HH, Peters H. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(2):F440-9.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149(2):274-93.

Lassila M. Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab* 2002; 3(1):61-71.

Lesko LJ, Atkinson AJ Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:347-66.

Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5(9):513-9.

Lieberthal W, Levine JS. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(12):2493-502.

Liu EH, Siegel RM, Harlan DM, O'Shea JJ. T cell-directed therapies: lessons learned and future prospects. *Nat Immunol* 2007; 8(1):25-30.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001; 25(4):402-8.

Luo L, Sun Z, Luo G. Rapamycin is less fibrogenic than Cyclosporin A as demonstrated in a rat model of chronic allograft nephropathy. *J Surg Res* 2013; 179(1):e255-63.

Mange KC, Cizman B, Joffe M, Feldman HI. Arterial hypertension and renal allograft survival. *JAMA* 2000; 283(5):633-8.

Martínez-García C, Izquierdo A, Velagapudi V, Vivas Y, Velasco I, Campbell M, Burling K, Cava F, Ros M, Oresic M, Vidal-Puig A, Medina-Gomez G. Accelerated renal disease is associated with the development of metabolic syndrome in a glucolipotoxic mouse model. *Dis Model Mech* 2012; 5(5):636-48.

Martin-Martin N, Slattery C, McMorrow T, Ryan MP. TGF- $\beta$ 1 mediates sirolimus and cyclosporine A-induced alteration of barrier function in renal epithelial cells via a noncanonical ERK1/2 signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(6):F1281-92.

Mattila PS. The actions of cyclosporin A and FK506 on T-lymphocyte activation. *Biochem Soc Trans* 1996; 24(1):45-9.

Mota A. Sirolimus: a new option in transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6(3):479-87.

Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(2):481-508.

O'Connell S, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Identification of novel indicators of cyclosporine A nephrotoxicity in a CD-1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252(2):201-10.

Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois YC, Lecorre D, Mucchielli MH, Imbeaud S, Agier N, Hertig A, Thervet E, Legendre C, Beaune P, Anglicheau D. Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229(2):184-96.

Park JW, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee J, Kim SW. Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats. *Kidney Int* 2010; 77(12):1076-85.

Pestel S, Krzykalla V, Weckesser G. Measurement of glomerular filtration rate in the conscious rat. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007; 56(3):277-89.

Picchianti-Diamanti A, Rosado MM, Scarsella M, Laganà B, D'Amelio R. P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases. *Int J Mol Sci* 2014; 15(3):4965-76.

Piloto N, Teixeira HM, Teixeira-Lemos E, Parada B, Garrido P, Sereno J, Pinto R, Carvalho L, Costa E, Belo L, Santos-Silva A, Teixeira F, Reis F. Erythropoietin promotes deleterious cardiovascular effects and mortality risk in a rat model of chronic sports doping. *Cardiovasc Toxicol* 2009; 9(4):201-10.

Ponticelli C, Cucchiari D, Graziani G. Hypertension in kidney transplant recipients. *Transpl Int* 2011; 24(6):523-33.

Rao A. NFATp, a cyclosporin-sensitive transcription factor implicated in cytokine gene induction. *J Leukoc Biol* 1995; 57(4):536-42.

Reddy RN, Knotts TL, Roberts BR, Molkentin JD, Price SR, Gooch JL. Calcineurin A- $\beta$  is required for hypertrophy but not matrix expansion in the diabetic kidney. *J Cell Mol Med* 2011; 15(2):414-22.

Reis F, Rocha L, Ponte L, Alcobia T, Almeida L, Costa-Almeida C, Teixeira F. Effect of preventive and regressive isosorbide 5-mononitrate treatment on catecholamine levels in plasma, platelets, adrenals, left ventricle and aorta in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Life Sci* 2005; 77(20):2514-28.

Reis F, Rocha-Pereira P, Teixeira de Lemos E, Parada B, Baptista S, Figueiredo A, Santos-Silva A, Costa-Almeida C, Mota A, Teixeira F. Oxidative stress in cyclosporine-induced hypertension: evidence of beneficial effects or tolerance development with nitrate therapy. *Transplant Proc* 2007; 39(8):2494-500.

Reis F, Tavares P, Fontes Ribeiro CA, Antunes F, Teixeira F. The peripheral serotonergic system and platelet aggregation in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Thromb Res* 1999; 96(5):365-72.

Reis F, Tavares P, Rito LC, Teixeira HM, Santos Dias JD, Ferrer-Antunes C, Mesquita JF, Teixeira F. Platelet activation is increased in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36(1):56-64.

Reis FN. The unsolved cyclosporine-induced kidney injury: is paricalcitol a feasible new renoprotective option? *Kidney Int* 2010; 77(12):1055-7.

Sánchez-Pozos K, Lee-Montiel F, Pérez-Villalva R, Uribe N, Gamba G, Sander M, Lyson T, Thomas GD, Victor RG. Sympathetic neural mechanisms of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9(11):121S-138S.

Sereno J, Parada B, Rodrigues-Santos P, Lopes PC, Carvalho E, Vala H, Teixeira-Lemos E, Alves R, Figueiredo A, Mota A, Teixeira F, Reis F. Serum and renal tissue markers of nephropathy in rats under immunosuppressive therapy: cyclosporine versus sirolimus. *Transplant Proc* 2013; 45(3):1149-56.

Stemmer K, Perez-Tilve D, Ananthakrishnan G, Bort A, Seeley RJ, Tschöp MH, Dietrich DR, Pfluger PT. High-fat-diet-induced obesity causes an inflammatory and tumor-promoting microenvironment in the rat kidney. *Dis Model Mech* 2012; 5(5):627-35.

Textor SC, Taler SJ, Canzanello VJ, Schwartz L, Augustine JE. Posttransplantation hypertension related to calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* 2000; 6(5):521-30.



Uz E, Bayrak O, Uz E, Kaya A, Bayrak R, Uz B, Turgut FH, Bavbek N, Kanbay M, Akcay A. Nigella sativa oil for prevention of chronic cyclosporine nephrotoxicity: an experimental model. *Am J Nephrol* 2008; 28(3):517-22.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7):RESEARCH0034.

Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y. Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int* 1998; Aug 54(2):482-91.

Wang S, Schmaderer C, Kiss E, Schmidt C, Bonrouhi M, Porubsky S, Gretz N, Schaefer L, Kirschning CJ, Popovic ZV, Gröne HJ. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. *Dis Model Mech* 2010; 3(1-2):92-103.

Xiao Z, Shan J, Li C, Luo L, Lu J, Li S, Long D, Li Y. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review. *Am J Nephrol* 2013; 37(1):30-40.

Zhang W, Victor RG. Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2000; 13(9):999-1004.



# CAPÍTULO VII

A conversão para Sirolimus melhora a nefropatia induzida pela Ciclosporina

- Biomarcadores em soro, urina e rim (genes e proteínas)



## 1. Introdução

Os inibidores da calcineurina, como a ciclosporina, são fármacos imunossupressores clinicamente importantes para a prevenção da rejeição do enxerto após o transplante de órgãos e também no tratamento de várias doenças autoimunes, tais como a psoríase, a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistémico, entre outras [Young et al., 1994; Paziana et al., 2013]. Apesar da notável redução no número de episódios de rejeição aguda após a introdução da CsA na prática clínica, a terapia de longo prazo é tipicamente associada ao aparecimento de nefrotoxicidade induzida pelo fármaco [Lebrancgu et al., 2011].

Evitar o uso de inibidores da calcineurina, em particular da CsA, na imunoterapia após transplante, tem sido visto como uma opção inválida por quase todos os centros de transplantação a nível mundial, principalmente por causa dos riscos de rejeição a curto prazo. Um dos principais objectivos a longo prazo da terapêutica imunossupressora pós-transplante é a redução do tempo de exposição ao fármaco, mantendo o enxerto funcional, minimizando os graves efeitos secundários, incluindo as infecções e a nefrotoxicidade [Dummer et al., 2012]. Várias estratégias têm sido tentadas como forma de minimizar os efeitos nefastos da CsA [Barbari et al., 2007]. A redução da dose está associada a uma melhoria modesta na função renal, mas a nefrotoxicidade induzida pela CsA é progressiva ao longo do tempo quando a exposição ao fármaco é mantida. Evitar completamente o uso da CsA está associado a maiores taxas de rejeição aguda e não tem sido uma opção. Assim, os protocolos de eleição da comunidade médica centram-se hoje na conversão da ciclosporina para outros fármacos, como o sirolimus (SRL), um inibidor do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) [Mota et al., 2005; Gordois et al., 2006; Campistol et al., 2009]. A conversão mais tardia de CsA para SRL obteve resultados variáveis, possivelmente porque a retirada foi realizada após os danos renais já serem muito extensos e

irreversíveis. A conversão precoce, por outro lado, antes de lesão renal significativa, está associada a melhorias em geral, incluindo da depuração da creatinina e de alguns marcadores de fibrose, assim como à diminuição da lesão crónica do enxerto. Contudo, esta a questão está longe de ser consensual, como o estudo CONVERT o demonstrou [Marti et al., 2005; Boratyńska et al., 2006; Ranga net al., 2006; Bunnapradist et al., 2009]. Apesar da literatura recente apontar para o aparecimento de proteinúria induzida pelo SRL, este fármaco tem sido indicado como um agente imunossupressor menos nefrotóxico, por si só, quando comparado com os inibidores da calcineurina [Weir et al., 2010; Almeida et al., 2013], mas a sua utilização depois da CsA tem um impacto sobre a função e a estrutura renal que deve ser melhor elucidado. O principal dilema hoje em dia é encontrar a duração mais adequada para a exposição da CsA e o momento apropriado para a substituição por outros fármacos menos nefrotóxicos, como o SRL, a fim de se obter uma renoprotecção sem comprometer o enxerto devido a episódio de rejeição aguda.

Sendo a nefrotoxicidade um importante contribuinte para o dano do enxerto ao longo do tempo, é crucial entender o impacto renal dos protocolos de conversão de CsA para SRL e identificar biomarcadores precoces para a toxicidade induzida pela CsA, e de seguimento pós-conversão para SRL, a fim de melhorar as estratégias terapêuticas após o transplante, por forma a aumentar a sobrevida do enxerto a longo prazo e reduzir as taxas de mortalidade associadas a factores cardiorenais. Os estudos experimentais em tecidos animais são essenciais para elucidar essas questões e ajudar a identificar a relevância de biomarcadores emergentes associados ao dano renal para esta situação específica, como o NGAL, o Kim-1, e o CTGF, entre outros. Esta identificação permitirá melhorar o conhecimento sobre a forma mais adequada de lidar com a nefropatia associada aos fármacos em questão.

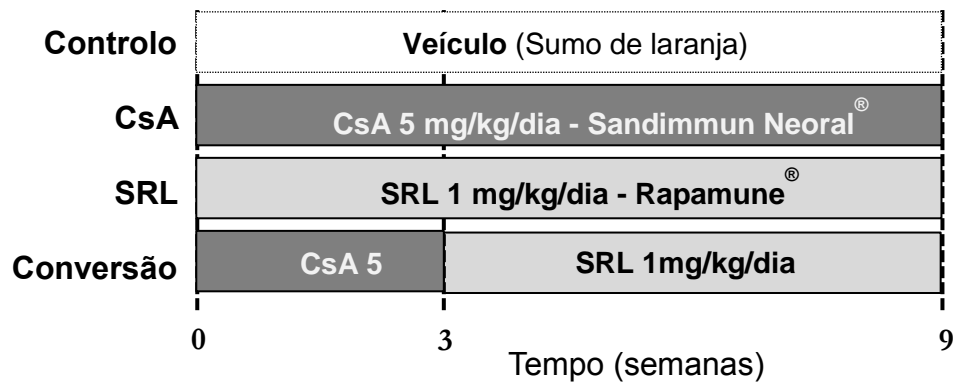
A parte A deste trabalho permitiu concluir que os mecanismos, e os biomarcadores, que estão envolvidos nos efeitos adversos da CsA sobre o tecido renal não são os mesmos a curto e a longo prazo. Para além disso, um estudo preliminar

mostrou que a conversão mais precoce de CsA para SRL promove um melhor perfil cardiorenal em relação à conversão mais tardia [Serenó, 2012]. Nesta parte do estudo pretendeu-se clarificar a evolução da nefropatia num protocolo de conversão precoce de CsA para SRL em rato, recorrendo a amostras de soro, urina e à expressão de genes e proteínas no tecido renal, como possíveis marcadores da evolução da disfunção e lesão renal.

## 2. Modelo animal

Neste estudo foram usados ratos Wistar machos, com 11 semanas de idade adquiridos à Charles River Laboratories (Barcelona, Espanha). Durante o estudo, os ratos foram alojados (dois animais por gaiola) em gaiolas apropriadas, submetidos a ciclos de 12h de luz/escuridão e com ração adequada ao tipo de estudo e animal (IPM-R20, Leticia, Barcelona, Espanha), tendo livre acesso à bebida (água). Quarenta e dois animais foram divididos em dois protocolos, de acordo com o período do tratamento (Figura 20). Dezoito animais foram utilizados num protocolo de 3 semanas de tratamento, divididos em 3 grupos: Controlo (veículo: sumo de laranja), ciclosporina (5 mg/Kg/dia de Sandimun Neoral<sup>®</sup>, Novartis Farma Produtos Farmacêuticos SA, Sintra, Portugal) e Sirolimus (1 mg/kg/dia de Rapamune<sup>®</sup>, Laboratórios Pfizer Lda., Lisboa, Portugal). Vinte e quatro animais foram utilizados num protocolo de 9 semanas de tratamentos e divididos em 4 grupos: Controlo (veículo), ciclosporina A (5 mg/Kg/dia), sirolimus (1 mg/kg/dia) e Conversão (ciclosporina A, 5 mg/Kg/dia, durante 3 semanas e Sirolimus, 1 mg/kg/dia, durante as últimas 6 semanas). Os tratamentos foram administrados por sonda esofágica e o peso corporal foi monitorizado diariamente. As experiências nos animais foram realizadas de acordo com as Directivas do Conselho Europeu para a experimentação animal (2010/63/EU) e as autoridades nacionais, sendo o estudo aprovado pelo comité de ética local para estudos de investigação em animais. Os animais foram mantidos num biotério certificado, em gaiolas individuais ventiladas, com as medidas adequadas para o bem-estar animal e redução do sofrimento durante os procedimentos, incluindo enriquecimento ambiental e anestesia/analgesia.





**Figura 20.** Diagrama ilustrativo dos grupos em estudo e protocolo dos tratamentos.

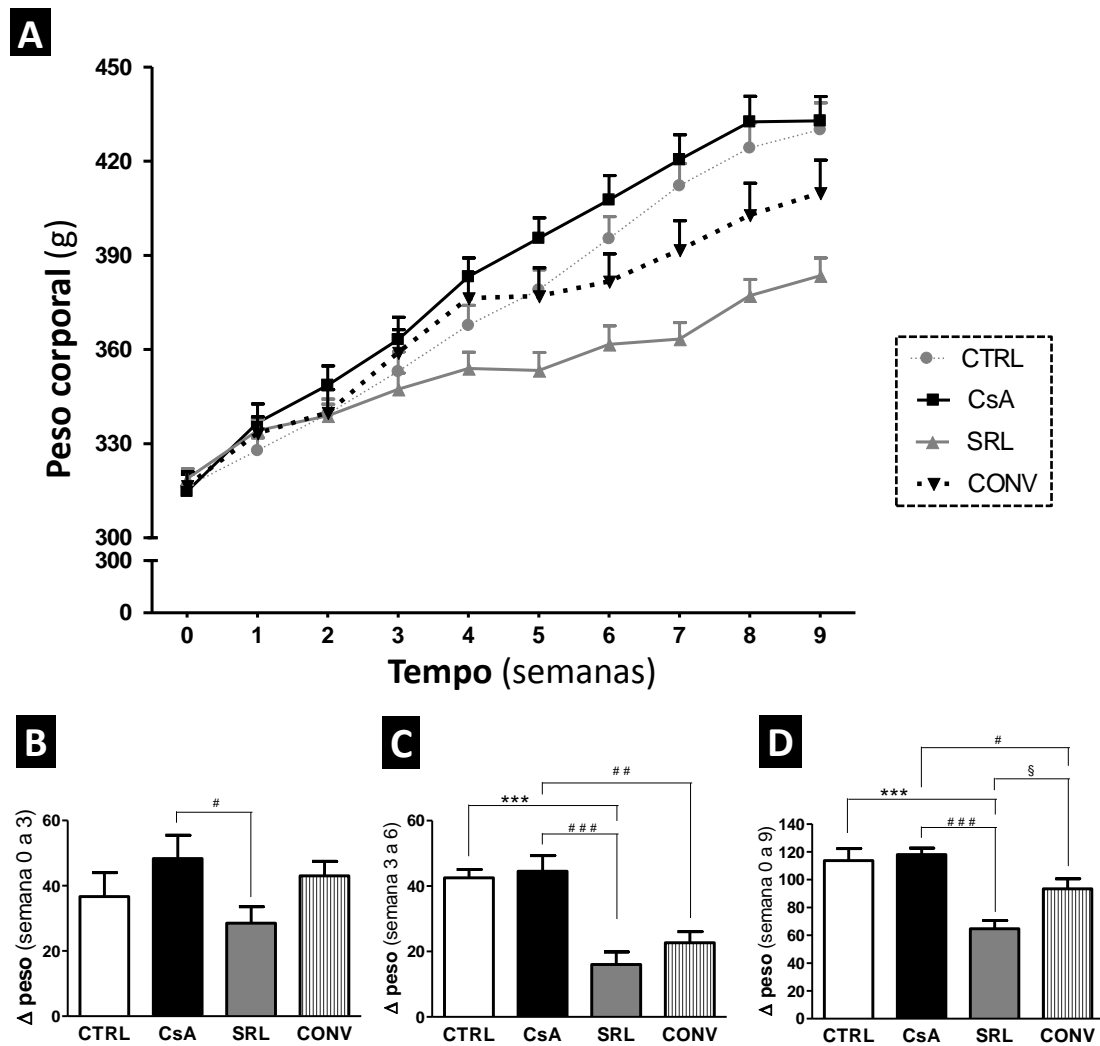
### 3. Resultados

#### 3.1. Concentração sanguínea dos fármacos

Foram obtidas concentrações sanguíneas “de vale” (seguindo os trabalhos anteriores realizados no instituto [Reis et al., 1999] de CsA ( $367,0 \pm 45,5$  ng/ml) e de SRL (de  $7,8 \pm 1,9$  ng/ml) que se encontravam dentro do intervalo obtido em humanos sob terapia imunossupressora com CsA e SRL.

#### 3.2. Monitorização do peso corporal

O peso corporal foi monitorizado durante as 9 semanas de tratamento (Figura 21). Os animais tratados com CsA apresentaram um perfil de peso corporal semelhante ao dos animais do grupo controlo. No entanto, os grupos tratados com SRL demonstraram uma redução do peso corporal ao longo dos tratamentos, o que foi notório quando administrada isoladamente, bem como quando a CsA foi substituída por SRL às 3 semanas de tratamento no grupo de conversão.



**Figura 21.** Evolução do peso corporal durante as 9 semanas de tratamento (**A**) e variação de peso corporal nas primeiras 3 semanas (**B**), das 3 às 6 semanas (**C**) e do início ao final do tratamento (**D**). \*\*\* $P < 0,001$  versus grupo Controlo; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  e ### $P < 0,001$  versus grupo CsA; § $P < 0,05$  e §§ $P < 0,01$  versus grupo SRL.

### 3.3. Dados bioquímicos e hematológicos

No que respeita ao perfil lipídico, a CsA induziu um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na concentração sérica de triglicéridos, que não foi evidente nos animais tratados com SRL (Tabela 2). A concentração sérica de colesterol total tendeu a aumentar em todos os grupos tratados em comparação com o grupo controlo, embora as diferenças não alcançassem significado estatístico. Os ratos tratados com CsA

mostraram hiperglicemia ( $P < 0,05$ ), que foi menos evidente nos 2 grupos de animais que foram tratados com SRL (SRL e conversão). Perfis semelhantes foram encontrados para as actividades da creatina cinase e transaminase glutâmico oxalacética, sugerindo cardio e hepatotoxicidade em resultado do tratamento com CsA, mas não com SRL (Tabela 2).

Quanto aos dados hematológicos, não foram encontradas diferenças significativas quanto à contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, número de plaquetas e plaquetócrito. No entanto, foi encontrada uma diminuição no número de glóbulos brancos no grupo tratado com CsA, que se manteve também reduzido no grupo conversão (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados bioquímicos e hematológicos após 9 semanas de tratamento.

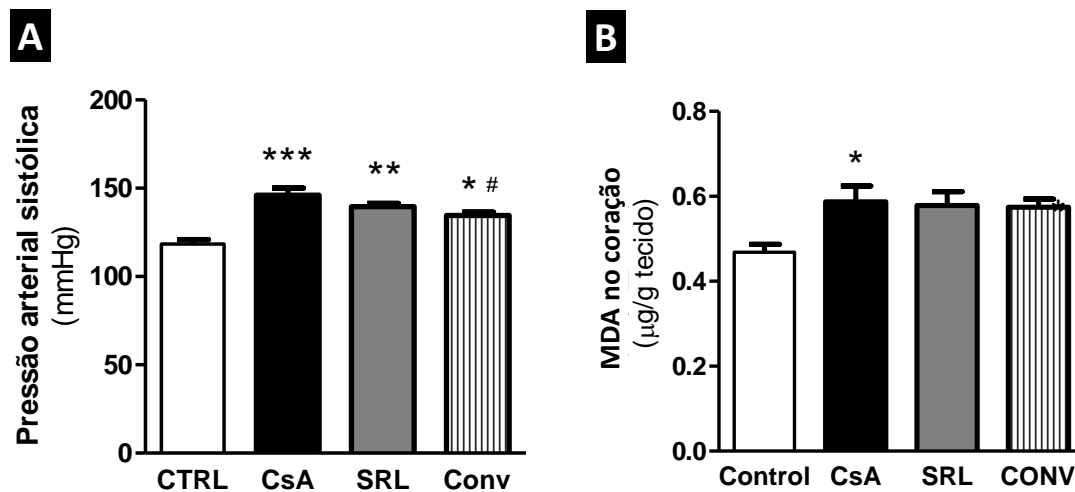
<b>Parâmetros</b>	<b>Controlo</b> (veículo)	<b>CsA</b> (5 mg/kg/day)	<b>SRL</b> (1 mg/kg/day)	<b>Conversão</b> (CsA → SRL)
<i>Dados bioquímicos</i>				
TGs (mmol/L)	1,13 ± 0,10	2,22 ± 0,20*	1,47 ± 0,15	1,22 ± 0,16 <sup>#</sup>
Col. total (mmol/L)	1,27 ± 0,04	1,44 ± 0,05	1,47 ± 0,13	1,43 ± 0,06
Glucose (mmol/L)	8,34 ± 1,04	16,42 ± 2,19*	13,38 ± 1,26	12,50 ± 1,24
Ácido úrico (µmol/L)	73,36 ± 12,06	97,55 ± 29,42	160,60 ± 21,17	79,70 ± 11,38
CK (µmol/L)	17342 ± 1452	51094 ± 20221	28356 ± 8001*	23198 ± 3017
TGO (IU/L)	69,67 ± 3,99	118,60 ± 33,62	95,17 ± 14,46	84,33 ± 9,97
TGP (IU/L)	38,17 ± 2,40	35,60 ± 3,33	34,83 ± 2,55	32,83 ± 2,06
<i>Dados hematológicos</i>				
GVs (x10 <sup>6</sup> /µL)	7,54 ± 0,12	7,84 ± 0,21	8,29 ± 0,23	8,10 ± 0,18
HCT (%)	39,27 ± 0,58	38,85 ± 0,88	41,63 ± 1,30	41,18 ± 0,85
Hb (g/dL)	14,15 ± 0,14	14,18 ± 0,30	14,87 ± 0,46	14,87 ± 0,32
PLT (x10 <sup>3</sup> /µL)	752,3 ± 30,7	711,0 ± 48,2	702,2 ± 57,9	685,5 ± 37,3
PCT (%)	0,45 ± 0,012	0,50 ± 0,02	0,45 ± 0,04	0,39 ± 0,02
GBs (x10 <sup>3</sup> /µL)	7,40 ± 0,71	3,88 ± 0,56*	8,35 ± 1,01 <sup>###</sup>	4,73 ± 0,54 <sup>§§</sup>

Os valores representam a média ± erro padrão da média de um n=6 por grupo. \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 versus grupo Controlo; #P<0,05 e ###P<0,001 versus grupo CsA; §P<0,05 e §§P<0,01 versus grupo SRL.

### 3.4. Pressão arterial e frequência cardíaca e peroxidação lipídica no tecido cardíaco

Para além do aumento da actividade da CK no grupo tratado com CsA verificou-se um aumento significativo da pressão arterial sistólica (P<0,001) (Fig. 22A). Ainda no mesmo grupo, constatou-se uma concentração mais elevada (P<0,05) de

MDA no tecido cardíaco, um indicador de peroxidação lipídica (Fig. 22B). Os animais tratados com SRL também demonstraram um aumento significativo da PAS, porém em magnitudes inferiores ( $P < 0,01$ ) aos registados com a CsA. A conversão de CsA para SRL revelou níveis mais baixos de PAS e peroxidação lipídica comparando com o grupo tratado com CsA.



**Figura 22.** Marcadores de cardiotoxicidade: Pressão arterial sistólica (A) e peroxidação lipídica (concentração de malondialdeído) no coração (B), nos 4 grupos em estudo no final das 9 semanas de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de um  $n=6$  por grupo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  versus grupo Controlo.

### 3.5. Avaliação histomorfológica no rim e marcação de colagénio

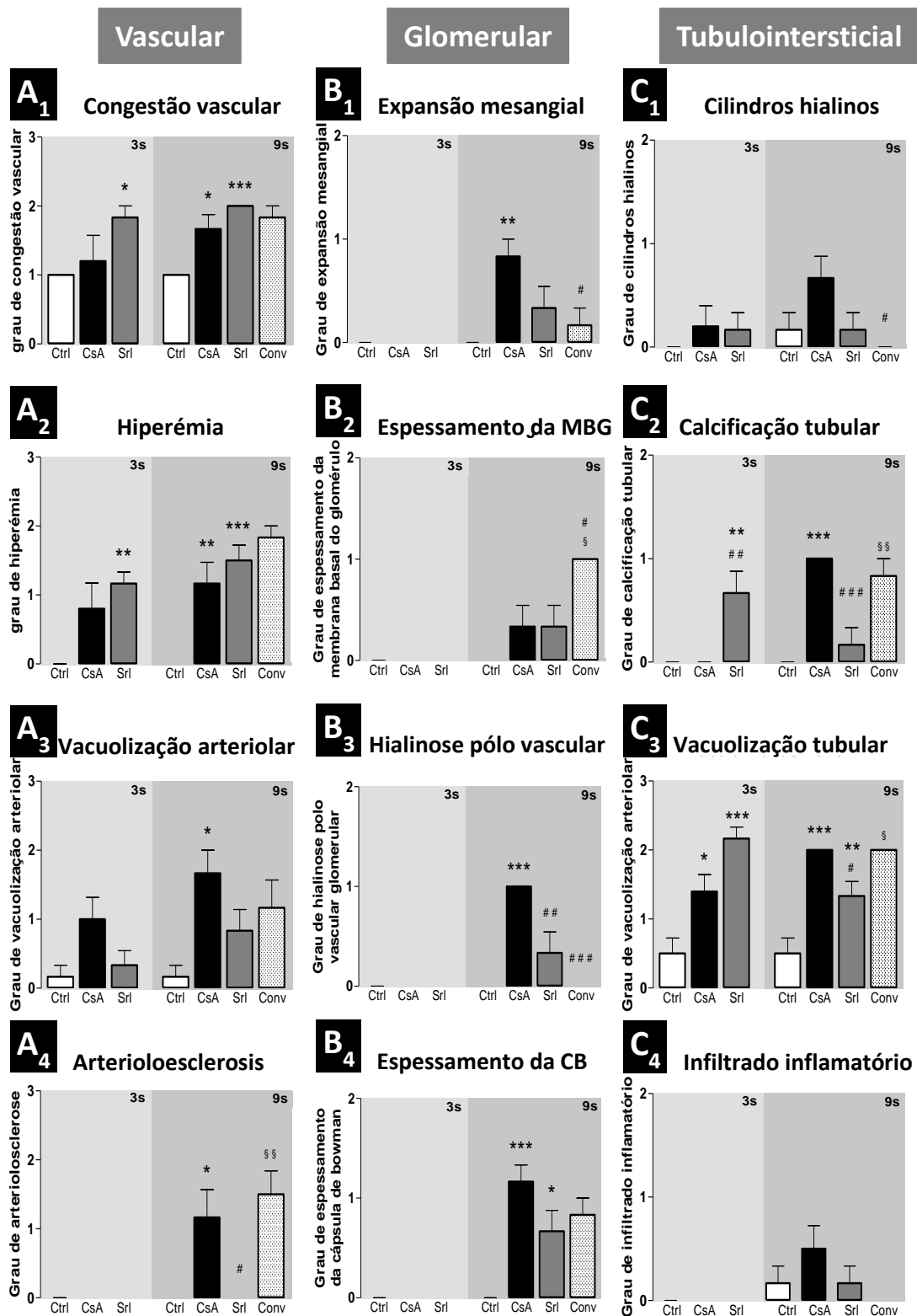
A nefrotoxicidade foi confirmada pela análise de lesões vasculares, glomerulares e tubulares, em cortes de rim corados com H&E e PAS. Após 3 semanas de tratamento com CsA apenas foram encontradas alterações morfológicas ligeiras nos túbulos (vacuolização tubular) quando comparadas com o grupo controlo (Figura 23). No entanto, maiores sinais de toxicidade foram identificados nos vasos uma vez que em alguns cortes de rim foi notória a presença de vacuolização arteriolar e hiperemia. O tratamento com SRL durante idêntico período, descrito na literatura como menos nefrotóxico que a ciclosporina, surpreendente, revelou algumas lesões a nível

vascular (congestão e hiperemia) e tubular (vacuolização e calcificação). O *score* global das lesões em cada campo mostrou que apenas o SRL foi capaz de induzir importantes danos nos vasos ( $P<0,05$ ) e túbulos ( $P<0,01$ ) após o primeiro período de 3 semanas (Figuras 24(a1) e 24(c1)).

O tratamento a longo prazo com CsA (9 semanas) promoveu alterações relevantes nas várias estruturas do rim (vasos, glomérulos e túbulos), as quais são consideradas sinais claros de nefrotoxicidade. As principais alterações encontradas em comparação com o controlo estão representadas na Figura 23. Na exposição longa com CsA, foi identificada congestão vascular, hiperemia vascular, vacuolização arteriolar e arterioloesclerose, sendo todas as variações estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo (Figura 23(A1-4)). O Sirolimus revelou um padrão semelhante ao encontrado para a CsA mas não induziu arterioloesclerose. O protocolo de conversão não promove qualquer vantagem no domínio vascular quando comparados com o tratamento isolado com CsA, uma vez que apenas dois ratos do grupo apresentaram arteriosclerose (graus 1 e 2).

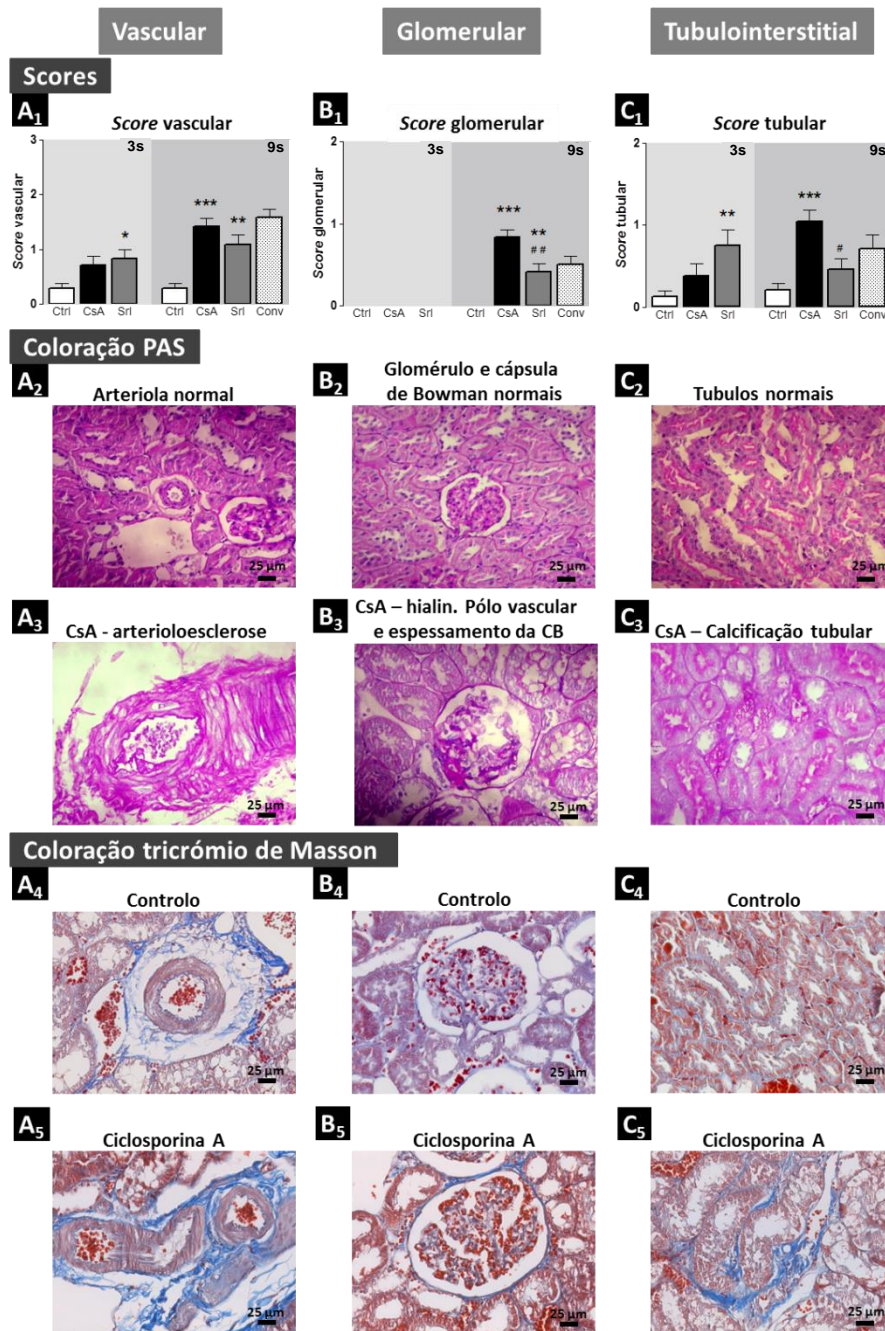
A nível glomerular, após 9 semanas de tratamento com CsA as principais lesões encontradas foram expansão mesangial ( $P<0,01$ ), hialinose do pólo vascular ( $P<0,001$ ) e espessamento da cápsula de Bowman ( $P<0,001$ ) em comparação com os rins dos ratos do grupo controlo (Figura 23(b1-4)). No tratamento com SRL a única lesão significativa encontrada foi o espessamento da cápsula de Bowman, confirmando um melhor perfil, também constatado no grupo da conversão. Expansão mesangial e hialinização do polo vascular foram lesões ausentes ou de grau baixo comparativamente aos ratos tratados com CsA. No entanto, todos os ratos do grupo de conversão apresentaram espessamento da membrana basal glomerular ( $P<0,05$  vs CsA). O *score* glomerular global mostrou claramente que o SRL é menos tóxico do que a CsA ( $P<0,01$ ) e isso reflectiu-se também num melhor perfil encontrado no grupo conversão.

A CsA induz danos tubulares e as principais lesões identificadas foram vacuolização tubular e calcificação ( $P < 0.001$ , ambos), em relação ao perfil normal encontrado nos ratos do grupo controlo (Figuras 23(C1-4) e 24(C2-3)). No entanto, foi identificada a presença de cilindros hialinos e infiltrado inflamatório em quase todos os rins (grau 1, menos de 25% dos túbulos). O tratamento com Sirolimus apenas induziu vacuolização tubular. Ainda assim, quando a utilização da CsA precedeu o uso de SRL (grupo de conversão), a calcificação e vacuolização tubulares permaneceram presentes no mesmo grau encontrado no tratamento isolado com CsA. Contudo, não foram detectados cilindros hialinos ( $P < 0,05$ ) nem infiltrado inflamatório nos rins do grupo conversão. A Figura 24(c1) dá uma ideia global sobre a influência dos tratamentos nos túbulos, onde fica claro que a CsA promove maior dano tubular que o SRL, e a conversão da ciclosporina para SRL revelou-se benéfica no sentido de haver menor grau total de lesões nos campos glomerular e tubular.



**Figura 23.** Avaliação semi-quantitativa das lesões vasculares (A), glomerulares (B) e tubulointerstitiais (C). Cada gráfico representa uma lesão para os 3 grupos na semana 3 (Controlo, ciclosporina A e Sirolimus) e 4 grupos na semana 9 (Controlo, ciclosporina A, sirolimus e conversão). Os valores são média ± e.p.m. \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001 versus grupo controlo; # P<0,05 e ### P<0,001, face ao grupo ciclosporina; § P<0,05 e §§ P<0,01 versus grupo Sirolimus. espessamento da CB, espessamento da cápsula de Bowman; Espessamento da MBG, espessamento da membrana basal glomerular.





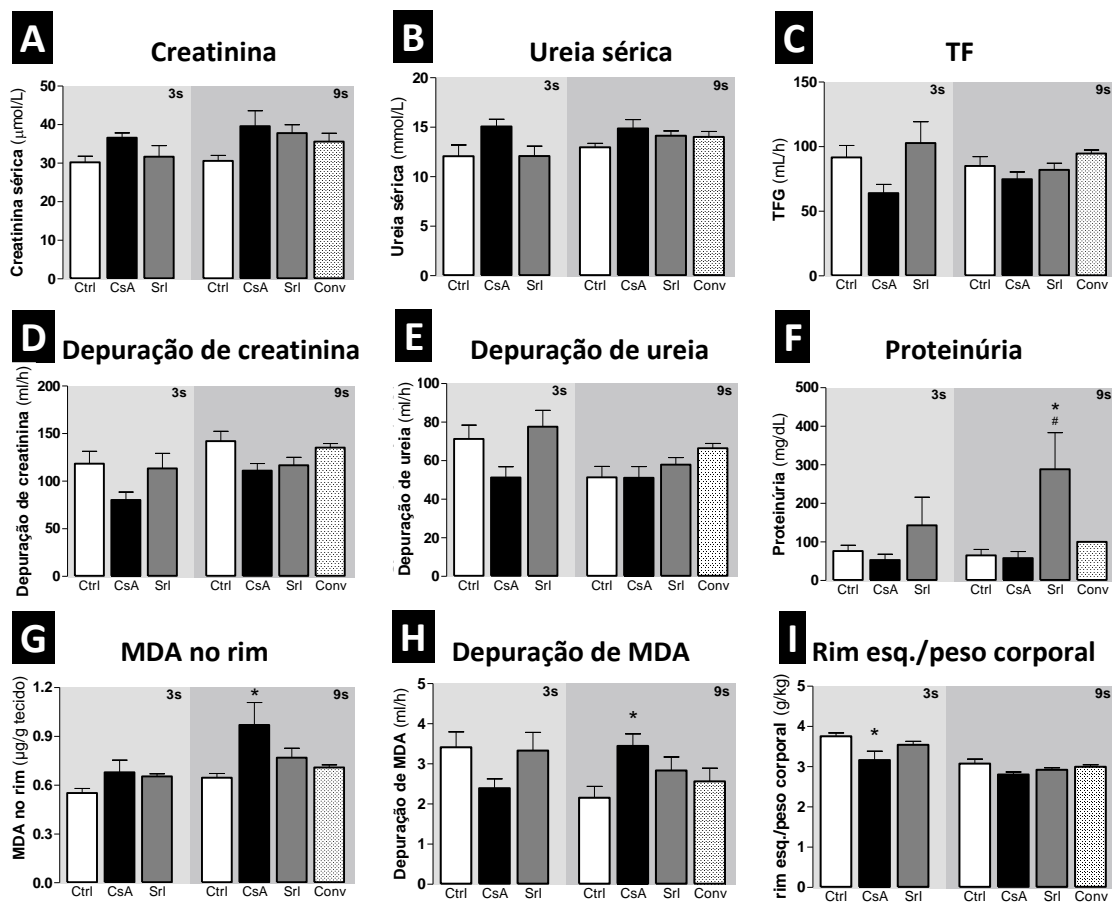
**Figura 24.** Score global das lesões vasculares (**A1**), glomerulares (**B1**) e tubulointerstitiais (**C1**) e fotos representativas de seções histomorfológicas renais coradas com PAS e com tricrómio de Masson, após 9 semanas de tratamento. A imagem **A2** representa uma arteriola renal normal do grupo de controlo e **A3** arterioesclerose, que estava presente em todos os rins tratados com CsA. **B2** e **B3** representam uma cápsula normal e pólo vascular hialinizado com espessamento da cápsula de Bowman, dos grupos controlo e CsA, respectivamente. **C2** e **C3** imagens correspondentes a túbulos normais do grupo controlo e calcificação tubular nos rins de ratos tratados com CsA, respectivamente. Fotomicrografias representativas de seções histomorfológicas renais com coloração tricrómio de Masson no grupo Controlo (**A4**, **B4** e **C4**) e ciclosporina A (**A5**, **B5** e **C5**), após 9 semanas de tratamento. A CsA promove a deposição de fibras de colagénio em torno de arteriolas, cápsulas de Bowman e túbulos (fibrose). Os valores são média  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao grupo controlo; #  $P < 0,05$  e ##  $P < 0,01$  versus grupo ciclosporina.

O colagénio é a principal proteína fibrosa insolúvel na matriz extracelular e no tecido conjuntivo e é claramente identificado na coloração com tricrómio de Masson; modificações na produção do colagénio reflectem mudanças celulares e consequente disfunção renal. Nos rins de ratos controlo, o colagénio era raro nos glomérulos e túbulos, sendo detectada uma pequena quantidade de coloração azul tricrómio em redor dos vasos (Figuras 24(a4-5), 24(5-b4), 24(C4-5)). Após 9 semanas de tratamento com CsA, a coloração era claramente visível nas extremidades exteriores das células tubulares (córtex e medula), visualizando-se em perfeitas condições a presença de fibrose intersticial. Também foi notória a deposição de colagénio na região da cápsula de Bowman, contribuindo este colagénio para aumentar a espessura da mesma; em redor dos vasos também se verificou maior deposição de colagénio nos ratos tratados com CsA. Os grupos Sirolimus e conversão revelaram coloração normal de colagénio (idêntica à encontrada no grupo controlo).

### **3.6. Avaliação da nefrotoxicidade através marcadores de soro, urina e no tecido renal**

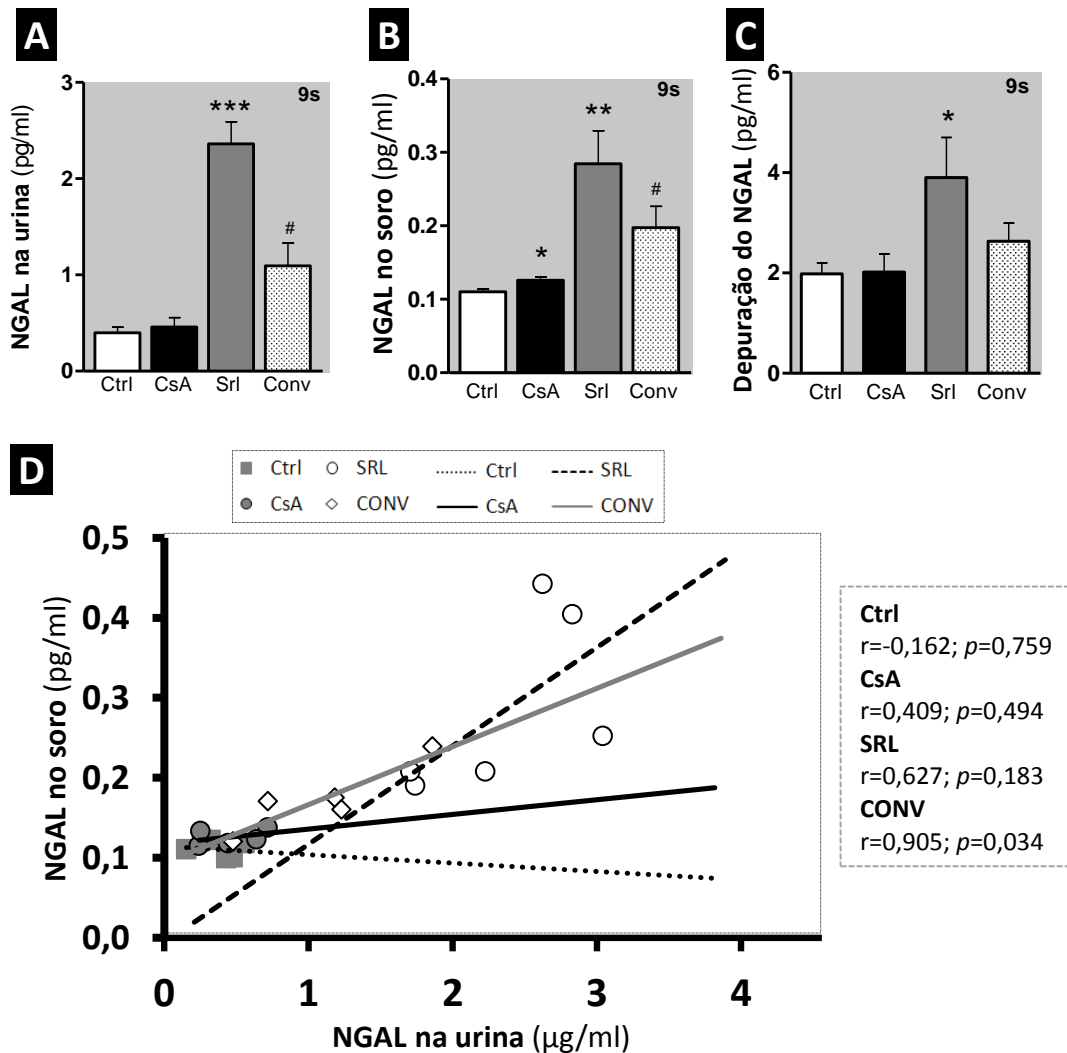
Os marcadores clássicos em soro que permitem avaliar a função renal, como a creatinina e a ureia, apresentaram um valor tendencialmente superior, ainda que não significativo, após as 3 semanas de tratamento com CsA, bem como uma tendência para diminuição das taxas de depuração de creatinina e ureia (Figuras 25(a), 25(b), 25(d) e 25(e)), respectivamente). Para além disso, a CsA mostrou uma tendência para diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). Por outro lado, foram detectados valores inalterados para o Grupo SRL para todos os marcadores de soro e urina. A longo prazo (9 semanas), o tratamento com CsA apresentou uma tendência de agravamento da creatinina e ureia séricas; para além disso, a TFG e a razão peso do rim/peso corporal estavam tendencialmente diminuídas, enquanto a concentração de MDA no tecido renal e a sua taxa de depuração aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ).

A principal mudança encontrada no tratamento com SRL após 3 semanas foi a presença de proteinúria, com um aumento notório após 9 semanas, indicando um efeito dependente do tempo de tratamento. O protocolo de conversão revelou uma normalização dos marcadores clássicos (creatinina e ureia no soro e clearances); mantendo-se inalterada a TFG, a concentração urinária de proteína e os níveis de peroxidação lipídica (Figura 25).



**Figura 25.** Marcadores séricos, urinários e tecidulares de função renal. Níveis séricos de creatinina (A) e respectiva clearance (D), níveis de ureia em soro (B) e respectiva clearance (E), taxa de filtração glomerular (C), proteína urinária (F), peroxidação lipídica no rim (níveis de malondialdeído) (G) e respectiva depuração (H) e razão do peso do rim sob o peso corporal (I), às 3 e 9 semanas para todos os tratamentos. Os valores são média ± e.p.m. \* P<0,05 versus grupo controlo; # P<0,05 em relação ao grupo Ciclosporina.

O NGAL tem sido descrito na literatura como um possível biomarcador de nefrotoxicidade. O tratamento com CsA a longo prazo promoveu um aumento da concentração desta proteína no soro ( $P < 0,05$ ) sem afectar os valores na urina e a taxa de depuração. Os ratos tratados com SRL apresentaram um aumento de NGAL sérico e urinário, assim como de depuração. O uso de SRL para substituir a CsA conduziu a um aumento dos níveis de NGAL sérico e na urina em comparação com o grupo CsA ( $P < 0,05$ ) (Figura 26(a), 26(b), e D7(c)). A Figura 26(d) mostra a correlação entre os valores de NGAL no soro e na urina; curiosamente, com apenas seis amostras de cada grupo, enquanto os grupos controlo e CsA foram incapazes de mostrar uma correlação (de *Pearson*) significativa, no grupo SRL houve uma linearidade ( $r = 0,627$ ,  $P = 0,183$ ), que foi ainda mais notória e estatisticamente significativa no grupo de conversão ( $r = 0,905$ ,  $P = 0,034$ ).

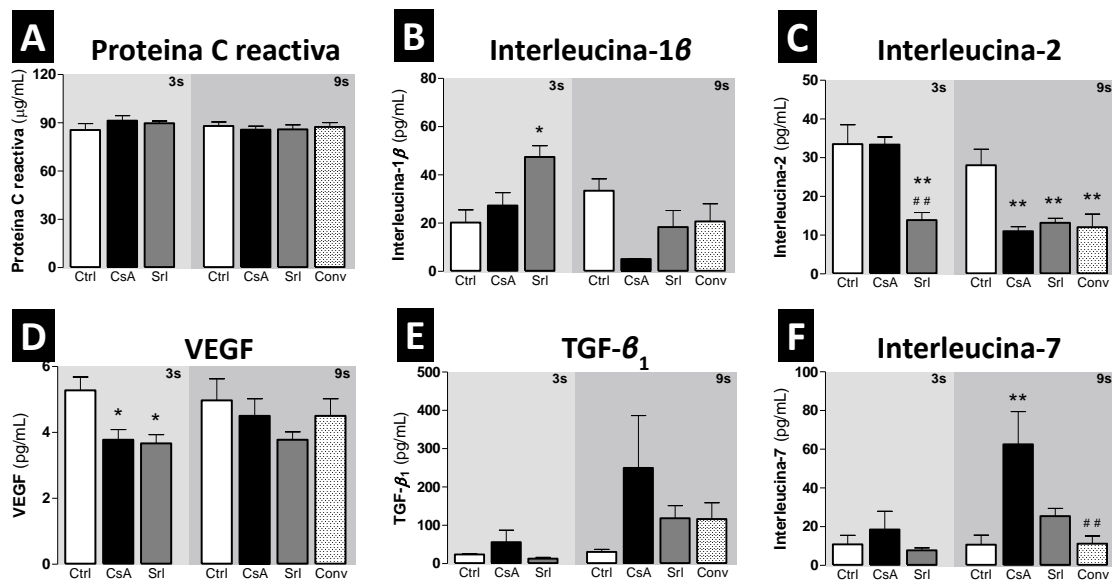


**Figura 26.** Quantificação de NGAL em soro e em urina e sua correlação, como marcador de toxicidade renal. Níveis de NGAL na urina (A), no soro (B), depuração (C) e correlação entre os valores de NGAL no soro e na urina (D) às 9 semanas de tratamento. Os valores são a média ± e.p.m. \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001 em relação ao grupo controle; # P<0,05 em relação ao grupo ciclosporina A.

### 3.7. Marcadores séricos de inflamação, proliferação e angiogénese

Neste modelo os valores séricos de proteína C reactiva de alta sensibilidade permaneceram inalterados em todos os grupos com terapia imunossupressora às 3 e 9 semanas. No entanto, o tratamento com SRL fez aumentar os níveis de IL-1 $\beta$  no tratamento mais curto enquanto a CsA provocou uma diminuição às 9 semanas

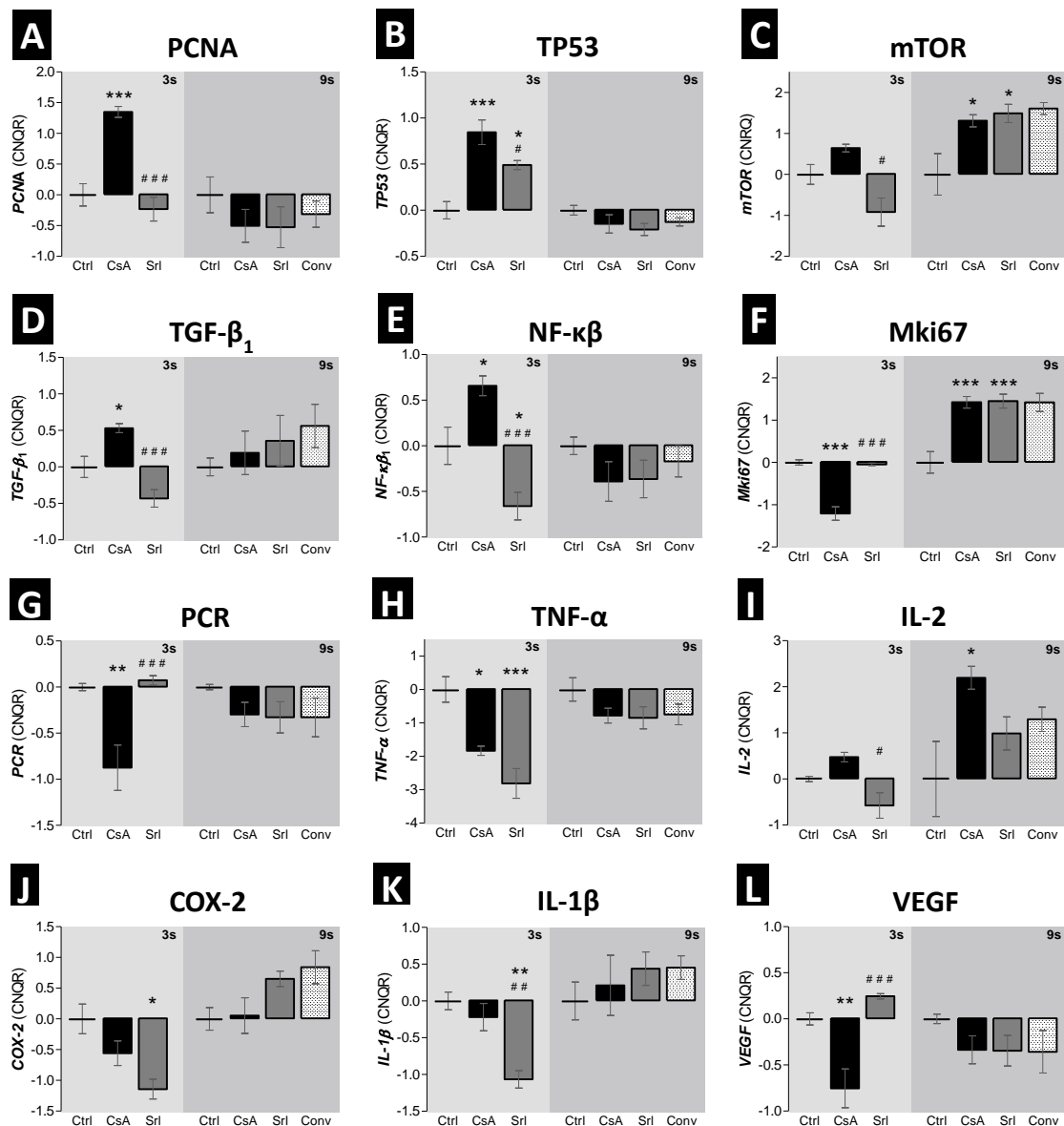
(Figuras 27(a) e 27(b)). A concentração sérica de IL-2, um marcador de inflamação e de actividade imunossupressora, diminuiu após 3 semanas de tratamento com SRL ( $P<0,01$ ). Redução idêntica ( $P<0,01$ ) foi verificada às 9 semanas em todos os grupos com terapia imunossupressora (CsA, SRL e conversão) comparativamente ao grupo controlo (Figura 27(c)). O conteúdo sérico de VEGF diminuiu no tratamento de curta duração para ambos os fármacos, com valores inalterados nos protocolos de longa duração. Os níveis séricos de TGF- $\beta$  aumentaram ligeiramente às 3 semanas, e de forma mais pronunciada após 9 semanas de tratamento com CsA (Figuras 27(e) e 27(f)). Curiosamente, foi encontrado um padrão idêntico para os níveis de IL-7 no soro, mostrando correlação significativa com os valores de TGF- $\beta_1$  séricos nos tratamentos de curta e longa duração ( $r=0,871$ ,  $P=0,129$ ;  $r=0,873$ ,  $P=0,053$ , respectivamente, com a correlação de *Pearson*).



**Figura 27.** Marcadores séricos de inflamação, proliferação e angiogénese. Concentração sérica de proteína C reactiva (A), interleucina-1 $\beta$  (B), interleucina-2 (C), factor de crescimento do endotélio vascular (D), factor de crescimento transformante beta-1 (E) e interleucina-7 (F). Os valores são média  $\pm$  e.p.m. \*  $P<0,05$  versus grupo controlo; #  $P<0,05$  em relação ao grupo ciclosporina A.

### **3.8. Expressão génica no rim de marcadores de proliferação, fibrose, inflamação e angiogénese**

Foram avaliados vários marcadores de proliferação, fibrose, inflamação e angiogénese por expressão de ARN mensageiro no rim, às 3 e 9 semanas, para os três protocolos de imunossupressão, em comparação com o grupo controlo (Figura 28). Após 3 semanas de tratamento com CsA, verificou-se uma regulação negativa significativa do antigénio identificado pelo anticorpo monoclonal de Ki67 (*Mki67*) ( $P < 0,001$ ), PCR ( $P < 0,01$ ), *TNF- $\alpha$*  ( $P < 0,05$ ) e *VEGF* ( $P < 0,01$ ) (Figura 28). No entanto, a expressão da *IL-2*, *COX-2*, *mTOR* e *IL-1 $\beta$*  permaneceram inalteradas. Para além disso, verificou-se um aumento significativo da expressão dos genes que codificam a proteína do antigénio nuclear de proliferação celular (*PCNA*) e a proteína p53 (*TP53*) ( $P < 0,001$ ), acompanhado por um ligeiro aumento ( $P < 0,05$ ) da expressão de *TGF- $\beta_1$*  e de *NF- $\kappa$ B*. Por outro lado, o inibidor da mTOR (SRL) apenas estimulou a expressão do gene *TP53* e regulou negativamente alguns marcadores inflamatórios (*TNF- $\alpha$* , *COX-2* e *IL-1 $\beta$* ). No tratamento mais longo de CsA quase todos os genes apresentaram uma expressão normal comparativamente ao grupo controlo. No entanto, foi encontrada uma sobre-expressão significativa de *IL-2*, *mTOR* e *Mki67*. Nos grupos SRL e conversão apenas os genes da *mTOR* e *Mki67* permaneceram com sobre-expressão, em contraste com o que foi observado com as exposições dos fármacos às 3 semanas (figura 28).

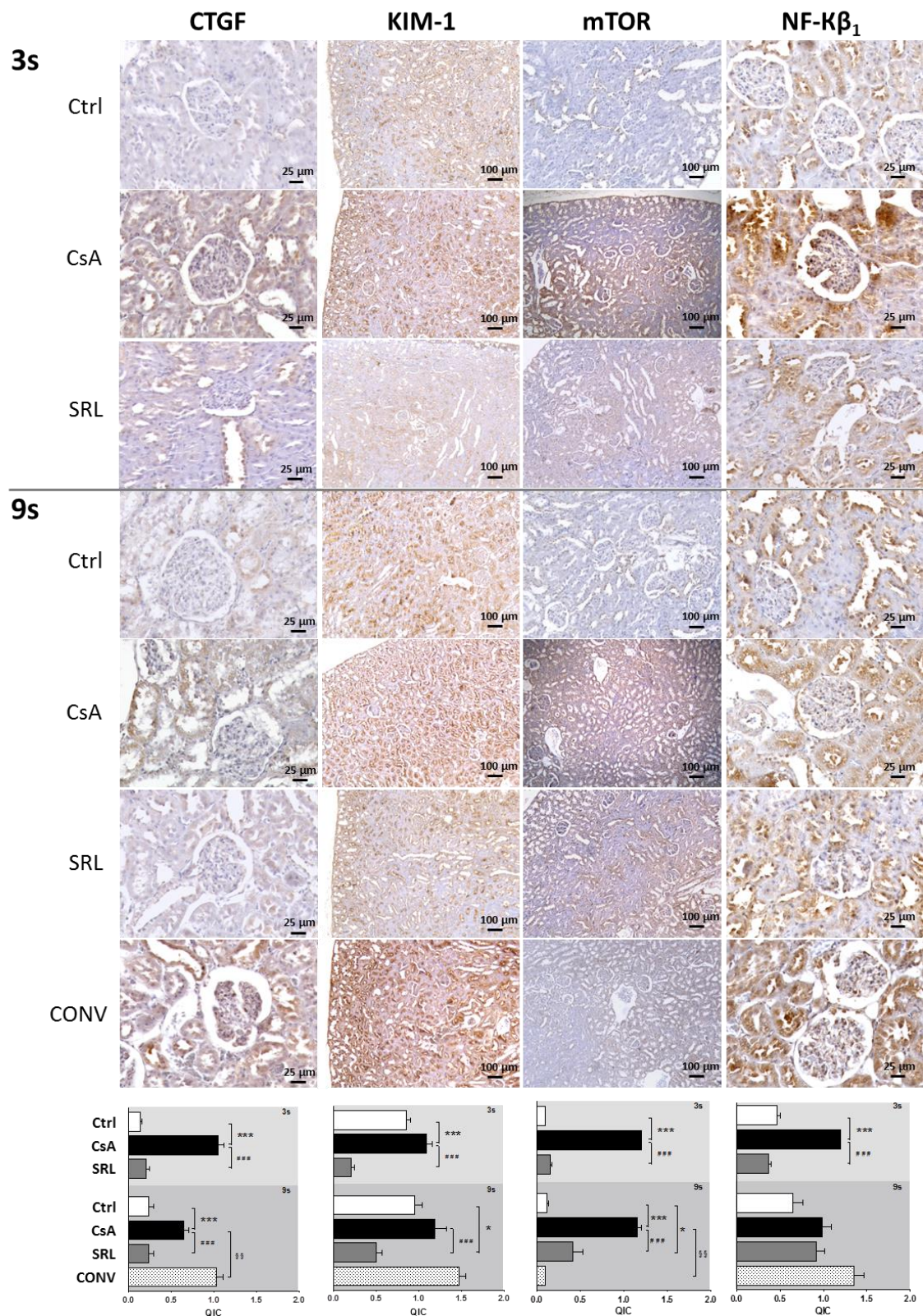


**Figura 28.** Expressão génica (ARN) no rim de mediadores de proliferação, fibrose, inflamação e angiogénese. *PCNA* (A), *TP53* (B), *mTOR* (C), *TGF-β<sub>1</sub>* (D), *NF-κB* (E) e *Mki67* (F) como marcadores de proliferação e fibrose; *PCR* (L), *TNF-α* (H), *IL-2* (I), *COX-2* (J) e *IL-1β* (K) como marcadores de inflamação e *VEGF* (L) como marcador de angiogénese. Os valores são média de CNRQ (“calibrated normalized relative quantities”) em função do grupo controlo ± e.p.m. \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001 versus grupo controlo; # P<0,05, ## P<0,01 e ### P<0,001, versus grupo Ciclosporina A. COX-2, ciclooxigenase-2; PCR, proteína C reactiva; IL-1β, interleucina-1 beta; IL-2, interleucina-2; Mki67, antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67; mTOR, alvo da rapamicina em mamíferos; NF-κB, factor nuclear kappa Beta; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; TGF-β<sub>1</sub>, factor de crescimento transformante beta 1; TNF-α, factor de necrose tumoral alfa; TP53, proteína p53; VEGF, factor de crescimento do endotélio vascular.

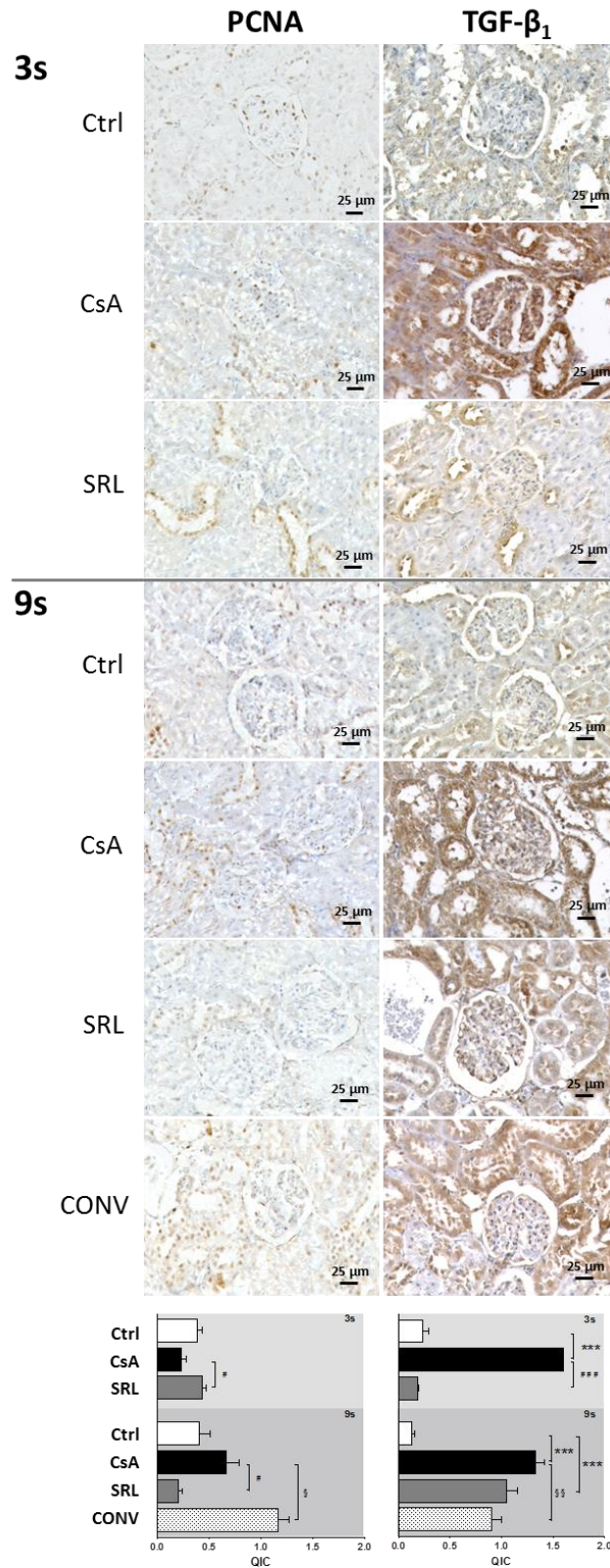


### 3.9. Expressão proteica no rim por imunohistoquímica

O tratamento de curta duração com CsA aumentou a expressão das proteínas CTGF, Kim-1, mTOR, NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> e TGF- $\beta$  (P<0,001), enquanto o tratamento com SRL não promoveu alterações na expressão destas proteínas, comparando com o grupo controlo (Figuras 29 e 30). O tratamento a longo prazo com CsA promoveu um aumento na expressão da mTOR, TGF- $\beta$  e CTGF, em comparação com o grupo controlo, mas as duas últimas proteínas apresentam menor área e intensidade da coloração (*score QIC*), quando comparado com o tratamento de apenas 3 semanas de CsA. A expressão renal de Kim-1, NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> e PCNA permaneceram inalteradas no tratamento mais longo de CsA versus o grupo controlo. O tratamento com SRL promoveu, após 9 semanas, uma diminuição da expressão de Kim-1 e uma sobre-expressão de TGF- $\beta$ . No protocolo de conversão verificou-se um aumento da expressão de CTGF e de PCNA, enquanto a expressão de mTOR e de TGF- $\beta$  diminuíram significativamente, comparativamente ao grupo CsA (Figuras 29 e 30).



**Figura 29.** Expressão proteica no rim por marcação imunohistoquímica. Factor de crescimentodo tecido conjuntivo (CTGF), molécula-1 de lesão renal (Kim-1), alvo da rapamicina no mamífero (mTOR) e factor nuclear kappa beta-1 (NF-κB1). Cada figura é representativa dos 3 grupos às 3 semanas (controlo, ciclosporina A e sirolimus) e 4 grupos às 9 semanas (controlo, ciclosporina A, sirolimus e conversão).



**Figura 30.** Expressão proteica no rim por marcação imunohistoquímica. Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e factor de crescimento transformante beta 1 (TGF-β). Cada figura é representativa dos 3 grupos às 3 semanas (controlo, ciclosporina A e sirolimus) e 4 grupos às 9 semanas (controlo, ciclosporina A, sirolimus e conversão).



## 4. Discussão

A monitorização da terapêutica imunossupressora em doentes com transplante de órgãos sólidos é baseada na medição de indicadores de rejeição do transplante alogénico, bem como na avaliação regular dos níveis do fármaco no sangue, que devem ser mantidos dentro da janela terapêutica do fármaco, a fim de manter a eficácia imunossupressora sem excessivos e/ou indesejados efeitos secundários. A avaliação da nefrotoxicidade relacionada com o fármaco é geralmente baseada em marcadores séricos clássicos de função renal, que são mais fáceis de realizar e menos dispendiosos; no entanto, uma quantidade crescente de evidências sugere que estes marcadores não reflectem com precisão o estado da função renal num determinado ponto de tempo de uso dos fármacos. De facto, os marcadores tradicionais de função renal, tais como a concentração sérica de ureia e de creatinina, têm sido descritos como insensíveis, porque apenas aparecem alterados quando 70-80% da massa renal epitelial já se encontra perdida [Han et al., 2002; Rached et al., 2008]. O uso de amostras não-invasivas (como a urina) tem sido apontado como uma opção para monitorizar a toxicidade de fármacos. No entanto, a presença de enzimas e um elevado número de proteínas pode levar a alguma instabilidade da amostra, traduzindo-se em alta variabilidade dos valores analisados [Rached et al., 2008]. A identificação de biomarcadores potencialmente úteis no sangue periférico e na urina, em comparação com marcadores tecidulares renais (gene ou proteína), será clinicamente muito importante. O presente estudo pretendia clarificar as vias de evolução da nefropatia num protocolo de conversão de ciclosporina para SRL em ratos, focando-se em amostras de soro, urina, tecido renal (gene e proteína), bem como elucidar o envolvimento de biomarcadores emergentes de dano renal que sejam possíveis candidatos na evolução da disfunção renal (sem lesões) para um estágio mais avançado de nefrotoxicidade (moderada a crónica).

Para além da análise do impacto que os fármacos, e o protocolo de conversão, tiveram a nível renal, procedeu-se a uma avaliação metabólica e cardíaca com marcadores de uso clínico. Verificámos, como esperado, que a CsA promove alterações cardíacas, com aparecimento de hipertensão e taquicardia, aumento da actividade da creatina cinase e da concentração sérica de glicose, bem como aumento do stresse oxidativo no coração. O SRL promoveu efeitos metabólicos menos marcados, mas a nível cardíaco verificou-se o aparecimento de hipertensão (sem taquicardia), para além do abrandamento do crescimento dos animais, o que poderá estar associado ao seu carácter anti-proliferativo [Diekmann et al., 2006]. A conversão de CsA para SRL produziu menos efeitos secundários, nomeadamente os relacionados com o perfil metabólico e também os valores de hipertensão induzida pela CsA, o que está em linha com alguns estudos anteriores [He et al., 2009; Stephany et al., 2009; Zeier et al., 2009; Laham et al., 2010].

No nosso estudo, os marcadores séricos e urinários clássicos foram incapazes de reflectir com precisão as alterações na função renal após os tratamentos de curta e de longa duração de CsA, apesar da presença de lesão renal, que foi mais pronunciada no maior tempo de exposição à CsA. Estes dados vêm de encontro ao que Han em 2002 e Rached em 2008 apontaram sobre a insensibilidade destes marcadores para descrever o real estado patológico do rim. Este facto demonstra a necessidade de melhores biomarcadores de disfunção/dano renal. Quanto à caracterização da lesão renal, verificámos que os vasos são as primeiras estruturas renais afectadas pelo uso da CsA, apenas após 3 semanas de tratamento. Verificou-se a presença de algumas lesões, como a hiperemia vascular e vacuolização arteriolar (que pode estar relacionada com o aparecimento de hipertensão), sendo as lesões ainda mais agravadas com a exposição prolongada à CsA. Estes dados complementam a informação de que os primeiros sinais patológicos da CsA estão relacionados com a vasoconstrição arteriolar aferente, a microangiopatia trombótica e a vacuolização tubular [Naesens et al., 2009]. Para além disso, os sinais agudos da

exposição à CsA estão relacionados com uma diminuição da vasodilatação e um aumento da vasoconstrição e formação de radicais livres, que estão entre os principais mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de hipertensão e diminuição da taxa de filtração glomerular [Roullet et al., 1994]. O SRL tem sido descrito como um agente menos nefrotóxico do que a CsA [Luo et al., 2013], o que explica o facto dos inibidores da mTOR serem indicados para substituir a CsA [Mota et al., 2005; Campistol et al., 2009]. De acordo com os nossos resultados histomorfológicos, o SRL induz menor toxicidade a nível vascular, glomerular e tubular que a CsA, e este facto justifica um melhor perfil no grupo de conversão; no entanto, a congestão vascular, a hiperemia e a arterioesclerose não foram prevenidas com a utilização do SRL após a CsA. No geral, podemos concluir que o *score* vascular total no grupo de conversão se manteve semelhante ao grupo de CsA, mas os *scores* globais glomerular e tubular foram claramente reduzidos com o protocolo de conversão. Para além disso, nos ratos tratados com CsA houve desenvolvimento de fibrose renal através da formação e deposição de colagénio em redor dos vasos e túbulos, contribuindo a nível glomerular para o espessamento das cápsulas de Bowman. O SRL, por si só, ou mesmo após o tratamento com CsA, não promoveu fibrose ou deposição de colagénio. Após 3 semanas de exposição à CsA foram encontradas apenas ligeiras modificações (ou mesmo ausentes em alguns casos) na estrutura de tecido; no entanto, após a exposição a longo prazo à CsA, foram observadas significativas lesões glomerulares, tubulares e vasculares. Apesar disso, na semana 9 os marcadores renais utilizados na prática clínica (TFG, creatinina e ureia no soro e taxas de depuração) apareceram apenas tendencialmente alterados. Adicionalmente, observámos uma variação interessante nos níveis de depuração de MDA entre as 3 e as 9 semanas de tratamento com CsA, quando as lesões estavam ausentes/ligeiras (3 semanas) e quando estavam bem evidenciadas no tecido renal (9 semanas). Os nossos dados sugerem que a clearance de MDA poderia ser um marcador preditivo de nefrotoxicidade induzida pela CsA, pois a clearance aparece diminuída às 3 semanas

---

(ainda sem lesões), e aumenta na presença de lesões às 9 semanas. O stresse oxidativo pode promover a formação/libertação de uma variedade de agentes vasoactivos [Garcia-Cohen et al., 2000] que podem afectar a função renal directamente, causando vasoconstrição renal ou diminuindo o coeficiente de ultrafiltração glomerular capilar, levando assim à redução da taxa de filtração glomerular. Para além disso, a relação entre a proteinúria e a nefrotoxicidade induzidas pela CsA é complexa, o que limita o seu poder como um marcador precoce [O'Connell et al., 2011]. A peroxidação lipídica ocorre como resultado da reacção de lipídios multi-insaturados com agentes oxidantes, promovendo stresse oxidativo nas estruturas renais. O MDA urinário reflecte a presença de dano renal, o que pode ser a causa ou a consequência da peroxidação lipídica e a correlação entre a depuração de MDA e o grau de lesão renal, podendo ser esta uma possível estratégia para identificar precocemente a nefrotoxicidade induzida pela CsA. A presença de baixo grau de lesões no tratamento crónico com SRL e nos grupos de protocolo de conversão reforçam essa ideia, tanto mais que não houve aumento significativo na depuração de MDA para ambos os grupos.

O desenvolvimento de um biomarcador não invasivo que possa diagnosticar a disfunção renal de forma precoce e também monitorizar a resposta à terapia, será clinicamente muito valioso. É também importante reconhecer que as alterações do conteúdo sérico de creatinina e de ureia reflectem, primariamente, alterações funcionais na capacidade de filtração e não são genuínos marcadores de lesão [Urbschat et al., 2011]. Nos últimos anos, tem havido um esforço para identificar biomarcadores mais precisos da nefrotoxicidade aguda induzida por ciclosporina. A proteína lipocalina gelatinase associada aos neutrófilos (NGAL) tem sido apontada como um biomarcador preciso de nefrotoxicidade [Mishra et al., 2003; Mishra et al., 2004]. O NGAL na urina e no plasma pode ser encontrado 10.000 e 100 vezes aumentado em casos de lesão renal, respectivamente, face aos valores considerados basais. Isto poderá fazer do NGAL um marcador renal potencialmente muito sensível a

diferentes graus de lesão renal. No entanto, de acordo com os nossos dados, em tratamentos de curta e longa duração com CsA (claramente descrita como um fármaco nefrotóxico) não houve alteração dos níveis séricos e urinários de NGAL. Curiosamente, as concentrações em urina e em soro apresentaram linearidade no grupo SRL e uma forte correlação no grupo de conversão. O SRL está descrito na literatura como um agente menos nefrotóxico do que os inibidores de calcineurina, mas um dos efeitos apontados ao SRL é o desenvolvimento de proteinúria [Cai et al., 2011; Cinà et al., 2012]. A elevação dos níveis urinários e séricos de NGAL nos ratos tratados com SRL no nosso estudo poderá estar relacionada com o aparecimento de proteinúria. Recentemente, um modelo animal em que a proteína mTOR se encontrava reprimida, verificou-se uma acumulação de vesículas autolisossómicas nos podócitos que potenciavam o aparecimento de proteinúria [Cinà et al., 2012] e a redução da actividade da AKT, afectando assim o citoesqueleto do podócito [Vassiliadis et al., 2011]. Para além disso, a nível tubulointerstitial, a inibição de mTOR usando rapamicina tem um papel no transporte de proteína, pois reduz a reabsorção tubular de proteínas o que contribui para o aumento dos níveis urinários [Straathof-Galema et al., 2006]. Adicionalmente, um bloqueador do receptor da angiotensina II foi capaz de contrariar o efeito do sirolimus, não só através de alterações hemodinâmicas, mas também, em parte, pela reparação da lesão dos podócitos [Cai et al., 2011].

Neste estudo, encontramos um aumento tendencial do TGF- $\beta_1$  renal nos ratos tratados com CsA, desde as 3 semanas e aumentado com a exposição prolongada, podendo este factor ser um hipotético biomarcador de progressão da nefrotoxicidade. Curiosamente, foi verificado um padrão idêntico para a IL-7 no soro, verificando-se uma correlação significativa com os conteúdos séricos de TGF- $\beta_1$  nos tratamentos de curto e longo prazo. A IL-7 é produzida pelas células do estroma e liga-se às células T, que expressam o receptor de IL-7 (IL-7R), excepto as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Os níveis de IL-7 em circulação aumentam durante períodos de linfopenia



para manter a regulação das células T nativas e suportar a expansão periférica dependente do timo e manter as células T maduras [Dean, 2008], aumentando a expressão da proteína Bcl-2, que tem propriedades anti-apoptóticas [Litjens et al., 2006; Chetoui et al., 2010]. O tratamento com CsA deprime o sistema imunitário, especialmente o número e activação das células T mas, alternativamente, as restantes células do sistema imunitário podem contrariar a depressão imunológica, aumentando os níveis de IL-7, o que pode ser correlacionado com a progressão da doença renal crónica no presente estudo.

As alterações na expressão de ARNm são consideradas um dos eventos primários a nível celular, que também podem ocorrer em resposta a danos celulares e tecidulares; especulou-se que estes biomarcadores poderiam ajudar a prever os efeitos adversos antes dos actuais marcadores padrão (biomarcadores clínicos e histopatologia) indicarem a presença de lesão. As teorias actuais indicam que a lesão renal também é causada por factores não imunológicos, tal como a isquémia, que leva à activação de vários mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos [Li et al., 2009]. Li e Yang (2009) sugeriram que o dano renal envolve a activação da resposta imune inata que causa a activação do  $NF-\kappa\beta$  e induz a maturação de células dendríticas e a infiltração de linfócitos T no enxerto, com ambas as vias a levarem à inflamação e fibrose intersticiais que contribuem para a nefropatia crónica. Em concordância, os nossos dados confirmam que a toxicidade da CsA pode começar com o aumento da expressão do gene  $NF-\kappa\beta$  (por *RT-qPCR*), confirmada também pela sobre-expressão da proteína (por marcação imunohistoquímica) após 3 semanas de tratamento. No entanto, este efeito encontra-se suprimido no tratamento mais prolongado de CsA. O tratamento com SRL reduziu os níveis de ARNm, resultando na expressão normal da proteína, comparativamente ao grupo controlo, tanto nos tratamentos a curto como a longo prazo, indicando que este factor nuclear poderia ter um impacto importante no desenvolvimento de nefrotoxicidade. No final do protocolo de conversão (CsA substituída por SRL), não houve diferenças na expressão genética mas permaneceu

um aumento da expressão da proteína na região tubulointersticial, provavelmente devido à exposição prévia da CsA. No nosso modelo animal, o tratamento com CsA a curto prazo está associado a um aumento dos níveis de ARNm para o *TGF-β1* e *PCNA* no tecido renal, que estão identificados como mediadores chave de fibrose e proliferação [Li et al., 2009; Park et al., 2010]. No entanto, essas alterações foram acompanhadas por uma resposta anti-inflamatória, uma vez que os marcadores de inflamação (incluindo *COX-2*, *TNF-α* e PCR), bem como de proliferação celular (*Mki67*) e angiogénese (*VEGF*) foram reprimidos, talvez responsáveis pela atenuação dos efeitos citotóxicos da CsA num tratamento curto. Uma maior sobre-expressão de *NF-κβ* e *TP53* podem ser vistos neste modelo como uma resposta compensatória, uma vez que inibem a mTOR [Feng et al., 2005]. O tratamento curto de SRL revelou propriedades anti-inflamatórias, anti-fibróticas e anti-proliferativas, vistas pela regulação negativa dos níveis de ARNm renal do *TNF-α*, *COX-2*, *IL-1β*, *TGF-β1*, *NF-κβ* e *mTOR*. Na exposição prolongada à CsA, a nefrotoxicidade evoluiu com o tempo, como observado pelo aumento do grau de lesões histológicas, o que parece estar associado com outras vias moleculares e mediadores. Na verdade, houve uma significativa sobre-expressão do gene *Mki67*, contrariamente à que foi observada depois do tratamento curto, sugerindo um esgotamento das respostas contra-reguladoras, que foi acompanhado paralelamente por um aumento da expressão de mTOR, uma cinase serina/treonina, importante na regulação do crescimento celular, na proliferação, na motilidade, na síntese de proteínas e na transcrição [Park et al., 2010]. Como Lieberthal e Levine (200) demonstraram, a mTOR tem um importante papel na mediação do processo de regeneração e recuperação, de acordo com a extensão do dano renal. Para além disso, a actividade da mTOR é baixa ou ausente no rim normal, mas aumenta acentuadamente após lesão renal aguda. Da mesma forma, a inibição da mTOR tem sido associada a uma diminuição da fibrose renal, glomerulosclerose e inflamação intersticial, [Kramer et al., 2008; Lieberthal e Levine, 2009; Chen et al, 2012]. Neste estudo, foi avaliada a expressão da proteína por

imunohistoquímica, constatando-se estar aumentada no tratamento com CsA e, mais importante, o seu aumento foi sequencial em função da longevidade do tratamento, o que está de acordo com um estudo anterior que sugeria que o aumento de expressão da mTOR em ratos tratados com CsA resulta alterações no podócito, que se traduz em dano glomerular [Inoki et al., 2011]. Para além disso, foi detectada uma expressão normal de mTOR renal nos ratos tratados com SRL, sendo que este efeito do SRL se revelou determinante no grupo conversão pela importante diminuição da expressão renal desta proteína, o que poderá explicar a redução das lesões encontradas quando se compara com o grupo CsA.

Nos últimos anos, alguns estudos toxicológicos mostraram hipotéticos biomarcadores de nefropatia aguda [Garcia-Cohen et al., 2000; Rached et al., 2008; Fuchs e Hewitt, 2011]. Parte dos estudos associados à nefrotoxicidade centram-se na procura de marcadores de toxicidade precoce; no entanto, efeitos mínimos sobre a função renal são muito difíceis de detectar, daí ser difícil encontrar um ou uma combinação de biomarcadores que mostrem o real estado da função renal. Porém, estes estudos devem ser complementados com a revelação de biomarcadores capazes de fazer o seguimento do fármaco por tempos mais longos como os tratamentos muitas vezes exigem. A molécula-1 de lesão renal (Kim-1) é uma proteína transmembranar expressa nos túbulos proximais e é excretada na urina; nos últimos anos tem sido apontada como um possível marcador de lesão renal em modelos agudos. Este factor tem um papel na proliferação e reparação dos tecidos [Rached et al., 2008; Ichimura et al., 2004] pois confere capacidade fagocitária para eliminar “restos/resíduos” celulares [Hoffman et al., 2010]. No nosso estudo, procedeu-se à marcação da Kim-1 e verificou-se a sua presença nas células epiteliais dos túbulos proximais no grupo controlo e mais intensamente no grupo tratado com CsA, o que hipoteticamente pode ser indicado como um marcador sensível de alteração funcional no rim, precedente ao aparecimento da lesão. À semelhança do nosso estudo, Rached (2008) identificou a Kim-1 como um potencial biomarcador de nefrotoxicidade aguda

usando a ocratoxina A. No entanto, depois de nove semanas, verificou-se menor intensidade da coloração nos túbulos proximais, sugerindo que a Kim-1 pode ser vista como um hipotético biomarcador de toxicidade aguda à CsA (sem lesões estruturais), mas não como um biomarcador de nefrotoxicidade moderada a crónica. A Kim-1 aparece sub-expressa nos rins de ratos tratados com SRL; no entanto, quando o SRL foi usado para substituir a CsA (grupo de conversão), foi verificada marcação idêntica à dos ratos tratados com CsA após 3 semanas, o que sugere que a exposição anterior de CsA danificou alguns túbulos proximais de forma irreversível e que o aumento face ao grupo controlo pode estar a acontecer devido a uma tentativa de as células processarem a reparação tecidular para remover resíduos celulares.

O factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) é um polipéptido implicado na síntese da matriz extracelular, que pertence a uma sinalização pró-fibrótica (que tem o TGF- $\beta_1$  como modulador) e tem sido apontado como um possível biomarcador de nefrotoxicidade induzida pela CsA. No nosso modelo, a expressão de CTGF renal aumentou após o tratamento de curto e longo prazo com CsA, o que está de acordo com a sobre-expressão renal de TGF- $\beta_1$ , verificada por imunohistoquímica. No entanto, na exposição mais longa à CsA, a expressão renal de CTGF foi ligeiramente reduzida comparativamente ao tratamento curto de CsA, podendo ser explicado por este factor ser excretado na urina, como sugeriu O'Connell e colaboradores (2012) noutro estudo experimental. O tratamento com SRL por si só não promove qualquer alteração da expressão CTGF quando comparado com o grupo controlo, pois estamos na ausência de fibrose ou deposição de colagénio nos ratos tratados com este fármaco, como mencionado anteriormente. No entanto, no protocolo de conversão verificou-se que o uso de SRL, após a retirada da CsA, não restabeleceu a marcação para níveis basais de CTGF (idênticos ao SRL). Isto sugere, uma vez mais, que algumas das “agressões” moleculares/morfológicas induzidas pelo curto tratamento de ciclosporina são mantidas após a conversão para SRL.

A rapamicina é capaz de retardar a progressão da fibrose renal e atrasar o início da insuficiência renal, por meio da redução da hipertrofia glomerular, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, e redução da inflamação intersticial [Park et al., 2010]. Como sugerido anteriormente, a rapamicina é menos fibrogénica do que a CsA [Luo et al., 2013], o que está de acordo com os dados por nós descritos no protocolo de conversão. Estes resultados reforçam a recomendação para substituição de CsA por SRL, não só porque a exposição da CsA já é, por si só, notoriamente mais nociva, promovendo a deterioração da estrutura renal, mas também porque a sobre-expressão da mTOR parece ser uma característica da evolução da lesão renal induzida pela CsA que é corrigida com o uso do SRL.

## 5. Bibliografia

- Almeida CC, Silveira MR, de Araújo VE, de Lemos LL, de Oliveira Costa J, Reis CA, de Assis Acurcio F, das Gracas Braga Ceccato M. Safety of immunosuppressivedrugs used as maintenance therapy in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Pharmaceuticals (Basel)* 2013; 6(10):1170-94.
- Barbari AG, Stephan AG, Masri MA. Calcineurin inhibitor-free protocols: risks and benefits. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2007; 18(1):1-23.
- Boratyńska M, Banasik M, Watorek E, Falkiewicz K, Patrzalek D, Szyber P, Klinger M. Conversion to sirolimus from cyclosporine may induce nephrotic proteinuria and progressive deterioration of renal function in chronic allograft nephropathy patients. *Transplant Proc* 2006; 38(1):101-4.
- Bunnapradist S, Vincenti F. Transplantation: To convert or not to convert: lessons from the CONVERT trial. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5(7):371-3.
- Cai Y, Chen Y, Zheng S, Chen B, Yang Y, Xia P. Sirolimus damages podocytes in rats with protein overload nephropathy. *J Nephrol* 2011; 24(3):307-12.
- Campistol JM, Cockwell P, Diekmann F, Donati D, Guirado L, Herlenius G, Mousa D, Pratschke J, San Millán JC. Practical recommendations for the early use of mTOR inhibitors (sirolimus) in renal transplantation. *Transpl Int* 2009; 22(7):681-7.
- Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Remuzzi G. Nephrotoxic aspects of cyclosporine. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl):234S-239S
- Chen G, Chen H, Wang C, Peng Y, Sun L, Liu H, Liu F. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts. *PLoS One* 2012; 7(3):e33626.

- Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology* 2010; 130(3):418-26.
- Cinà DP, Onay T, Paltoo A, Li C, Maezawa Y, De Arteaga J, Jurisicova A, Quaggin SE. mTOR regulates autophagic flux in the glomerulus. *Autophagy* 2012; 8(4):696-8.
- Dean RM, Fry T, Mackall C, Steinberg SM, Hakim F, Fowler D, Odom J, Foley J, Gress R, Bishop MR. Association of serum interleukin-7 levels with the development of acute graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* 2008; 26(35):5735-41.
- Diekmann F, Campistol JM. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft nephropathy: benefits and risks. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(3):562-8.
- Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol* 2012; 26(1):1-10.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(23):8204-9.
- Fuchs TC, Hewitt P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *AAPS J* 2011; 13(4):615-31.
- Garcia-Cohen EC, Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodriguez-Martinez MA. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(1):75-81.
- Gordois A, Nobes M, Toohey M, Russ G. Cost-effectiveness of sirolimus therapy with early cyclosporin withdrawal vs. long-term cyclosporin therapy in Australia. *Clin Transplant* 2006; 20(4):526-36.

- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62(1):237-44.
- He Z, Chen L, Qiu J, Li J, Zhao D, Chen G, Wang C. Conversion from cyclosporine A to sirolimus retards the progression of chronic allograft nephropathy in the long term in a rat kidney transplantation model. *J Int Med Res* 2009; 37(5):1396-410.
- Hoffmann D, Fuchs TC, Henzler T, Matheis KA, Herget T, Dekant W, Hewitt P, Mally A. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology* 2010; 277(1-3):49-58.
- Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(3):F552-63.
- Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, Blattner SM, Ikenoue T, Rüegg MA, Hall MN, Kwiatkowski DJ, Rastaldi MP, Huber TB, Kretzler M, Holzman LB, Wiggins RC, Guan KL. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(6):2181-96.
- Krämer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, Binder E, Loof T, Khadzhynov D, Kawachi H, Shimizu F, Diekmann F, Budde K, Neumayer HH, Peters H. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(2):F440-9.
- Laham G, Sleiman S, Soler Pujol G, Diaz C, Dávalos M, Vilches A. Conversion to sirolimus allows preservation of renal function in kidney and kidney-pancreas allograft recipients. *Transplant Proc* 2010; 42(1):309-13.
- Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5(9):513-9.
- Lieberthal W, Levine JS. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(12):2493-502.
-



- Litjens NH, van Druningen CJ, Betjes MG. Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes. *Clin Immunol* 2006; 118(1):83-91.
- Luo L, Sun Z, Luo G. Rapamycin is less fibrogenic than Cyclosporin A as demonstrated in a rat model of chronic allograft nephropathy. *J Surg Res* 2013; 179(1):e255-63.
- Mange KC, Cizman B, Joffe M, Feldman HI. Arterial hypertension and renal allograft survival. *JAMA* 2000; 283(5):633-8.
- Marti HP, Frey FJ. Nephrotoxicity of rapamycin: an emerging problem in clinical medicine. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(1):13-5.
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10):2534-43.
- Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2004; 24(3):307-15.
- Mota A. Sirolimus: a new option in transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6(3):479-87.
- Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(2):481-508.
- O'Connell S, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Identification of novel indicators of cyclosporine A nephrotoxicity in a CD-1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252(2):201-10.
- O'Connell S, Tuite N, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Cyclosporine A—induced oxidative stress in human renal mesangial cells: a role for ERK 1/2 MAPK signaling. *Toxicol Sci* 2012; 126(1):101-13.

- Park JW, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee J, Kim SW. Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats. *Kidney Int* 2010; 77(12):1076-85.
- Paziana K, Del Monaco M, Cardonick E, Moritz M, Keller M, Smith B, Coscia L, Armenti V. Ciclosporin use during pregnancy. *Drug Saf* 2013; 36(5):279-94.
- Pestel S, Krzykalla V, Weckesser G. Measurement of glomerular filtration rate in the conscious rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007; 56(3):277-89.
- Rached E, Hoffmann D, Blumbach K, Weber K, Dekant W, Mally A. Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin a in vivo and in vitro. *Toxicol Sci* 2008; 103(2):371-81.
- Rangan GK. Sirolimus-associated proteinuria and renal dysfunction. *Drug Saf* 2006; 29(12):1153-61.
- Reis F, Rocha-Pereira P, Teixeira de Lemos E, Parada B, Baptista S, Figueiredo A, Santos-Silva A, Costa-Almeida C, Mota A, Teixeira F. Oxidative stress in cyclosporine-induced hypertension: evidence of beneficial effects or tolerance development with nitrate therapy. *Transplant Proc* 2007; 39(8):2494-500.
- Roullet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1994; 93(5):2244-50.
- Sereno J, Romão AM, Parada B, Lopes P, Carvalho E, Teixeira F, Reis F. Cardiorenal benefits of early versus late cyclosporine to sirolimus conversion in a rat model. *J Pharmacol Pharmacother* 2012; 3(2):143-8.
- Stephany BR, Boumitri M, Budev M, Alao B, Poggio ED. Absence of proteinuria predicts improvement in renal function after conversion to sirolimus-based immunosuppressive regimens in lung transplant survivors with chronic kidney disease. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28(6):564-71.
- Straathof-Galema L, Wetzels JF, Dijkman HB, Steenbergen EJ, Hilbrands LB. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006; 6(2):429-33.

- Textor SC, Taler SJ, Canzanello VJ, Schwartz L, Augustine JE. Posttransplantation hypertension related to calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* 2000; 6(5):521-30.
- Urbschat A, Obermüller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers*. 2011; 16 Suppl 1:S22-30.
- Vassiliadis J, Bracken C, Matthews D, O'Brien S, Schiavi S, Wawersik S. Calcium mediates glomerular filtration through calcineurin and mTORC2/Akt signaling. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(8):1453-61.
- Weir MR, Diekmann F, Flechner SM, Lebranchu Y, Mandelbrot DA, Oberbauer R, Kahan BD. mTOR inhibition: the learning curve in kidney transplantation. *Transpl Int* 2010; 23(5):447-60.
- Young EW, Ellis CN, Messana JM, Johnson KJ, Leichtman AB, Mihatsch MJ, Hamilton TA, Groisser DS, Fradin MS, Voorhees JJ. A prospective study of renal structure and function in psoriasis patients treated with cyclosporin. *Kidney Int* 1994; 46(4):1216-22.
- Zeier M, Van Der Giet M. Calcineurin inhibitor sparing regimens using m-target of rapamycin inhibitors: an opportunity to improve cardiovascular risk following kidney transplantation? *Transpl Int* 2011; 24(1):30-42.



# **CAPÍTULO VIII**

**Impacto renal de um protocolo de  
redução da dose de Ciclosporina A e  
posterior conversão para Sirolimus**



## 1. Introdução

A CsA é um inibidor da calcinerina que revolucionou a transplantação por reduzir substancialmente e significativamente as taxas de rejeição aguda e crónica desde a sua introdução na prática clínica. Para além disso, a ciclosporina tem indicação terapêutica para ser usada no tratamento de várias doenças auto-imunes, tais como a psoríase, a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistémico, entre outras, o que levou ao seu grande uso ao longo dos últimos 25 anos (Boissonnat et al., 2012; Young et al., 1994). Apesar da notável eficácia que este fármaco tem na prevenção da rejeição, a terapia a longo prazo está associada ao desenvolvimento de nefrotoxicidade (Lebranchu et al., 2011). Na prática clínica, as causas mais comuns de perda de enxertos são a morte dos doentes por causas não associadas ao transplante ou o aparecimento de fibrose intersticial e atrofia tubular renal, concomitantemente com doenças cardiovasculares (TerMeulen et al., 2004). Como foi demonstrado nas partes A e B desta tese, o tratamento com a CsA está associado a uma toxicidade renal, com se agrava com o aumento do tempo de exposição mas que pode ser minimizado através da conversão para sirolimus. No entanto, alguns doentes de maior risco imunológico necessitam de maiores doses nos tempos iniciais pós transplante, o que pode colocar em causa o próprio rim transplantado (Weir et al., 2010). Dado o importante impacto negativo dos efeitos indesejados desta classe de fármacos, foram intensificados esforços nos últimos anos na procura de estratégias capazes de minimizar estes problemas, sem afectar a eficaz prevenção dos episódios de rejeição aguda (Manito et al., 2011). Evitar completamente o uso dos inibidores da calcineurina, em particular de CsA, tem sido visto como uma opção inválida por quase todos os centros de transplante em todo o mundo, especialmente por causa dos riscos elevados em rejeição aguda. Na verdade, segundo Sanchez-pozos e colegas (2010),

esta classe de fármacos continua a ser usada numa percentagem elevada (cerca 90%) como terapêutica de base em transplantação.

Os principais objectivos a longo prazo desta terapêutica imunossupressora são a manutenção da funcionalidade do enxerto, a garantia da eficácia imunossupressora, com redução de exposição aos CNIs de forma a minimizar os graves efeitos secundários, incluindo a infecção e a nefrotoxicidade (Dummer et al., 2012). A redução da dose de CsA e os protocolos de conversão para outros fármacos (Manito et al., 2011), especialmente o Sirolimus (Mota, 2005; Gordoís et al., 2006; Campistol et al., 2009), continuam a ser opções terapêuticas de eleição pós-transplante. A utilização de reduzidas doses de CsA imediatamente após transplantação renal foi já avaliado em ensaios clínicos e os resultados sugerem um benefício na função renal (Kahan et al., 1999; de Sévaux et al., 2001; Gonwa et al., 2002; Muhlbacher e Paczek, 2002). No entanto, esses estudos clínicos não foram suficientemente fortes e muitos centros de transplante no mundo ainda preferem usar altas doses de CsA como terapêutica de “ataque” para garantir imunossupressão segura e confiável, seguida de conversão.

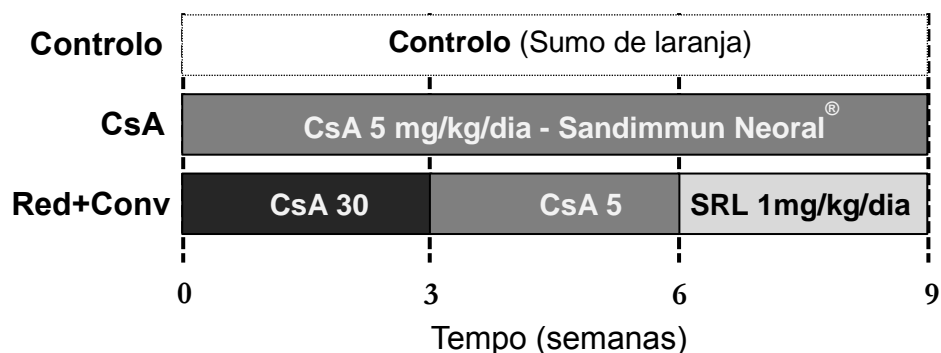
Actualmente, os esforços centram-se em esclarecer o tempo mais adequado de exposição à CsA e o momento ideal para promover a redução da dose e/ou substituição por outro fármaco menos nefrotóxico, sem comprometer o enxerto por um episódio de rejeição. Na parte A deste trabalho, esclarecemos alguns mecanismos e biomarcadores subjacentes à transição de disfunção renal (sem lesões renais) para nefrotoxicidade (presença de lesões moderadas). Posteriormente, na parte B, constatámos que a conversão de CsA (dose baixa/moderada) para SRL permite assegurar alguma protecção renal. Seguindo o enquadramento dos anteriores capítulos, pretendeu-se avaliar neste modelo animal o impacto na função e lesão renal de um protocolo de terapia imunossupressora baseado na utilização inicial de uma dose mais alta de CsA, seguido de redução da dose e posterior conversão para SRL, usando como amostras soro, urina e tecido renal e biomarcadores descritos na



literatura como emergentes, tais como NGAL, KIM-1 e CTGF, e alguns marcadores clássicos em uso na prática clínica.

## 2. Modelo animal

Ratos Wistar machos (Charles River Lab. Inc, Barcelona, Espanha), com 11 semanas de idade, foram mantidos em ciclos de luz de 12h (noite/dia), com temperatura controlada ( $22.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ ), com ração de manutenção (IPM-R20, Letica, Barcelona, Espanha) e acesso *ad libitum* à água e ração. Os animais foram divididos em três grupos e tratados durante 9 semanas: Controlo (veículo: sumo de laranja), CsA (5 mg/kg/dia de Sandimun Neoral<sup>®</sup>, Novartis Farma Produtos Farmacêuticos SA, Sintra, Portugal) e Redução + Conversão (Red+Conv): CsA 30 mg/kg/dia durante as primeiras três semanas, seguido de 3 semanas com redução da dose de CsA para 5 mg/kg/dia, e em seguida conversão nas 3 semanas finais para SRL 1 mg/kg/dia (Rapamune<sup>®</sup>, Laboratórios Pfizer Lda., Lisboa, Portugal) (Figura 31). O estudo envolveu seis ratos por grupo em três tempos de análise (3, 6 e 9 semanas), tendo-se usado neste estudo um total de 54 animais. Os tratamentos foram realizados por sonda esofágica e o peso corporal foi monitorizado diariamente. As experiências nos animais foram realizadas de acordo com as Directivas do Conselho Europeu para a experimentação animal (2010/63/EU) e as autoridades nacionais, sendo o estudo aprovado pelo comité de ética local para estudos de investigação em animais. Os animais foram mantidos num biotério certificado, em gaiolas individuais ventiladas, com as medidas adequadas para o bem-estar animal e redução do sofrimento durante os procedimentos, incluindo enriquecimento ambiental e anestesia/analgesia.



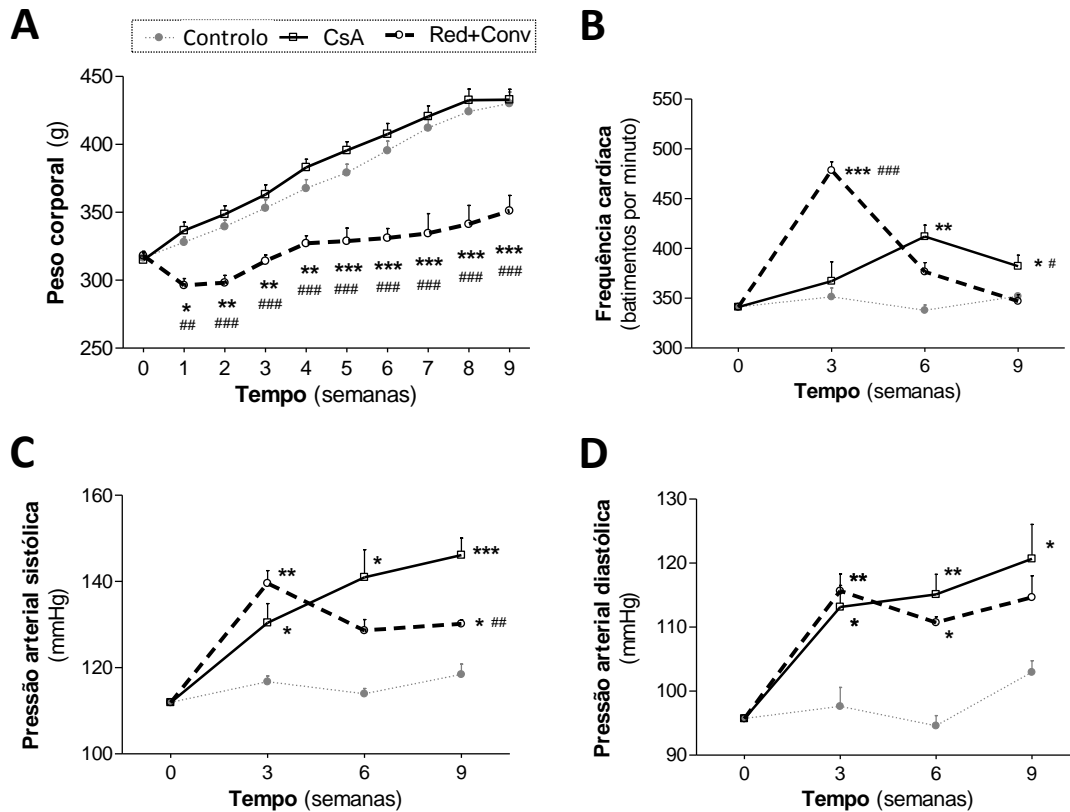
**Figura 31.** Diagrama ilustrativo da distribuição dos animais pelos 3 grupos ao longo das 9 semanas de tratamentos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Monitorização do peso corporal

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas durante as 9 semanas de tratamentos entre o grupo Controlo e os animais tratados unicamente com 5 mg de CsA (Figura 32A). No entanto, os animais do grupo Red+Conv, que iniciaram o tratamento com CsA (30 mg), perderam peso de forma significativa na primeira semana ( $P < 0,05$  vs controlo), sendo que de seguida começaram a recuperar peso, mas a um ritmo mais lento que o grupo controlo até ao final da terceira semana. Nesta altura do tratamento a dose de CsA foi reduzida para 5 mg, tendo-se registado uma taxa de crescimento idêntica à do grupo CsA (30 mg). Posteriormente, às seis semanas, promoveu-se a conversão para SRL (1 mg), mantendo-se a taxa de crescimento do tratamento anterior ( $P < 0,001$ ) (Figura 32).

### 3.2. Pressão arterial e frequência cardíaca

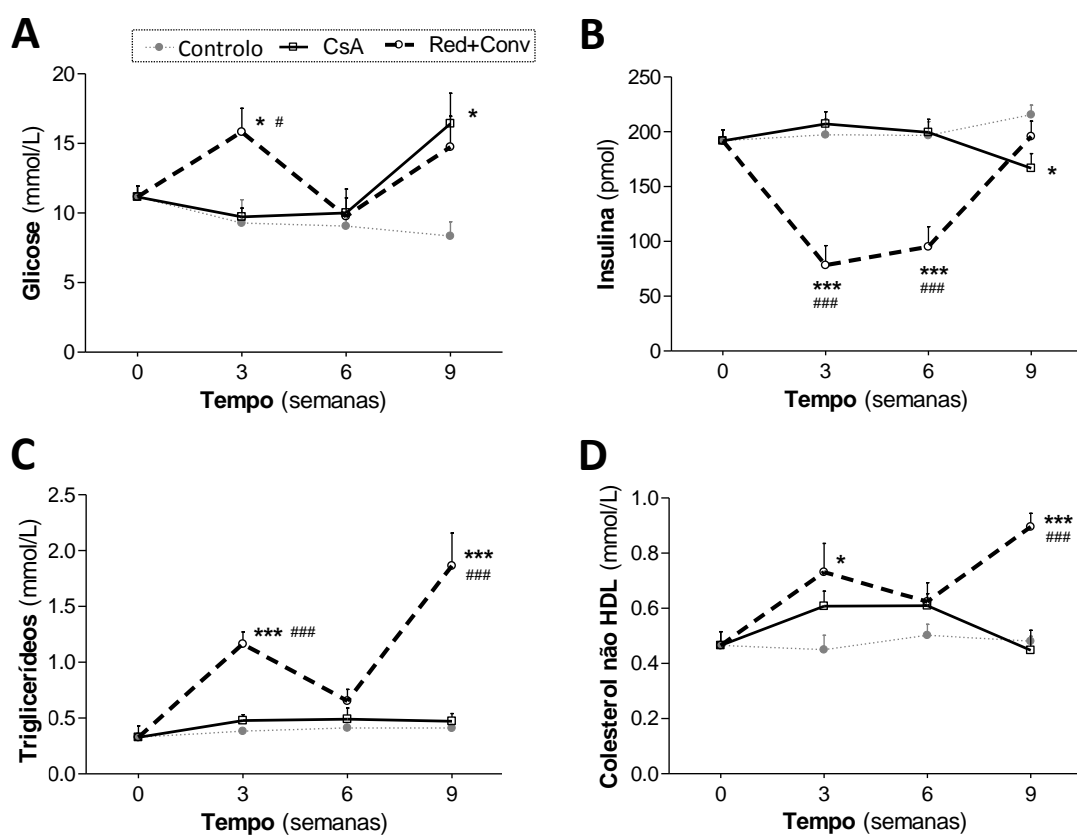


**Figura 32.** Evolução do peso corporal (A), frequência cardíaca (B) e pressões arteriais sistólica (C) e diastólica (D) durante as 9 semanas de tratamento. Valores em médias  $\pm$  e.p.m. \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001 em relação ao grupo controle; # P<0,05, ## P<0,01 e ### P<0,001 em relação ao grupo CsA 5 mg.

Os ratos tratados com CsA (5 mg) durante as nove semanas apresentaram um aumento contínuo e significativo das pressões arteriais sistólica (P<0,001) e diastólica (P<0,05) ao longo do período experimental, acompanhado de taquicardia (P<0,05) (Figura 32B a 32D). Um terceiro grupo de ratos iniciou o tratamento com uma dose de CsA mais elevada (30 mg), demonstrando um aumento superior da pressão arterial sistólica e diastólica (P<0,01, ambas) e da frequência cardíaca (P<0,001), com apenas 3 semanas de tratamento. Neste mesmo grupo, os animais foram de seguida tratados durante 3 semanas com uma dose mais baixa de CsA, correspondente nos humanos a uma dose de manutenção da imunossupressão. A redução da dose veio reduzir

significativamente os valores de pressões arteriais e de frequência cardíaca. Na continuação deste protocolo, os mesmos animais receberam depois SRL, durante 3 semanas, tendo os valores de pressão arterial permanecido inalterados, mas observando-se uma diminuição da frequência cardíaca para valores próximos dos do grupo controle (Figura 32B a 32D).

### 3.3. Perfil glicémico, insulinémico e lipídico



**Figura 33.** Perfil lipídico, glicémico e insulinémico. Concentração sérica de glicose (A), insulina (B), triglicédeos (C) e colesterol total (D) durante os tratamentos. Valores em médias  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao grupo controle; #  $P < 0,05$  e ###  $P < 0,001$  em relação ao grupo CsA 5 mg.

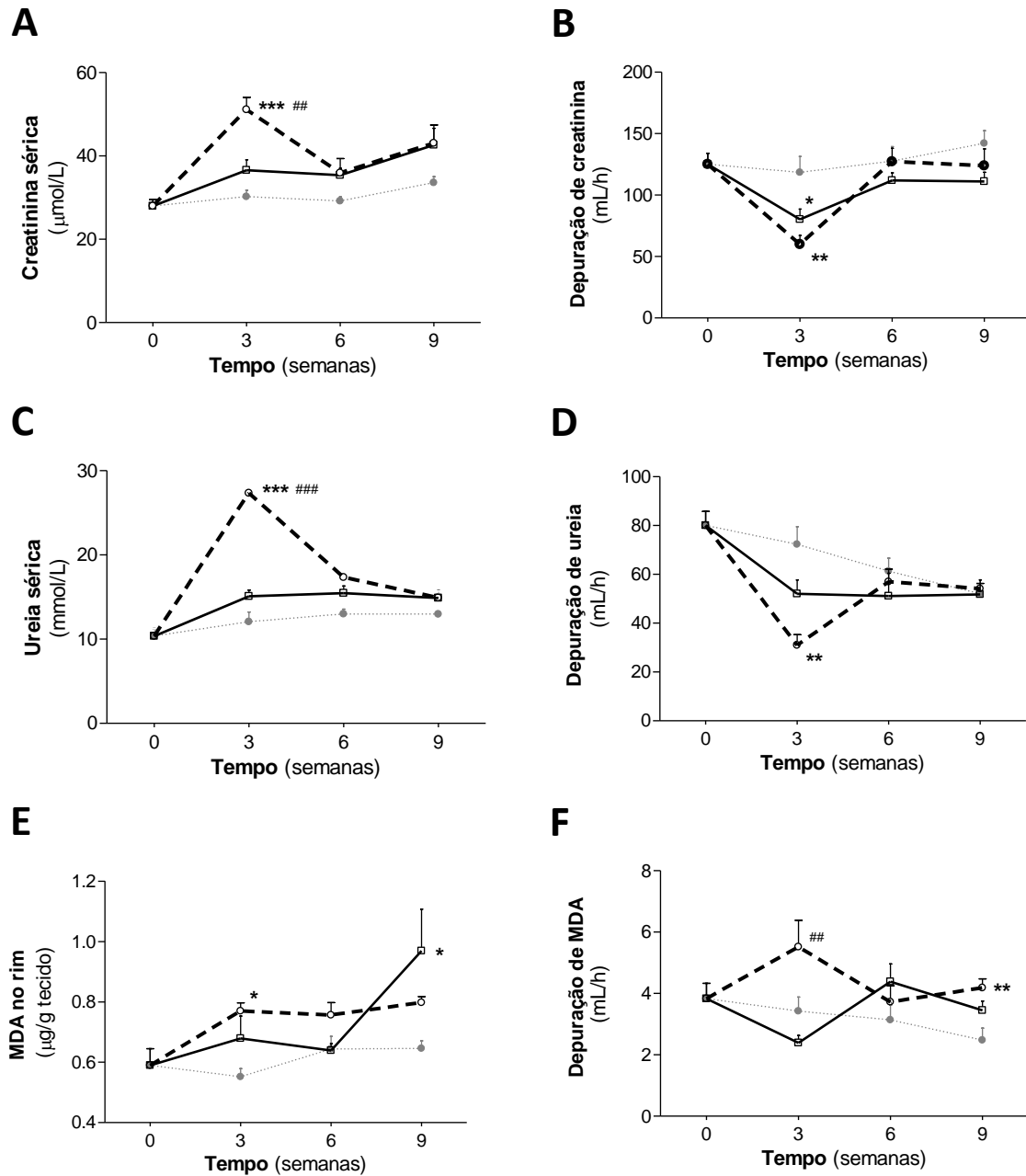
Os ratos tratados unicamente com a dose mais baixa de CsA (5 mg) apresentaram um aumento dos níveis séricos de glicose ( $P < 0,05$ ) e uma redução do

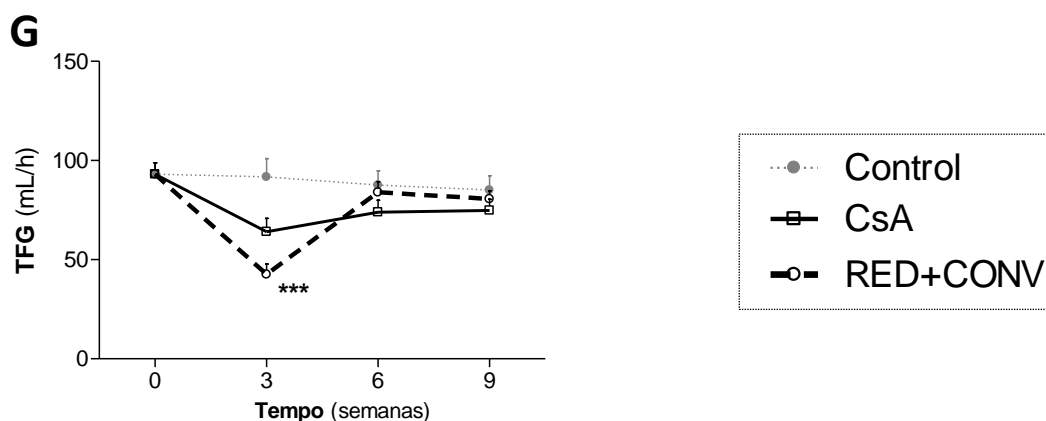
conteúdo de insulina ( $P<0,05$ ), sem alterações significativas dos níveis de triglicérides e de colesterol não-HDL, comparativamente aos animais controlo, no ponto final (semana 9) (Figura 33A, 33B, 33C e 33D). Porém, nos ratos tratados com a dose mais elevada de CsA (30 mg) verificou-se um aumento da concentração sérica de triglicéridos ( $P<0,001$ ), colesterol não-HDL ( $P<0,05$ ) e glicose ( $P<0,01$ ), assim como uma redução abrupta de insulina ( $P<0,001$ ). A redução da dose de CsA foi capaz de normalizar os valores de glicose, triglicéridos e colesterol não-HDL e promover uma inibição da redução dos níveis de insulina. A substituição de CsA por SRL durante as últimas 3 semanas conduziu a um aumento notável dos valores séricos de glicose ( $P<0,05$ ), triglicérides ( $P<0,001$ ) e colesterol não-HDL ( $P <0,001$ ), e uma completa normalização dos níveis de insulina, em relação ao grupo de controlo (Figura 33A, 33B, 33C e 33D).

### **3.4. Avaliação da nefrotoxicidade através de marcadores no soro, urina e tecido renal**

Os marcadores séricos usados na prática clínica para avaliar a função renal, tais como a creatinina e a ureia (soro, urina e taxa de depuração), bem como a taxa de filtração glomerular (TFG), apenas apresentaram pequenas variações no grupo tratado com 5 mg de ciclosporina ao longo de todo o período das 9 semanas, em comparação com o grupo controlo, sendo que foram encontradas lesões renais significativas, as quais serão descritas no ponto seguinte. No entanto, quando a dose de 30 mg de ciclosporina foi usada nas primeiras 3 semanas, a concentração sérica dos marcadores clássicos de função renal (creatinina e ureia) aumentou de forma marcada ( $P<0,01$ ), acompanhada por uma diminuição significativa das taxas de depuração ( $P<0,01$ ), bem como da taxa de filtração glomerular ( $P<0,001$ ) (Figura 34A, 34B, 34C, 34D e 34G). Após a redução da dose de 30 para 5 mg durante 3 semanas, estes marcadores registaram valores normais, os quais foram mantidos de forma estável

também após a conversão para o SRL nas últimas três semanas de tratamento. O conteúdo renal de MDA, marcador de peroxidação lipídica, e a sua depuração renal, aumentaram de forma significativa apenas na dose mais elevada de CsA, tendo estabilizado após a redução da dose e a conversão para SRL, com um aumento da depuração neste último período de tratamento (Figura 34E e 34F).



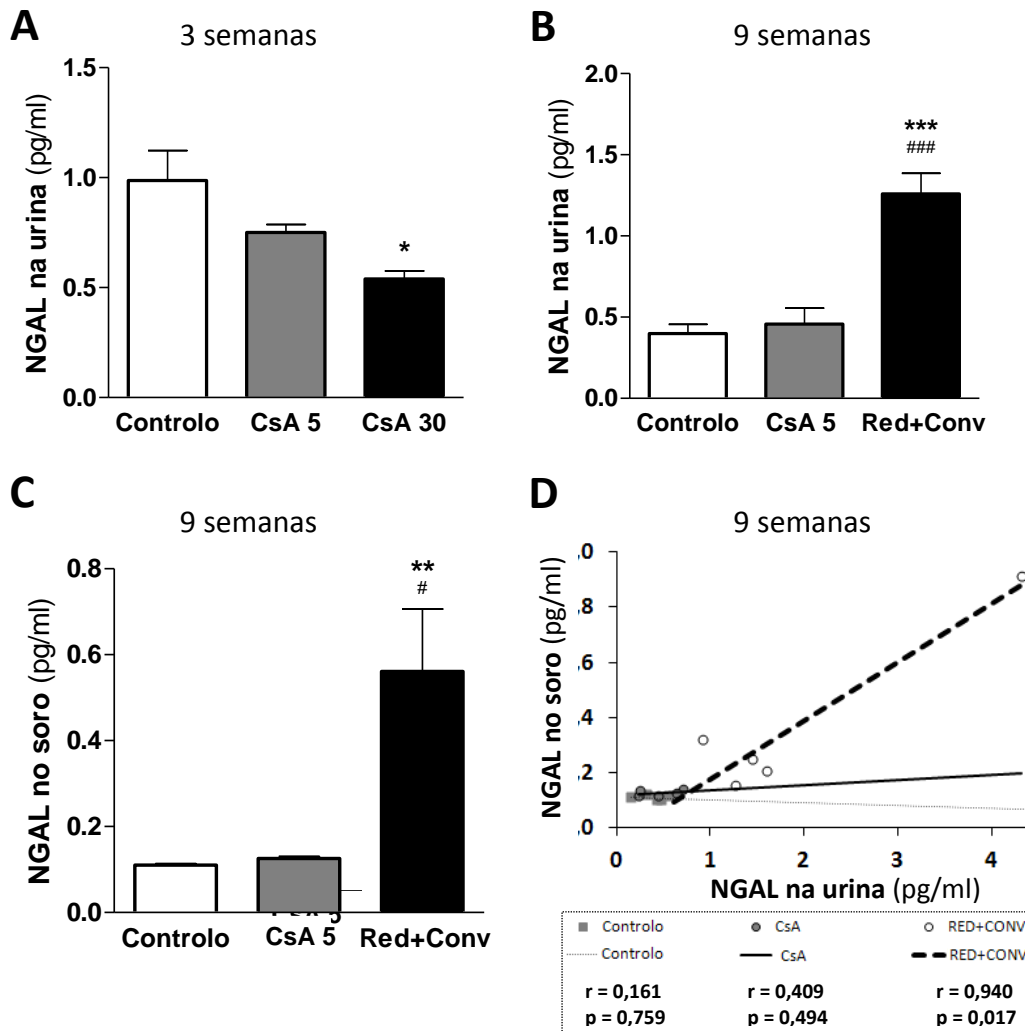


**Figura 34.** Marcadores séricos, urinários e tecidulares de função renal. Níveis séricos de creatinina (A) e respectiva depuração (B), níveis de ureia no soro (C) e respectiva depuração (D), peroxidação lipídica no rim (níveis de MDA) (E) e respectiva depuração (F), e taxa de filtração glomerular (G), durante as 9 semanas de tratamentos. Valores em médias  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  versus grupo controle; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  e ###  $P < 0,001$  em relação ao grupo CsA 5 mg.

### 3.5. A lipocalina gelatinase associada a neutrófilos (NGAL) como um hipotético biomarcador de nefrotoxicidade após a redução da dose de CsA e posterior conversão para SRL

A concentração sérica e urinária de NGAL tem sido descrita como um hipotético biomarcador de nefrotoxicidade associada a fármacos. Neste modelo, às 3 semanas, a dose baixa de ciclosporina não alterou significativamente o conteúdo urinário de NGAL; no entanto, verificou-se uma diminuição significativa ( $P < 0,01$ ) no grupo tratado com a dose mais elevada de CsA (30 mg) (Figura 35A). O tratamento de baixa dose de CsA durante o período longo não afectou as concentrações de NGAL no soro e na urina. No entanto, foram encontradas alterações significativas de NGAL no grupo com redução seguida de conversão. Na verdade, no tempo final (9 semanas), o conteúdo de NGAL aumentou significativamente na urina ( $P < 0,001$ ) e no soro ( $P < 0,01$ ) quando comparado com os níveis medidos no grupo controle e no tratado com CsA (Figura 35B e 35C). Mais ainda, não foi encontrada relação entre os valores de urina e soro (correlação de *Pearson*) no grupo controle ( $r = 0,161$ ,  $p = 0,759$ ) e

no grupo CsA 5 mg ( $r=0,494$   $P=0,409$ ), enquanto foi verificada uma correlação directa e significativa entre as concentrações presentes nas amostras de urina e de soro no grupo Red+Conv ( $r=0,940$ ,  $P=0,017$ ) (Figura 35D).



**Figura 35.** Quantificação de NGAL em soro e em urina e sua correlação, como marcador de toxicidade renal. Níveis de NGAL na urina às 3 semanas (A), na urina (B) e no soro (C) às 9 semanas de tratamento. O gráfico D, mostra a correlação entre os valores de NGAL na urina e no soro às 9 semanas de tratamento. Os valores são a média  $\pm$  e.p.m. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$  e \*\*\*  $P<0,001$  em relação ao grupo controlo; #  $P<0,05$  e ###  $P<0,001$  em relação ao grupo CsA 5 mg.

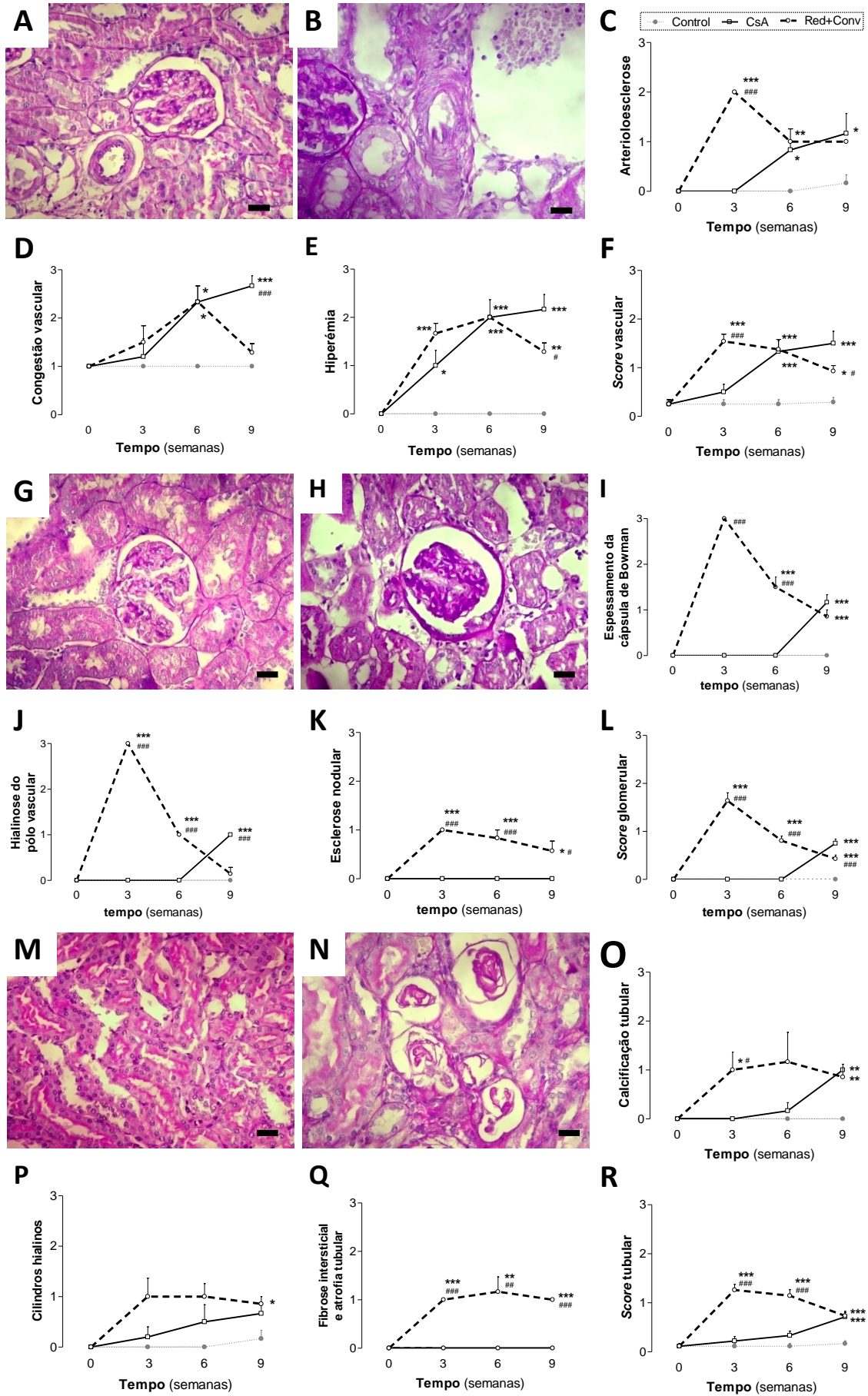


### 3.6. Avaliação histomorfológica no rim

Nesta avaliação histomorfológica todas as estruturas renais foram tidas em consideração, recorrendo à examinação de cortes corados com H&E e PAS, e atribuindo-lhes graus de severidade. Após 3 semanas de tratamento com baixa dose de CsA, apenas alterações pontuais e ligeiras foram detectadas nos túbulos e nos glomérulos, sendo que o principal sinal de toxicidade foi a hiperemia, em comparação com o grupo controlo (Figura 36E). Por outro lado, a alta dose de CsA promoveu aparecimento de lesões em todas as estruturas renais, de grau leve a moderado, sendo que algumas atingiram o grau severo. Neste tratamento foi notória a presença de arterioloesclerose (Figura 36A), bem como de congestão vascular, hiperémia e arteriosclerose, reflectindo um *score* global vascular de grau moderado (Figura 36F). Para além disso, induziu o espessamento da cápsula de Bowman (Figura 36H), hialinização do pólo vascular e esclerose nodular como principais lesões, sendo que também se visualizou expansão mesangial, atrofia glomerular e espessamento da membrana basal do glomérulo, resultando num *score* global glomerular de grau 2 (lesões moderadas) (Figura 36D). A nível tubular, a presença de calcificação tubular (Figura 36N), cilindros hialinos e fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA) foram as principais lesões, mas foi verificada irregularidade da membrana tubular, degeneração vacuolar, infiltração inflamatória e dilatação tubular, representando um *score* global de lesões tubulares de grau moderado (Figura 36R).

Às 6 semanas, depois de 3 semanas com redução da dose de CsA, verificou-se uma melhoria no domínio vascular global (principalmente arteriosclerose) e no corpúsculo glomerular (espessamento da cápsula de Bowman, hialinização do polo vascular e esclerose nodular); no entanto, não foi registada uma melhoria na região tubulointersticial, e as lesões renais mais graves, tais como a calcificação tubular e o IFTA, foram ainda mais evidentes, indicando que a dose mais elevada de CsA pode causar danos irreversíveis em algumas estruturas renais. Por outro lado, a conversão

de CsA para o inibidor de mTOR produziu uma redução notável do grau de lesões renais. Enquanto a arterioesclerose foi a única lesão que se manteve inalterada, houve uma clara melhoria na congestão vascular e hiperemia, resultando numa diminuição estatisticamente significativa no *score* vascular global para ligeiro ( $P<0,05$ ), quando comparado com o grupo da dose de CsA 5 mg. Para além disso, o protocolo de conversão apresentou uma diminuição nos graus de lesões glomerulares, comparativamente à terapia de ciclosporina 5 mg ( $P<0,001$ ) (Figura 36D). Adicionalmente, verificou-se melhoria a nível tubular, com *score* global idêntico ao encontrado no grupo tratado com baixa dose de CsA (Figura 36R).



**Figura 36.** Avaliação semi-quantitativa das lesões vasculares, glomerulares e tubulointersticiais. Microfotografias de uma arteríola normal do grupo controlo (**A**) e arteriolesclerose do grupo Red+Conv (**B**) no final de 3 semanas de tratamento. Os gráficos **C**, **D**, **E** e **F** representam as avaliações semi-quantitativas de arteriolesclerose, congestão vascular, hiperémia e *score* global das lesões vasculares, respectivamente durante as 3, 6 e 9 semanas de tratamentos. Microfotografias de um corpúsculo glomerular do grupo controlo (**G**) e espessamento da cápsula de Bowman e hialinização do polo vascular do grupo Red+Conv (**H**) no final de 3 semanas de tratamento. Os gráficos **I**, **J**, **K** e **L** representam as avaliações semi-quantitativas de espessamento da cápsula de Bowman, hialinose do polo vascular, esclerose nodular e *score* global das lesões glomerulares, respectivamente durante as 3, 6 e 9 semanas de tratamentos. Microfotografias de um corpúsculo glomerular do grupo controlo (**M**) e calcificação tubular do grupo Red+Conv (**N**) no final de 3 semanas de tratamento. Os gráficos **O**, **P**, **Q** e **R** representam as avaliações semi-quantitativas de calcificação tubular, cilindros hialinos, fibrose intersticial e atrofia tubular, e *score* global das lesões tubulares, respectivamente durante as 3, 6 e 9 semanas de tratamentos. Valores em médias  $\pm$  e.p.m. \*  $P < 0,05$ , . \*\*  $P < 0,01$ , e \*\*\*  $P < 0,001$  versus grupo controlo; #  $P < 0,05$  ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , face ao grupo ciclosporina 5 mg.

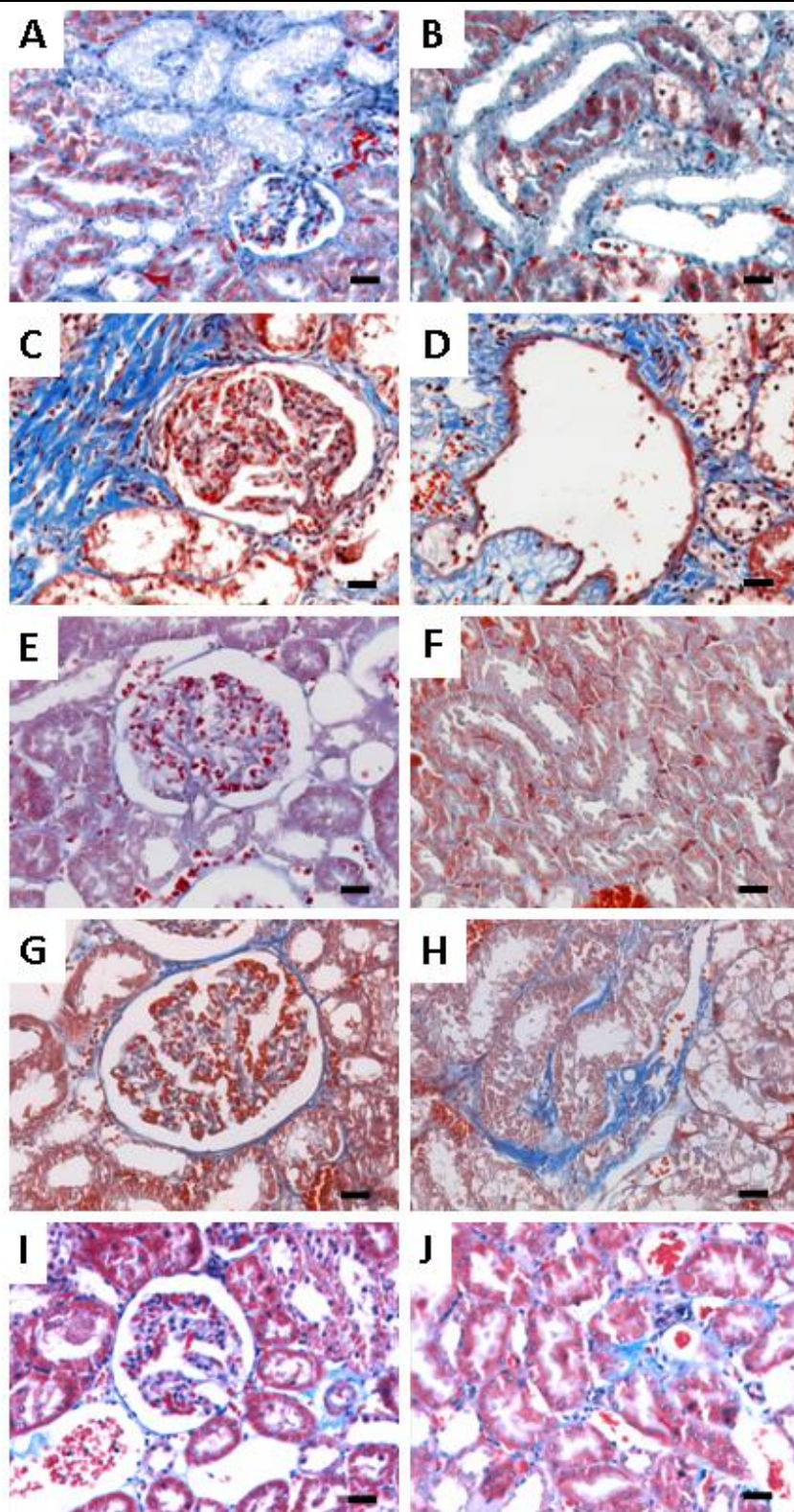
### 3.7. Deposição de colagénio em estruturas renais

Nos rins de ratos tratados controlo, a coloração de colagénio (azul) foi rara nos glomérulos (Figura 37E), sendo que em redor dos túbulos era pouco perceptível a borda azul (Figura 37F). Após 3 semanas de CsA (baixa dose), não houve alterações significativas na deposição de colagénio; no entanto, após 9 semanas, a coloração de colagénio era claramente visível nas bordas externas das células tubulares (córtex e medula), representando fibrose intersticial (Figura 37H) e em alguns glomérulos, contribuindo para um maior espessamento da cápsula de Bowman (Figura 37G). A utilização de uma dose mais elevada de ciclosporina, mesmo num tratamento a curto prazo, induziu a produção de colagénio e a sua deposição de forma intensa em torno dos glomérulos (Figura 37A) e dos túbulos, limitando assim a funcionalidade de células (Figura 37B).

A redução da dose de CsA foi associada a uma atenuação da coloração azul, com uma eliminação completa de coloração dentro do glomérulo, sendo que esta apenas se observava em torno das cápsulas de Bowman, o que sugere uma melhor

funcionalidade renal. Nos túbulos, foi encontrada hipertrofia e deposição de colagénio, mas não dentro do epitélio (Figura 37D), limitando os processos de reabsorção e de produção. No grupo RED+Conv às 9 semanas, os rins tinham um menor grau de coloração de colagénio, associado a uma boa organização celular (sem áreas atroficas ou hipertróficas), comparando com o grupo CsA 5 mg (Figura 37I e 37J).



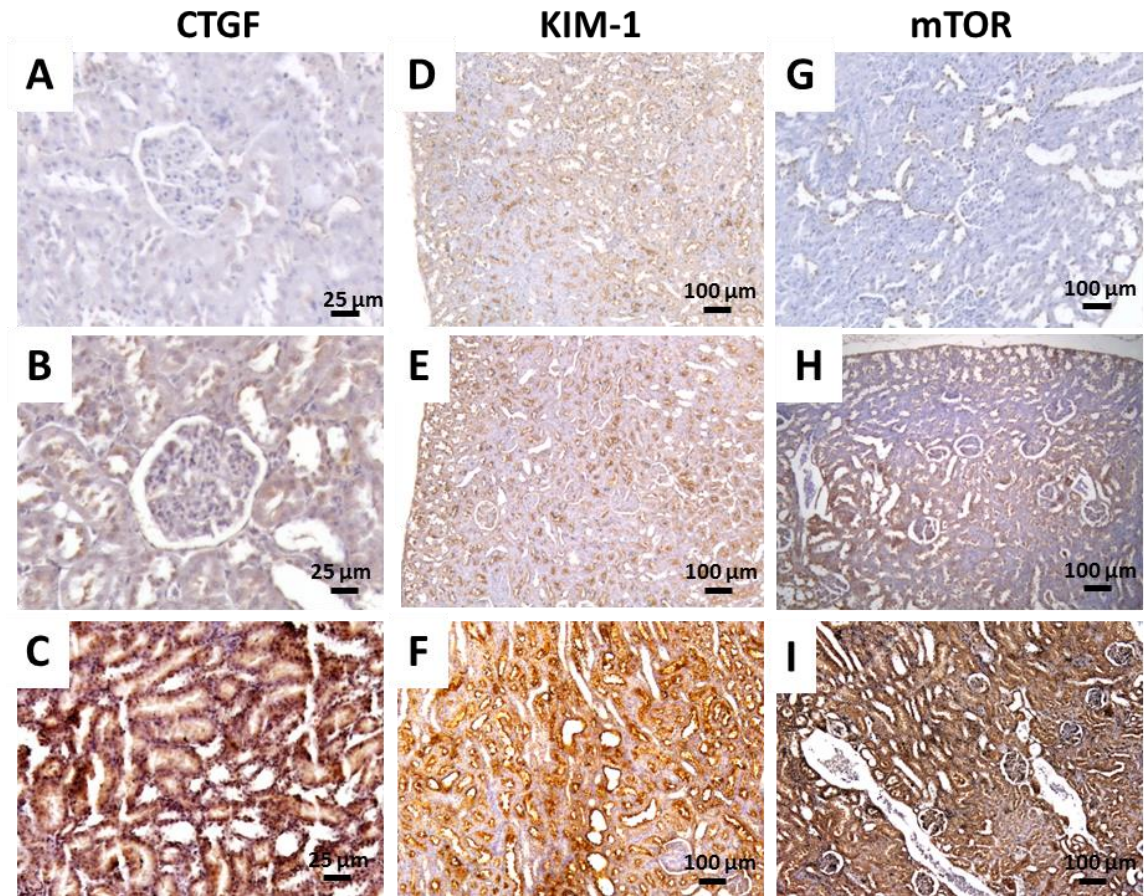


**Figura 37.** Microfotografias da coloração de tricrómio de Masson representativas dos grupos em estudo. Imagens do grupo Controlo (E, F) e CsA 5 mg (G, H) às 9 semanas de tratamento e do grupo Red+Conv às 3 (A, B), às 6 (C, D) e às 9 semanas (I, J) de tratamento, mostrando o padrão de deposição de colagénio (cor azul). Nas imagens A e B é bem notória a deposição de colagénio em toda a estrutura do corpúsculo glomerular e fibrose tubulointersticial, respectivamente. Cada barra representa 25  $\mu$ m de ampliação.

### 3.8. Expressão proteica no rim por imunohistoquímica

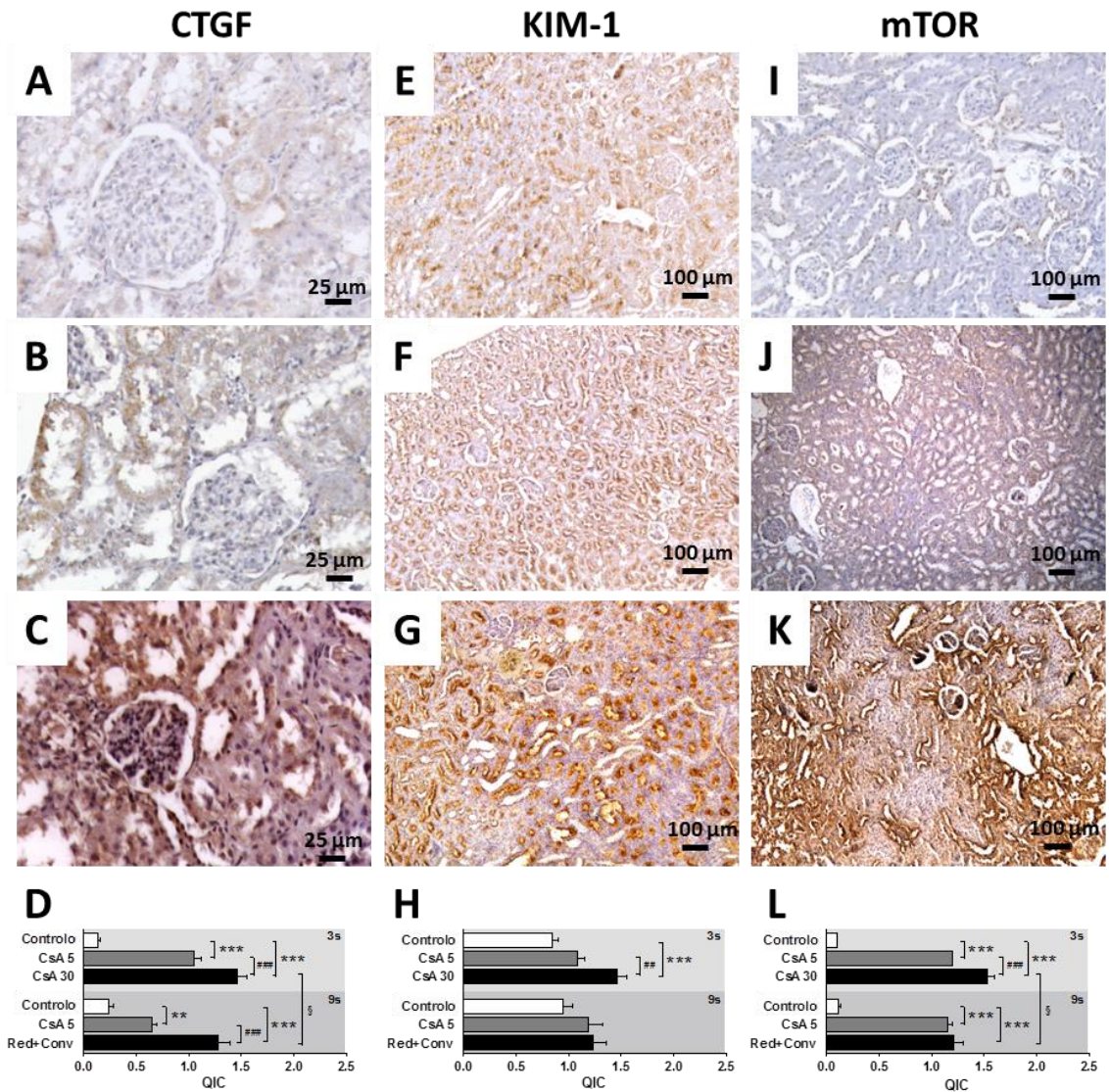
A dose mais baixa de CsA, para um tratamento a curto prazo de 3 semanas, aumentou a expressão proteica renal de CTGF, Kim-1, mTOR, NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> e TGF- $\beta$  (P<0,001), comparativamente ao grupo controlo. A dose mais elevada de CsA também promoveu um aumento na expressão de todas as proteínas, sendo mais elevada do que nos rins tratados com a dose mais baixa de CsA para CTGF (P<0,001), Kim-1 (P<0,01) e mTOR (P<0,001) (Figura 38 e 40). O tratamento a longo prazo com a dose mais baixa de CsA promoveu o aumento da expressão de CTGF, mTOR e TGF- $\beta$  versus o grupo de controlo, enquanto a expressão de Kim-1, NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> e PCNA se manteve inalterada. Após a redução da dose de CsA e substituição para SRL, o tecido renal apresentou imunorreactividade aumentada para CTGF, relativamente aos grupos controlo e CsA 5 mg (P<0,001). Além disso, enquanto a expressão de mTOR e TGF- $\beta$  foi semelhante e verificou-se uma diminuição na expressão de NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> (P <0,001) e o PCNA (P <0,05), em comparação com a monoterapia de CsA (Figura 39 e 41).



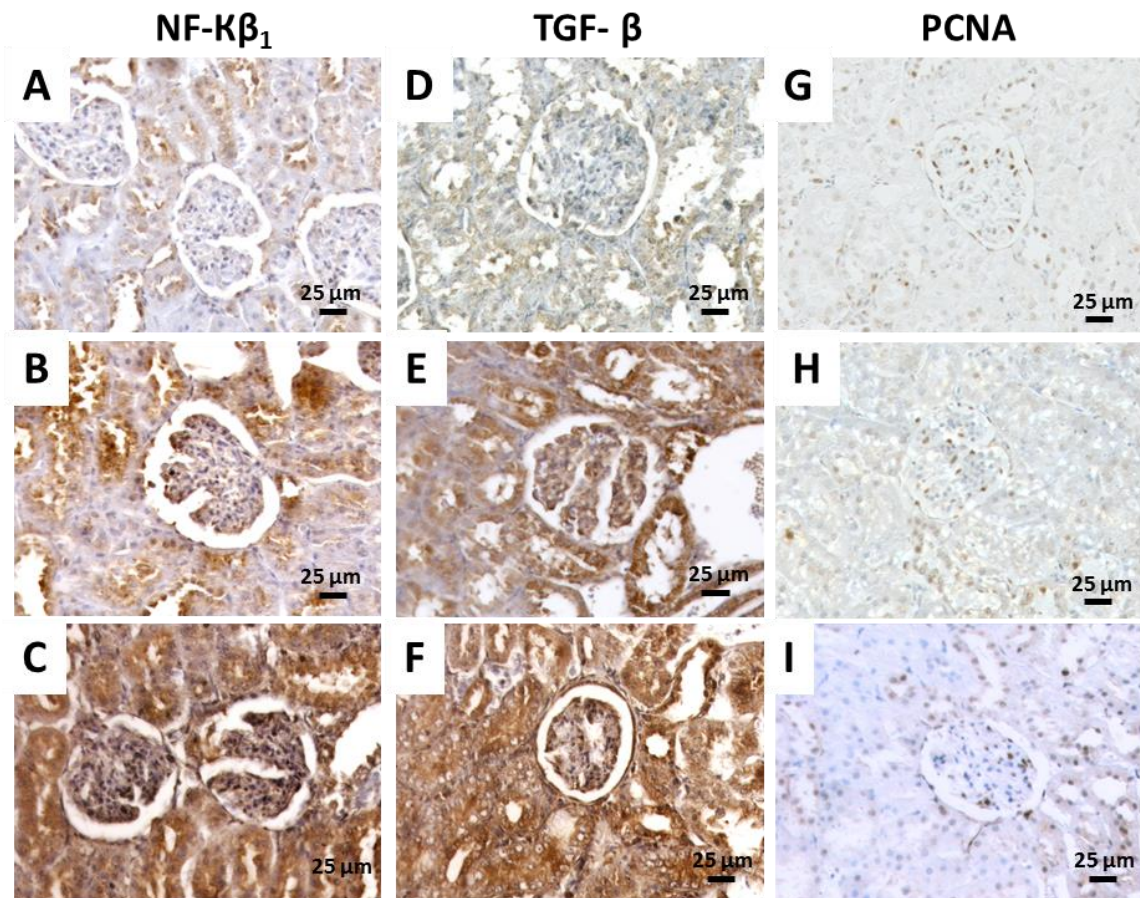


**Figura 38.** Expressão proteica no rim por imunohistoquímica. Factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), molécula-1 de lesão renal (Kim-1) e alvo da rapamicina no mamífero (mTOR). Cada figura é representativa dos grupos controlo (A, D, G), CsA 5 mg (B, E, H) e CsA 30 mg (C, F, I) às 3 semanas de tratamento.



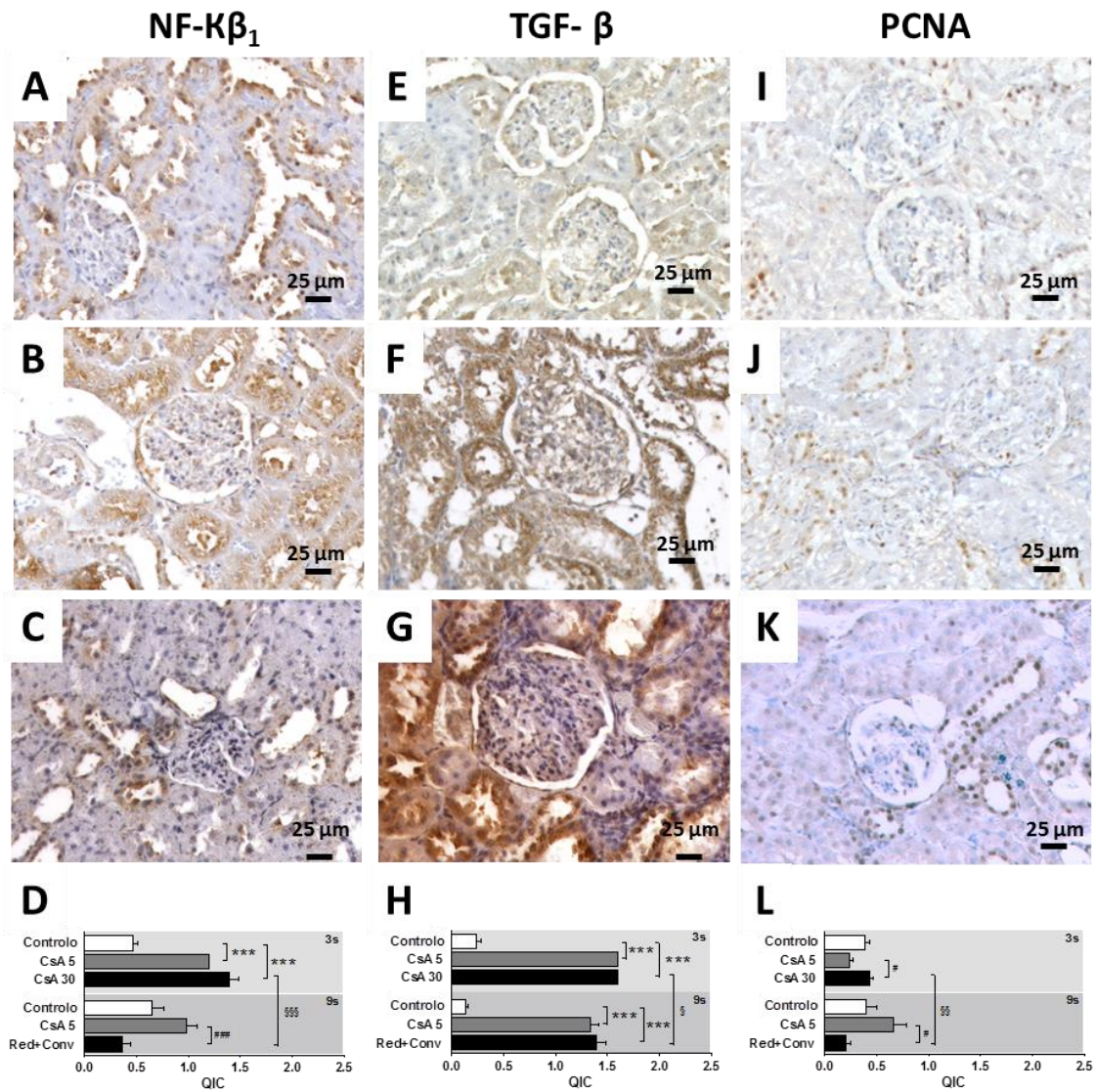


**Figura 39.** Expressão proteica no rim por imunohistoquímica. Factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), molécula-1 de lesão renal (Kim-1) e alvo da rapamicina no mamífero (mTOR). Cada figura é representativa dos grupos controlo (A, E, I), CsA 5 mg (B, F, J) e Red+Conv (C, G, K) às 9 semanas de tratamento. Os gráficos D, H e L representam a quantificação da intensidade e área da expressão da proteína. Valores em médias  $\pm$  e.p.m. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  versus grupo controlo; # #  $P < 0,01$  e # # #  $P < 0,001$ , face ao grupo ciclosporina 5 mg; §  $P < 0,05$  versus CsA 30 mg às 3 semanas de tratamento.



**Figura 40.** Expressão proteica no rim por imunohistoquímica. Factor nuclear kappa beta-1 (NF- $\kappa B_1$ ), factor de crescimento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ ) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Cada figura é representativa dos grupos controlo (A, D, G), CsA 5 mg (B, E, H) e CsA 30 mg (C, F, I) às 3 semanas de tratamento.





**Figura 41.** Expressão proteica no rim por imunohistoquímica. Factor nuclear kappa beta-1 (NF-κβ<sub>1</sub>), factor de crescimento transformante beta 1 (TGF-β) e antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA). Cada figura é representativa dos grupos controlo (A, E, I), CsA 5 mg (B, F, J) e Red+Conv (C, G, K) às 9 semanas de tratamento. Os gráficos D, H e L representam a quantificação da intensidade e área da expressão da proteína. Valores em médias ± e.p.m. \*\*\* P<0,001 versus grupo controlo; # P<0,05 e ### P<0,001, face ao grupo ciclosporina 5 mg; § P<0,05, §§ P<0,01 e §§§ P<0,001 versus CsA 30 mg às 3 semanas de tratamento.

## 4. Discussão

O presente estudo pretendeu esclarecer a evolução da nefropatia num protocolo em que foi utilizada uma dose de ataque de CsA (30 mg) durante um curto período de 3 semanas, seguido por uma redução da dose de CsA para 5 mg durante mais 3 semanas e, por fim, conversão para um inibidor de mTOR, o sirolimus, durante mais 3 semanas, comparativamente a um protocolo de CsA A (5 mg) durante 9 semanas, imitando a dose de CsA de manutenção usada em doentes transplantados. Foi usado um modelo de rato com rins nativos para avaliar a evolução da nefrotoxicidade, através da análise de amostras de soro, urina e tecido renal.

A dose de manutenção de ciclosporina não afectou o peso corporal ao longo do tratamento; porém, a dose mais elevada durante 3 semanas, provocou uma evidente perda de peso nos ratos logo na primeira semana, começando depois a mostrar alguma recuperação de peso. A perda de peso corporal esteve também associada à presença de diarreia sofrida pelos animais sob este tratamento, sendo que esse efeito diminuiu após a redução da dose. Por outro lado, a substituição de CsA para o SRL conduziu a uma menor taxa de ganho de peso dos animais, o que pode ser devido às propriedades anti-proliferativas do SRL. Neste estudo ficou demonstrado para uma dose de manutenção de ciclosporina de 5 mg/kg/dia no rato, que alguns dos efeitos adversos graves da CsA, incluindo a hipertensão arterial e a dislipidemia, já estão presentes após apenas 3 semanas de tratamento, e que são agravados durante uma exposição mais longa (9 semanas). Se o tratamento imunossupressor se iniciar com uma dose mais elevada de CsA verifica-se um notável aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (sistólica e diastólica) para valores até mesmo superiores aos encontrados após 6 semanas com uma dose mais baixa CsA. Curiosamente, a redução da dose levou a uma redução da pressão arterial e, em seguida, a conversão para SRL reduziu ainda mais a frequência cardíaca, para valores

iguais aos do grupo controlo. No entanto, os valores de pressão arterial foram incapazes de normalizar e verificou-se mesmo uma tendência para valores superiores. Na parte A deste capítulo experimental, foram discutidos alguns mecanismos hipoteticamente envolvidos na hipertensão arterial induzida pela CsA. Para além de um desequilíbrio vasomotor sistémico, de causa multifactorial [Sander et al., 1996; Reis et al., 1999; Lassila, 2002; Reis et al., 2003; Reis et al., 2007;], tem sido descrita uma componente vascular renal como responsável tanto pela hipertensão como pela nefropatia induzidas pela CsA [Zhang e Victor, 2000]

No que diz respeito à glicose, insulina e metabolismo lipídico, estudos recentes *ex vivo* em células de tecido adiposo, bem como *in vivo* em ratos, utilizando a CsA, mostraram num teste de tolerância à glicose uma diminuição na sua captação, causando resistência e hiperglicemia [Lopes et al., 2013; Pereira et al., 2013; Fuhrmann et al., 2014], que pode ser responsável pelo desenvolvimento de pré-diabetes pós-transplante. Neste modelo, a monoterapia com CsA aumentou os níveis de glicose no sangue no tratamento de nove semanas, acompanhado por uma diminuição do conteúdo de insulina. No entanto, 30 mg de CsA após apenas três semanas causou hiperglicemia e redução da concentração de insulina, em conjunto com um aumento significativo da concentração sérica de triglicédeos e de colesterol não-HDL. A redução da dose CsA normalizou as concentrações de triglicédeos e de colesterol não-HDL e levou a uma pequena recuperação dos conteúdos de insulina. Quando a CsA foi substituída pelo SRL, os conteúdos de glicose, triglicédeos e colesterol não-HDL aumentaram novamente para valores superiores aos basais. Muito recentemente, foi relatado que esta dose de SRL induz alterações metabólicas em tratamentos de curto ou de longo prazo no fígado, no músculo-esquelético e em alguns tipos de tecido adiposo em ratos [Fuhrmann et al., 2014; Lopes et al., 2014], o que está de acordo com os nossos resultados e com a prática clínica em doentes transplantados.

Relativamente à caracterização bioquímica renal, verificámos que os marcadores séricos de disfunção renal (TFG, creatinina e ureia no soro e taxa de

depuração) são incapazes de expressar plenamente o real estado da função e lesão renal na dose de manutenção de CsA (5 mg), pois não existiram diferenças significativas nestes marcadores tradicionais no tempo final de tratamento, mas foram identificadas lesões renais. No entanto, a peroxidação lipídica no rim estava aumentada no final do tratamento no momento em que as lesões renais eram evidentes nos glomérulos e nos túbulos. Uma dose de 30 mg de CsA durante apenas três semanas Em geral, a redução da dose de CsA normalizou os parâmetros séricos e as depurações, bem como, o conteúdo renal de MDA e a sua taxa de depuração. A conversão de CsA para SRL manteve os mesmos níveis nos marcadores descritos, embora de alguma forma superiores aos encontrados nos animais controlo. O SRL foi descrito como indutor de proteínas na urina, mas a relação entre proteinúria e efeitos induzidos pelo SRL na função renal ainda não é clara e apresenta-se como complexa, tornando a proteinúria um marcador algo limitado para avaliar a disfunção precoce ou a presença de dano renal [O'connell et al., 2011].

O desenvolvimento de biomarcadores não invasivos capazes de diagnosticar a disfunção renal de forma precoce, e monitorizar a resposta à terapia, juntamente com a capacidade de prever a evolução, seria muito valioso. Durante os últimos anos, tem havido esforços para identificar melhores biomarcadores e mais precisos para a nefrotoxicidade induzida por CsA aguda. A lipocalina gelatinase associada a neutrófilos (NGAL) tem sido apontada como um marcador de fase aguda da nefrotoxicidade que pode ser encontrada na urina e no plasma, fazendo do NGAL um potencial biomarcador renal muito sensível a diferentes graus de lesão renal. No entanto, 3 e 9 semanas de tratamentos com baixas doses de CsA não promoveram alterações nos níveis de NGAL séricos e urinários; no entanto, após 3 semanas de tratamentos a dose alta de CsA revelou uma diminuição significativa de conteúdo NGAL na urina, um efeito que foi abolido às 9 semanas (depois da redução da dose de CsA durante 3 semanas e conversão para SRL por mais 3 semanas), pelo aumento simultâneo e proporcional dos conteúdos séricos e urinários de NGAL. Para além

disso, os níveis de NGAL na urina e no soro apresentaram uma correlação significativa no grupo Red+Conv ( $r=0,940$ ,  $P=0,017$ ). Curiosamente, no outro modelo anteriormente apresentado (capítulo B), no protocolo de conversão de CsA para SRL, verificou-se linearidade idêntica entre os conteúdos de NGAL na urina e no soro, acompanhado por proteinúria, sugerindo assim que os níveis de NGAL na urina e no soro poderiam ser vistos como marcadores de disfunção renal e evolução em protocolos de conversão para SRL. Este inibidor da mTOR é descrito na literatura como um agente menos nefrotóxico do que os inibidores da calcineurina, mas um dos melhores efeitos descritos é o desenvolvimento de proteinúria [Cay et al., 2011; Cina et al., 2012]. No capítulo anterior, o SRL, *per se*, desenvolveu proteinúria às 9 semanas de tratamento. Usando modelos com a proteína mTOR “silenciada”, verificou-se uma acumulação de vesículas autolisossômicas nos podócitos que potenciavam o aparecimento de proteinúria [Cinà et al., 2012] e a redução da actividade da AKT, afectando assim o citoesqueleto do podócito [Vassiliadis et al., 2011]. Para além disso, a nível tubulointersticial, a inibição de mTOR usando rapamicina tem um papel no transporte de proteína, pois reduz a sua reabsorção tubular, o que contribui para o aumento dos níveis urinários [Straathof-Galema et al., 2006].

Quanto à caracterização da patologia renal, verificámos que os vasos são as primeiras estruturas renais afectadas pelas baixas doses de CsA, depois de apenas 3 semanas de tratamento, como mostrado pela presença de algumas lesões, tais como hiperemia vascular e vacuolização arteriolar, que pode estar relacionado com o aparecimento de hipertensão; as lesões foram ainda mais agravadas com a exposição prolongada de CsA, com um score global vascular de leve a moderado. Estes dados complementam informações anteriores sugerindo que os primeiros eventos patológicos promovidos pela CsA estão relacionados com a vasoconstrição da arteríola aferentes, a microangiopatia trombótica e a vacuolização tubular [Naesens et al., 2009]. Para além disso, os eventos agudos da CsA estão relacionados com a

diminuição da vasodilatação e formação de radicais livres, que estão entre os principais mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da hipertensão e diminuição da taxa de filtração glomerular [Roullet et al., 1994]. A TFG é um dos marcadores que registou alterações no tratamento com doses mais elevadas de ciclosporina. Por outro lado, neste tratamento, lesões vasculares de grau moderado apareceram num curto período de tratamento, observando-se de seguida uma recuperação ligeira após a redução da dose de CsA e, adicionalmente, quando a CsA foi completamente substituída por sirolimus (grau ligeiro). Na literatura o SRL, é descrito como um agente menos nefrotóxico que a ciclosporina [Luo et al, 2013], o que explica o facto de que os inibidores de mTOR serem testados para substituir a CsA [Campistol et al., 2009; Mota, 2005]. A nível glomerular, no final da monoterapia com CsA (5 mg) apenas foram identificadas lesões leves. No entanto, no protocolo Red+Conv, às 3 semanas, a maioria das lesões analisadas foram classificadas como sendo de grau moderado a grave, tais como espessamento da cápsula de Bowman e hialinização do polo vascular. Apesar da esclerose nodular ter sido classificada apenas como leve, a simples presença desta lesão significa num estágio avançado da doença renal. Esta lesão representa danos irreversíveis e progressivos nos nefrónios, resultando em esclerose glomerular e, conseqüentemente, perda no número de nefrónios [Remuzzi e Bertani, 1998]. A redução de dose de CsA foi associada a uma recuperação da estrutura renal, vista pela redução do grau de todas as lesões. A conversão de CsA para SRL ainda trouxe benefícios adicionais, pois o *score* global ficou entre ausente e leve. A nível tubulointerstitial, uma vez mais, com CsA (5 mg) em monoterapia observaram-se lesões leves, enquanto com 30 mg se constatou existirem lesões severas em apenas 3 semanas de tratamento. A redução da dose de CsA foi incapaz de promover uma recuperação significativa nas estruturas tubulointersticiais, mas a conversão conseguiu amenizar parte das lesões.

Neste estudo, foi avaliada a fibrose renal, que é uma das mais graves conseqüências da utilização da CsA, por intermédio da coloração tricrómio de Masson,



que mostra a deposição de colagénio. A maior parte da formação e deposição de colagénio ocorre em torno dos túbulos, limitando a sua funcionalidade. Foi verificada a presença de fibrose renal em ratos sob CsA 5 mg em monoterapia, mas somente às nove semanas e num grau leve a moderado, capaz de ser reversível e de a função renal restaurada. No entanto, foi visualizada um grau de fibrose grave nos rins dos ratos com alta dose de CsA em todas as estruturas (vasos, glomérulos e túbulos), limitando assim a filtração, a secreção e a reabsorção. A redução da dose de CsA promoveu melhoria nos rins, o que foi reforçado pela menor deposição de colagénio nas estruturas. Na verdade, os podócitos não apresentaram uma coloração intensa a azul, indicando a ausência de colagénio nessas estruturas. Contudo, foi verificado colagénio à volta das cápsulas de Bowman e em redor dos túbulos, mas não no interior das células. A substituição de CsA por SRL trouxe evidentes benefícios tubulointersticiais, pois a marcação de colagénio era quase inexistente. A melhoria da fibrose renal (que é visto como uma via comum final da utilização da CsA na nefropatia de aloenxerto) promovida pelo SRL pode ser devida às suas propriedades anti-proliferativas, para além da capacidade imunossupressora [Luo et al., 2013].

No nosso modelo, a expressão de CTGF (um mediador de fibrose e possível marcador de nefrotoxicidade) no rim aumentou após o tratamento a curto prazo com CsA, mas principalmente na dose mais elevada. Após uma exposição mais prolongada à CsA (com a dose mais baixa) a expressão de CTGF no rim foi ligeiramente reduzida, o que pode ser explicado por um aumento da eliminação urinária, como previamente sugerido por O'Connell et al. (2011) noutro estudo experimental. No rim dos ratos sob o protocolo Red+Conv, a expressão de CTGF no rim foi reduzida, o que pode estar relacionado com a diminuição de fibrose e deposição de colagénio. No entanto, neste grupo a expressão de CTGF não foi normalizada pois foi verificada coloração nos glomérulos e nos túbulos sugerindo, uma vez mais, que algumas das lesões induzidas pela ciclosporina são mantidas mesmo após a conversão para SRL.

Durante os últimos anos, vários estudos toxicológicos têm sido focados na avaliação de hipotéticos biomarcadores que sejam capazes de prever a nefropatia aguda [Fuchs e Hewitt, 2011; Rached et al., 2008; Urbschat et al., 2011], mas sabe-se que os efeitos mínimos sobre a função renal são muito difíceis de detectar. Uma das moléculas apontadas como um possível marcador de nefrotoxicidade é o Kim-1, uma proteína envolvida na proliferação e reparação de tecidos [Han et al., 2002; Ichimura et al., 2004; Hoffmann et al., 2010]. Neste estudo, a Kim-1 apareceu marcada nas células epiteliais dos túbulos proximais, que é uma estrutura sensível ao fármaco e os seus metabolitos. Após 3 semanas de tratamento com CsA de baixa dose, foi encontrado intensa coloração de Kim-1 nos túbulos proximais, mas mais ainda com a dose mais elevada de CsA. Embora esta proteína pode ser vista como um hipotético marcador para a toxicidade da CsA na presença de lesões suaves a moderadas agudas, não pode ser considerada um bom biomarcador de nefrotoxicidade crónica já que a sua expressão foi diminuindo ao longo do tempo com a continuação do tratamento de CsA de baixa dose, bem como no grupo Red+Conv no tempo final. No entanto, uma vez que KIM-1 tem um papel na reparação de tecidos, a redução da expressão de KIM-1 no grupo Red+Conv reforça a ideia de que a redução da dose de CsA e, em seguida, a conversão para SRL, são alterações que conferem renoprotecção. Li e Yang (2009), sugeriram que os danos renais envolvem a activação da resposta imune inata, que provoca a activação do  $\text{NF-}\kappa\beta_1$  e induz a maturação de células dendríticas e de linfócitos T na infiltração do enxerto que contribuem para a nefropatia crónica. Estes resultados confirmam que a toxicidade da CsA pode começar com o aumento da proteína  $\text{NF-}\kappa\beta$  (imunohistoquímica) após 3 semanas de tratamento com CsA e esta sobreexpressão é patente tanto com baixas como com altas doses de CsA, mas mais notório com alta dose; este efeito é contra-regulado com a conversão para SRL. Os resultados indicam que a expressão renal de  $\text{NF-}\kappa\beta_1$  diminuiu de uma maneira dependente do tempo, o que sugere que a redução encontrada no protocolo Red+Conv poderá ser um efeito directo de SRL sob a exposição anterior à CsA,

indicando assim que este factor nuclear pode ter um impacto importante no desenvolvimento de nefrotoxicidade. Para além disso, o tratamento com baixa dose de CsA a curto prazo não foi associado com o aumento da expressão de PCNA no tecido renal, que foi identificado como sendo o mediador chave da fibrose e proliferação [Li e Yang, 2009]. No entanto, um maior tempo de tratamento com a dose mais baixa de CsA promoveu um aumento de PCNA, que é coincidente com o aparecimento de lesões renais. Após a redução da dose de CsA e substituição por SRL, foram detectados baixos níveis deste factor nuclear, que vem de encontro ao verificado no NF- $\kappa\beta_1$  após a mudança para o SRL.

O TGF- $\beta$  foi descrito nas últimas décadas como um factor de crescimento importante para a nefrotoxicidade induzida pela CsA; o nosso modelo vai de encontro a esta teoria. No entanto, durante a exposição prolongada à CsA a nefrotoxicidade evolui, tal como constatado pelo aumento do grau das lesões histológicas, o que parece estar associado a outras vias moleculares e mediadores. Na verdade, no nosso modelo houve uma sobreexpressão significativa de mTOR no rim, uma proteína serina/treonina cinase que tem um importante papel na regulação do crescimento celular, proliferação, motilidade, sobrevivência, síntese de proteínas e de transcrição [Feng et al., 2005]. Mais interessante, a utilização de SRL após o protocolo baseado em CsA reduziu significativamente a expressão de mTOR de acordo com a redução das lesões. Como Lieberthal e Levine (2009) demonstraram, a mTOR desempenha um importante papel na mediação do processo de regeneração e recuperação, dependendo da extensão do dano renal. De facto, a inibição da mTOR tem sido associada com uma melhoria da fibrose renal, glomeruloesclerose e inflamação intersticial, tendo um papel importante em doenças renais distintas [Chen et al., 2012; Kramer et al., 2008] e neste modelo foi verificado uma sobreexpressão da mTOR em ratos tratados com CsA, que conduz a dano glomerular [Inoki et al., 2011]. Além disso, mostrámos previamente que a SRL não aumentou a expressão de mTOR renal num

curto período de tratamento, o que pode explicar a atenuação de lesões encontradas no final do protocolo Red+Conv.

Nesta secção do trabalho, ficou patente que a rapamicina é menos fibrogénica que a CsA, demonstrado num protocolo de redução da dose de CsA seguido por substituição completa por SRL. Claramente, estes resultados reforçam a ideia para a substituição de CsA por SRL quando a prevenção da rejeição aguda está garantida, não só porque os protocolos de exposição à CsA em determinadas doses e por tempos maiores são notoriamente mais deletérios, promovendo a deterioração da estrutura renal, mas também porque a sobre-expressão da mTOR parece ser uma característica da nefropatia induzida pela utilização prolongada de CsA.

## 5. Bibliografia

- Boissonnat P, Gaillard S, Mercier C, Redonnet M, Lelong B, Mattei MF, Mouly-Bandini A, Pattier S, Sirinelli A, Epailly E, Varnous S, Billes MA, Sebbag L, Ecochard R, Cornu C, Gueyffier F. Impact of the early reduction of cyclosporine on renal function in heart transplant patients: a French randomised controlled trial. *Trials* 2012; 13:231.
- Cai Y, Chen Y, Zheng S, Chen B, Yang Y, Xia P. Sirolimus damages podocytes in rats with protein overload nephropathy. *J Nephrol* 2011; 24(3):307-12.
- Campistol JM, Cockwell P, Diekmann F, Donati D, Guirado L, Herlenius G, Mousa D, Pratschke J, San Millán JC. Practical recommendations for the early use of mTOR inhibitors (sirolimus) in renal transplantation. *Transpl Int* 2009; 22(7):681-7.
- Chen G, Chen H, Wang C, Peng Y, Sun L, Liu H, Liu F. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts. *PLoS One* 2012; 7(3):e33626.
- Cinà DP, Onay T, Paltoo A, Li C, Maezawa Y, De Arteaga J, Jurisicova A, Quaggin SE. mTOR regulates autophagic flux in the glomerulus. *Autophagy* 2012; 8(4):696-8.
- de Sévaux RG, Gregoor PJ, Hené RJ, Hoitsma AJ, Vos P, Weimar W, Van Gelder T, Hilbrands LB. A controlled trial comparing two doses of cyclosporine in conjunction with mycophenolate mofetil and corticosteroids. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(8):1750-7.
- Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol* 2012; 26(1):1-10.

- Fuchs TC, Hewitt P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *AAPS J* 2011; 13(4):615-31.
- Fuhrmann A, Lopes P, Sereno J, Pedro J, Espinoza DO, Pereira MJ, Reis F, Eriksson JW, Carvalho E. Molecular mechanisms underlying the effects of cyclosporin A and sirolimus on glucose and lipid metabolism in liver, skeletal muscle and adipose tissue in an in vivo rat model. *Biochem Pharmacol* 2014; 88(2):216-28.
- Gonwa TA, Hricik DE, Brinker K, Grinyo JM, Schena FP; Sirolimus Renal Function Study Group. Improved renal function in sirolimus-treated renal transplant patients after early cyclosporine elimination. *Transplantation* 2002; 74(11):1560-7.
- Gordois A, Nobes M, Toohey M, Russ G. Cost-effectiveness of sirolimus therapy with early cyclosporin withdrawal vs. long-term cyclosporin therapy in Australia. *Clin Transplant* 2006; 20(4):526-36.
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62(1):237-44.
- Hoffmann D, Fuchs TC, Henzler T, Matheis KA, Herget T, Dekant W, Hewitt P, Mally A. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology* 2010; 277(1-3):49-58.
- Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(3):F552-63.
- Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, Blattner SM, Ikenoue T, Rüegg MA, Hall MN, Kwiatkowski DJ, Rastaldi MP, Huber TB, Kretzler M, Holzman LB, Wiggins RC, Guan KL. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(6):2181-96.

- Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. Rapamune Study Group. *Transplantation*.1999; 68(10):1526-32.
- Krämer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, Binder E, Loof T, Khadzhyunov D, Kawachi H, Shimizu F, Diekmann F, Budde K, Neumayer HH, Peters H. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(2):F440-9.
- Lassila M. Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab* 2002; 3(1):61-71.
- Lebranchu Y, Thierry A, Thervet E, Büchler M, Etienne I, Westeel PF, Hurault de Ligny B, Moulin B, Rérolle JP, Frouget T, Girardot-Seguin S, Toupance O. Efficacy and safety of early cyclosporine conversion to sirolimus with continued MMF- four-year results of the Postconcept study. *Am J Transplant* 2011; 11(8):1665-75.
- Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5(9):513-9.
- Lopes P, Fuhrmann A, Sereno J, Pereira MJ, Nunes P, Pedro J, Melão A, Reis F, Carvalho E. Effects of cyclosporine and sirolimus on insulin-stimulated glucose transport and glucose tolerance in a rat model. *Transplant Proc* 2013; 45(3):1142-8.
- Lopes PC, Fuhrmann A, Sereno J, Espinoza DO, Pereira MJ, Eriksson JW, Reis F, Carvalho E. Short and long term in vivo effects of Cyclosporine A and Sirolimus on genes and proteins involved in lipid metabolism in Wistar rats. *Metabolism*2014; 63(5):702-15.
- Luo L, Sun Z, Luo G. Rapamycin is less fibrogenic than Cyclosporin A as demonstrated in a rat model of chronic allograft nephropathy. *J Surg Res* 2013; 179(1):e255-63.
-

- Manito N, Rábago G, Palomo J, Arizón JM, Delgado J, Almenar L, Crespo-Leiro MG, Lage E, Pulpón L. Improvement in chronic renal failure after mycophenolate mofetil introduction and cyclosporine dose reduction: four-year results from a cohort of heart transplant recipients. *Transplant Proc.* 2011 Sep;43(7):2699-706.
- Mota A. Sirolimus: a new option in transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6(3):479-87.
- Muhlbacher F, Paczek L. An open-label study to evaluate the efficacy and safety of cyclosporine reduction in de novo renal allograft recipients receiving sirolimus: a dose comparative study. *Am J Transplant* 2002; 3:S238.
- Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(2):481-508.
- O'Connell S, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Identification of novel indicators of cyclosporine A nephrotoxicity in a CD-1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252(2):201-10.
- Pereira MJ, Palming J, Rizell M, Aureliano M, Carvalho E, Svensson MK, Eriksson JW. The immunosuppressive agents rapamycin, cyclosporin A and tacrolimus increase lipolysis, inhibit lipid storage and alter expression of genes involved in lipid metabolism in human adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365(2):260-9.
- Rached E, Hoffmann D, Blumbach K, Weber K, Dekant W, Mally A. Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin a in vivo and in vitro. *Toxicol Sci* 2008; 103(2):371-81.
- Reis F, Almeida L, Alcobia T, Santos-Dias JD, Lourenço M, Palmeiro A, Ferrer-Antunes CA, Mesquita JF, Pontes F, Teixeira F. Isosorbide-5-mononitrate treatment prevents cyclosporin A-induced platelet hyperactivation and the underlying nitric oxide-cyclic guanosine-3',5'-monophosphate disturbances. *Thromb Res* 2003; 110(2-3):107-15.
-



- Reis F, Rocha L, Ponte L, Alcobia T, Almeida L, Costa-Almeida C, Teixeira F. Effect of preventive and regressive isosorbide 5-mononitrate treatment on catecholamine levels in plasma, platelets, adrenals, left ventricle and aorta in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Life Sci* 2005; 77(20):2514-28.
- Reis F, Rocha-Pereira P, Teixeira de Lemos E, Parada B, Baptista S, Figueiredo A, Santos-Silva A, Costa-Almeida C, Mota A, Teixeira F. Oxidative stress in cyclosporine-induced hypertension: evidence of beneficial effects or tolerance development with nitrate therapy. *Transplant Proc.* 2007; 39(8):2494-500.
- Reis F, Tavares P, Fontes Ribeiro CA, Antunes F, Teixeira F. The peripheral serotonergic system and platelet aggregation in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Thromb Res* 1999; 96(5):365-72.
- Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998; 339(20):1448-56.
- Roullet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1994; 93(5):2244-50.
- Sander M, Lyson T, Thomas GD, Victor RG. Sympathetic neural mechanisms of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9(11):121S-138S.
- Straathof-Galema L, Wetzels JF, Dijkman HB, Steenbergen EJ, Hilbrands LB. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006; 6(2):429-33.
- ter Meulen CG, van Riemsdijk I, Hené RJ, Christiaans MH, Borm GF, van Gelder T, Hilbrands LB, Weimar W, Hoitsma AJ. Steroid-withdrawal at 3 days after renal transplantation with anti-IL-2 receptor alpha therapy: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant* 2004; 4(5):803-10.
- Urbschat A, Obermüller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers* 2011; 16 Suppl 1:S22-30.

- Vassiliadis J, Bracken C, Matthews D, O'Brien S, Schiavi S, Wawersik S. Calcium mediates glomerular filtration through calcineurin and mTORC2/Akt signaling. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(8):1453-61.
- Weir MR, Diekmann F, Flechner SM, Lebranchu Y, Mandelbrot DA, Oberbauer R, Kahan BD. mTOR inhibition: the learning curve in kidney transplantation. *Transpl Int* 2010; 23(5):447-60.
- Young EW, Ellis CN, Messana JM, Johnson KJ, Leichtman AB, Mihatsch MJ, Hamilton TA, Groisser DS, Fradin MS, Voorhees JJ. A prospective study of renal structure and function in psoriasis patients treated with cyclosporin. *Kidney Int* 1994; 46(4):1216-22.
- Zhang W, Victor RG. Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2000; 13(9):999-1004.

# **CAPÍTULO IX**

**Comentários finais e conclusões**



## 1. Comentários finais

Aumentar o tempo de vida do enxerto de forma a aumentar a esperança de vida do doente transplantado continua a ser o maior desafio da transplantação, incluindo a renal. Apesar do importante papel que os CNIs desempenham na prevenção da rejeição do enxerto, a nefrotoxicidade a eles associada é considerada há vários anos como um dos maiores potenciadores da disfunção e da perda futura do órgão transplantado, não havendo ainda, até ao momento, uma alternativa terapêutica satisfatória. A experiência clínica e os estudos em modelos animais confirmam a nefrotoxicidade induzida pelos CNIs, mas vários aspectos importantes, como os mecanismos subjacentes à evolução da nefrotoxicidade e os melhores biomarcadores, permanecem por clarificar e a sua elucidação será clinicamente relevante. A imunossupressão baseada em protocolos envolvendo CNIs, incluindo a CsA e o Tac, continua a ser a base da terapêutica do doente transplantado, sobretudo devido à grande capacidade para prevenir a rejeição, incluindo a rejeição aguda. No entanto, a nefrotoxicidade crónica desses fármacos continua a ser o *calcanhar de aquiles* da terapêutica imunossupressora, caracterizando-se por lesão renal irreversível em todas as estruturas renais, incluindo os glomérulos, as arteríolas, e a região tubulointersticial.

Ao longo dos últimos anos, e reconhecendo a existência e a gravidade destes efeitos secundários dos CNIs, nomeadamente da CsA, várias estratégias terapêuticas têm sido conduzidas no sentido de minimizar esta nefrotoxicidade. Tais medidas de minimização passam pela utilização de fármacos renoprotectores uma vez instituída a disfunção renal, mas sobretudo adaptando protocolos de imunossupressão potencialmente menos nefrotóxicos. Contudo, só uma clarificação mais precisa dos mecanismos envolvidos na evolução da nefrotoxicidade, bem como dos biomarcadores mais fiáveis desta condição, incluindo em protocolos de conversão

para outros fármacos, poderá ajudar e a combater /ou retardar este grave efeito secundário.

Na prática, os biomarcadores devem revelar mais informações que possam ser relevantes para o perfil de segurança do fármaco/classe em questão e o factor translacional destes biomarcadores para os seres humanos é da maior importância na actualidade. É reconhecido que os actuais marcadores são pouco sensíveis e inespecíficos em relação à estrutura renal lesada, pois a toxicidade aguda é considerada assintomática. Por exemplo, a creatinina e a ureia séricas apenas se manifestam significativamente alteradas quando parte da massa renal já se perdeu [Abulezz, 2008]. Por isso, um dos desafios mais importantes será a identificação de marcadores biológicos para a previsão do impacto renal a longo prazo após o transplante. Há uma vantagem muito clara na preferência pelo uso de amostras não-invasivas para a detecção de marcadores renais; no entanto, especificamente no caso de biomarcadores da transcrição e de proteínas no tecido renal, há que considerar a necessidade do auxílio de um protocolo de biópsias. A desvantagem da necessidade de material de biópsia pode ser o principal factor de limitação para estudos básicos na prática clinica, a menos que esses marcadores (genes ou proteínas) sejam igualmente identificados em sangue e/ou urina.

Optou-se por usar neste trabalho um modelo de rim nativo, que não é um espelho totalmente fiel da realidade do doente transplantado, mas que ainda assim nos apresenta várias vantagens: reproduz de forma relativamente clara a toxicidade dos fármacos *per se*, (exclui a interferência dos aspectos relacionados com a cirurgia) e permite a comparação com a grande maioria dos trabalhos nesta área que, na verdade, se baseiam igualmente em rim nativo.

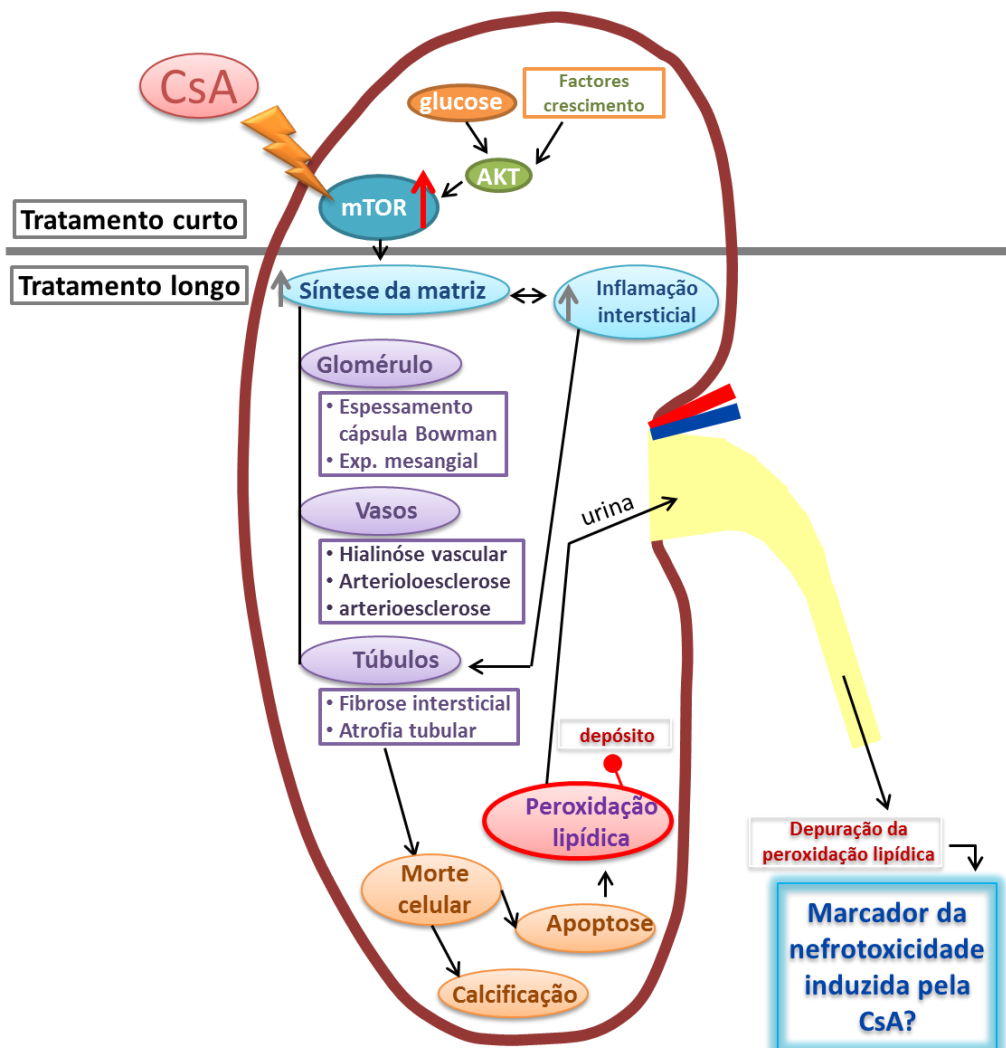
Num caracter imunossupressor, avaliámos a proteína interleucina-2 livre em circulação e que é fundamental para a activação dos linfócitos T e sua interferência na rejeição do enxerto. Tal análise permite aferir, ainda que indirectamente, da capacidade imunossupressora dos dois fármacos em concentrações de manutenção,

utilizadas na prática clínica, e confirmadas neste estudo através do doseamento das concentrações sanguíneas dos fármacos em estudo. Os valores séricos de IL-2 para os grupos CsA, SRL e protocolo de conversão, às 9 semanas, foram idênticos e muito inferiores aos registados no grupo controlo sem qualquer terapia imunossupressora, o que confirma o esperado efeito dos fármacos a este nível.

Na primeira parte experimental, pretendeu-se comparar o impacto animal renal de um tratamento curto e outro longo com CsA, como modelos de toxicidade aguda e crónica, através de amostras de soro, urina e tecido renal, com especial enfoque em marcadores clássicos e marcadores emergentes de proliferação/fibrose, inflamação e angiogénese, acompanhados por uma análise histomorfológica. Após um tratamento de curta duração (agudo) com CsA, verificou-se existirem alterações na função renal, avaliada usando marcadores bioquímicos tradicionais em soro e urina, mas ainda sem modificações significativas da estrutura renal (lesão). Em termos moleculares, constatou-se existir uma expressão renal aumentada de alguns genes, incluindo o *PCNA*, o *TGF-β<sub>1</sub>*, o *Tp53* e o *NF-κβ*, bem como de mTOR, tanto o gene como a proteína, e sobretudo a nível tubular. Nesta situação, porém, parece existir uma contra-regulação, já que vários genes associados às vias inflamatórias se encontravam reprimidos no rim. Após o tratamento mais longo (crónico), foram encontradas lesões idênticas às verificadas clinicamente, sendo que neste estudo se confirmou a evolução da nefrotoxicidade induzida pela CsA ao longo do tempo. Tratamentos prolongados com CsA levaram ao aparecimento de lesões reversíveis e irreversíveis, dependendo das estruturas lesadas. Como referido, a mTOR é uma proteína de proliferação e crescimento celular, síntese de proteínas e transcrição de factores, assim como do controlo do citoesqueleto [Park et al., 2010]. A sobre-expressão desta proteína nos túbulos renais, verificada já às 3 semanas, que se acentua com o aumento da exposição (9 semanas), sugere que possa estar associada à fibrose e a outras lesões proliferativas encontradas a nível tubular (Figura 42). Com efeito, o facto de aparecer gradualmente aumentada, em sintonia com a presença de

lesões, sugere que desempenha um papel importante, senão crucial, na evolução das lesões induzidas pela CsA. Esta hipótese sugere igualmente que a sua inibição possa promover melhoria da funcionalidade e estrutura renal, com inevitável impacto ao nível de glomeruloesclerose e/ou da fibrose e atrofia tubular.

Esta etapa inicial do trabalho permitiu ainda sugerir a possibilidade de usar a taxa de depuração do MDA como possível marcador de nefrotoxicidade, uma vez que se constatou estar substancialmente aumentada na fase em que ocorreram as lesões renais, isto é, após a exposição prolongada à CsA (Figura 42). Uma sugestão idêntica havia sido sugerida por alguns investigadores em trabalhos anteriores [Knight et al, 1989], mas tal possibilidade não fora consistentemente avaliada posteriormente.



**Figura 42.** Diagrama ilustrativo das vias de sinalização activadas e patologias renais promovidas pelos tratamentos curto e longo de CsA. Exp. Mesangial, Expansão mesangial.



Considerando os achados encontrados nesta análise da transição da disfunção renal induzida pela CsA para nefrotoxicidade, em particular a possibilidade de envolvimento da sobre-expressão da mTOR na evolução da lesão renal, achou-se oportuno avaliar o impacto de um protocolo de conversão de CsA para SRL. Este fármaco imunossupressor tem um mecanismo de acção que passa pela inibição da mTOR, e tem sido associado a um carácter menos nefrotóxico (ou renoprotector), ainda que o exacto impacto renal destes protocolos permaneça por elucidar, tanto mais que existem evidências de que a sua utilização possa estar condicionada em casos em que promove o desenvolvimento de proteinúria.

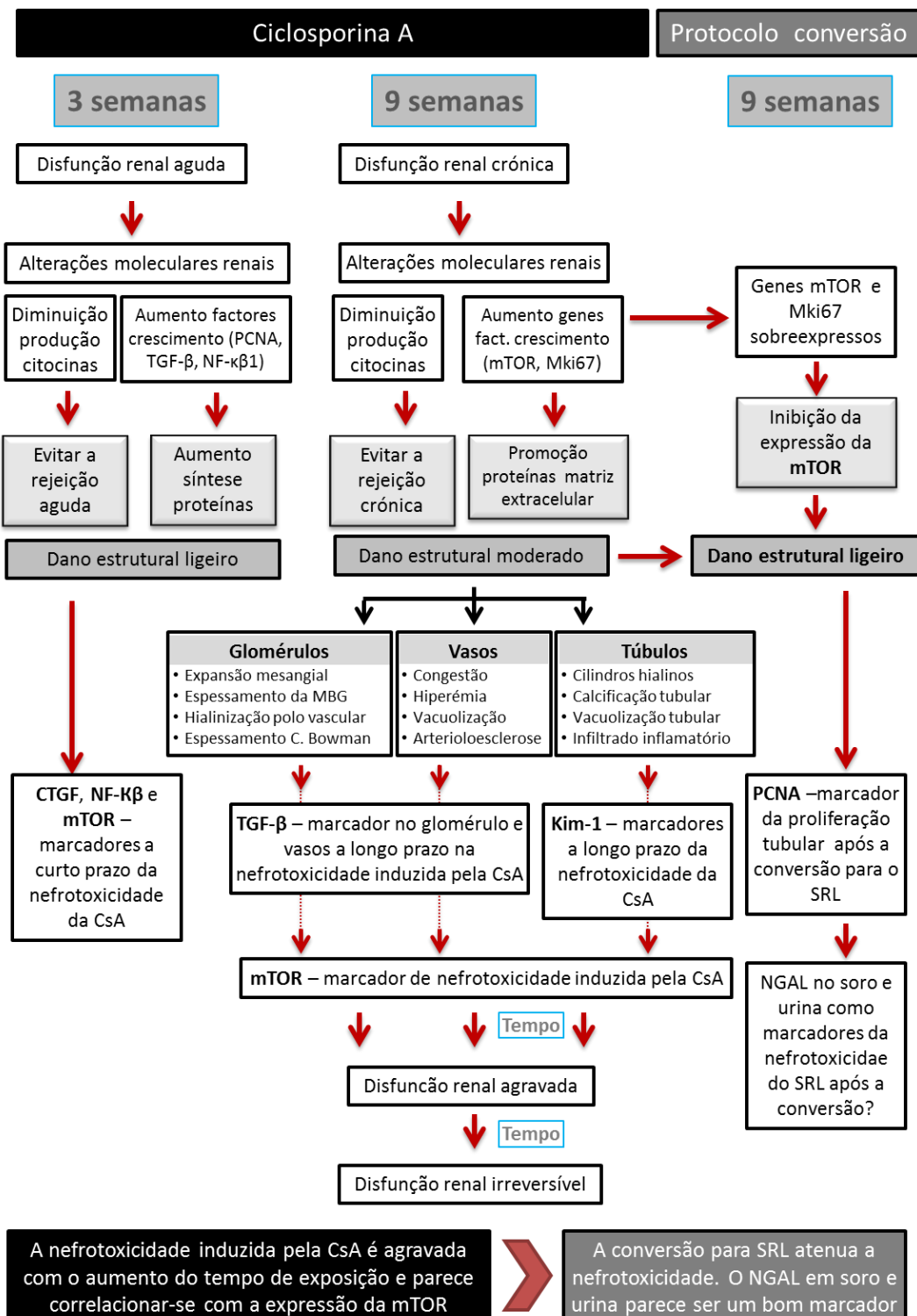
Constatou-se, numa análise inicial, que os marcadores séricos e urinários não reflectem com exactidão as alterações na estrutura/função renal nos tratamentos com CsA, sobretudo a curto prazo, já que em tratamento prolongado as evidências de disfunção e lesão renal foram mais claras. Esta análise vem reforçar a ideia de que os marcadores actualmente usados na prática clínica não espelham o real estado do rim, ou seja, somente se manifestam quando uma percentagem de massa renal está afectada. Histologicamente, foram encontradas lesões de carácter proliferativo e fibrótico, sendo uma parte delas atenuadas/eliminadas quando se converte a CsA para SRL. Não obstante a melhoria das lesões, o SRL, *per se*, apresenta potencial para desenvolvimento de proteinúria, tal como tem sido descrito repetidamente em termos clínicos [Reiser, 2013; Jun et al., 2014; Ponticelli, 2014] ou investigação básica [Ko et al., 2013], e que este trabalho experimental confirma e reproduz fielmente. Esta característica tem sido a principal responsável pelas dúvidas sobre o real carácter renoprotector deste fármaco, recomendando prudência e escolha criteriosa na sua utilização.

Por isso, o desenvolvimento de biomarcadores não invasivos e que possam diagnosticar e monitorizar a disfunção renal de forma precoce, será clinicamente relevante. Neste trabalho testaram-se alguns desses marcadores em ensaios de tecido renal, soro e urina. Os resultados mostram que no rim, e a curto prazo (3

semanas), CTGF, NF- $\kappa$ B e mTOR podem ser potenciais biomarcadores. A longo prazo (9 semanas), TGF- $\beta_1$  e kim-1, assim como mTOR, poderão ser potenciais mais-valias na sinalização da nefrotoxicidade crónica. No soro, de assinalar a proximidade de perfil entre o TGF- $\beta_1$  e a IL-7 no tratamento mais longo com CsA, podendo haver aqui alguma associação entre a patologia renal e a IL-7. O protocolo de conversão de CsA para SRL ficou associado a melhorias na funcionalidade do rim e foi capaz de atenuar as lesões induzidas pela CsA e impedir a sua evolução.

As seguintes questões poderão se colocadas: como monitorizar a função renal nem protocolo que envolve fármacos com alvos moleculares e mecanismos de acção diferentes e com impacto distinto a nível renal? Existirão biomarcadores mais fiáveis para acompanhamento da (dis)função renal após a conversão da CsA para SRL? Neste trabalho, sobressaiu o perfil sérico e urinário do NGAL, uma proteína produzida nos túbulos renais que pode ser reabsorvida por estas estruturas e ser doseada no soro, mas que é também eliminada na urina. O papel do NGAL em termos celulares é o de fomentar a reparação tecidual e eliminação de resíduos celulares, estando presente apenas residualmente em condições normais. Na literatura foi inicialmente apontado como um biomarcador de fase aguda de alguns agentes nefrotóxicos (por exemplo, ocratoxina A e gentamicina [Hoffmann et al., 2010]), mas em relação à nefrotoxicidade induzida pela CsA, não existem dados relevantes na literatura. Relativamente à influência do SRL *per se* nos níveis de NGAL, não se obteve igualmente nenhuma correlação directa neste estudo. No entanto, no protocolo de conversão verificou-se existir uma linearidade entre as concentrações séricas e urinárias, o que poderá ser um indicador da redução da capacidade de reabsorção tubular de proteínas associado com maior relaxamento dos podócitos [Reiser, 2013] depois do uso de CsA, o que vai de encontro à proteinúria que o fármaco (SRL) promove *per se*. A Figura 43 ilustra as principais alterações encontradas, incluindo mecanismos moleculares e lesões renais, resultantes de um protocolo de administração de CsA, suprimido pela conversão para SRL. São ainda apontados

possíveis biomarcadores das duas situações: tratamento com CsA e transição para SRL.



**Figura 43.** Diagrama ilustrativo das alterações moleculares e estruturais, e possíveis biomarcadores, promovidas pelos tratamentos de CsA (3 e 9 semanas) e pelo protocolo de conversão de CsA para SRL.

Poderá concluir-se desta parte que a nefrotoxicidade induzida pela CsA é agravada com a duração de exposição e que uma característica desta evolução é o aumento da expressão renal de mTOR (gene e proteína). A conversão para SRL atenua este efeito da CsA, sendo que nesta fase do tratamento se destaca a correlação entre os níveis séricos e urinários de NGAL como um possível marcador do impacto renal, podendo vir a ser útil clinicamente se confirmado com estudos mais abrangentes.

Depois de analisados os tratamentos ao longo do tempo de CsA e SRL isoladamente, e de testado um protocolo de conversão que se assemelhe ao usado em doentes com risco imunológico normalmente baixo, sem risco de rejeição aguda particularmente elevado, pretendeu-se avaliar o impacto renal de um protocolo que possa representar melhor os doentes com risco imunológico mais elevado e que são mais susceptíveis a desenvolverem rejeição aguda, razão pela qual precisem de ser tratadas com fármacos/regimes de imunossuppressores mais potentes.

Neste sentido, estudou-se um grupo de animais administrados inicialmente (por 3 semanas) com uma dose mais elevada de CsA, com posterior redução substancial da dose e, por fim, conversão para SRL no último período de 3 semanas. A figura 44 esquematiza o impacto renal de um protocolo baseado na utilização de uma dose padrão de CsA com posterior conversão para SRL, em comparação com a utilização de uma dose de CsA, seguido de redução da dose e posterior conversão para SRL. Em relação aos tratamentos com CsA, constatou-se que a aplicação de uma dose mais elevada, mesmo que durante um curto período de tempo (3 semanas), tem um impacto mais amplo na função e lesão renal, bem como em outros aspectos de relevo, como a pressão arterial, a frequência cardíaca e os perfis lipídico e glicídico.

Se o tratamento imunossupressor se iniciar com uma dose mais elevada de CsA verifica-se um notável aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (sistólica e diastólica) para valores superiores aos encontrados após 6 semanas com uma dose mais baixa de CsA. Na parte A deste capítulo experimental, foram

discutidos alguns mecanismos hipoteticamente envolvidos na hipertensão arterial induzida pela CsA. A origem deste desequilíbrio vasomotor sistémico tem causa multifactorial [Sander et al., 1996; Reis et al., 1999; Lassila, 2002; Reis et al., 2003; Reis et al., 2007], mas também é devida uma componente vascular renal promovida pela CsA [Zhang e Victor, 2000]. Esta dose mais alta de CsA (30 mg) promove ainda hiperglicemia e dislipidemia (aumento de triglicédeos e de colesterol não-HDL) e redução da concentração de insulina. A nível renal, esta dose diminuiu a TFG e as taxas de depuração de creatinina e de ureia, juntamente com aumento dos níveis séricos, acompanhado por elevação da concentração renal de MDA e da sua depuração. O aumento da depuração de MDA e do conteúdo renal podem ter um papel importante como biomarcadores preditivos de nefrotoxicidade induzida pela CsA, uma vez que as variações apareceram no momento das lesões renais. No entanto, os níveis de NGAL no soro e urina permaneceram inalterados. Relativamente às lesões renais, em termos gerais, as lesões glomerular foram classificadas como sendo de grau moderado a grave, algumas delas de carácter irreversível, causadoras de perda de nefrónios e promotoras de esclerose glomerular [Remuzzi e Bertani, 1998]. A nível tubular, constatou-se existirem lesões severas, sendo a fibrose renal uma das mais graves consequências da utilização da CsA. Genericamente, a redução da dose originou melhorias significativas na gravidade das lesões glomerulares e vasculares, mas sem atenuação das tubulointersticiais. Em termos metabólicos, a redução da dose CsA normalizou as concentrações de triglicédeos e de colesterol não-HDL e levou a uma pequena recuperação dos conteúdos de insulina, registando-se também valores mais baixos de pressão arterial e frequência cardíaca. A conversão de CsA para SRL reduziu a pressão arterial, normalizou a frequência cardíaca, o conteúdo de insulina e os marcadores clínicos renais. Estas melhorias foram acompanhadas por um perfil histomorfológico mais favorável a nível glomerular, vascular e tubulointersticial, com a fibrose renal classificada como sendo de baixo grau ou mesmo vestigial. Curiosamente, o NGAL voltou a apresentar um perfil de

correlação entre as concentrações séricas e as urinárias depois da conversão de CsA para SRL, reforçando a ideia de que possa vir a ser considerado um bom biomarcador em protocolos de conversão.

Parâmetros	3 semanas		6 semanas		9 semanas	
	CsA 5 mg	CsA 30 mg	CsA 5 mg	Redução	CsA 5 mg	Red + Conv
Frequência cardíaca	0	+++	++	+	+	0
Pressão arterial sistólica	+	++	++	+	++	+
Pressão arterial diastólica	+	++	++	+	++	+
Glicose	0	+	0	0	+	+
Insulina	0	+++	0	+++	+	0
Triglicerídeos	0	+++	0	0	0	+++
Depuração creatinina	+	++	0	0/+	0	0
Depuração ureia	0/+	++	0	0	0	0
Taxa filtração glomerular	0/+	+++	0	0	0	0
TBARs no rim	0/+	+	0	0/+	+	0/+
NGAL na urina	0/+	+	N.R.	N.R.	0	+++
Arterioesclerose	0	+++	+	++	+ /+++	+ /+++
Congestão vascular	0	0	+	+	+++	0
Hiperémia	+	++	++	++	+++ /+++	+ /+++
Scoring vascular médio	0	+ /+++	+	+ /+++	+ /+++	+
Espessamento C. Bowman	0	+++	0	++	+	+
Hialinização polo vascular	0	+++	0	+	+	0
Esclerose nodular	0	+	0	+	0	0/+
Scoring glomerular médio	0	++	0	+	+	0/+
Calcificação tubular	0	+	0	+ /+++	+	+
Cilindros hialinos	0	+	0	+	0/+	+
Fibrose e atrofia tubular	0	+	0	+ /+++	0	+
Scoring tubular médio	0	+ /+++	0	+	+	0/+
Colagénio	0	+++	0	++	+	+
CTGF	++	+++	N.A.	N.R.	+	+++
Kim-1	0/+	+	N.R.	N.R.	0/+	0/+
mTOR	++	+++	N.R.	N.R.	++	++
NF- $\kappa\beta_1$	++	+++	N.R.	N.R.	+	0
TGF- $\beta$	+++	+++	N.R.	N.R.	++	++
PCNA	0	0	N.R.	N.R.	0	0

Legenda:

+++	++ /+++	++	+ /+++	+	0/+	0	N.R.
							Não realizado

**Figura 44.** Esquema ilustrativo do impacto renal provocado por uma terapia contínua com baixa dose de CsA em comparação com um protocolo de redução da dose de CsA (30 mg para 5 mg) e posterior conversão para SRL.

## 2. Conclusões

Como conclusões, destacam-se neste trabalho de investigação básica, usando um modelo animal de rim nativo, alguns aspectos que julgamos serem relevantes em termos de possibilidade de aplicação na prática clínica no contexto de terapêutica imunossupressora do doente transplantado renal:

- A CsA induz disfunção renal e nefrotoxicidade. Este efeito é agravado com a utilização de doses mais elevadas e com o aumento do tempo de exposição ao fármaco. A nefrotoxicidade é acompanhada por outras perturbações que contribuem para o aumento do risco cardiovascular, incluindo a hipertensão arterial, a taquicardia, a hiperglicemia e a dislipidemia.
- A transição da disfunção renal induzida pela CsA para a nefrotoxicidade caracteriza-se pela afectação progressiva da estrutura renal em todas as regiões (vascular, glomerular e tubular), pelo aumento da taxa de depuração de produtos da peroxidação lipídica, e pela expressão renal aumentada de moléculas mediadoras de fenómenos de fibrose e proliferação, destacando-se a mTOR.
- A conversão precoce para SRL, após um período prévio de tratamento com CsA, mimetizando assim um dos protocolos de minimização da utilização da CsA em uso na prática clínica, permite atenuação, ou mesmo prevenir, a evolução das lesões renais, não obstante os efeitos nefastos que o SRL induz *per se*, incluindo as alterações metabólicas e a indução de proteinúria.

- Os marcadores clássicos (séricos e urinários) de disfunção e lesão renal parecem não ser suficientemente fiáveis para clarificar o tipo e a extensão da disfunção e lesão renal a cada momento dos protocolos envolvendo diferentes imunomoduladores (CsA e SRL).
- Dos protocolos de conversão de CsA para SRL sobressai a maior dificuldade em atenuar algumas das lesões quando a dose de CsA é mais elevada e o seu impacto negativo a nível renal é já extenso e, em alguns aspectos, irreversível.
- O impacto de um protocolo de conversão parece poder ser melhor aferido através de alguns marcadores não tradicionais, incluindo os níveis de NGAL, que apresentaram correlação em soro e urina apenas neste tipo de estratégia.

Em suma, a nefrotoxicidade induzida pela CsA é atenuada através da conversão para SRL, devendo esta substituição ser realizada antes do desenvolvimento de lesões muito graves e irreversíveis e o impacto renal destes protocolos acompanhado de biomarcadores fiáveis e mais específicos.



# **CAPÍTULO X**

Bibliografía



- Aboujaoude W, Milgrom ML, Govani MV. Lymphedema associated with sirolimus in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2004;77(7):1094-6.
- Abulezz S. KIM-1 expression in kidney allograft biopsies: Improving the gold standard. *Kidney Int*. 2008;73(5):522-3.
- Alexander RT, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(8):1451-8.
- Almeida CC, Silveira MR, de Araújo VE, de Lemos LL, de Oliveira Costa J, Reis CA, de Assis Acurcio F, das Gracas Braga Ceccato M. Safety of immunosuppressive drugs used as maintenance therapy in kidney transplantation: a systematic review and meta analysis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(10):1170-94.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
- Andoh TF, Bennett WM. Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998;7(3):265-70.
- Ashman N, Chapagain A, Dobbie H, Raftery MJ, Sheaff MT, Yaqoob MM. Belatacept as maintenance immunosuppression for postrenal transplant de novo drug-induced thrombotic microangiopathy. *Am J Transplant*. 2009;9(2):424-7.
- Augustine JJ, Rodriguez V, Padiyar A, Bodziak KA, Schulak JA, Hricik DE. Reduction in erythropoietin resistance after conversion from sirolimus to enteric coated mycophenolate sodium. *Transplantation*. 2008;86(4):548-53.

- Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86(9):1206-13.
- Bateman JC, Barberio JR, Grice P, Klopp CT, Pierpont H. Fatal complications of intensive antibiotic therapy in patients with neoplastic disease. *AMA Arch Intern Med*. 1952;90(6):763-73.
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-12.
- Bilbao I, Sapisochin G, Dopazo C, Lazaro JL, Pou L, Castells L, Caralt M, Blanco L, Gantxegi A, Margarit C, Charco R. Indications and management of everolimus after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41(6):2172-6.
- Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(1):F2-9.
- Bodziak KA, Hricik DE. New-onset diabetes mellitus after solid organ transplantation. *Transpl Int*. 2009;22(5):519-30.
- Bökenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, Schumann G, Byrd D, Brodehl J. Cystatin C – a new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. *Pediatrics*. 1998;101(5):875-81.

- Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2008;241:78-83.
- Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(7):519-31.
- Bouvier N, Flinois JP, Gilleron J, Sauvage FL, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D, Pallet N. Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(1):F160-9.
- Brar H, Olivier J, Lebrun C, Gabbard W, Fulop T, Schmidt D. Predictors of mortality in a cohort of intensive care unit patients with acute renal failure receiving continuous renal replacement therapy. *Am J Med Sci.* 2008;335(5):342-7.
- Bren A, Pajek J, Grego K, Buturovic J, Ponikvar R, Lindic J, Knap B, Vizjak A, Ferluga D, Kandus A. Follow-up of kidney graft recipients with cyclosporine-associated hemolytic-uremic syndrome and thrombotic microangiopathy. *Transplant Proc.* 2005;37(4):1889-91.
- Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol.* 2003;178(2):169-75.
- Brouard S, Ashton-Chess J, Souillou JP. Surrogate markers for the prediction of long term outcome in transplantation: Nantes Actualité Transplantation (NAT) 2007 meeting report. *Hum Immunol.* 2008;69(1):2-8.

Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, Baeten D, Zhang M, Ashton Chess J, Braudeau C, Hsieh F, Dupont A, Pallier A, Moreau A, Louis S, Ruiz C, Salvatierra O, Souillou JP, Sarwal M. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15448-53.

Bumbea V, Kamar N, Ribes D, Esposito L, Modesto A, Guitard J, Nasou G, Durand D, Rostaing L. Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(11):2517-23.

Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM. Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003;23(5):465-76.

Canadian Neoral Renal Transplantation Study Group. Absorption profiling of cyclosporine microemulsion (neoral) during the first 2 weeks after renal transplantation. *Transplantation.* 2001;72(6):1024-32.

Champion L, Stern M, Israël-Biet D, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H, Porcher R, Morelon E. Brief communication: sirolimus-associated pneumonitis: 24 cases in renal transplant recipients. *Ann Intern Med.* 2006;144(7):505-9.

Chang CT, Hung CC, Tian YC, Yang CW, Wu MS. Cyclosporin reduces paracellin-1 expression and magnesium transport in thick ascending limb cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(4):1033-40.

Chapman JR, Nankivell BJ. Nephrotoxicity of cyclosporin A: short-term gain, long-term pain? *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(8):2060-3.

- Chawla LS, Kellum JA. Acute kidney injury in 2011: Biomarkers are transforming our understanding of AKI. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(2):68-70.
- Chow KM, Li PK. Review article: New-onset diabetes after transplantation. *Nephrology (Carlton).* 2008;13(8):737-44.
- Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch.* 2009;458(6):1039-48.
- Christians U, Kohlhaw K, Budniak J, Bleck JS, Schottmann R, Schlitt HJ, Almeida VM, Deters M, Wonigeit K, Pichlmayr R. Cyclosporine metabolite pattern in blood and urine of liver graft recipients. I. Association of cyclosporine metabolites with nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;41:285-290.
- Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet.* 2010;375(9731):2073-81.
- Chuang P, Langone AJ. Clobetasol ameliorates aphthous ulceration in renal transplant patients on sirolimus. *Am J Transplant.* 2007;7(3):714-7.
- Ciancio G, Burke GW, Gaynor JJ et al. A randomized long-term trial of tacrolimus/sirolimus versus tacrolimus/mycophenolate versus cyclosporine/sirolimus in renal transplantation: three-year analysis. *Transplantation.* 2006;81:845-852.

Cinà DP, Onay T, Paltoo A, Li C, Maezawa Y, De Arteaga J, Jurisicova A, Quaggin SE. MTOR regulates autophagic flux in the glomerulus. *Autophagy*. 2012;8(4):696-8.

Clive DM. Renal transplant-associated hyperuricemia and gout. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(5):974-9.

Collins BS, Davis CL, Marsh CL, McVicar JP, Perkins JD, Alpers CE. Reversible cyclosporine arteriopathy. *Transplantation*. 1992;54(4):732-4.

Copeland KR, Thliveris JA, Yatscoff RW. Toxicity of cyclosporine metabolites. *Ther Drug Monit*. 1990;12(6):525-32.

Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007;298(17):2038-47.

Creput C, Le Friec G, Bahri R, Amiot L, Charpentier B, Carosella E, Rouas-Freiss N, Durrbach A. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. *Hum Immunol*. 2003;64(11):1033-8.

Cusumano AM, González Bedat MC. Chronic kidney disease in Latin America: time to improve screening and detection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(2):594-600.

Daniel C, Renders L, Amann K, Schulze-Lohoff E, Hauser IA, Hugo C. Mechanisms of everolimus-induced glomerulosclerosis after glomerular injury in the rat. *Am J Transplant*. 2005;5(12):2849-61.

Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med*. 2007;13(6):252-9.



Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, Dotta F, Haller H, Hernández D, Kasiske BL, Kiberd B, Krentz A, Legendre C, Marchetti P, Markell M, van der Woude FJ, Wheeler DC; International Expert Panel. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation*. 2003;75(10 Suppl):SS3-24.

de Mare-Bredemeijer EL, Metselaar HJ. Optimization of the use of Calcineurin inhibitors in liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):85-95.

Dean PG, Grande JP, Sethi S, Park WD, Griffin MD, Cosio FG, Larson TS, Stegall MD. Kidney transplant histology after one year of continuous therapy with sirolimus compared with tacrolimus. *Transplantation*. 2008;85(8):1212-5.

Dean PG, Lund WJ, Larson TS, Prieto M, Nyberg SL, Ishitani MB, Kremers WK, Stegall MD. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation*. 2004 ;77(10):1555-61.

del Moral RG, Andujar M, Ramírez C, Gómez-Morales M, Masseroli M, Aguilar M, Olmo A, Arrebola F, Guillén M, García-Chicano MJ, Nogales FF, O'Valle F. Chronic cyclosporin A nephrotoxicity, P-glycoprotein overexpression, and relationships with intrarenal angiotensin II deposits. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1705-14.

Delanghe JR, Speeckaert MM. Creatinine determination according to Jaffe-what does it stand for? *NDT Plus*. 2011;4(2):83-86.

- Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B, Worley PF, Kozma SC, Powell JD. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;30(6):832-44.
- Desai N, Heenan S, Mortimer PS. Sirolimus-associated lymphoedema: eight new cases and a proposed mechanism. *Br J Dermatol*. 2009;160(6):1322-6.
- Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension*. 1994;23(6 Pt 2):957-61.
- Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant*. 1995;9(2):79-84.
- Dittrich E, Schmaldienst S, Soleiman A, Hörl WH, Pohanka E. Rapamycin-associated post-transplantation glomerulonephritis and its remission after reintroduction of calcineurin-inhibitor therapy. *Transpl Int*. 2004;17(4):215-20.
- Dowling RJ, Pollak M, Sonenberg N. Current status and challenges associated with targeting mTOR for cancer therapy. *BioDrugs*. 2009;23(2):77-91.
- Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T, Yao J, Takeda M, Araki I, Sawada N, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Suppression of NF-kappaB by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol*. 2009;182(11):7201-11.

Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Köttgen A, Levey AS, Levin A. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158-69.

Eggers PW. Effect of transplantation on the Medicare end-stage renal disease program. *N Engl J Med*. 1988;318(4):223-9.

Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valentine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sørensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhardt P; RAD B253 Study Group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2003;349(9):847-58.

Ekberg H, Grinyó J, Nashan B, Vanrenterghem Y, Vincenti F, Voulgari A, Truman M, Nasmyth-Miller C, Rashford M. Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study. *Am J Transplant*. 2007;7(3):560-70.

Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloz P, Halloran PF; ELITE Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2007;357(25):2562-75.

English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation*. 1987;44(1):135-41.

Evans RW, Manninen DL, Garrison LP Jr, Hart LG, Blagg CR, Gutman RA, Hull AR, Lowrie EG. The quality of life of patients with end-stage renal disease. *N Engl J Med*. 1985;312(9):553-9.

Feldman G, Kiely B, Martin N, Ryan G, McMorrow T, Ryan MP. Role for TGF-beta in cyclosporine-induced modulation of renal epithelial barrier function. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(6):1662-71.

Fervenza FC, Fitzpatrick PM, Mertz J, Erickson SB, Liggett S, Popham S, Wochos DN, Synhavsky A, Hippler S, Larson TS, Bagniewski SM, Velosa JA; Mayo Nephrology Collaborative Committee. Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(5):1288-92.

Flechner SM, Glyda M, Cockfield S, Grinyo J, Legendre C, Russ G, et al: The ORION study: comparison of two sirolimus-based regimens versus tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011;11:1633-1644.

Flechner SM, Goldfarb D, Solez K, Modlin CS, Mastroianni B, Savas K, Babineau D, Kurian S, Salomon D, Novick AC, Cook DJ. Kidney transplantation with sirolimus and mycophenolate mofetil-based immunosuppression: 5-year results of a randomized prospective trial compared to calcineurin inhibitor drugs. *Transplantation*. 2007;83(7):883-92.

Flechner SM, Kobashigawa J, Klintmalm G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant*. 2008;22(1):1-15.

Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly. *Am J Kidney Dis*. 2001;37(1):79-83.

- Franz M, Regele H, Schmaldienst S, Stummvoll HK, Hörl WH, Pohanka E. Posttransplant hemolytic uremic syndrome in adult retransplanted kidney graft recipients: advantage of FK506 therapy? *Transplantation*. 1998;66(9):1258-62.
- Frimat L, Cassuto-Viguier E, Charpentier B, Noël C, Provôt F, Rostaing L, Glotz D, Sraer JD, Bourbigot B, Moulin B, Lang P, Ducloux D, Pouteil-Noble C, Girardot-Seguín S, Kessler M. Impact of cyclosporine reduction with MMF: a randomized trial in chronic allograft dysfunction. The 'reference' study. *Am J Transplant*. 2006;6(11):2725-34.
- Fritsche L, Budde K, Dragun D, Einecke G, Diekmann F, Neumayer HH. Testosterone concentrations and sirolimus in male renal transplant patients. *Am J Transplant*. 2004;4(1):130-1.
- Fuchs TC, Hewitt P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *AAPS J*. 2011;13(4):615-31.
- Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K, Wen CP. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*. 2013;382(9889):339-52.
- Garrouste C, Kamar N, Guilbeau-Frugier C, Guitard J, Esposito L, Lavayssière L, Nogier MB, Cointault O, Ribes D, Rostaing L. Long-term results of conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in 150 maintenance kidney transplant patients. *Exp Clin Transplant*. 2012; 10(2):110-8
- Garrouste C, Kamar N, Guilbeau-Frugier C, Guitard J, Esposito L, Lavayssière L, Nogier MB, Cointault O, Ribes D, Rostaing L. Long-term results of conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in 150 maintenance kidney transplant patients. *Exp Clin Transplant*. 2012; 10(2):110-8

Gilbert RE, Akdeniz A, Weitz S, Usinger WR, Molineaux C, Jones SE, Langham RG, Jerums G. Urinary connective tissue growth factor excretion in patients with type 1 diabetes and nephropathy. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2632-6.

Gleadle JM. Review article: How cells sense oxygen: lessons from and for the kidney. *Nephrology (Carlton)*. 2009;14(1):86-93.

Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, Klintmalm GB. End stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation*. 2001;72(12):1934-9.

Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ*. 1996;7(4):469-80.

Guerra G, Ilahe A, Ciancio G. Diabetes and kidney transplantation: past, present, and future. *Curr Diab Rep*. 2012;12(5):597-603.

Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int*. 2000;58(4):1389-99.

Gwinner G, Mengel M, Franz I, Kreipe HH, Haller H, Schwarz A: Acute rejection and borderline rejection in protocol biopsies of renal allograft recipients: Risk factors and impact on outcome [Abstract 29]. Paper presented at the American Transplant Congress; May 20 to 25, 2005; Seattle, WA.

- Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A; NGAL Meta analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;54(6):1012-24.
- Hagen M, Hjelmessaeth J, Jenssen T, Morkrid L, Hartmann A. A 6-year prospective study on new onset diabetes mellitus, insulin release and insulin sensitivity in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(10):2154-9.
- Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation.* 1999;68(9):1356-61.
- Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-29.
- Han SW, Li C, Ahn KO, Lim SW, Song HG, Jang YS, Cho YM, Jang YM, Ghee JY, Kim JY, Kim SH, Kim J, Kwon OJ, Yang CW. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol.* 2008;28(5):707-14.
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62(1):237-44.
- Hancock WW, Gao W, Faia KL, Csizmadia V. Chemokines and their receptors in allograft rejection. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(5):511-6.
- Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev.* 2008;88(2):451-87.

- Hardinger KL, Brennan DC. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. *World J Transplant.* 2013;3(4):68-77.
- Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, Ackermann H, Seidl C, Hocher B, Zanger UM, Geiger H, Eichelbaum M, Schwab M. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(5):1501-11.
- Haydar AA, Denton M, West A, Rees J, Goldsmith DJ. Sirolimus-induced pneumonitis: three cases and a review of the literature. *Am J Transplant.* 2004;4(1):137-9.
- Heeger PS. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant.* 2003;3(5):525-33.
- Heering P, Grabensee B. Influence of ciclosporin A on renal tubular function after kidney transplantation. *Nephron.* 1991;59(1):66-70.
- Heering PJ, Klein-Vehne N, Fehsel K. Decreased mineralocorticoid receptor expression in blood cells of kidney transplant recipients undergoing immunosuppressive treatment: cost efficient determination by quantitative PCR. *J Clin Pathol.* 2004;57(1):33-6.
- Hertig A, Anglicheau D, Verine J, Pallet N, Touzot M, Ancel PY, Mesnard L, Brousse N, Baugey E, Glotz D, Legendre C, Rondeau E, Xu-Dubois YC. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(8):1584-91.
- Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Ther Drug Monit.* 2010;32(4):387-93.



- Höcherl K, Dreher F, Vitzthum H, Köhler J, Kurtz A. Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(10):2427-36.
- Höcherl K, Kees F, Krämer BK, Kurtz A. Cyclosporine A attenuates the natriuretic action of loop diuretics by inhibition of renal COX-2 expression. *Kidney Int.* 2004;65(6):2071-80.
- Hoffmann D, Fuchs TC, Henzler T, Matheis KA, Herget T, Dekant W, Hewitt P, Mally A. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology.* 2010; 277(1-3):49-58.
- Hoffmann D, Fuchs TC, Henzler T, Matheis KA, Herget T, Dekant W, Hewitt P, Mally A. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology.* 2010; 277(1-3):49-58.
- Holmes A, Abraham DJ, Chen Y, Denton C, Shi-wen X, Black CM, Leask A. Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem.* 2003;278(43):41728-33.
- Hur KY, Kim MS, Kim YS, Kang ES, Nam JH, Kim SH, Nam CM, Ahn CW, Cha BS, Kim SI, Lee HC. Risk factors associated with the onset and progression of posttransplantation diabetes in renal allograft recipients. *Diabetes Care.* 2007;30(3):609-15.
- Huyghe E, Zairi A, Nohra J, Kamar N, Plante P, Rostaing L. Gonadal impact of target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) in male patients: an overview. *Transpl Int.* 2007;20(4):305-11.

- Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, Sanicola M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.* 1998;273(7):4135-42.
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell.* 1993;4(6):637-45.
- Iijima K, Hamahira K, Kobayashi A, Nakamura H, Yoshikawa N. Immunohistochemical analysis of renin activity in chronic cyclosporine nephropathy in childhood nephritic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(12):2265-71.
- Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, Kusek JW, Manzi J, Van Lente F, Zhang YL, Coresh J, Levey AS; CKD-EPI Investigators. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med.* 2012;367(1):20-9.
- International Neoral Renal Transplantation Study Group.. Cyclosporine microemulsion (Neoral) absorption profiling and sparse-sample predictors during the first 3 months after renal transplantation. *Am J Transplant.* 2002;2(2):148-56.
- Issa N, Kukla A, Ibrahim HN. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol.* 2013;37(6):602-12.
- Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Teramura Y, Kawamura A, Hata T, Ninomiya S, Esumi Y. Absorption, distribution, metabolism and excretion of tacrolimus (FK506) in the rat. *Drug Metab Pharmacokinet.* 1998;13:259-65.

Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nickleit V. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(7):1963-8.

Jun H, Jung CW, Kim MG, Park KT. Experiences on conversion to once-daily Advagraf and sirolimus combination in stable kidney recipients. *Transplant Proc.* 2014; 46(2):400-2.

Jun H, Jung CW, Kim MG, Park KT. Experiences on conversion to once-daily Advagraf and sirolimus combination in stable kidney recipients. *Transplant Proc.* 2014; 46(2):400-2.

Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med.* 1989;321(25):1725-38.

Kahan BD. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(10):831-8.

Kamar N, Frimat L, Blancho G, Wolff P, Delahousse M, Rostaing L. Evaluation of the efficacy and safety of a slow conversion from calcineurin inhibitor- to sirolimus-based therapies in maintenance renal-transplant patients presenting with moderate renal insufficiency. *Transpl Int.* 2007;20(2):128-34.

Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM, Gallon L, Meier-Kriesche HU, Weir MR, Wilkinson A. Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2008;8(7):1384-92.

Kawahara T, Asthana S, Kneteman NM. m-TOR inhibitors: what role in liver transplantation? *J Hepatol.* 2011;55(6):1441-51.

KDIGO. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Suppl.* 2012;2(1):1-138.

Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation*. 1996;62(7):920-6.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9 Suppl 3:S1-155.

Killackey MT. Transplantation in obese patient. *Mt Sinai J Med*. 2012;79(3):388-96.

Kim MJ, Mayr M, Pechula M, Steiger J, Dickenmann M. Marked erythrocyte microcytosis under primary immunosuppression with sirolimus. *Transpl Int*. 2006;19(1):12-8.

Knight JA, Cheung AK, Pieper RK, Servilla K. Increased urinary lipoperoxide levels in renal transplant patients. *Ann Clin Lab Sci* 1989; 19(4):238-41.

Knight JA, Cheung AK, Pieper RK, Servilla K. Increased urinary lipoperoxide levels in renal transplant patients. *Ann Clin Lab Sci* 1989; 19(4):238-41.

Knight SR, Morris PJ. The clinical benefits of cyclosporine C2-level monitoring: a systematic review. *Transplantation*. 2007;83(12):1525-35.

Ko HT, Yin JL, Wyburn K, Wu H, Eris JM, Hambly BD, Chadban SJ. Sirolimus reduces vasculopathy but exacerbates proteinuria in association with inhibition of VEGF and VEGFR in a rat kidney model of chronic allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28(2):327-36.

- Ko HT, Yin JL, Wyburn K, Wu H, Eris JM, Hambly BD, Chadban SJ. Sirolimus reduces vasculopathy but exacerbates proteinuria in association with inhibition of VEGF and VEGFR in a rat kidney model of chronic allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28(2):327-36.
- Kreis H, Oberbauer R, Campistol JM, Mathew T, Daloz P, Schena FP, Burke JT, Brault Y, Gioud-Paquet M, Scarola JA, Neylan JF; Rapamune Maintenance Regimen Trial. Long-term benefits with sirolimus-based therapy after early cyclosporine withdrawal. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(3):809-17.
- Kung L, Batiuk TD, Palomo-Pinon S, Noujaim J, Helms LM, Halloran PF. Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine. *Am J Transplant.* 2001;1(4):325-33.
- Lameire NH, Bagga A, Cruz D, De Maeseneer J, Endre Z, Kellum JA, Liu KD, Mehta RL, Pannu N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet.* 2013;382(9887):170-9.
- Larson TS, Dean PG, Stegall MD, Griffin MD, Textor SC, Schwab TR, Gloor JM, Cosio FG, Lund WJ, Kremers WK, Nyberg SL, Ishitani MB, Prieto M, Velosa JA. Complete avoidance of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a randomized trial comparing sirolimus and tacrolimus. *Am J Transplant.* 2006;6(3):514-22.
- Laskow DA, Curtis JJ, Luke RG, Julian BA, Jones P, Deierhoi MH, Barber WH, Diethelm AG. Cyclosporine-induced changes in glomerular filtration rate and urea excretion. *Am J Med.* 1990;88(5):497-502.
- Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation.* 2002;73(9):1373-81.

- Lea JP, Sands JM, McMahon SJ, Tumlin JA. Evidence that the inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity by FK506 involves calcineurin. *Kidney Int.* 1994;46(3):647-52.
- Lebranchu Y, Thierry A, Thervet E, Büchler M, Etienne I, Westeel PF, Hurault de Ligny B, Moulin B, Rérolle JP, Frouget T, Girardot-Seguin S, Toupance O. Efficacy and safety of early cyclosporine conversion to sirolimus with continued MMF- four-year results of the Postconcept study. *Am J Transplant.* 2011;11(8):1665-75.
- Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O, Westeel PF, Etienne I, Thervet E, Moulin B, Frouget T, Le Meur Y, Glotz D, Heng AE, Onno C, Buchler M, Girardot-Seguin S, Hurault de Ligny B. Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: concept study. *Am J Transplant.* 2009;9(5):1115-23.
- Letavernier E, Bruneval P, Mandet C, Duong Van Huyen JP, Péraldi MN, Helal I, Noël LH, Legendre C. High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(2):326-33.
- Letavernier E, Péraldi MN, Pariente A, Morelon E, Legendre C. Proteinuria following a switch from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Transplantation.* 2005;80(9):1198-203.
- Leung LY, Lim H-K, Hicks D, et al. Sirolimus (rapamycin): Metabolite characterization in rat and human liver microsomal incubations and trough whole blood of renal transplant patients treated with sirolimus, cyclosporine and prednisone. *ISSX Proc* 1996;10:366.

Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2007;72(3):247-59.

Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2006;145(4):247-54.

Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet.* 2012;379(9811):165-80.

Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, Kasiske BL, Eckardt KU. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* 2011;80(1):17-28.

Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12.

Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han WK, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon RW, Li L, Balakrishnan VS, Pereira BJ, Bonventre JV, Jaber BL. Urinary N-acetyl-beta (D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(3):904-12.

- Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetzkaya L, Pratt B, Ledbetter S. Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(2):377-88.
- Luan FL, Zhang H, Schaubel DE, Miles CD, Cibrik D, Norman S, Ojo AO. Comparative risk of impaired glucose metabolism associated with cyclosporine versus tacrolimus in the late posttransplant period. *Am J Transplant*. 2008;8(9):1871-7.
- MacDonald A, Scarola J, Burke JT, Zimmerman JJ. Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clin Ther*. 2000;22 Suppl B:B101-121.
- Mahé E, Morelon E, Lechaton S, Sang KH, Mansouri R, Ducasse MF, Mamzer-Bruneel MF, de Prost Y, Kreis H, Bodemer C. Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation*. 2005;79(4):476-82.
- Maiorano A, Stallone G, Schena A, Infante B, Pontrelli P, Schena FP, Grandaliano G. Sirolimus interferes with iron homeostasis in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2006;82(7):908-12.
- Markell M. New-onset diabetes mellitus in transplant patients: pathogenesis, complications, and management. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(6):953-65.
- Marti HP, Frey FJ. Nephrotoxicity of rapamycin: an emerging problem in clinical medicine. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(1):13-5.
- Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernández-Fuentes M, Soullillou JP, Sánchez-Fueyo A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7(2):309-19.



- McTaggart RA, Tomlanovich S, Bostrom A, Roberts JP, Feng S. Comparison of outcomes after delayed graft function: sirolimus-based versus other calcineurin inhibitor sparing induction immunosuppression regimens. *Transplantation*. 2004;78(3):475-80.
- Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol*. 1998 ;49(6):356-63.
- Mihatsch MJ, Thiel G, Basler V, Ryffel B, Landmann J, von Overbeck J, Zollinger HU. Morphological patterns in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 1985;17(4 Suppl 1):101-16.
- Miller JL. Sirolimus approved with renal transplant indication. *Am J Health Syst Pharm*. 1999;56(21):2177-8.
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534-43.
- Miura K, Nakatani T, Asai T, Yamanaka S, Tamada S, Tashiro K, Kim S, Okamura M, Iwao H. Role of hypomagnesemia in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*. 2002;73(3):340-7.
- Montalbano M, Neff GW, Yamashiki N, Meyer D, Bettiol M, Slapak-Green G, Ruiz P, Manten E, Safdar K, O'Brien C, Tzakis AG. A retrospective review of liver transplant patients treated with sirolimus from a single center: an analysis of sirolimus-related complications. *Transplantation*. 2004;78(2):264-8.

- Montori VM, Basu A, Erwin PJ, Velosa JA, Gabriel SE, Kudva YC. Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature. *Diabetes Care*. 2002;25(3):583-92.
- Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int*. 2007;71(10):967-70.
- Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):153-9.
- Morozumi K, Takeda A, Uchida K, Mihatsch MJ. Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology? *Transplant Proc*. 2004;36(2 Suppl):251S-256S.
- Mota A, Arias M, Taskinen EI, Paavonen T, Brault Y, Legendre C, Claesson K, Castagneto M, Campistol JM, Hutchison B, Burke JT, Yilmaz S, Häyry P, Neylan JF; Rapamune Maintenance Regimen Trial. Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years. *Am J Transplant*. 2004;4(6):953-61.
- Muntner P, Newsome B, Kramer H, Peralta CA, Kim Y, Jacobs DR Jr, Kiefe CI, Lewis CE. Racial differences in the incidence of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(1):101-7.
- Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE, Suthanthiran M. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*. 2005;353(22):2342-51.

Mytilineos J, Laux G, Opelz G. Relevance of IL10, TGFbeta1, TNFalpha, and IL4Ralpha gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant.* 2004;4(10):1684-90.

Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(2):481-508.

Nagata M, Ninomiya T, Doi Y, Yonemoto K, Kubo M, Hata J, Tsuruya K, Iida M, Kiyohara Y. Trends in the prevalence of chronic kidney disease and its risk factors in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(8):2557-64.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003;349(24):2326-33.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation.* 2004;78(4):557-65.

Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM. Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. *Transplantation.* 2004;77(9):1457-9.

Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, Cheung E, Allen RD, O'Connell PJ, Chapman JR. Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation.* 2001;71(4):515-23.

National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse. Kidney and Urologic Diseases Statistics for the United States. Available online: <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/kustats/> (accessed on 04 June 2014).

National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.

Navarro-Antolín J, López-Muñoz MJ, Klatt P, Soria J, Michel T, Lamas S. Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *FASEB J.* 2001;15(7):1291-3.

Neau-Cransac M, Moreau K, Deminière C, Merville P, Saric J. Decrease in sirolimus induced proteinuria after switch to everolimus in a liver transplant recipient with diabetic nephropathy. *Transpl Int.* 2009;22(5):586-7.

Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(12):2151-7.

Nieves-Cintrón M, Amberg GC, Nichols CB, Molkentin JD, Santana LF. Activation of NFATc3 down-regulates the beta1 subunit of large conductance, calcium-activated K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle and contributes to hypertension. *J Biol Chem.* 2007;282(5):3231-40.

Oberbauer R, Segoloni G, Campistol JM, Kreis H, Mota A, Lawen J, Russ G, Grinyó JM, Stallone G, Hartmann A, Pinto JR, Chapman J, Burke JT, Brault Y, Neylan JF; Rapamune Maintenance Regimen Study Group. Early cyclosporine withdrawal from a sirolimus-based regimen results in better renal allograft survival and renal function at 48 months after transplantation. *Transpl Int.* 2005;18(1):22-8.

Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, Arndorfer J, Christensen L, Merion RM. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med.* 2003;349(10):931-40.

Oyen O, Strøm EH, Midtvedt K, Bentdal O, Hartmann A, Bergan S, Pfeffer P, Brekke IB. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in renal allograft recipients with thrombotic microangiopathy/hemolytic uremic syndrome. *Am J Transplant.* 2006;6(2):412-8.

Pallet N, Bouvier N, Bendjallabah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant.* 2008;8(11):2283-96.

Pallet N, Rabant M, Xu-Dubois YC, Lecorre D, Mucchielli MH, Imbeaud S, Agier N, Hertig A, Thervet E, Legendre C, Beaune P, Anglicheau D. Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;229(2):184-96.

Paziana K, Del Monaco M, Cardonick E, Moritz M, Keller M, Smith B, Coscia L, Armenti V. Ciclosporin use during pregnancy. *Drug Saf.* 2013;36(5):279-94.

- Pearson TC, Mulgaonkar S, Patel A, et al. Efficacy and safety of mycophenolate mofetil (MMF)/sirolimus (SRL) maintenance therapy after calcineurin inhibitor (CNI) withdrawal in renal transplant recipients: final results of the Spare-the-Nephron (STN) trial. *Am J Transplant.* 2008;8(Suppl 2):213.
- Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, Cushman M, McClellan W, Zakai NA, Safford MM, Zhang X, Muntner P, Warnock D. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA.* 2011;305(15):1545-52.
- Pfaller W, Gstraunthaler G. Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect.* 1998;106 Suppl 2:559-69.
- Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdmann EA, Shankland SJ, Alpers CE, Bennett WM, Couser WG, et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 1995;6(4):1186-96.
- Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, Clark J, Verani RR, Chou TC, Kahan BD. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(5):1059-71.
- Ponticelli C. De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol.* 2007;67(6):335-40.
- Ponticelli C. The pros and the cons of mTOR inhibitors in kidney transplantation. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014; 10(2):295-305.

Ponticelli C. The pros and the cons of mTOR inhibitors in kidney transplantation. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014; 10(2):295-305.

Pontrelli P, Rossini M, Infante B, Stallone G, Schena A, Loverre A, Ursi M, Verrienti R, Maiorano A, Zaza G, Ranieri E, Gesualdo L, Ditunno P, Bettocchi C, Schena FP, Grandaliano G. Rapamycin inhibits PAI-1 expression and reduces interstitial fibrosis and glomerulosclerosis in chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2008;85(1):125-34.

Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *JAMA.* 1993;270(11):1339-43.

Qi W, Twigg S, Chen X, Polhill TS, Poronnik P, Gilbert RE, Pollock CA. Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(4):F800-9.

Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S, Taburet AM, Charpentier B, Becquemont L. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(6):546-52.

Randhawa PS, Shapiro R, Jordan ML, Starzl TE, Demetris AJ. The histopathological changes associated with allograft rejection and drug toxicity in renal transplant recipients maintained on FK506. Clinical significance and comparison with cyclosporine. *Am J Surg Pathol.* 1993;17(1):60-8.

Reiser J. Akt2 relaxes podocytes in chronic kidney disease. *Nat Med.* 2013; 19(10):1212-3.

Reiser J. Akt2 relaxes podocytes in chronic kidney disease. *Nat Med.* 2013; 19(10):1212-3.

Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(8):1459-62.

Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(1):25-38.

Roby KA, Shaw LM. Effects of cyclosporine and its metabolites in the isolated perfused rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 1993;4(2):168-77.

Rostaing L, Kamar N. mTOR inhibitor/proliferation signal inhibitors: entering or leaving the field? *J Nephrol.* 2010;23(2):133-42.

Ruiz JC, Campistol JM, Sánchez-Fructuoso A, Rivera C, Oliver J, Ramos D, Campos B, Arias M, Diekmann F. Increase of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus-based treatment in kidney transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(11):3252-7.

Rüster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(11):2985-91.

Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem.* 1993;268(9):6077-80.

Säemann MD, Haidinger M, Hecking M, Hörl WH, Weichhart T. The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *Am J Transplant.* 2009;9(12):2655-61.



- Saliba F, Dharancy S, Lorho R, Conti F, Radenne S, Neau-Cransac M, Hurtova M, Hardwighsen J, Calmus Y, Dumortier J. Conversion to everolimus in maintenance liver transplant patients: a multicenter, retrospective analysis. *Liver Transpl.* 2011;17(8):905-13.
- Saurina A, Campistol JM, Piera C, Diekmann F, Campos B, Campos N, de las Cuevas X, Oppenheimer F. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft dysfunction: changes in glomerular haemodynamics and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(2):488-93.
- Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, Campistol JM, Racusen L, Polinsky MS, Goldberg-Alberts R, Li H, Scarola J, Neylan JF; Sirolimus CONVERT Trial Study Group. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation.* 2009;87(2):233-42.
- Schrier RW. Vasopressin and aquaporin 2 in clinical disorders of water homeostasis. *Semin Nephrol.* 2008;28(3):289-96.
- Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, Fulladosa X, Torras J, Carrera M, Grinyó JM, Alsina J. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int.* 1997;51(1):310-6.
- Shah NK, Deeb WE, Choksi R, Epstein BJ. Dapagliflozin: a novel sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy.* 2012;32(1):80-94.

Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2000;58(3):1174-85.

Simon JF, Swanson SJ, Agodoa LY, Cruess DF, Bohem EM, Abbott KC. Induction sirolimus and delayed graft function after deceased donor kidney transplantation in the United States. *Am J Nephrol.* 2004;24(4):393-401.

Singh P, Thomson SC. Renal homeostasis and tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(1):59-64.

Skhiri H, Morelon E, Noel LH, Mamzer-Bruneel MF, Legendre C, Peraldi MN, Kreis H. Unusual post-transplantation recurrence of focal segmental glomerulosclerosis which resolved with cyclosporine but not with sirolimus. *Transpl Int.* 2005;18(4):458-60.

Smith KD. Toll-like receptors in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(3):189-96.

Sociedade Portuguesa de Transplantação. 2014.

Srinivas TR, Schold JD, Guerra G, Eagan A, Bucci CM, Meier-Kriesche HU. Mycophenolate mofetil/sirolimus compared to other common immunosuppressive regimens in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7(3):586-94.

Stallone G, Infante B, Schena A, Battaglia M, Ditunno P, Loverre A, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(12):3755-62.

- Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med.* 1981;305(5):266-9.
- Stephany BR, Augustine JJ, Krishnamurthi V, Goldfarb DA, Flechner SM, Braun WE, Hricik DE, Dennis VW, Poggio ED. Differences in proteinuria and graft function in de novo sirolimus-based vs. calcineurin inhibitor-based immunosuppression in live donor kidney transplantation. *Transplantation.* 2006;82(3):368-74
- Stockand JD. Vasopressin regulation of renal sodium excretion. *Kidney Int.* 2010;78(9):849-56.
- Stojnev S, Pejčić M, Dolicanin Z, Velickovic LJ, Dimov I, Stefanovic V. Challenges of genomics and proteomics in nephrology. *Ren Fail.* 2009;31(8):765-72.
- Straathof-Galema L, Wetzels JF, Dijkman HB, Steenbergen EJ, Hilbrands LB. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant.* 2006;6(2):429-33.
- Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(7):1359-68.
- Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2003;63(5):1714-24.
- Teteris SA, Engel DR, Kurts C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney Int.* 2011;80(2):139-45.

- Teutonico A, Schena PF, Di Paolo S. Glucose metabolism in renal transplant recipients: effect of calcineurin inhibitor withdrawal and conversion to sirolimus. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):3128-35.
- Textor SC, Burnett JC Jr, Romero JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, Porayko M, Krom R, Gores G, Hay E. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int.* 1995;47(5):1426-33.
- Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):324-37.
- Tjon AS, Sint Nicolaas J, Kwekkeboom J, de Man RA, Kazemier G, Tilanus HW, Hansen BE, van der Laan LJ, Tha-In T, Metselaar HJ. Increased incidence of early de novo cancer in liver graft recipients treated with cyclosporine: an association with C2 monitoring and recipient age. *Liver Transpl.* 2010;16(7):837-46.
- Tomlanovich SJ, Vincenti F. Sirolimus: defining nephrotoxicity in the renal transplant recipient. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(2):198-9.
- Twigg SM, Cao Z, McLennan SV, Burns WC, Brammar G, Forbes JM, Cooper ME. Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine. *Endocrinology.* 2002;143(12):4907-15.
- Uchida K, Gotoh A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta.* 2002;323(1-2):121-8.

- Valente JF, Hricik D, Weigel K, Seaman D, Knauss T, Siegel CT, Bodziak K, Schulak JA. Comparison of sirolimus vs. mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2003;3(9):1128-34.
- van den Akker JM, Wetzels JF, Hoitsma AJ. Proteinuria following conversion from azathioprine to sirolimus in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2006;70(7):1355-7.
- Van Pottelbergh G, Bartholomeeusen S, Buntinx F, Degryse J. The prevalence of chronic kidney disease in a Flemish primary care morbidity register. *Age Ageing.* 2012;41(2):231-3.
- Vassiliadis J, Bracken C, Matthews D, O'Brien S, Schiavi S, Wawersik S. Calcium mediates glomerular filtration through calcineurin and mTORC2/Akt signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(8):1453-61.
- Viklický O, Matl I, Voska L, Böhmová R, Jaresová M, Lácha J, Lodererová A, Stríz I, Teplan V, Vítko S. TGF-beta1 expression and chronic allograft nephropathy in protocol kidney graft biopsy. *Physiol Res.* 2003;52(3):353-60.
- Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, Uchida K, Pescovitz MD, Marchetti P, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, Chadban S, El-Shahawy M, Budde K, Goto N; DIRECT (Diabetes Incidence after Renal Transplantation: Neoral C Monitoring Versus Tacrolimus) Investigators. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant.* 2007;7(6):1506-14.

- Vinken P, Starckx S, Barale-Thomas E, Looszova A, Sonee M, Goeminne N, Versmissen L, Buyens K, Lampo A. Tissue Kim-1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Toxicol Pathol.* 2012;40(7):1049-62.
- Vogelbacher R, Wittmann S, Braun A, Daniel C, Hugo C. The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat. *Transplantation.* 2007;84(11):1492-9.
- Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, Roberts T, Li XJ, Brinkman H, Mason RM. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biochem J.* 2001;359(Pt 1):77-87.
- Webster AC, Lee VW, Chapman JR, Craig JC. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation.* 2006;81(9):1234-48.
- Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ.* 2005;331(7520):810.
- Weichhart T, Säemann MD. The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol.* 2009;30(5):218-26.
- Weir MR, Mulgaonkar S, Chan L, Shidban H, Waid TH, Preston D, Kalil RN, Pearson TC. Mycophenolate mofetil-based immunosuppression with sirolimus in renal transplantation: a randomized, controlled Spare-the-Nephron trial. *Kidney Int.* 2011;79(8):897-907.

- Wesselborg S, Fruman DA, Sagoo JK, Bierer BE, Burakoff SJ. Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp). *J Biol Chem.* 1996;271(3):1274-7.
- Williams D, Haragsim L. Calcineurin nephrotoxicity. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2006;13(1):47-55.
- Woolley AC, Rosenberg ME, Burke BA, Nath KA. De novo focal glomerulosclerosis after kidney transplantation. *Am J Med.* 1988;84(2):310-4.
- Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(10):1728-30.
- Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K, Vincent JL. Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature. *Am J Med.* 2005;118(8):827-32.
- Younes-Ibrahim M, Barnese M, Burth P, Castro-Faria MV. Inhibition of purified human kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by cyclosporine A: a possible mechanism for drug human nephrotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;986:633-5.
- Zhang QL, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health.* 2008;8:117.
- Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, Stachlewitz RF, Raleigh JA, Mason RP, Thurman RG. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Physiol.* 1998;275(4 Pt 2):F595-604.

Zimmerman JJ, Ferron GM, Lim HK, Parker V. The effect of a high-fat meal on the oral bioavailability of the immunosuppressant sirolimus (rapamycin). *J Clin Pharmacol.* 1999;39(11):1155-61.

Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol.* 1997;37(5):405-15.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):21-35.

Zuber J, Anglicheau D, Elie C, Bererhi L, Timsit MO, Mamzer-Bruneel MF, Ciroidi M, Martinez F, Snanoudj R, Hiesse C, Kreis H, Eustache F, Laborde K, Thervet E, Legendre C. Sirolimus may reduce fertility in male renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2008;8(7):1471-9.