LUCIANA PACHE DE FARIA GUIMARÃES

**Uso de N-acetilcisteína em pacientes portadores de cistinose
nefropática**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Pediatria
Orientadora: Dra. Maria Helena Vaisbich

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Guimarães, Luciana Pache de Faria

Uso de N-acetilcisteína em pacientes portadores de cistinose nefropática /
Luciana Pache de Faria Guimarães. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Maria Helena Vaisbich.

Descritores: 1.Cistinose 2.Insuficiência renal crônica 3.Estresse oxidativo
4.Acetilcisteína 5.Criança

USP/FM/DBD-425/13

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Paulo e Regina que mesmo morando distante me deram todo o apoio nos momentos mais difíceis dessa trajetória e em todas as outras da minha vida, meu marido Fernando que me ensinou a ter calma para resolver cada etapa desse trabalho e com ele aprendi o significado da palavra “amor”, e ao meu filho Pedro, que veio iluminar a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dra. Maria Helena Vaisbich por confiar em minha capacidade como pesquisadora, além da paciência e tranquilidade para me transmitir os ensinamentos de que necessitei.

Agradeço também aos queridos pacientes com cistinose, sempre tão colaborativos com o trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro e a equipe do LIM 12 por me ajudarem na análise dos exames coletados.

Agradeço aos colegas do LIM 36, em especial ao Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho e à Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca, por me ajudarem na coleta dos exames.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADRO

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CISTINOSE NEFROPÁTICA INFANTIL.....	2
1.2. PATOGÊNESE	3
1.3. GENÉTICA.....	4
1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	5
1.4.A. MANIFESTAÇÕES MAIS FREQUENTES NA PRIMEIRA DÉCADA DA VIDA	5
1.4.B. MANIFESTAÇÕES MAIS TARDIAS	7
1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	9
1.5.A. ALTERAÇÕES LABORATORIAIS DA SÍNDROME DE FANCONI	9
1.5.B. EXAME OFTALMOLÓGICO COM LÂMPADA DE FENDA (BIOMICROSCOPIA)	11
1.5.C. MIELOGRAMA.....	11
1.5.D. EXAMES ESPECIAIS	12
1.6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	13
1.7. TRATAMENTO	15
1.7.A. TRATAMENTO PALIATIVO	15
1.7.B. TRATAMENTO ESPECÍFICO	17
1.8. RECENTES MECANISMOS PATOGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA CISTINOSE	21
1.8.A. METABOLISMO ATP	21
1.8.B. APOPTOSE	22
1.8.C. AUTOFAGIA MITOCONDRIAL (MITOFAGIA).....	22
1.8.D. OXIDAÇÃO CELULAR (<i>STRESS</i> OXIDATIVO).....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS.....	31

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6 RESULTADOS	39
6.1. RESULTADOS DAS ETAPAS 1 E 2 DO ESTUDO.....	40
6.2. RESULTADOS DA ETAPA 3 DO ESTUDO	41
6.3. RESULTADOS DA ETAPA 4.....	45
6.3.A. EFEITOS COLATERAIS DA N-ACETILCISTEÍNA.....	47
7 DISCUSSÃO.....	48
8 CONCLUSÕES.....	63
9 REFERÊNCIAS	66
10 ANEXOS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CN	- cistinose nefropática
ATP	- trifosfato de adenosina
SO	- stress oxidativo
RFG	- ritmo de filtração glomerular
TBARS	- substâncias ácido-tiobarbitúricas
GSH	- glutathione
NAC	- N-acetilcisteína
SF	- síndrome de Fanconi
TP	- túbulo proximal
DRCT	- doença renal crônica terminal
TRS	- terapia renal substitutiva
VMI-5	- Beery-Buktenica Developmental Test of Visual-Motor Integration
LDL	- lipoproteína de baixa densidade
PM	- peso molecular
GESF	- glomeruloesclerose segmentar e focal
Ang II	- angiotensina II
rhGH	- hormônio de crescimento recombinante humano
DP	- desvio-padrão
ACEI	- inibidor da enzima de conversão da angiotensina
ROS	- substâncias oxigênio reativas
OMS	- Organização Mundial de Saúde
DEXA	- Dual Energy X- ray Absorptiometry

FDA	- Food and Drug Administration
CDME	- dimetil cistina éster
GPx	- glutathione peroxidase
SRAA	- sistema renina-angiotensina-aldosterona
DRC	- doença renal crônica
HPLC	- método de cromatografia líquida de alta resolução
FAPESP	- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
CCIR	- registro internacional de cistinose
TMO	- transplante de células da medula óssea
NADPH	- complexo enzimático fosfato de nucleotídeo de nicotinamida e adenina
NF- κ B	- fator nuclear Kappa B
HIF-1	- fator indutor de hipóxia 1- α
AP-1	- proteína ativadora 1
LDL-ox	- lipoproteína de baixa densidade oxidada
TGF- β	- fator de crescimento tumoral- β
GST	- glutathione S-transferase
RNM	- ressonância nuclear magnética
SC	- superfície corpórea
PKC- δ	- proteína quinase C gama
SOD	- superóxido dismutase
GSSG	- glutathione oxidado
TGO	- transaminase glutâmico-oxalacética
GR	- glutathione redutase
TGP	- transaminase glutâmico-pirúvica

MDA - malondialdeído

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos tiol (mediana, variação) em fibroblastos cultivados da pele (nmol/mg de proteína).....	26
Tabela 2 – Compostos tiol (mediana, variação) em células polimorfonucleares (nmol/mg de proteína).....	26
Tabela 3 – Pacientes com cistinose nefropática (n=20) estratificados de acordo com estágio de Doença Renal Crônica (DRC) de acordo com o KDOQI.....	40
Tabela 4 – Dados de 26 pacientes com cistinose incluídos neste estudo e a distribuição das 103 medidas de acordo com os estágios do KDOQI de Doença Renal Crônica (DRC).	42
Tabela 5 – Creatinina sérica (mg/dL), cistatina C sérica (mg/L) e <i>clearance</i> de creatinina estimado pela estatura em medidas seriadas de 26 pacientes portadores de Cistinose Nefropática distribuídas por estágio de doença renal crônica de acordo com o KDOQI.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mutação mais comum na cistinose 57kb deletion- deleção 57kb, <i>CTNS</i> -gene responsável pela codificação da cistinosina, <i>CARKL/TRPV1</i> - genes adjacentes ao <i>CTNS</i> e mutuamente afetados na deleção 57kb.....	5
Figura 2 – Visualização dos cristais de cistina na conjuntiva (Figura 2a), córnea (Figura 2b) e medula óssea (Figura 2c)	12
Figura 3 – Esquema demonstrando a ação da cisteamine nas células	18
Figura 4 – Esquema mostrando o sistema enzimático que leva à produção de ROS, como $\cdot O_2^-$, e sua metabolização..	23
Figura 5 – Esquema da formação de glutathione no citosol das células (Figura 5a) e sua ação como antioxidante (Figura 5b).....	25
Figura 6 – Glutathione (a) em nmoles/mg de proteína e ATP (b) em nmoles/mg de proteína nas células tubulares proximais cistinóticas (em preto) e células tubulares proximais controles (em branco) (média±DP) após serem cultivadas em condições basais (21% oxigênio) e em condições hipóxicas (3% oxigênio).....	27
Figura 7 - Correlação entre TBARS sérico e creatinina sérica (a, b), uréia (c) e <i>clearance</i> de creatinina pela fórmula de Schwartz (Cl_{creat} estatura) (d) em pacientes com cistinose nefropática. a: $r = -0,04$, $p = 0,86$. b: $r = 0,02$, $p = 0,93$. c: $r = -0,10$, $p = 0,65$. d: $r = 0,17$, $p = 0,46$	41
Figura 8 – Gráfico Bland-Altman mostrando a relação entre cistatina C sérica (mg/L) e creatinina sérica (mg/dL) em pacientes com cistinose nefropática.....	43
Figura 9– Gráfico Bland-Altman mostrando a relação entre cistatina C sérica (mg/L) e o <i>clearance</i> de creatinina estimado pela fórmula de Schwartz ($mL/min/1,73 m^2SC$).....	43
Figura 10 – Níveis de TBARS sérico em T0 (início da NAC) e após 3 meses de uso de NAC (T1) em 23 pacientes com cistinose	46
Figura 11 – Creatinina sérica 6 meses (T-6), 3 meses (T-3) antes da NAC e em T0 (início da NAC) e em T1 (após 3 meses com NAC), após 3 meses da retirada da NAC (T+3) e após 6 meses da retirada da NAC (T+6) em 23 pacientes com cistinose	46
Figura 12 – <i>Clearance</i> de creatinina pela fórmula de Schwartz 6 meses (T-6) e 3 meses (T-3) antes da NAC, e em T0 (início da NAC), T1 (após 3 meses com NAC), 3	

meses (T+3) e 6 meses (T+6) após a retirada da NAC em 23 pacientes com cistinose	46
Figura 13 – Cistatina C sérica 6 meses (T-6), 3 meses (T-3) antes da NAC e em T0 (início da NAC) e em T1 (após 3 meses com NAC) em 23 pacientes com cistinose ...	47
Figura 14 – Ativação da sinalização fibrogênica via NADPH oxidase pelo LDL-ox.	54
Figura 15 – Esquema representativo dos efeitos da lipoperoxidação sobre as células.	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais doenças que cursam com síndrome de Fanconi e suas características principais.....	14

RESUMO

Guimarães LPF. Uso de N-acetilcisteína em pacientes portadores de Cistinose Nefropática (Dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A cistinose nefropática (CN) é uma doença autossômica recessiva, sistêmica e grave, caracterizada pelo acúmulo intralisossomal de cistina. A cisteamine (droga depletora de cistina intralisossomal) é essencial para o tratamento. Entretanto, mesmo quando o uso de cisteamine é precoce, os pacientes, geralmente, evoluem para doença renal crônica terminal por volta da segunda ou terceira décadas da vida e, podem apresentar acometimento extrarenal. Existem evidências que o acúmulo de cistina não é responsável por todas as anormalidades observadas na CN. Estudos têm demonstrado metabolismo alterado do trifosfato de adenosina (ATP), aumento na taxa de apoptose, deficiência de glutathione no citosol e aumento na autofagia mitocondrial, levando a um aumento da produção de espécies oxigênio reativas. Portanto, pacientes com CN podem ser mais suscetíveis ao *stress* oxidativo (SO) e isto pode contribuir para a progressão da doença renal.

Os objetivos deste estudo foram: - avaliar um marcador sérico de SO em crianças com CN, comparar os resultados com os observados em controles normais e, correlacioná-los com o ritmo de filtração glomerular (RFG); - estudar a correlação entre os parâmetros empregados para avaliar o RFG nestes pacientes; - administrar uma droga antioxidante (N-acetilcisteína, NAC) para todos os pacientes e avaliar marcadores de RFG e de SO antes e durante o tratamento com esta droga.

Foram incluídos pacientes com CN, com idade inferior a 18 anos, com doença renal crônica classe I a IV (KDOQY) e com boa aderência ao tratamento, incluindo cisteamine. SO foi avaliado através da dosagem sérica de substâncias ácido-tiobarbitúricas (TBARS) e, o RFG foi avaliado pela creatinina e cistatina C séricas e, pelo *clearance* de creatinina (fórmula de Schwartz). NAC, na dose de 25 mg/Kg/dia, dividida em 3 tomadas, foi administrada a todos os pacientes que foram controles de si mesmos. Marcadores de SO e de RFG foram estudados imediatamente antes do início da droga (T0) e após 3 meses do seu uso (T1).

Para avaliação do marcador de SO em pacientes com CN, comparação com controles normais e com os parâmetros de RFG, foram selecionados 20 pacientes, idade de $8,0 \pm 3,6$ anos e, 43 controles normais com idade de $7,4 \pm 1,1$ anos. Nos pacientes com CN o nível sérico de TBARS encontrado foi $4,03 \pm 1,02$ nmol/ml, enquanto que no grupo controle foi $1,60 \pm 0,04$ nmol/ml ($p < 0,0001$). Não foi detectada correlação significativa entre TBARS sérico e grau de função renal, avaliada através da creatinina sérica e do *clearance* de creatinina (fórmula de Schwartz). Neste estudo houve correlação significativa entre todos os parâmetros de RFG estudados, creatinina sérica, cistatina C sérica e *clearance* de creatinina (fórmula de Schwartz). Na avaliação da influência da NAC sobre o SO e função renal, foram incluídos 23 pacientes (16 meninos), idade $8,5 \pm 3,0$ anos. Em relação ao TBARS sérico detectamos em T0 mediana de 6,92 nmol/mL (3,3-29,0) e em T1 mediana de 1,7 nmol/mL (0,6-

7,2) ($p < 0,0001$). Em relação à função renal, houve diferença significativa na creatinina sérica entre T0 ($1,1 \pm 0,5$ mg/dL) e T1 ($0,9 \pm 0,5$ mg/dL) ($p < 0,0001$), no *clearance* de creatinina entre T0 ($69,7 \pm 32,2$ mL/min/ $1,73$ m²SC) e T1 ($78,5 \pm 33,9$ mL/min/ $1,73$ m²SC) ($p = 0,006$) e na cistatina C sérica entre T0 ($1,33 \pm 0,53$ mg/L) e T1 ($1,15 \pm 0,54$ mg/L) ($p = 0,0057$). Também foram incluídos os dados da creatinina e cistatina C séricas, e do *clearance* de creatinina observados 6 e 3 meses antes do início da NAC e de 3 e 6 meses após a retirada da NAC (na retirada não foi avaliada a cistatina C sérica).

Concluindo, níveis elevados de TBARS sérico foram detectados em pacientes com CN e estes não tiveram correlação com o grau de função renal. Em adição, durante um período de três meses, NAC foi administrada a pacientes com CN e em uso de cisteamine e, foi observada redução do SO e melhora significativa da função renal. Nenhum efeito colateral foi detectado. Este é o primeiro relato que demonstra aumento do SO no soro de pacientes com CN e possíveis benefícios sobre a função renal com a adição de uma droga antioxidante ao arsenal terapêutico.

Estudos controlados e com maior número de pacientes são necessários para confirmar estes achados.

Descritores: cistinose, função renal, *stress* oxidativo, N-acetilcisteína, criança

SUMMARY

Guimarães LPF. N-acetylcysteine use in patients with Nephropathic Cystinosis (Dissertation). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Nephropathic Cystinosis (NC) is an autosomal recessive systemic severe disease characterized by intralysosomal cystine accumulation. Cysteamine (a depleting-drug of cystine storage) is essential for the treatment. Unfortunately, even when cysteamine treatment begins early, the patients usually develop end stage renal disease at approximately the 2nd or 3rd decades of life, and they can also present extrarenal compromise. There is great evidence that cystine accumulation itself is not responsible for all abnormalities observed in NC. Studies have demonstrated altered ATP metabolism, increased apoptosis, deficiency of glutathione in the cytosol and, increased mitochondrial autophagy leading to increased production of reactive oxidative species. Therefore, cystinotic patients can be more susceptible to oxidative stress (OS) and this can contribute to the progression of the renal disease.

Our goal was to evaluate a serum marker of OS in NC children, compare the results with those observed in healthy controls and correlate with glomerular filtration rate (eGFR) parameters. We also evaluated the correlation of the different eGFR parameters in these patients, e.g. serum creatinine, serum cystatin C and creatinine clearance by Schwartz formula. Finally, N-acetylcysteine (NAC, an antioxidant drug) was given to all patients and we evaluated renal function and OS status under this treatment.

We enrolled cystinosis patients, aged bellow 18 years with Chronic Kidney Disease class I to IV (KDOQY) with good adherence to the treatment, including cysteamine. OS was evaluated through serum TBARS, eGFR was evaluated by serum creatinine, cystatin C, and creatinine clearance (Schwartz formula). NAC (25mg/Kg/day divided in 3 doses per day) was given during three months to all patients (T1) that were control of themselves, considering the evaluation just before NAC initiation (T0).

In the first part of this study (evaluation of a marker of OS, comparison of the results with those observed in healthy controls and correlation with renal function status), we selected 20 patients aged 8.0 ± 3.6 years and observed serum TBARS levels of 4.03 ± 1.02 nmol/ml. Serum TBARS levels in the 43 healthy controls, aged 7.4 ± 1.1 years, were 1.60 ± 0.04 nmol/ml. There was a significant difference between the serum TBARS levels among the 2 groups ($p < 0.0001$). We detected no significant correlation between serum TBARS and renal function status. We also observed a significant correlation among the eGFR parameters of this study. In the second part of the study, when patients received NAC and renal function and OS were evaluated, we studied 23 patients (16 males) aged 8.5 ± 3.0 years. In relation to serum TBARS levels at T0 we detected median = 6.92 nmol/mL (3.3-29.0) and at T1 median = 1.7 nmol/mL (0.6-7.2) ($p < 0.0001$). In relation to renal function, there was a significant difference in serum creatinine between $T0 = 1.1 \pm 0.5$ mg/dL and $T1 = 0.9 \pm 0.5$ mg/dL ($p < 0.0001$), creatinine clearance: $T0 = 69.7 \pm 32.2$ and

T1=78.5±33.9 mL/min/1.73m²BS (p=0.006), and cystatin C: T0=1.33±0.53 and at T1=1.15±0.54 mg/L (p=0.0057). We also included data from serum creatinine, creatinine clearance and cystatin C 6 (T-6) and 3 months (T-3) before NAC initiation and 3 (T+3) and 6 months (T+6) after NAC withdrawn (after NAC withdrawn cystatin C was not evaluated).

In conclusion, an increased level of serum TBARS in patients with NC was observed and this abnormality was not correlated with the renal function degree. In addition, over a three-month period, we used cysteamine and NAC in cystinosis patients without renal replacement therapy and observed a reduction in oxidative stress and significantly improvement in renal function. No side-effects were observed.

Larger and controlled studies are needed to confirm these findings. This is the first report that shows increased OS in serum of NC patients.

Descriptors: cystinosis, renal function, oxidative stress, N-acetylcysteine, children

---

1 INTRODUÇÃO

Cistinose é uma doença genética que pode se apresentar de três formas¹, a saber:

- cistinose nefropática infantil, forma mais frequente e grave da doença;
- cistinose nefropática juvenil, forma intermediária, de início mais tardio e menos frequente, acometendo menos de 5% dos pacientes, na qual a progressão da doença renal e a alteração do crescimento são menos severas²;
- cistinose não nefropática, caracterizada apenas pelo acometimento ocular e presença de cristais na medula óssea^{1,3}.

Estas duas últimas variantes não se enquadram nos objetivos deste estudo e, portanto, não serão abordadas.

1.1. CISTINOSE NEFROPÁTICA INFANTIL

A Cistinose nefropática infantil, é uma doença rara, grave e sistêmica, com herança autossômica recessiva, caracterizada pelo acúmulo intralisossomal de cistina. Sua incidência é de 1:100.000 a 1:200.000 nascidos vivos, sendo que na região francesa da Bretanha chega a 1:26.000⁴.

Primeiramente descrita por Emil Abderhalden em 1903, que relatou o caso de uma criança com deficiência grave de crescimento que foi a óbito aos 21 meses de idade e, na qual ele observou cristais de cistina no fígado e baço⁵. Outros pacientes pediátricos que apresentaram raquitismo, deficiência de crescimento, glicosúria e fosfatúria foram descritos nas décadas de 20 e 30⁵. Na década de 60, Schneider et al. demonstraram pela primeira vez o aumento dos níveis de cistina intracelular nos leucócitos de pacientes com cistinose e, observaram que estes pacientes apresentavam como primeira manifestação clínica a síndrome de Fanconi (SF), caracterizada pelo comprometimento das funções do túbulo proximal (TP)^{6, 7}.

O prognóstico desta doença melhorou consideravelmente com a melhora no tratamento da SF nas décadas de 50 e 60, permitindo que essas crianças sobrevivessem aos primeiros anos de vida. Porém, os pacientes

evoluíam para doença renal crônica terminal (DRCT) já na primeira década da vida. Com o surgimento e aprimoramento das técnicas de terapia renal substitutiva (TRS) estes pacientes aumentaram a sobrevida e, acometimentos em outros órgãos começaram, então, a serem observados, revelando que não se trata apenas de uma doença renal, mas sim sistêmica.

É uma doença crônica, progressiva e devastadora, com a formação de cristais de cistina intracelulares em diversos órgãos e comprometimento funcional dos mesmos, determinando prognóstico extremamente desfavorável para estes pacientes. Em 1976 com a descoberta de uma droga capaz de depletar os estoques intracelulares de cistina, a cisteamine⁸, houve uma melhora no tratamento destes pacientes, como veremos na seção 1.7.b.

1.2. PATOGÊNESE

Em condições normais, cerca de 40 % do enxofre proveniente da dieta está sob a forma de proteínas contendo cistina, uma molécula que consiste de 2 cisteínas unidas por uma ponte dissulfeto. Normalmente, após a degradação inicial em peptídeos, estes entram nos lisossomos, onde sofrem a ação de hidrolases ácidas^{9,10}. Tanto a cistina como a cisteína saem do lisossomo para o citoplasma, onde a cistina é rapidamente reduzida a cisteína pela ação do glutathione, presente em altas concentrações nesta região da célula. A cisteína é então incorporada a uma proteína ou degradada. Na cistinose os níveis plasmáticos de cistina são normais; porém, existe um acúmulo intracelular de cistina que varia de um tipo celular para outro e, é decorrente de um defeito do transporte lisossomal da cistina, o qual ocorre por anormalidade de funcionamento da proteína que transporta a cistina para o citosol e, como consequência ocorre acúmulo intra-lisossomal deste aminoácido em diversas células do organismo^{6,11,12}.

Nesta doença a cristalização intracelular da cistina ocorre, pois, ao contrário da cisteína que é altamente solúvel, a cistina só se solubiliza em quantidades inferiores a 2mM (0,48 ng/ml), acima desta concentração ocorre cristalização, na forma de cristais birrefringentes e hexagonais, que podem ser

observados na córnea, conjuntiva, medula óssea, rins, leucócitos, fibroblastos, e outras células de pacientes com cistinose^{11,12}.

Esta é, portanto, uma doença de depósito lisossomal, na qual ocorre comprometimento do transporte da cistina do lisossomo para o citosol das células, pelo acometimento da proteína de transporte lisossomal. Entretanto, como será descrito na seção 1.8., somente a deposição de cristais de cistina intracelular não explica completamente a patogênese da doença e outros mecanismos têm sido investigados^{13, 14}.

1.3. GENÉTICA

O gene causador da doença foi mapeado no cromossomo 17p13 e denominado de *CTNS*, sendo constituído por 12 exons. Town et al. observaram que o *CTNS* codifica uma proteína integral com características de proteína de membrana lisossomal, por eles denominada “cistinosina”^{15, 16}.

O gene *CTNS* apresenta forte expressão em pâncreas, rim maduro e fetal, músculo esquelético e, em menor extensão na placenta, coração, pulmão e fígado. A condição do heterozigoto pode ser identificada através de técnica de amplificação por PCR, viabilizando o diagnóstico do estado de portador da doença^{15,16}.

Desde a descoberta do gene, mais de 90 mutações foram identificadas, as quais determinam uma alteração na cistinosina⁶. A mutação mais comum no norte da Europa é a deleção 57-kb (aproximadamente 75% dos casos), removendo os 9 primeiros exons e parte do exon 10 do gene *CTNS*, determinando praticamente perda de toda a formação e função da cistinosina⁶. Esta mutação surgiu na Alemanha há cerca de 1500 anos atrás e afeta aproximadamente metade dos pacientes da América do Norte e Europa¹. No Brasil, esta mutação foi identificada em 13/35 (37,2%) pacientes¹⁷. Nesta mutação também ocorre remoção de parte dos genes *TRPV1* e *CARKL*, como pode ser visto na Figura 1. Este último foi identificado na fosforilação da sedoheptulose, metabólito intermediário da via da pentose, determinando um aumento da sedoheptulose sérica e urinária destes pacientes, podendo ser um método de *screening* em famílias com esta mutação. O gene *TRPV1* codifica

um canal iônico presente nos nervos sensitivos. Ainda não se sabe a contribuição desses genes na patogênese da doença, porém esses pacientes apresentam acometimento extrarenal mais severo e uma maior taxa de mortalidade⁵. Na população Franco-Canadense foi encontrada uma mutação isolada W138X¹.

Figura 1 – Mutação mais comum na cistinose⁵ 57kb deletion- deleção 57kb, *CTNS*- gene responsável pela codificação da cistinósina, *CARKL/TRPV1*- genes adjacentes ao *CTNS* e mutuamente afetados na deleção 57kb

1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

1.4.a. MANIFESTAÇÕES MAIS FREQUENTES NA PRIMEIRA DÉCADA DA VIDA

Ao nascimento esses pacientes apresentam peso e estatura dentro da normalidade. As manifestações da doença iniciam-se por volta de 6 a 12 meses de idade, e são, em geral, decorrentes do acometimento renal com SF, que se manifesta com poliúria, polidipsia, deficiência de crescimento e do ganho de peso, episódios de vômitos, desidratação, febre e/ou por deformidades ósseas¹⁸.

Acometimento renal: manifesta-se inicialmente através da SF; entretanto, evolutivamente ocorre comprometimento glomerular, sendo que por volta de 10 anos de idade as crianças já necessitam, em geral, de TRS sem o tratamento específico com cisteamine¹⁹.

Deficiência de ganho de peso e crescimento: decorrente de várias causas como acidose metabólica, doença óssea metabólica, distúrbios hidroeletrólíticos, anorexia, hipotireoidismo, entre outras e, por fim, por perda da função renal glomerular. Na evolução natural da cistinose, os pacientes

encontram-se, geralmente, no percentil 3 para estatura com 1 ano de vida e crescem numa velocidade menor do que crianças saudáveis (50-60% do normal)¹. O crescimento é mais lento do que em crianças com falência renal por outras causas e, na grande maioria, não é corrigido com o uso da cisteamine¹. Besouw et al. avaliaram o crescimento de 9 pacientes tratados adequadamente com cisteamine. Neste estudo a secreção noturna de GH foi estudada em 4/9 pacientes e foi normal em todos; no entanto, o teste do glucagon evidenciou uma deficiência de GH em 1 caso e, 2/4 pacientes apresentaram uma alteração no tempo de pico do GH, podendo indicar uma alteração subclínica na secreção deste hormônio²⁰.

Comprometimento ocular: é precoce, sendo que ao final do 1º ano de vida podem ser observados cristais de cistina na córnea ou conjuntiva dos pacientes acometidos através da biomicroscopia. Inicialmente os pacientes apresentam fotofobia; entretanto, a evolução pode ser grave, com despigmentação granular da retina e amaurose²¹.

Hipotireoidismo: ocorre por depósito de cristais de cistina na glândula tireóide, o qual se instala, geralmente, por volta de 5 a 10 anos de idade e torna necessária a reposição hormonal definitiva¹.

Acometimento das glândulas sudoríparas: o depósito de cristais nas glândulas sudoríparas determina uma má-adaptação ao calor, a qual pode estar presente desde os primeiros anos de vida²¹.

Anemia: é uma ocorrência frequente na doença e se deve a três mecanismos principais: alteração na síntese de eritropoetina, impregnação da medula óssea pelos cristais de cistina e mais tardiamente, hemólise por hiperesplenismo²¹.

Comprometimento do trato gastrointestinal: as queixas digestivas são bastante frequentes em fase precoce da doença, compreendendo em geral anorexia, vômitos e náusea. Em sua fisiopatologia pode-se admitir a contribuição dos distúrbios metabólicos e eletrolíticos, mas também a presença de cristais na mucosa gastrointestinal, principalmente no estômago que foi identificada em crianças com até 5 anos de idade²². Com a evolução da doença, pode haver a deposição de cristais na musculatura orofaríngea e esofágica levando a dificuldade de deglutição e engasgamento²³.

Diminuição da pigmentação da pele e cabelos²¹.

1.4.b. MANIFESTAÇÕES MAIS TARDIAS

Ocorrem, em geral, a partir da segunda década da vida e decorrem da deposição disseminada de cristais de cistina na intimidade celular de cada órgão e incluem:

Acometimento do fígado e baço: levando a insuficiência hepática e pancitopenia. Também tem sido observada hipertensão portal não-cirrótica devido à hiperplasia nodular regenerativa¹.

Envolvimento pancreático: determinando disfunção exócrina e endócrina, com o desenvolvimento de *diabetes mellitus*. Entretanto, cabe ressaltar que intolerância à glicose tem sido observada em pacientes por volta de 5 anos de idade²⁴.

Hipogonadismo: no sexo feminino a puberdade, geralmente, ocorre sem intercorrências e existem relatos de pacientes que engravidaram; porém, no sexo masculino pode haver hipogonadismo primário, não completando o desenvolvimento puberal³.

Comprometimento do sistema nervoso central: geralmente, ocorre na terceira década da vida quando o indivíduo pode apresentar encefalopatia com sintomas cerebelares e piramidais, quadro que tem início com alterações na marcha e no sensório e, que tem como substrato, atrofia cerebral e alargamento dos sulcos na tomografia computadorizada, podendo evoluir com paralisia pseudobulbar e morte²¹. Também tem sido observado quadros de encefalopatia associada à morte súbita³.

Hipertensão intracraniana, associada a cefaléia e papiledema pode ocorrer por obstrução ao fluxo líquórico pela deposição de cristais de cistina no plexo coróide²¹.

Trauner et al. avaliaram a coordenação motora fina de 52 crianças com cistinose, idade entre 2 e 17 anos, tratadas precocemente com cisteamine e, 49 controles, através de um teste padronizado, o *Beery-Buktenica Developmental Test of Visual-Motor Integration* (VMI-5). A ressonância nuclear magnética (RNM) também foi realizada para observar se alterações estruturais

cerebrais estavam associadas ao comprometimento motor fino. Os resultados mostraram que pacientes com a doença apresentaram alterações na coordenação motora fina quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$) e, estas já estavam presentes em pacientes pré-escolares, mostrando que o acúmulo de cistina altera o desenvolvimento cerebral precocemente. Não houve uma associação estatisticamente significativa entre essas alterações e as imagens na RNM, sugerindo a participação de uma outra causa para a disfunção motora, como o acúmulo de cistina *in utero* ou um efeito direto do gene no desenvolvimento cerebral. Esse foi o primeiro estudo que documenta deficiência na coordenação motora persistente e não progressiva em pacientes com cistinose, onde as alterações já estão presentes na idade pré-escolar e persistem por toda a adolescência²⁵.

Acometimento muscular: a miopatia vacuolar devido ao acúmulo de cistina nos músculos, geralmente se manifesta após a primeira década da vida. Os pacientes apresentam, inicialmente, atrofia e perda da força muscular distal acometendo eminências tenares, hipotenares e músculos interósseos das mãos (“mão em garra”) e, posteriormente, progredindo para acometimento muscular generalizado. Com a progressão da doença observa-se, em mais de 50% dos casos, disfagia e restrição ventilatória com teste de função pulmonar mostrando redução da pressão inspiratória máxima, pressão expiratória máxima e ventilação voluntária máxima¹. A eletromiografia mostra um padrão miopático, com velocidade de condução normal e, na biópsia muscular são observados cristais de cistina com fibrilas colágenas perimisiais²⁶. A perda de carnitina relacionada à SF pode também estar envolvida no mecanismo de perda da força muscular.

Alterações das funções intelectuais: Apesar do QI ser normal, pode haver alteração em funções neurocognitivas, como da integração visual-motora, memória visual e tátil, atenção, planejamento e velocidade motora. Estas alterações não parecem ser evolutivas e não causam impedimento da vida intelectual e produtiva do indivíduo^{27, 28}.

Calcificação vascular: A calcificação vascular é frequente na população em geral e está associada a um aumento do risco cardiovascular. Diversos estudos experimentais mostraram que células musculares lisas arteriais podem

se diferenciar em osteoblastos e produzir matriz extracelular, levando à formação de matriz óssea²⁹ e, que moléculas inflamatórias (como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada e citocinas pró-inflamatórias) e produtos do *stress* oxidativo podem estimular este processo de diferenciação³⁰.

Pacientes com cistinose podem apresentar aumento do *stress* oxidativo, como veremos posteriormente e, portanto, maior risco de calcificação vascular^{13,14}.

1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico deve ser suspeitado em qualquer paciente com SF, já que a cistinose nefropática é a causa mais frequente de SF na infância. Como a condição clínica na maioria dos pacientes é satisfatória nos primeiros meses de vida ou, inicialmente, nem todas as características da doença estão presentes ou são reconhecidas, muitas vezes o diagnóstico é retardado e, assim a doença é agravada sem o tratamento adequado.

1.5.a. ALTERAÇÕES LABORATORIAIS DA SÍNDROME DE FANCONI

Densidade urinária baixa ≤ 1010 : decorrente da intensa perda de água pelo TP.

Glicosúria sem hiperglicemia e sem sintomatologia.

Alteração na reabsorção de fosfato no TP que culmina com raquitismo hipofosfatêmico, caracterizado pela diminuição da reabsorção tubular de fosfato e do transporte máximo de fosfato corrigido pelo ritmo de filtração glomerular (TPO4/RFG) e cursa com níveis séricos elevados de fosfatase alcalina; nesta doença, também, ocorre comprometimento da 1 α hidroxilação da vitamina D, que ocorre normalmente nas células do TP. Todo este quadro se traduz clinicamente como deformidades ósseas e atraso na deambulação.

Acidose metabólica proximal decorrente da deficiência de reabsorção de bicarbonato filtrado que normalmente é de cerca de 80% no TP.

Hipocalcemia e hipercalcúria: hipocalcemia intensa pode determinar tetania e alterações na condução cardíaca; hipercalcúria resulta da acidose

metabólica e da perda de cálcio pelo TP e, contribui para hipocalcemia, assim como a deficiência da 1,25 OH vitamina D₃.

Hiperexcreção de ácido úrico: determina hipouricemia, a qual não determina sintomatologia conhecida.

Hiperaminoacidúria: perda não seletiva de aminoácidos na urina por alteração na reabsorção pelo TP; ao que se sabe não determina sintomatologia.

Proteinúria de baixo peso molecular: assim como outras doenças que acometem o TP, como a doença de Dent e a síndrome de Lowe⁵, a proteinúria de baixo peso molecular (PM) é uma característica da cistinose nefropática. A reabsorção das proteínas de baixo PM no epitélio do TP é mediada por receptores multiligantes, como a megalina e a cubilina, num processo chamado endocitose, onde ligantes presentes no ultrafiltrado glomerular ligam-se aos receptores na superfície luminal da célula tubular localizados em regiões especializadas da membrana, denominadas “depressões revestidas”⁵. Essa região da membrana internaliza-se formando vesículas que englobam os complexos proteína-receptor, os quais são encaminhados para os lisossomos para hidrólise³¹. Defeitos no aparato endocítico do TP foram demonstrados na doença de Dent e síndrome de Lowe, levando à investigação da função e expressão da megalina e cubilina na cistinose⁵. Entretanto, o exame histológico de um fragmento renal obtido de um paciente com esta doença mostrou que esses receptores estavam normalmente expressos na membrana da borda em escova e vesículas endocíticas, sugerindo que o mecanismo da proteinúria de baixo PM na cistinose parece ser diferente do observado nestas outras doenças do TP⁵. Hipoteticamente, a proteinúria na cistinose resultaria da saturação de receptores ligantes endocíticos, causando proteinúria de baixo PM e albuminúria⁵.

Albuminúria: a pequena quantidade de albumina normalmente filtrada também é reabsorvida por endocitose; na cistinose, inicialmente, observa-se microalbuminúria, mas com o progredir da doença ocorre comprometimento glomerular progressivo, com proteinúria nefrótica.

Hipocalemia e hiponatremia: ocorrem pela disfunção do TP; lembrando que níveis de potássio abaixo de 2 meq/l podem levar à alteração na condução cardíaca.

Hipomagnesemia: por perda de magnésio pelo TP.

Diminuição da reabsorção de carnitina no TP: a qual contribui para o acometimento muscular progressivo.

Graus variáveis de comprometimento do ritmo de filtração glomerular, sendo que no final da primeira década de vida, sem o tratamento específico, os pacientes evoluem com perda da função renal e necessidade de TRS, sendo responsável por 5% dos casos de falência renal em crianças¹.

1.5.b. EXAME OFTALMOLÓGICO COM LÂMPADA DE FENDA (BIOMICROSCOPIA)

Trata-se de exame não invasivo que possibilita a visualização dos cristais de cistina na córnea e conjuntiva e, em casos mais avançados, também na íris. Excelente método diagnóstico para o final do primeiro ano de vida, visto que em alguns casos os cristais não são observados nos primeiros meses (Figuras 2a e 2b).

1.5.c. MIELOGRAMA

Permite a visualização dos cristais hexagonais de cistina na medula através de exame microscópico com luz polarizada. Este exame é mais invasivo e está indicado naqueles casos com forte suspeita e exame oftalmológico negativo (Figura 2c).

Figura 2 – Visualização dos cristais de cistina na conjuntiva (Figura 2a), córnea (Figura 2b) e medula óssea (Figura 2c)

1.5.d. EXAMES ESPECIAIS

Medida do conteúdo intracelular de cistina: pode ser feita em leucócitos e fibroblastos. É um método diagnóstico direto e útil na monitorização da dosagem da medicação específica (bitartrato de cisteamine). A realização da dosagem da cistina intraleucocitária, tornou-se padrão no seguimento de pacientes portadores de cistinose nefropática para adequação da dose de cisteamine e para verificação da aderência ao tratamento. Existem várias metodologias disponíveis internacionalmente para esta avaliação; porém, a medida da cistina intraleucocitária, preferencialmente em leucócitos polimorfonucleares por espectrofotometria de massa é o método mais sensível³. Na América Latina, atualmente, não existe nenhum laboratório que realize este exame.

A concentração de cistina em indivíduos normais é inferior a 0,2 nmol ½ cistina/mg de proteína. Nos portadores sãos é de cerca de 1 nmol ½ cistina/mg de proteína e, nos doentes apresenta-se acima de 2 nmol ½ cistina/mg de proteína¹⁷.

Medida da concentração de cistina em amostra de vilo coriônico: é método direto de diagnóstico pré-natal que pode ser realizado a partir de 8 a 10 semanas de vida intrauterina. No entanto, por ser oneroso e de risco, está indicado somente em casos com história familiar fortemente positiva, como no caso de irmão portador da doença.

Estudo molecular: o conhecimento da mutação envolvida atualmente não modifica o tratamento. Espera-se no futuro que o conhecimento da mutação possa dar idéia de prognóstico e individualizar o tratamento.

Biópsia renal: A análise de material de biópsia renal permite a visualização dos cristais através de luz polarizada mas, da mesma forma que o mielograma, trata-se de exame invasivo e pouco prático para o diagnóstico.

As alterações histológicas na fase inicial são limitadas. Pode ser visualizada atrofia do TP chamada de “deformidade em pescoço de cisne”, a qual é decorrente do processo de apoptose desta porção tubular, que aparece, em geral, após os 6 meses de vida; também podem ser observadas irregularidades da borda em escova e hipertrofia celular com citoplasma proeminente e hipercromático. Podócitos multinucleados e células epiteliais parietais gigantes são frequentemente observados³. A microscopia eletrônica demonstra retração dos processos podocitários, especialmente em pacientes com proteinúria elevada e, observa-se apenas o núcleo e uma pequena quantidade de citoplasma na célula tubular epitelial³. A mitocôndria, lisossomos e borda em escova desaparecem com a evolução da doença.

A deterioração da função renal é acompanhada por lesões progressivas túbulo-intersticiais e glomerulares, consistindo em fibrose intersticial, atrofia tubular, colapso do tufo glomerular segmentar ou global e acúmulo de material na matriz mesangial. A histologia renal de pacientes com doença mais avançada demonstra lesão glomerular indistinguível da glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) idiopática.

1.6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras doenças que levam à SF. O Quadro 1 mostra as principais doenças que determinam SF.

Quadro 1 - Principais doenças que cursam com síndrome de Fanconi e suas características principais³.

Doença	Gene	Herança	Proteína envolvida	Anormalidades clínicas e laboratoriais
Cistinose	<i>CTNS</i>	AR	Cistinosina	Alterações características da SF, fotofobia, acometimento extrarenal mais tardio, DRCT
Síndrome ARC	<i>VPS33B</i>	AR	Vps33	Artrogripose, colestase, fâcies dismórfica, ictiose, plaquetas alteradas, infecções severas
Doença de Dent	<i>CLCN5</i>	Recessivo ligado ao X	Canal de cloro 5	Proteinúria de baixo peso molecular, hipercalcúria, nefrocalcinose, nefrolitíase, falência renal
Síndrome de Fanconi-Bickel	<i>SLC2A2</i>	AR	GLUT2	Acúmulo de glicogênio hepatorenal, hepatomegalia, raquitismo, osteomalácia, retardo mental
Galactosemia	<i>GALT</i>	AR	Galactose-1-fosfato-uridil-transferase	Hepatomegalia, doença hepática, catarata, retardo mental
Doença de depósito de glicogênio tipo 1	<i>G6PC</i>	AR	Glicose-6-fosfatase	Hipoglicemia, acidose láctica, hiperlipidemia, hepatomegalia
Intolerância a frutose hereditária	<i>ALDOB</i>	AR	AldoseB	Intolerância a frutose, retardo no crescimento
Mucopolidose II	<i>GNPTAB</i>	AR	N acetilglucosamina-1-fosfotransferase	Nanismo, fâcies grosseira, fragilidade da pele e mucosa, retardo mental
SF idiopática	?	AD/AR	?	SF idiopática
Síndrome de Lowe	<i>OCRL1</i>	Recessivo ligado ao X	Fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato-5-fosfatase	Baixa estatura, catarata congênita, retardo mental, criptorquidia, artropatia, aumento de transaminases e creatina quinase
Tirosinemia	<i>FAHD2A</i>	AR	Fumaril-acetoacetato-hidrolase	Glomeruloesclerose, nefrocalcinose, hepatomegalia, cirrose, raquitismo, retardo do crescimento
Doença de Wilson	<i>ATP7B</i>	AR	ATP7B	Anéis de Kayser-Fleischer, hepatite, cirrose

SF - síndrome de Fanconi, AR – autossômica recessiva, AD – autossômica dominante, Síndrome ARC (artrogripose, disfunção renal, colestase), GLUT2 – transportador facilitador de glicose 2, ATP7B – transportador de cobre ATPase (subunidade β), DRCT – doença renal crônica terminal, ? - desconhecido

1.7. TRATAMENTO

1.7.a. TRATAMENTO PALIATIVO

O acompanhamento inicial dessas crianças deve ser feito ao menos 1 a 2 vezes por semana, inclusive com coleta de exames, até que esteja estabilizado o quadro hidroeletrólítico e metabólico. Quando estáveis, deve ser realizado entre 1 e 2 meses a fim de avaliar peso e estatura, estado nutricional, anormalidades bioquímicas, função renal, dosagem de cistina intraleucocitária (não realizada em nosso serviço, porém exame importante para avaliar a aderência e efetividade do tratamento). Já na primeira década da vida é necessário avaliar o acometimento extrarenal, principalmente da tireóide, tolerância à glicose e, posteriormente, avaliar a função hepática, comprometimento muscular e função gonadal e, pelo menos anualmente, realizar exame oftalmológico.

Todos os pacientes com cistinose necessitam ter livre acesso a água e *toilette*, devido a intensa poliúria e polidipsia; também deve ser evitada a exposição solar excessiva, tanto pela fotofobia como pelo risco de desidratação.

A terapia sintomática consiste no tratamento da SF, com reposição de fluidos e eletrólitos, correção da acidose metabólica, adequação nutricional e tratamento do raquitismo, além do acometimento extrarenal quando presente.

O tratamento do acometimento extrarenal é direcionado para o controle das funções dos órgãos acometidos. As alterações podem ser evitadas, minimizadas ou retardadas com o tratamento específico com cisteamine, porém, depois de instaladas necessitam, em geral, de tratamento de suporte por toda a vida. Assim, na presença de hipotireoidismo deve ser feita a reposição hormonal; e do *diabetes mellitus* é necessária a dieta e uso de hipoglicemiante oral e/ou insulina. A terapêutica da anemia pode necessitar da utilização de eritropoetina recombinante humana e suplementação de ferro e, avaliação do ácido fólico e vitamina B12, especialmente nos pacientes com grau mais avançado de doença renal.

Em relação ao tratamento da baixa estatura, em um estudo o hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH) foi administrado para 7 de 9 pacientes em uso de cisteamine. Ao iniciar rhGH, a altura estava abaixo de 2 DP (desvio-padrão) em 5 dos 7 pacientes e, ao final permaneceu abaixo de 2 DP em somente 1/7 pacientes, o qual recebeu prednisolona em dose alta após o transplante renal. Nos 2 pacientes não tratados com rhGH, a altura final permaneceu abaixo de 4 DP. Neste estudo os autores concluem que o rhGH melhora significativamente o crescimento de pacientes com cistinose e deve ser iniciado precocemente²⁰. Paralelamente, outros autores também mostraram que o uso de rhGH aumenta significativamente o crescimento linear, melhorando a velocidade de crescimento e a estatura na fase pré-puberal¹.

O uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (iECA) requer muita cautela, pois como se trata de pacientes poliúricos pode haver piora da função renal³². Esta droga, além de seu efeito anti-proteinúrico, inibe a produção de angiotensina II (All), a qual tem um importante papel na progressão da doença renal, pois estimula o crescimento celular, inflamação e fibrose renal. Em adição, a All é um importante mediador do *stress* oxidativo, e promove a produção de substâncias oxigênio reativas (ROS), como será especificado na seção I.8³³.

Pacientes com evolução para DRCT necessitam de TRS e, neste grupo de doentes, o transplante preemptivo tem ótima indicação. Primeiramente por que sendo pacientes poliúricos, não necessitam de diálise por hipervolemia até em estágios avançados da doença renal crônica e, também por que não há recidiva da doença de base no enxerto^{34,35}.

Em relação às condições de saúde bucal, um estudo realizado em 33 pacientes considerando os parâmetros propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS)³⁶, mostrou que pacientes entre 0 e 5 anos de idade tinham menor risco de cáries dentárias que a população geral e pacientes mais velhos¹⁷. Entre os fatores que podem influenciar este achado, os autores sugerem condições melhores de higiene oral, pois nesta faixa etária esta é, geralmente, supervisionada, a menor incidência de dieta cariogênica, desde que os pacientes preferem alimentos salgados a doces, e a ausência de hipoplasia de esmalte. Entretanto, existem alguns fatores de risco neste grupo

de doentes, como episódios mais frequentes de vômitos, que podem alterar a composição e fluxo da saliva²¹. Portanto, vigilância das condições orais é fundamental para manutenção da saúde oral destes pacientes.

Com todo o tratamento atual os pacientes chegam à vida adulta, e são necessários outros exames para avaliar complicações mais tardias. Sendo assim, recomenda-se realizar um exame fluoroscópico da deglutição, teste de função pulmonar para monitorar a progressão da disfunção pulmonar extraparenquimatosa, raio X ósseo e densitometria óssea (DEXA – *Dual Energy X- ray Absorptiometry*) para avaliação das alterações ósseas, ecocardiograma para detecção de calcificações coronarianas, ressonância nuclear magnética do crânio na avaliação de atrofia e calcificação cerebral, além de exames para avaliar o comprometimento neurológico e a parte neurocomportamental³⁷.

1.7.b. TRATAMENTO ESPECÍFICO

Desde a demonstração, em 1976, da depleção dos estoques intracelulares de cistina, *in vitro* e *in vivo*, pela β -mercaptoetilamina ou cisteamine⁸, vários serviços na Europa e Estados Unidos da América passaram a utilizá-la no tratamento desta doença. Esta substância age rompendo a ponte de enxofre que une as duas cisteínas, que formam a molécula de cistina, deixando-as na forma livre; uma das cisteínas forma um complexo com a cisteamine que consegue deixar o lisossomo e atinge o citosol pelo transportador da lisina; enquanto a outra molécula de cisteína livre atravessa a membrana lisossomal³⁸. A Figura 3 mostra um esquema da ação da cisteamine nas células.

Figura 3 – Esquema demonstrando a ação da cisteamine nas células. A cistina é formada por 2 moléculas de cisteína unidas por uma ponte dissulfeto. A cisteamine age rompendo esta ponte e formando um complexo com uma das cisteínas, o qual deixa o lisossomo pelo transportador da lisina. A outra molécula de cisteína deixa livremente o lisossomo. L= lisossomo

As formulações iniciais da cisteamine, como o hidrocloreto de cisteamine e, posteriormente, a fosfocisteamine, eram de baixa tolerância gástrica, além de odor e sabor extremamente desagradáveis; entretanto, desde 1994, já está aprovado pela agência *Food and Drug Administration* (FDA), o bitartrato de cisteamine (Cystagon^R – Mylan Pharmaceuticals, comercializado na Europa pela Orphan-Europe desde 1997) como droga-órfã de escolha para o tratamento da cistinose, com a vantagem de ser manipulada em cápsulas, tendo melhor aceitabilidade e melhor tolerância gástrica.

A dose inicial recomendada da cisteamine era 50 mg/kg/dia (aproximadamente 1,30 g/m²/dia) para crianças abaixo de 12 anos ou com peso <50 kg, e 2 g/dia para pacientes acima de 12 anos ou peso >50 kg, e dose máxima de 90 mg/kg/dia (aproximadamente 1,95 g/m²/dia), sendo que as doses diárias são administradas em 4 porções iguais a cada 6 horas. Entretanto, em crianças, a relação peso/superfície corpórea (SC) aumenta com a idade, resultando numa maior dose diária da medicação quando calculada por kg em pacientes pré-adolescentes e adolescentes. Portanto, a recomendação atual é calcular a dose por SC, evitando doses acima de 1,95 g/m²/dia, que se relacionaram à ocorrência de efeitos adversos; respeitando a dose máxima de 2 g/dia³⁹.

A medicação específica, bitartrato de cisteamine, por suas características farmacocinéticas, demanda individualização da dose de acordo

com os níveis de cistina intraleucocitária, objetivando a redução da mesma a cerca de 1 nmol $\frac{1}{2}$ cistina /mg de proteína. É importante frisar que a dosagem dos níveis de cistina nos polimorfonucleares mostra valores mais altos do que em leucócitos misturados, pois a cistina se acumula preferencialmente em polimorfonucleares, resultando numa diferença nos valores de referência.

Recomenda-se iniciar com doses menores e aumentar paulatinamente até a dose alvo, de acordo com a tolerância, especialmente gástrica, do paciente¹. Seus efeitos colaterais estão principalmente relacionados ao trato gastrointestinal, no qual promove aumento da secreção de gastrina, e ao odor desagradável, devido aos metabólitos da cisteamine, dimetil sulfito e metanetiol⁴⁰. Outros como reação alérgica, febre, convulsão, neutropenia, letargia, mialgia, artralgia já foram relatados^{41,42}. Recentemente, um estudo europeu detectou novos efeitos adversos em 8/550 pacientes tratados com cisteamine. Os autores relataram que 1/8 foi a óbito por isquemia cerebral e 1 não tinha as informações necessárias para uma conclusão. Nos 6 casos restantes, observaram que 6/6 desenvolveram lesões vasculares nos cotovelos, caracterizadas por angioendoteliomatose com irregularidade na distribuição das fibras de colágeno, sintomas neurológicos (1/6 pacientes), dor óssea e muscular (2/6), e/ou estrias (2/6). Em 3 dos 6 casos, a dose administrada de cisteamine excedeu a dose máxima recomendada de 1,95 g/m²/dia. A redução na dose foi associada à melhora dos sinais e sintomas nos 6 casos, sugerindo uma relação causal com a dose de cisteamine³⁹. A teratogenicidade desta medicação ainda não foi comprovada em humanos. Em ratos, altas doses afetaram o desenvolvimento fetal. Entretanto, comparativamente, a dose estudada foi muito mais alta do que a usada em humanos; portanto, como ainda não existe uma conclusão, recomenda-se que mulheres que planejam engravidar devem deixar de usar a medicação durante a gestação¹.

A cisteamine é metabolizada em hipotaurina pela cisteamine dioxigenase. A hipotaurina é oxidada em taurina, que pode ser excretada na urina ou convertida em sais biliares⁴³. Uma pequena parte (aproximadamente 3%) da cisteamine ingerida é transformada em metanetiol e dimetil sulfito que é excretado pela via respiratória e em menor quantidade pela urina e suor⁴³. Em

pacientes com SF devido a cistinose, a excreção urinária de cisteamine é desprezível⁴⁴. Este estudo observou a falta de correlação entre ritmo de filtração glomerular (RFG) e nível plasmático de cisteamine; portanto, a dose da cisteamine não deve ser ajustada na redução da função renal, visando manter o nível de cistina intraleucocitária o mais baixo possível, levando em conta a dose máxima recomendada ($1,95 \text{ g/m}^2$ em adulto 2 g/d), evitando assim complicações extrarenais ao longo da vida⁴³.

Os benefícios da utilização da cisteamine em longo prazo são múltiplos, como melhora da SF e do crescimento, retardo na evolução para DRCT e acometimento extrarenal, especialmente nos casos em que a medicação é iniciada precocemente, com boa tolerabilidade e aderência, mantendo-se os níveis intraleucocitários de cistina em cerca de 1 nmol de $1/2$ cistina/mg de proteína^{8,40,41,45}.

Recentemente, foi demonstrado que a cisteamine, além de seu efeito depletor do acúmulo intralisossomal de cistina, pode aumentar os níveis intracelulares de glutathione (GSH) e, restabelecer o estado oxidativo, diminuindo o *stress* oxidativo⁴⁶.

Atualmente já existe o bitartrato de cisteamine de liberação entérica que deve ser tomado a cada 12 horas, permitindo assim uma melhor aderência ao tratamento⁴⁷. Estudos mostram que a administração dessa nova apresentação manteve os níveis de cistina intraleucocitária, assim como o RFG, a função tireoideana e hepática. Comparativamente, observou-se que com a cisteamine de liberação lenta os pacientes necessitam de menor dose de cisteamine do que com Cystagon^R para manter níveis semelhantes de cistina intraleucocitária⁴⁷. Entretanto, ainda não existem estudos em longo-prazo com esta nova formulação.

Como a cisteamine não tem efeito sobre os cristais na córnea, indica-se o uso da solução oftalmológica de cisteamine, capaz de dissolver os cristais em oito a quarenta meses se usada corretamente (a cada duas horas pelo menos)². Atualmente a formulação de solução oftalmológica 0,44% (Cystaran^R - Sigma-Tau Pharmaceuticals) já é disponível comercialmente e é aprovada pelo FDA desde Outubro de 2012.

Entretanto, embora o tratamento com cisteamine melhore o prognóstico destes pacientes, a evolução para DRCT não é totalmente excluída. Segundo Gahl et al. “o tratamento com cisteamine não é 100% efetivo”, mesmo com todas as medidas adequadas, pois alguns pacientes apresentam complicações extrarenais e DRCT com cerca de 20 anos de idade⁴⁸. Greco et al. também observaram que a DRCT não foi evitada na maioria dos pacientes, mas apenas retardada para a segunda ou terceira década da vida, assim como as complicações tardias, que ocorreram em grande proporção de pacientes⁴⁹. Em adição, má aderência ao tratamento ocorre comumente nestes pacientes, devido à posologia a cada 6 horas e aos efeitos colaterais.

Portanto, permanece o desafio de como tratar adequadamente pacientes com cistinose nefropática. Assim, é necessário investigar quais fatores adicionais estão envolvidos na patogênese desta doença para encontrar um tratamento ideal.

1.8. RECENTES MECANISMOS PATOGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA CISTINOSE

Existem evidências de que o acúmulo de cistina por si só não é responsável por todas as anormalidades presentes na cistinose. Estudos *in vitro*, em modelos celulares e em células de pacientes com cistinose, têm mostrado uma interligação entre acúmulo intralisossomal de cistina, alterações no metabolismo do ATP, aumento na taxa de apoptose, oxidação celular e autofagia mitocondrial (mitofagia)^{13,14}.

1.8.a. METABOLISMO ATP

Estudos realizados em células tubulares renais saturadas com dimetil cistina éster (CDME), modelo experimental para cistinose, mostraram que há diminuição no metabolismo de ATP nessas células, e consequentemente, uma alteração na reabsorção tubular proximal, levando à SF⁵⁰. Além disso, também ocorre uma redução na síntese de glutathione, principal antioxidante intracelular,

pois para que haja sua formação a partir da cisteína no citosol, há consumo de duas moléculas de ATP⁵¹.

1.8.b. APOPTOSE

Foi demonstrado que células saturadas com CDME apresentaram uma alta taxa de apoptose⁵². O acúmulo intralisossomal de cistina altera o lisossomo, havendo a ruptura da sua membrana e liberação de cistina para o citosol, que se liga à proteína pró-apoptótica quinase C gama (PKC- δ), estimulando a apoptose. Também foi observado um aumento da expressão da caspase-4, enzima importante na morte celular programada, em tecidos renais de pacientes com cistinose com número reduzido de células tubulares proximais⁵³. A morte celular por apoptose do TP pode explicar as deformidades em “pescoço de cisne” presentes nas células renais tubulares proximais e, pode levar ao achado de glomérulos atubulares.

1.8.c. AUTOFAGIA MITOCONDRIAL (MITOFAGIA)

Autofagia é o processo pelo qual as organelas e resíduos de citoplasma são sequestrados e, posteriormente, direcionados aos lisossomos para degradação hidrolítica⁵⁴. Evidências crescentes indicam que a autofagia mitocondrial ocorre seletivamente e o termo "mitofagia" tem sido sugerido para este processo⁵⁵. Eliminação programada das mitocôndrias disfuncionais e envelhecidas é essencial para proteger as células dos danos do metabolismo mitocondrial desordenado e liberação de proteínas proapoptóticas. O mecanismo de renovação mitocondrial é predominantemente sequestro autofágico e liberação para os lisossomos para hidrólise.

Na cistinose nefropática as mitocôndrias apresentam-se edemaciadas, podendo haver um defeito no metabolismo celular relacionado à redução da fosforilação oxidativa mitocondrial. Em fibroblastos e em células epiteliais renais foi observado um número aumentado de autofagossomos (marcador da autofagia) e vacúolos autofágicos, sugerindo que uma alteração da autofagia tem um papel importante nesta doença¹⁴. Estas observações foram associadas

com anormalidades mitocondriais estruturais e aumento da produção de espécies oxigênio reativas (ROS).

1.8.d. OXIDAÇÃO CELULAR (STRESS OXIDATIVO)

A principal fonte de formação de ROS é o oxigênio (O_2), que é reduzido a *ânion* superóxido ($\cdot O_2^-$) por diversas vias enzimáticas, como mostrado na Figura 4, mas a cadeia de transporte de elétron pela via mitocondrial é a principal.

O $\cdot O_2^-$ é instável em solução aquosa e tem meia-vida de segundos, sendo catalizado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD). Como o H_2O_2 é menos reativo que o $\cdot O_2^-$, a SOD é considerada como parte da via de detoxicação, neutralizando os *ânions* superóxidos. Além disso, o H_2O_2 é reduzido pela catalase ou glutathione peroxidase (GPx) em H_2O . A GPx participa da via de detoxicação de diversos lipoperóxidos prejudiciais³³.

Figura 4 – Esquema mostrando o sistema enzimático que leva à produção de ROS, como $\cdot O_2^-$, e sua metabolização. Em termos quantitativos, a fosforilação oxidativa mitocondrial é o sistema mais importante, mas o complexo enzimático fosfato de nucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase é o principal na produção de ROS via All. O $\cdot O_2^-$ é instável e catalisado em H_2O_2 pela SOD. O H_2O_2 tem um papel importante no metabolismo de outros ROS e pode oxidar o cloreto e formar ácido hipocloroso (HOCl) na presença da mieloperoxidase (MPO). O radical hidroxil mais reativo ($\cdot OH$) também pode ser formado a partir do H_2O_2 . A catalase ou GPx detoxifica o $\cdot O_2^-$ em H_2O ³³.

A All atua sobre o *stress* oxidativo pela ativação do complexo NADPH oxidase e o mecanismo pelo qual ocorre esta ativação tem sido objeto de muito estudo. Nos neutrófilos, durante o ciclo respiratório, a All ativa o complexo NADPH oxidase, através da transcrição de diferentes subunidades da NADPH oxidase, como p22phox e p47phox, ou várias Nox proteínas e, em células vasculares foi visto que a caveolina 1 participa desse processo, levando à formação de ROS³³. O complexo enzimático NADPH oxidase também é encontrado na célula endotelial; porém, nesta, a produção de ROS, como $\cdot\text{O}_2^-$ ocorre em menor quantidade. Estudos mais recentes sugerem que a All participa diretamente do estímulo mitocondrial, levando à produção de ROS, independente do estímulo do complexo NADPH oxidase^{33,56}.

Atualmente sabe-se que a aldosterona também participa na formação de ROS através do aumento da expressão das subunidades p47phox e p67phox da NADPH oxidase³³. Assim, parte do efeito previamente atribuído a All e mediado pela NADPH oxidase na produção de $\cdot\text{O}_2^-$, pode ser devido ao efeito da aldosterona.

Portanto, o uso de bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) nestes pacientes teria efeitos benéficos em reduzir o *stress* oxidativo, pois pela poliúria e, consequente contração de volume extracelular, estes apresentam ativação deste sistema. Entretanto, deve-se considerar o risco de piora da função renal.

Desde a observação de níveis urinários elevados de 5-oxoprolina, precursor do GSH, em pacientes com cistinose, atenção especial tem sido dada ao metabolismo deste, que é o principal antioxidante intracelular. A oxoprolinúria não é específica da cistinose e já foi observada em outras doenças genéticas, como na deficiência de 5-oxoprolinase e glutathione sintetase⁵⁷. O GSH é formado a partir da 5-oxoprolina e necessita da L-cisteína, presente no citosol, para sua produção final; porém, na cistinose a cisteína encontra-se aprisionada no lisossomo, e consequentemente ocorre uma redução na formação de GSH e acúmulo de 5-oxoprolina nesses pacientes⁵³. O GSH tem a propriedade de converter os lipoperóxidos em produtos não tóxicos, mantendo a integridade das mitocôndrias e membranas

celulares. Sua ação se faz através do fornecimento de equivalentes reduzidos para que a GPx catalise a redução do H_2O_2 e lipoperóxidos em água e seu respectivo álcool. Durante esse processo o GSH é oxidado (GSSG) e este é reciclado em GSH pela glutathione redutase (GR) e pelo NADPH. Quando as células são expostas a um aumento do *stress* oxidativo, a relação GSH/GSSG reduz, como uma consequência do acúmulo de GSSG. A medida dos níveis de GSSG ou relação GSH/GSSG é um ótimo indicador de *stress* oxidativo e pode ser usado para monitorar a eficácia do uso de estratégias antioxidantes (Figura 5b)⁵⁸. A Figura 5 mostra um esquema sobre a formação do GSH no citosol (Figura 5a) e sua ação como antioxidante (Figura 5b).

a)

b)

Figura 5 – Esquema da formação de glutathione no citosol das células (Figura 5a) e sua ação como antioxidante (Figura 5b). H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; GSH – glutathione; GPx – glutathione peroxidase; GSSG – glutathione oxidado; NADPH – fosfato de nucleotídeo de nicotinamida e adenina; GR – glutathione redutase⁵¹.

Levtchenko et al.⁵¹ mediram componentes do ciclo γ -glutamyl em fibroblastos (n=9) e leucócitos polimorfonucleares (n=15) de pacientes com cistinose e compararam com valores de fibroblastos (n=9) e polimorfonucleares (n=18) de controles normais e, observaram um aumento da cistina, do GSSG e da relação GSSG/GSH nas células de pacientes com cistinose, refletindo uma mudança no potencial *redox* nestas células e dano celular. Porém, não houve

uma diferença entre os valores de cisteína e glutathione total entre células de pacientes e controles (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Compostos tiol (mediana, variação) em fibroblastos cultivados da pele (nmol/mg de proteína)⁵¹

	Cistinose (n=9)	Controle (n=9)	P
Cistina	4.3 (2.7-5.5)	0.2 (0.1-0.3)	<0.001
Cisteína livre	7.8 (3.8-12.3)	5.5 (3.2-15.7)	NS
GSH total	11.5 (4.7-13.2)	9.7 (4.2-14.3)	NS
GSSG	0.7 (0.5-1.7)	0.3 (0.2-0.9)	<0.05
% GSSG/GSH total	9.1 (3.9-17.0)	4.7 (2.2-15.2)	<0.05
Cisteinil-glicina	0.5 (0.1-0.6)	0.1 (<0.1-0.2)	<0.05

Tabela 2 – Compostos tiol (mediana, variação) em células polimorfonucleares (nmol/mg de proteína)⁵¹

	Cistinose (n=15)	Controle (n=18)	P
Cistina	0.5 (0.3-0.8)	0.1 (0.09-0.2)	<0.001
Cisteína livre	31.6 (19.5-35.7)	27.2 (9.4-49.5)	NS
GSH total	12.1 (6.4-16.5)	14.3 (7.7-27.1)	NS
GSSG	0.9 (0.3-1.8)	0.3 (0.2-0.4)	<0.05
% GSSG/GSH total	7.1 (2.7-26.1)	2.0 (1.9-3.3)	<0.05
Cisteinil-glicina	2.1 (0.8-4.9)	1.8 (0.6-4.4)	NS

Posteriormente, Laube et al.⁵² cultivaram células tubulares renais proximais de pacientes com cistinose e controles, tanto em condições basais quanto hipóxicas. Neste trabalho, o GSH apresentou valores mais baixos nas células em condições basais, porém sem diferença estatisticamente significativa nos níveis de ATP entre os dois grupos. Entretanto, em condições hipóxicas, tanto o GSH quanto os níveis de ATP apresentaram uma redução

significativa, mostrando que o *stress* celular causado pela hipóxia interfere na ocorrência do *stress* oxidativo. Os resultados desse trabalho estão resumidos na Figura 6.

Figura 6 – Glutathione (a) em nmoles/mg de proteína e ATP (b) em nmoles/mg de proteína nas células tubulares proximais cistinóticas (em preto) e células tubulares proximais controles (em branco) (média±DP) após serem cultivadas em condições basais (21% oxigênio) e em condições hipóxicas (3% oxigênio)⁵².

Mais recentemente, Wilmer et al.⁵ demonstraram níveis elevados de GSSG em células epiteliais do TP em modelos celulares de cistinose, enquanto que Vivitsky et al. não detectaram estado *redox* anormal nestas células⁵⁹.

A depleção de GSH levou à disfunção mitocondrial em diversos modelos celulares e animais, afetando assim a síntese de ATP⁶⁰. Como as mitocôndrias são importantes fontes de ROS, especula-se que as células cistinóticas estariam menos protegidas da produção mitocondrial de radicais livres. O superóxido mitocondrial é convertido em H₂O₂ pela SOD e quando

liberado no citoplasma altera o potencial *redox* de toda a célula. O aumento da produção de radicais livres pode ser responsável pela apoptose demonstrada em fibroblastos e células tubulares epiteliais renais. Corroborando esta hipótese, o aumento da atividade da SOD, usada como indicador do aumento da produção de superóxido, também foi demonstrado em fibroblastos por Chol et al.⁶⁰.

Todos os estudos supracitados foram realizados *in vitro* e, portanto, é necessário um estudo *in vivo*, onde fatores como intensa demanda energética e aumento do *stress* oxidativo seriam importantes para resultados mais fidedignos nos valores do GSH que poderiam estar reduzidos, já que na maior parte destes estudos foi detectada uma correlação inversa entre acúmulo de cistina e GSH intracelular.

Conjuntamente, estes achados sugerem que pacientes com cistinose podem ser mais suscetíveis ao *stress* oxidativo, particularmente sob condições de *stress*, o que pode contribuir para a progressão da doença renal e do comprometimento extrarenal. O aumento do *stress* oxidativo pode ser o que falta para podermos correlacionar o acúmulo de cistina intralisossomal com outros mecanismos patogênicos propostos na cistinose como disfunção mitocondrial e apoptose.

_____ 2 JUSTIFICATIVA

Com base nos estudos atuais, este trabalho pretende avaliar se há aumento do *stress* oxidativo em pacientes com cistinose, sua relação com o grau de insuficiência renal e, verificar sua interferência na progressão da doença renal nestes pacientes.

_____ 3 OBJETIVOS

1. Avaliar marcadores de *stress* oxidativo em pacientes com cistinose nefropática e comparar os resultados com aqueles observados em crianças saudáveis.
2. Correlacionar os marcadores de *stress* oxidativo com a função renal glomerular desses pacientes.
3. Avaliar a correlação entre marcadores práticos de função renal glomerular em pacientes com cistinose nefropática.
4. Estudar a interferência do *stress* oxidativo sobre a função renal glomerular em pacientes com cistinose nefropática, através do uso de uma droga antioxidante, a N-acetilcisteína (NAC).

_____ 4 MATERIAL E MÉTODOS

O grupo de estudo foi constituído por pacientes com cistinose nefropática seguidos no ambulatório de nefrologia do Instituto da Criança-HCFMUSP com menos de 18 anos de idade, de ambos os sexos e, com doença renal crônica (DRC) estágios 1 a 4 de acordo com as diretrizes do *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI)*⁶¹.

Como critério de inclusão foi relevante a aderência ao tratamento, inclusive ao uso de bitartrato de cisteamine, o comparecimento às consultas e exames, adequado controle metabólico e eletrolítico, função tireoideana normal ou controlada por reposição hormonal e função hepática normal, além da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Informado pelo responsável. A medida da cistina intraleucocitária foi realizada em todos os pacientes, para verificar a aderência e eficácia do tratamento com cisteamine.

Não foi considerado critério de exclusão o acometimento de outros órgãos, frequentemente observado nesta doença.

O grupo controle normal foi constituído por escolares saudáveis de ambos os sexos.

Etapas 1 e 2 do estudo

Para alcançar os objetivos 1 e 2, avaliamos a medida de substâncias ácido-tiobarbitúricas (TBARS) no soro, a qual é considerada como marcador de *stress* oxidativo, em pacientes com cistinose nefropática e no grupo controle. Em adição, no grupo de doentes, correlacionamos os resultados do TBARS sérico com as seguintes medidas de função renal glomerular: creatinina e uréia séricas e com o *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz⁶², no sentido de verificar a correlação entre *stress* oxidativo e estágio de DRC.

Etapas 3 do estudo

Verificar a correlação entre diferentes marcadores práticos de função renal em pacientes com cistinose quais sejam: a creatinina sérica, a cistatina C sérica e o *clearance* de creatinina estimado pela estatura pela fórmula de

Schwartz⁶². A dosagem sérica da cistatina C não é rotineira; porém, por não depender da idade, massa muscular e nem do sexo, tem sido demonstrada sua eficácia na avaliação da função renal em crianças, especialmente com massa muscular deficiente como ocorre nestes pacientes, e por essa razão optamos pela sua realização⁶³.

Etapa 4 do estudo

Na quarta etapa do estudo, cujo objetivo foi avaliar a influência da droga antioxidante (NAC) sobre a função renal glomerular, foram realizadas medidas do TBARS sérico e dos parâmetros de função renal glomerular, imediatamente antes e durante o uso de NAC. Também foram avaliados possíveis efeitos colaterais da medicação. Todos os pacientes incluídos no estudo receberam a NAC por via oral na dose de 25mg/Kg/dia dividida em doses iguais a cada oito horas e, foram observados os resultados após três meses do uso da medicação. Esta dosagem foi escolhida baseada num estudo prévio em pacientes adultos transplantados renais onde foi demonstrado o benefício da NAC na preservação da função renal na dose de 600 mg recebido a cada doze horas sem efeitos colaterais⁶⁴. Com isso, se um paciente supostamente pesa 50Kg, 25mg/Kg/dia poderia ser usado em crianças na dose máxima de 1200mg/dia.

As seguintes variáveis foram avaliadas antes do uso da NAC (T0) e após 3 meses do seu uso (T1): creatinina sérica, depuração de creatinina estimada pela estatura através da fórmula de Schwartz⁶², cistatina C sérica, nível sérico de TBARS e enzimas hepáticas, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). A fim de comparar os resultados, foram avaliados a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina 3 meses (T-3) e 6 meses (T-6) antes do uso da NAC e 3 meses (T+3) e 6 meses (T+6) após a retirada da NAC. A cistatina C não foi medida após a retirada da NAC.

- Método de dosagens das variáveis analisadas

Creatinina sérica - medida pela reação de Jaffé modificada.

Cistatina C sérica - medida pelo método nefelométrico, sendo a faixa normal de 0,7 a 1,38 mg/l. A dosagem da cistatina C foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Instituto Central-HCFMUSP.

TBARS sérico (avaliação do *stress* oxidativo) - mede o malondialdeído, que é o principal produto da lipoperoxidação, gerado principalmente a partir de radicais hidroxil livres. TBARS foi calculado como nmol de malondialdeído formado por mL. Brevemente, 0,2 mL de soro foi diluído em 0,8 mL de água destilada. Imediatamente após, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético 17,5% e, na sequência, 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6%, pH 2. A seguir, a amostra foi colocada em banho-maria por 15 minutos, após o qual foi resfriada à temperatura ambiente. Subsequentemente, 1 mL de ácido tricloroacético 70% foi adicionado e, a mistura foi encubada por 20 minutos. A amostra foi, então, centrifugada por 15 minutos em 2,000 rpm. Usando um espectofotômetro, procedeu-se à leitura da densidade óptica do sobrenadante, lida em 534 nm contra um reagente branco. A quantidade de TBARS foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo a faixa normal de $1,60 \pm 0,04 \text{ nmol/mL}$ ⁶⁵. Este exame foi realizado no Laboratório de Investigação Médica LIM 12 – Disciplina de Nefrologia – HCFMUSP.

TGO – medida pelo método cinético colorimétrico de tempo fixo, sendo a faixa normal de 13 a 35 U/L.

TGP – medida pelo método cinético colorimétrico de tempo fixo, sendo a faixa normal de 7 a 35 U/L.

Medida da Cistina intraleucocitária – A medida do conteúdo de cistina intraleucocitária foi realizada no Laboratório de Genética e Bioquímica da UCSD, San Diego, Califórnia, USA, através do método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) por detecção espectrofotométrica. O preparo do *pellet* de leucócitos, no qual mede-se a cistina intraleucocitária, assim como a medida de proteína pelo método de Lowry, foi realizado no LIM 36 do ICr-HCFMUSP.

Este exame foi feito após 1,5 meses do uso de NAC. O resultado é expresso em nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg de proteína, sendo normal abaixo de 0,2. Em portadores sãos é em torno de 1 e em doentes acima de 2^{17} .

_____ 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas de comportamento *gaussiano* tiveram as médias e desvio-padrão calculadas. Para aquelas com comportamento não-paramétrico, foram calculadas as medianas e valores mínimo e máximo. Teste T para amostras independentes foi empregado para verificar possível diferença entre TBARS sérico do grupo de estudo e grupo controle. Correlação de Pearson foi empregada para verificar possível correlação entre TBARS sérico e os marcadores de função renal, assim como para verificar a correlação dos diferentes marcadores de função renal com distribuição normal e, caso a normalidade tenha sido rejeitada, procedeu-se à transformação logarítmica dos dados.

Na análise da Etapa 4 para as variáveis com distribuição normal, a comparação empregou testes paramétricos e para as variáveis sem distribuição normal, foram empregados testes não-paramétricos. A significância foi definida quando $p < 0,05$.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local (CAPpesq) e o consentimento informado foi assinado pelo responsável antes da inclusão do paciente em qualquer etapa do estudo.

Esta pesquisa teve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo número 2010/10622 e está registrada no clinicaltrials.gov com o ID NCT01614431.

_____ 6 RESULTADOS

Foram selecionados 26 pacientes, 16 meninos, com idade $7,8 \pm 3,7$ anos. Nas etapas 1 e 2 foram incluídos 20/26 casos. Na quarta etapa do estudo foram excluídos pacientes que evoluíram durante o período de observação com DRC estágio 5 (2 casos) e que perderam o seguimento (1 caso).

A dose de cisteamine foi de $72,06 \pm 5,22$ mg/Kg/dia dividida em 4 doses, a cada seis horas. A medida da cistina intraleucocitária foi realizada apenas uma vez, após 1,5 meses do início da NAC. Os níveis de cistina intraleucocitária tiveram uma mediana=1,2 nmol/2 cistina/mg de proteína (0,8-2,8).

6.1. RESULTADOS DAS ETAPAS 1 E 2 DO ESTUDO

Nestas etapas foram incluídos 20/26 pacientes (6 do sexo feminino) com cistinose nefropática e 43 controles normais estudados em relação à medida do TBARS sérico. A Tabela 3 mostra a distribuição dos pacientes de acordo com o estágio de DRC.

Tabela 3 - Pacientes com cistinose nefropática (n=20) estratificados de acordo com estágio de Doença Renal Crônica (DRC) de acordo com o KDOQI

Estágio de DRC	Número de pacientes
DRC 1	9
DRC 2	5
DRC 3	5
DRC 4	1

Nos 43 pacientes controles com idade $7,4 \pm 1,1$ anos (média $\pm$ DP), o nível sérico do TBARS foi $1,6 \pm 0,04$ nmol/mL; em pacientes com cistinose, idade $8,0 \pm 3,6$ anos (média $\pm$ DP), o nível sérico de TBARS foi $4,03 \pm 1,02$ nmol/mL. Não houve diferença estatística entre pacientes e controles em

relação à idade, porém houve uma diferença estatisticamente significativa entre o TBARS sérico entre os dois grupos ($p < 0,0001$). Para determinar o efeito do comprometimento da função renal glomerular sobre os níveis de TBARS sérico nos pacientes, correlacionamos este parâmetro com a creatinina e uréia séricas e com o *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz. Não houve correlação significativa entre TBARS sérico e esses parâmetros (Figura 7).

Figura 7 - Correlação entre TBARS sérico e creatinina sérica (a, b), uréia (c) e *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz (Clcreat estatura) (d) em pacientes com cistinose nefropática. a: $r = -0,04$, $p = 0,86$. b: $r = 0,02$, $p = 0,93$. c: $r = -0,10$, $p = 0,65$. d: $r = 0,17$, $p = 0,46$.

6.2. RESULTADOS DA ETAPA 3 DO ESTUDO

Para verificar a correlação entre os diferentes marcadores práticos de função renal em pacientes com cistinose foram medidos os seguintes parâmetros: creatinina sérica, cistatina C sérica e calculamos o *clearance* de creatinina estimado pela estatura pela fórmula de Schwartz, incluindo todas as

medidas destes parâmetros de todos os 26 pacientes durante o período de estudo (n= 103) e estratificadas de acordo com o estágio de DRC segundo o KDOQI⁶¹. A Tabela 4 mostra as características dos pacientes, em relação ao sexo, idade na primeira medida e distribuição das medidas de acordo com o estágio de DRC.

Tabela 4 – Dados de 26 pacientes com cistinose incluídos neste estudo e a distribuição das 103 medidas de acordo com os estágios do KDOQI de Doença Renal Crônica (DRC).

Idade (X ± DP) anos	7,8 ± 3,7
Sexo (masculino/feminino)	16/10
Número de medidas - estágio DRC 1	28
Número de medidas - estágio DRC 2	31
Número de medidas - estágio DRC 3	33
Número de medidas - estágio DRC 4	11

Considerando todas as 103 medidas, após a transformação logarítmica foi detectada uma correlação estatística significativa entre a creatinina sérica e a cistatina C sérica ($r= 0,81$, $p<0,0001$), entre a cistatina C sérica e o *clearance* de creatinina estimado ($r= 0,84$, $p < 0,0001$) e entre a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina estimado ($r=0,97$, $p < 0,0001$).

A Figura 8 mostra um gráfico Bland-Altman comparando a creatinina sérica e a cistatina C sérica e a Figura 9 mostra um gráfico Bland-Altman comparando a cistatina C sérica e o *clearance* de creatinina estimado.

Figura 8 – Gráfico Bland-Altman mostrando a relação entre cistatina C sérica (mg/L) e creatinina sérica (mg/dL) em pacientes com cistinose nefropática

Figura 9– Gráfico Bland-Altman mostrando a relação entre cistatina C sérica (mg/L) e o *clearance* de creatinina estimado pela fórmula de Schwartz (mL/min/1,73 m²SC)

A Tabela 5 mostra a creatinina sérica (mg/dL), cistatina C sérica (mg/L) e *clearance* de creatinina estimado pela estatura dos 26 pacientes portadores de cistinose nefropática distribuídas por estágio de DRC de acordo com o KDOQI⁶¹.

Tabela 5 – Creatinina sérica (mg/dL), cistatina C sérica (mg/L) e *clearance* de creatinina estimado pela estatura em medidas seriadas de 26 pacientes portadores de Cistinose Nefropática distribuídas por estágio de doença renal crônica de acordo com o KDOQI.

	<i>DRC 1</i>	<i>DRC 2</i>	<i>DRC 3</i>	<i>DRC 4</i>	<i>Todos</i>
Creatinina sérica (mg/dL) (X±DP)	0,44±0,10	0,89±0,18	1,48±0,43	2,90±0,54	1,17±0,79
Cistatina C (mg/L) (X±DP)	0,83±0,19	1,07±0,25	1,70±0,56	2,75±0,50	1,39±0,70
<i>Clearance</i> de creatinina (X±DP) (ml/min/1.73m ² SC)	125±28	71,8±9,2	44,3±10,4	22,2±4,8	72,3±39,7

Estratificando por estágio de DRC observamos que no grupo DRC 1 a creatinina sérica e a cistatina C tiveram distribuição normal, e o *clearance* de creatinina após a transformação logarítmica. Não foi detectada correlação significativa entre cistatina C e creatinina sérica ($r=0,35$, $p= 0,06$); mas foi detectada entre cistatina C e *clearance* de creatinina ($r=0,38$, $p= 0,04$) e entre creatinina sérica e *clearance* de creatinina ($r=0,95$, $p <0,0001$). No grupo DRC 2 a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina tiveram distribuição normal, e a cistatina C após transformação logarítmica. Não foi detectada correlação significativa entre creatinina sérica e cistatina C ($r= 0,21$, $p= 0,24$), entre cistatina C e *clearance* de creatinina ($r= 0,18$, $p= 0,32$); entretanto, entre creatinina sérica e *clearance* de creatinina a correlação foi significativa ($r= 0,80$, $p<0,0001$). No grupo DRC 3 os 3 parâmetros tiveram distribuição normal. A creatinina sérica e a cistatina C ($r= 0,66$, $p< 0,0001$), a cistatina C e o *clearance* de creatinina ($r= 0,79$, $p< 0,0001$) e a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina ($r= 0,81$, $p< 0,0001$) apresentaram correlação significativa. No grupo DRC 4 os parâmetros obedeceram a distribuição normal. A correlação entre creatinina sérica e cistatina C não foi significativa ($r= 0,39$, $p= 0,22$); porém, entre a cistatina C e o *clearance* de creatinina ($r= 0,61$, $p= 0,04$) e entre a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina ($r= 0,92$, $p< 0,0001$) foram significativas.

6.3. RESULTADOS DA ETAPA 4

Para esta etapa foram incluídos 23 pacientes, idade $8,5 \pm 3,0$ anos, com adequado controle metabólico e eletrolítico, aderentes ao tratamento e que terminaram o estudo em estágios de DRC 1 a 4 do KDOQI. Em relação ao TBARS sérico em T0 encontramos uma mediana = $6,92 \text{ nmoL/mL}$ ($3,3\text{-}29,0$) e em T1 mediana = $1,7 \text{ nmoL/mL}$ ($0,6\text{-}7,2$) com uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos ($p < 0,0001$), como mostrado na Figura 10. Em relação à função renal, houve uma diferença estatisticamente significativa entre T0 *versus* T1 ($p < 0,0001$), em T0 creatinina sérica = $1,10 \pm 0,50 \text{ mg/dL}$ e em T1 $0,90 \pm 0,50 \text{ mg/dL}$. Em relação ao *clearance* de creatinina estimado pela estatura encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre T0 *versus* T1 ($p = 0,006$): em T0 $69,7 \pm 32,2$ e em T1 $78,5 \pm 33,9 \text{ mL/min/1,73m}^2\text{SC}$. A Figura 11 mostra os valores da creatinina sérica e a Figura 12 os valores do *clearance* de creatinina. A análise da cistatina C sérica mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre T0 *versus* T1 ($p = 0,0057$). Valores da cistatina C sérica em T0 = $1,33 \pm 0,53$ e T1 = $1,15 \pm 0,54 \text{ mg/L}$ (Figura 13). Para a avaliação destes parâmetros entre T0 e T1 foi empregado o teste T para amostras pareadas.

No sentido de comparar os meses antes do protocolo com NAC e os meses após a retirada da NAC, nas Figuras 11 e 12 incluímos os valores da creatinina sérica e do *clearance* de creatinina, respectivamente, obtidos nos 3 e 6 meses antes do uso da medicação (T-3 e T-6) e 3 (T+3) e 6 meses (T+6) após a retirada da NAC. A cistatina C não foi medida após a retirada da NAC e, portanto na Figura 13 estão incluídos os valores encontrados antes do início da NAC e nos tempos T0 e T1.

Em resumo, a creatinina sérica em T-6 = $0,88 \pm 0,50 \text{ mg/dL}$, T-3 = $0,93 \pm 0,55 \text{ mg/dL}$, T0 = $1,10 \pm 0,50 \text{ mg/dL}$, T1 = $0,90 \pm 0,50$, T+3 = $1,17 \pm 0,50$, T+6 = $1,34 \pm 0,50 \text{ mg/dL}$ (Figura 11). *Clearance* de creatinina em T-6 = $82,3 \pm 40,6 \text{ mL/min/1,73 m}^2\text{SC}$, em T-3 = $80,6 \pm 38,9$, em T0 = $69,7 \pm 32,2$, em T1 = $78,5 \pm 33,9$, em T+3 = $59,1 \pm 18,8$ e em T+6 = $52,1 \pm 16,3$ (Figura 12). Cistatina C em T-6 = $1,20 \pm 0,45 \text{ mg/L}$, em T-3 = $1,18 \pm 0,48$, em T0 = $1,33 \pm 0,53$ e em T1 = $1,15 \pm 0,54 \text{ mg/L}$ (Figura 13).

Figura 10 – Níveis de TBARS sérico em T0 e após 3 meses de uso de NAC (T1) em 23 pacientes com cistinose

Figura 11 – Creatinina sérica 6 meses (T-6), 3 meses (T-3) antes da NAC e em T0 (início da NAC) e em T1 (após 3 meses com NAC), após 3 meses da retirada da NAC (T+3) e após 6 meses da retirada da NAC (T+6) em 23 pacientes com cistinose

Figura 12 – *Clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz 6 meses (T-6) e 3 meses (T-3) antes da NAC, e em T0 (início da NAC), T1 (após 3 meses com NAC), 3 meses (T+3) e 6 meses (T+6) após a retirada da NAC em 23 pacientes com cistinose

Figura 13 – Cistatina C sérica 6 meses (T-6), 3 meses (T-3) antes da NAC e em T0 (início da NAC) e em T1 (após 3 meses com NAC) em 23 pacientes com cistinose

6.3.a. EFEITOS COLATERAIS DA N-ACETILCISTEÍNA

Durante todo o estudo não foram relatados sintomas associados ao uso da NAC pelos pacientes. A avaliação das enzimas hepáticas mostrou que em nenhum caso houve aumento das mesmas durante o tratamento, permanecendo na faixa de normalidade em todos os casos.

---

7 DISCUSSÃO

A cistinose nefropática é uma doença severa e mesmo com o tratamento adequado com cisteamine, a progressão para DRC 5 é apenas retardada. Gahl et al.⁴⁸ enfatizam que “a cisteamine não é 100% efetiva” e mesmo com boa aderência, as complicações extrarenais e falência renal já estão presentes com cerca de vinte anos de idade nestes pacientes. Greco et al.⁴⁹ também demonstraram que a falência renal não pode ser prevenida na maioria dos pacientes, ocorrendo na segunda ou terceira décadas da vida.

Brodin-Sartorius et al.⁶⁶ estudaram uma coorte com 86 pacientes adultos (44 homens e 42 mulheres) com cistinose nefropática com mediana de idade ao diagnóstico de 1,5 anos (0,5-11,6) e idade na última avaliação de 26,7±7,0 anos. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: pacientes que iniciaram cisteamine antes dos 5 anos de idade n= 40, pacientes que iniciaram cisteamine acima dos 5 anos de idade n= 8 e pacientes que não receberam cisteamine antes de evoluir para DRCT n= 38. Os autores observaram que a incidência de DRCT foi menor nos pacientes tratados do que nos não tratados com cisteamine (n=40/48 pacientes, 83% vs n=38/38 casos, 100%). Entretanto, o início da terapia com cisteamine após 5 anos de idade não reduziu significativamente a incidência de DRCT se comparado àqueles que não receberam tratamento ($p>0,05$). A idade de evolução para DRCT foi 13,4±4,8 anos e 9,6±2,6 anos, respectivamente, nos grupos tratados antes de 5 anos e após 5 anos ($p<0,05$). Oito pacientes evoluíram para doença renal crônica, mas não para DRCT. Todos foram tratados com cisteamine antes de 2,5 anos de idade (mediana 1,5). Neste estudo foi observado hipotireoidismo em torno de 15 anos em 52% dos pacientes que receberam tratamento precoce, 73,3% dos que receberam tratamento tardio e 96,8% dos não tratados, mostrando que mesmo os pacientes que iniciaram tratamento com cisteamine antes dos 5 anos de idade apresentaram essa alteração. A ocorrência de acometimento muscular e *diabetes mellitus* também não foram retardadas nos pacientes com tratamento precoce, porém ocorreram num menor número de pacientes. Comprometimento muscular foi observado em 15% dos pacientes com

tratamento precoce, 53,6% dos tratados tardiamente e 61,1% dos não tratados e, *diabetes mellitus* em 27,5% dos tratados precocemente, 64,7% dos tratados tardiamente e 89,6% dos não tratados. Óbito ocorreu em 27,9% dos pacientes com uma média de idade de 26,8 anos, por infecção ou complicação neuromuscular. A crítica deste trabalho é que trata-se de um estudo retrospectivo e a média de idade em que os pacientes iniciaram cisteamine foi tardia (9,9 anos). Dados do registro internacional de cistinose (CCIR), onde os pacientes ou familiares preenchem um questionário *online* sobre a tolerância à cisteamine, aderência à medicação e sintomas apresentados, mostram que 83,2% dos pacientes iniciaram o uso da cisteamine antes dos 5 anos e desses, 29,9% realizaram pelo menos um transplante renal (desses, 78,2% antes dos 16 anos de idade). Outras complicações da doença como fraqueza muscular e hipotireoidismo ocorreram mesmo com o uso precoce da cisteamine, em 47,8% e 23,9% dos pacientes, respectivamente. Essas informações, baseadas numa grande coorte de pacientes (n=230) mostram que a evolução para DRCT e outras complicações ocorrem mesmo com o tratamento precoce da doença⁴².

Assim, a cistinose nefropática ainda apresenta muitas lacunas a serem desvendadas, e muito ainda precisa ser descoberto para o seu tratamento adequado.

Novas opções terapêuticas têm sido investigadas. Como comentado previamente, destaca-se uma nova formulação, a cisteamine de liberação entérica, aprovada pelo FDA em Outubro de 2012, a qual permite ser administrada a intervalos de 12 em 12 horas, proporcionando melhor aderência ao uso da medicação. Esta nova formulação tem se mostrado eficaz em reduzir o conteúdo intraleucocitário de cistina com doses menores⁴⁷.

Paralelamente, um estudo⁶⁷ realizado em modelo de camundongo *knockout* para o gene *CTNS*, mostrou que o transplante de células da medula óssea (TMO) ou células-tronco hematopoiéticas levou a uma melhora da função renal. Foram avaliados 30 camundongos *CTNS*^{-/-} transplantados há mais de 7 meses. Destes, 15 foram transplantados entre 2 e 6 meses de idade e 15 entre 6 e 10 meses de idade. Vinte e nove camundongos *CTNS*^{-/-} não tratados e 27 do tipo “selvagem” foram usados como controle. Quando comparados os ratos tratados com os controles, a creatinina sérica apresentou-

se mais baixa no primeiro grupo, assim como o grau de poliúria. Os níveis de cistina também apresentaram-se mais baixos em todos os tecidos dos ratos tratados (redução de 54% no rim, 56,5% nos músculos e 96,5% no fígado). Foi observada correlação entre a preservação da função renal nos ratos tratados com a porcentagem de células expressando o gene funcional *CTNS*. Não houve uma diferença significativa na função renal de ratos transplantados antes e após 6 meses de idade, sugerindo que mesmo em animais mais velhos o TMO pode contribuir para a preservação da função renal.

Outro estudo realizado previamente⁶⁸ mostrou que o TMO, assim como o transplante de células tronco hematopoiéticas, levou a uma redução significativa dos níveis de cistina intraleucocitária, assim como uma melhora da função renal após 4 meses do transplante de ratos modelo para cistinose.

Cabe ressaltar, que tais procedimentos não são inócuos e associam-se a complicações graves. No caso de transplante alogênico há maior risco de rejeição e doença do enxerto *versus* hospedeiro. No transplante autólogo, isto é, realizado com células do próprio paciente geneticamente modificadas por vetor viral que são reintroduzidas no paciente e passam a expressar *CTNS*, observa-se risco reduzido de rejeição; porém, o vetor modificado pode corromper outros genes e gerar efeitos colaterais como câncer⁶⁷.

Entretanto, enquanto estas novas medidas terapêuticas não são aplicáveis na prática clínica, persiste a necessidade de otimizar o tratamento destes pacientes, objetivando retardar ao máximo ou, mesmo, evitar a evolução para DRCT e o comprometimento de outros órgãos e sistemas. Assim, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença é fundamental para que tenhamos estratégias de intervenção.

Estudos recentes observaram alteração no metabolismo de ATP, aumento da taxa de apoptose e alterações do metabolismo oxidativo em células de pacientes com cistinose⁵. Provavelmente, todas essas alterações estão interligadas. Nesta doença ocorre um desbalanço entre fatores oxidantes e antioxidantes, e o principal antioxidante natural (GSH) está diminuído no citosol⁵¹.

A injúria celular ou disfunção de órgãos causada pelo *stress* oxidativo ocorre quando os ROS se acumulam em excesso, destruindo os mecanismos de defesa do hospedeiro. Diferentes radicais de oxigênio são gerados em resposta ao estímulo inflamatório pelos fagócitos e isto está relacionado à disfunção endotelial, pois o endotélio é uma fonte e alvo de agentes oxidantes, participando da resposta inflamatória. Diversas enzimas celulares localizadas na membrana plasmática, citoplasma, mitocôndria e peroxissomos geram ROS. Esses têm um papel importante na transdução, crescimento celular e processo inflamatório na fisiopatologia de diversas situações e doenças, como câncer, envelhecimento, aterosclerose, lesões radioativas, lesão por isquemia-reperfusão entre outras. Muitos trabalhos, assim como esse, mostram a importância dos metabólitos de oxigênio reduzido na patogênese das doenças renais⁶⁹.

Os principais radicais livres formados nas células humanas a partir da redução unieletrônica do oxigênio a água são: $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 . Este último é menos reagente e é formado a partir do primeiro, através da enzima SOD. O $\cdot\text{O}_2^-$ é, principalmente, produzido pela NADPH oxidase nos fagócitos e nas células mesangiais. Esses agentes oxidantes tiram um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácido graxo poliinsaturado da membrana celular, iniciando o processo de lipoperoxidação, com a formação de malondialdeído, que é dosado indiretamente pelo TBARS^{38,69,70}. Seria mais simples dosar o nível sérico dos radicais livres, porém estes apresentam meia-vida curta^{71,72}. Com a lipoperoxidação, ocorre o rompimento da integridade estrutural e capacidade de transporte das membranas de células e organelas^{52,53,71,73}. Além da lipoperoxidação, os radicais livres estão envolvidos em outras vias como ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear Kappa B (NF- κ B), fator indutor de hipóxia 1- α (HIF-1), proteína ativadora 1 (AP-1), além disso, modificam a atividade de proteínas quinases e fosfatases, canais iônicos e, promovem adesão molecular, levando à fibrose renal^{33,70}. Os radicais livres também levam a deformidades na membrana das hemácias, seguida de hemólise; e aumentam a diferenciação osteoblástica de células vasculares, intensificando o processo de calcificação vascular e risco cardiovascular²⁹.

Em pacientes com hipercolesterolemia ou com retardo no catabolismo do LDL, como ocorre na uremia, o LDL leva a efeitos deletérios no rim, sendo oxidado (LDL-ox) e, participando no desenvolvimento da glomeruloesclerose e fibrose intersticial. Em células mesangiais cultivadas, o LDL e LDL-ox induziram a expressão de elementos inflamatórios, como fator de crescimento derivado de plaquetas, interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e fator estimulador de colônias de macrófagos. O LDL também estimulou a produção de AII nas células mesangiais e células musculares lisas vasculares, levando a produção de superóxido, através da ativação da NADPH oxidase, como mostrado na Figura 14. Tanto a glomeruloesclerose quanto a fibrose intersticial induzidas pelo LDL-ox parecem ser causadas pela ativação do fator de crescimento tumoral- β (TGF- β), gerando uma cascata de eventos que aumentam a expressão de fatores de crescimento de tecido conectivo e matriz extracelular, como de fibronectina tipos I e III e, de colágeno tipo IV⁷⁰.

Figura 14 – Ativação da sinalização fibrogênica via NADPH oxidase pelo LDL-ox. LDL-ox estimula AII e TGF-β1, ativa PKC ou Ras dependente da NADPH oxidase, via proteína Rac, nas células mesangiais. Este processo leva a um aumento da geração de espécies oxigênio reativas e ativação da ERK1/2. A ativação da ERK1/2 estimula proteínas Smad, resultando no aumento da expressão dos genes alvos do TGF-β1⁷⁰. LDL-ox – lipoproteína de baixa densidade oxidada, AII/R – angiotensina II/receptor, TGF-β/R – fator de transformação do crescimento-β/receptores, PKC – proteína quinase C, ERK1/2 – sinal extracelular regulado pela quinase 1/2.

A Figura 15 mostra um esquema representativo dos efeitos deletérios da lipoperoxidação no corpo humano.

Figura 15 – Esquema representativo dos efeitos da lipoperoxidação sobre as células.

Como foi colocado na introdução, os estudos sobre *stress* oxidativo na cistinose foram conduzidos em modelos celulares, e nosso objetivo foi avaliar o *stress* oxidativo no soro de pacientes com cistinose. Usando uma simples metodologia, observamos que o TBARS sérico, um marcador de *stress* oxidativo, está aumentado nos pacientes com cistinose nefropática em uso de cisteamine⁶⁵. Nesse estudo, não houve correlação entre nível sérico de TBARS e *clearance* de creatinina, estágio da DRC ou com a creatinina e uréia séricas. Portanto, o *stress* oxidativo em pacientes com cistinose parece estar relacionado com os mecanismos intrínsecos da doença⁶⁵. Entretanto, foram estudados apenas 20 pacientes.

Esse conhecimento pode ser útil no tratamento desses pacientes, pois o *stress* oxidativo pode ser considerado como uma das causas da progressão da doença renal em pacientes com cistinose nefropática e não uma consequência da piora da função renal, já que o aumento do *stress* oxidativo tem sido observado em pacientes com DRC por outras causas^{51,70}.

Cistinose é uma doença que determina DRC terminal. Portanto, a avaliação da função renal glomerular é essencial. Os métodos confiáveis para avaliar o ritmo de filtração glomerular (RFG) são o *clearance* de inulina, do ácido etileno diamino tetra-acético ligado ao cromo (⁵¹Cr-EDTA) ou dietilenotriaminopenta-acetato ligado ao tecnécio (^{99m}Tc-DTPA) ou do Iohexol entre outros^{3,5}. Entretanto, são complicados, custosos, não totalmente livres de efeitos colaterais e difíceis de serem aplicados na prática. O *clearance* de

creatinina endógena seria uma opção; entretanto, depende de coleta cronometrada de urina e tem o mesmo inconveniente dos métodos colorimétricos para medir a creatinina. Em adição, pacientes com cistinose são poliúricos o que dificulta a coleta de urina cronometrada. Não existe um método prático consagrado para avaliação do RFG e a creatinina sérica permanece o mais utilizado. Pacientes com cistinose apresentam baixa estatura e massa muscular deficiente, o que pode comprometer a produção de creatinina e falsear os resultados da creatinina sérica e do *clearance* estimado de creatinina pela fórmula de Schwartz. A cistatina C pode ser um marcador da função renal glomerular nestes pacientes, pois não sofre influência da massa muscular ou sexo e é estável acima de 1 ano de idade^{5,17} entretanto, tem custo elevado^{2,3}. Assim, procedemos um estudo comparando marcadores práticos de função renal glomerular em pacientes com cistinose, quais sejam: creatinina sérica, cistatina C sérica e *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz, para validar nossos resultados comparativos com o TBARS sérico. Foi detectada boa correlação entre creatinina sérica e *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz com a cistatina C sérica em todas as medidas (n= 103) de 26 pacientes com diferentes estágios de DRC. Nos grupos estratificados de acordo com o estágio de DRC a melhor correlação foi detectada no grupo DRC 3. Uma explicação para a falta de correlação entre os parâmetros nos grupos pode ser o pequeno número de medidas⁷⁴. Assim, concluímos que a medida da cistatina C sérica não é essencial para avaliar a função renal neste grupo de doentes.

No sentido de estudar a interferência do *stress* oxidativo sobre a progressão da doença renal na cistinose, utilizamos uma droga antioxidante nestes pacientes, avaliando paralelamente marcadores de *stress* oxidativo e marcadores práticos da função renal glomerular. Partindo-se do princípio que estes pacientes apresentam deficiência intracelular de glutathione, poder-se-ia utilizar diretamente o glutathione para reduzir o *stress* oxidativo. Entretanto, este não atravessa a membrana celular⁷⁵ e, empregamos a NAC, proteína *thiol* precursora da L-cisteína, a qual atravessa a membrana celular e é capaz de reagir com quase todos os oxidantes, servindo como base antioxidante. Seu efeito protetor sobre algumas agressões orgânicas já foi demonstrado, como na

nefropatia induzida pelo contraste⁷⁶, pela ifosfamida⁷⁷, ciclosporina^{75,78}, cisplatina⁷⁹, na atenuação da progressão da insuficiência renal crônica e em transplantados renais⁸⁰.

Em um estudo prospectivo, placebo-controle, duplo cego realizado por Kimmel et al., pacientes (n=54) com acometimento leve a moderado da função renal que receberam contraste para realização de angiografia coronariana foram randomizados em três grupos onde o primeiro recebeu NAC (n=19), o segundo zinco (n=18) e o terceiro placebo (n=17). Todos os pacientes receberam hidratação venosa até 24 horas após o procedimento. O RFG foi avaliado através da dosagem da creatinina e cistatina C séricas 2 e 6 dias após a realização da angiografia, e este último marcador foi dosado devido às limitações já sabidas do primeiro. Não foi observado uma diferença na incidência da nefropatia induzida pelo contraste e não houve um aumento dos valores da creatinina após o uso do contraste (baixa osmolaridade e não-iônico) entre os grupos, porém dois dias após o seu uso, houve um aumento significativo da cistatina C sérica nos grupos que receberam zinco (p=0,012) e placebo (p=0,041), mostrando que a NAC preveniu a deterioração tardia da função renal. Neste trabalho, a cistatina C sérica refletiu melhor as alterações da função renal quando comparada à creatinina. A NAC e o zinco não tiveram efeito na prevenção da nefropatia através da dosagem da creatinina, porém através da dosagem da cistatina C, pôde-se sugerir seu efeito benéfico. O mecanismo fisiopatológico da nefropatia induzida pelo contraste ainda é desconhecido; porém, diversos fatores como vasoconstrição resultando em isquemia medular, efeito direto do contraste nas células tubulares renais e efeito tóxico causado pelos ROS parecem contribuir. Como os ROS têm um papel importante na patogênese da doença, a NAC tem sido usada com sucesso na prevenção da nefropatia induzida pelo contraste⁵⁶. Outro estudo duplo-cego e placebo controle foi realizado por Seguro et al. na avaliação do efeito da NAC na prevenção da nefropatia por contraste. Neste, 24 pacientes com insuficiência renal leve a moderada que realizaram angiografia coronariana eletiva foram randomizados para receber placebo ou NAC. Ambos os grupos receberam a mesma hidratação. A função renal foi avaliada 48 horas antes e 48 horas após o uso do contraste. O F2-isoprostano urinário (complexo

prostaglandina-like formado *in vivo* a partir de radicais livres da peroxidação do ácido araquidônico, independente da ciclooxigenase), marcador de *stress* oxidativo, foi dosado antes e após o procedimento, assim como a expressão da proteína α -glutathione S-transferase (marcador específico de injúria tubular proximal). Foi observado que o *clearance* de creatinina aumentou após o exame em pacientes que receberam NAC ($44,7 \pm 4,2$ vs $57,2 \pm 6,3$ ml/min/1,73m²; $p=0,02$), enquanto que no grupo placebo não houve alteração ($46,6 \pm 5,0$ vs $46,9 \pm 4,3$ ml/min/1,73m²; $p=0,90$). Após o uso do contraste, os níveis de F2-isoprostano no grupo placebo aumentaram significativamente acima dos valores basais ($2,9 \pm 0,7$ vs $10,3 \pm 2,1$ ng/mg creatinina, $p=0,007$), enquanto os valores no grupo que recebeu NAC se mantiveram ($3,5 \pm 0,5$ vs $4,1 \pm 0,9$ ng/mg creatinina; $p=0,63$). Além disso, o tratamento com NAC levou a uma redução dos níveis de α -glutathione S-transferase comparado ao grupo placebo ($0,8 \pm 0,2$ vs $2,4 \pm 0,7$ μ g/g; $p=0,046$). Neste estudo, que faz parte de uma meta-análise⁸¹ mostrando que o uso concomitante da NAC e hidratação reduzem em 56% o risco relativo da nefropatia induzida por contraste em pacientes com insuficiência renal crônica, foi observado que aqueles com falência renal crônica apresentaram uma melhora da função renal com o uso da NAC, evidenciando o papel do *stress* oxidativo na nefropatia por contraste⁷⁶.

Já na nefropatia induzida pela ciclosporina, pode ser observado na literatura que aproximadamente 30% dos pacientes que recebem esta medicação apresentam dano renal moderado a severo e este é dose-dependente^{75,78}. Ainda não está claro o mecanismo que leva à nefrotoxicidade, mas sabe-se que ocorre um aumento da resistência vascular renal e, consequentemente, uma redução do fluxo sanguíneo levando à isquemia renal. Diversas substâncias como a All, óxido nítrico, tromboxano/prostaciclina e, principalmente, a endotelina são possíveis mediadores da vasoconstrição. A má perfusão tecidual leva à quebra da molécula de ATP, levando a um aumento dos seus produtos de degradação, como a adenosina, inosina e hipoxantina. A primeira hipótese para a participação do *stress* oxidativo na nefropatia causada pela ciclosporina seria a conversão enzimática da hipoxantina em xantina pela xantina oxidase levando à produção de superóxido. Uma segunda hipótese seria a ativação do complexo p450 pela

ciclosporina resultando na formação de radicais livres. Diversos trabalhos mostraram uma redução significativa da atividade da SOD e da GPx, principais enzimas antioxidantes, em pacientes que receberam NAC, assim como um aumento dos níveis de MDA, da uréia e da creatinina séricas, que retornaram aos valores da normalidade com o uso da NAC, prevenindo assim a nefropatia induzida pela ciclosporina. Na avaliação histológica renal, alterações como atrofia tubular epitelial, vacuolização, descamação celular, debris celulares no TP, infiltrado inflamatório celular, fibrose intersticial, espessamento da membrana basal tubular e glomerular foram mínimas em pacientes que receberam NAC. Com esses resultados, os autores concluem que a ciclosporina pode continuar sendo usada no tratamento de diversas doenças auto-imunes, sem restrição na dose, quando associada ao uso da NAC, que além do seu efeito antioxidante, atua diretamente na célula muscular lisa, estimulando a liberação de óxido nítrico e reduzindo a resistência vascular. Além disso, a nefrotoxicidade da ciclosporina está associada a um acúmulo intracelular de cálcio e o uso de bloqueadores do canal de cálcio atenuam a lesão. A NAC também bloqueia esses canais, mantendo assim a homeostase do cálcio^{75,78}.

Já nos transplantados renais, a doença cardiovascular é a principal causa de morbimortalidade, e sabe-se que o aumento do *stress* oxidativo após o transplante renal leva à aterogênese. Fuentes et al. avaliaram 25 pacientes transplantados renais, os quais já haviam realizado o transplante há mais de um ano, que apresentavam hiperlipidemia leve a moderada, e recebiam como terapia imunossupressora inibidor da calcineurina e corticóide. Os critérios de exclusão foram a presença de *diabetes mellitus*, doença hepática ativa ou aumento dos níveis de desidrogenase láctica ou creatinofosfoquinase. Os pacientes foram avaliados (*stress* oxidativo, função renal e lipidograma) por 8 meses e neste período receberam 600 mg de NAC duas vezes ao dia. Não houve uma diferença significativa dos parâmetros de *stress* oxidativo antes e após o uso da NAC, mas houve um aumento do HDL após receberem NAC (54,83 mg/dL vs 61,82 mg/dL) ($p=0,01$), e uma correlação positiva entre GPx e HDL ($r=0,50$; $p=0,01$). Os níveis séricos de creatinina reduziram após o tratamento de 1,41 mg/dL para 1,31 mg/dL ($p=0,04$), assim como houve um

aumento do *clearance* de creatinina de 64,63 mL/min para 69,25 mL/min ($p=0,01$). A ação da NAC pode ter um efeito protetor na nefropatia crônica do enxerto nos transplantados renais, pois as características histológicas da lesão vascular são semelhantes à aterosclerose. Foi detectada uma melhora significativa da função renal após o tratamento com NAC, porém ainda não se tem uma explicação definitiva⁸⁰.

A ifosfamida é um importante agente quimioterápico usada no tratamento de tumores sólidos como rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, sarcoma de Ewing, sarcomas ósseos, osteossarcoma e neuroblastoma; porém, aproximadamente 30% dos pacientes que recebem esta medicação desenvolvem nefrotoxicidade⁷⁷. A ifosfamida é uma pró-droga metabolizada no fígado pelo citocromo p450 em seu metabólito ativo, o qual é oxidado nas células tubulares renais proximais, levando à produção de cloracetaldéido, responsável pelo efeito nefrotóxico, através da oxidação do GSH⁸³. Particularmente, Chen et al. avaliaram o efeito protetor da NAC na nefropatia induzida pela ifosfamida em ratos, que foram divididos em 4 grupos, 6 ratos em cada grupo. O grupo 1 recebeu NaCl 0,9%/dia intraperitoneal por 5 dias, o grupo 2 recebeu NAC 1,2 g/Kg/dia intraperitoneal por 5 dias, o grupo 3 recebeu ifosfamida 50 mg/Kg/dia intraperitoneal por 5 dias e o grupo 4 recebeu NAC + ifosfamida por 5 dias via intraperitoneal. Após o tratamento foram coletadas amostras de sangue (sódio, potássio, uréia, creatinina, fósforo, albumina, magnésio, glicose), urina (potássio, uréia, creatinina, fósforo, magnésio, proteína e β 2-microglobulina) e homogeneizado renal (GSH, MDA, atividade da glutathione S-transferase-GST, enzima fase II que facilita a conjugação do GSH com metabólitos reativos). No grupo 3 foi visto um aumento dos níveis séricos de creatinina ($p<0,001$), dos níveis urinários de magnésio ($p<0,05$) e da β 2-microglobulina urinária ($p<0,01$); assim como uma redução dos níveis séricos de potássio, uréia, fósforo, albumina, magnésio e glicose, quando comparado ao grupo 1. O tratamento com NAC (grupo 4) preveniu significativamente a redução dos níveis séricos de potássio e magnésio ($p<0,05$). Neste mesmo grupo, os níveis de GSH encontraram-se depletados em mais de 50% em relação ao grupo 1 ($p<0,01$) e o tratamento com NAC reverteu esta depleção. Os níveis de MDA apresentaram-se elevados nos ratos que receberam

ifosfamida, e o tratamento combinado com NAC preveniu este aumento. No grupo 3 houve uma redução da atividade da glutathione S-transferase (GST) em relação ao grupo que recebeu solução salina ($p < 0,05$) e o tratamento com NAC preveniu esta redução ($p < 0,05$)⁷⁷.

Este estudo foi o primeiro a demonstrar que a NAC previne a nefrotoxicidade induzida pela ifosfamida em modelo animal. Doses altas de ifosfamida (50mg/kg) resultaram em alteração da função renal, evidenciada pelo aumento da creatinina sérica, da excreção urinária de magnésio e de β 2-microglobulina urinária. Os autores observaram também um aumento do *stress* oxidativo, detectado pela depleção dos níveis de GSH, aumento de MDA e redução da atividade da GST. A NAC preveniu o aumento dos níveis séricos de creatinina e urinários de magnésio e β 2-microglobulina, assim como a depleção de GSH e aumento dos níveis de lipoperóxido, reduzindo a severidade da nefrotoxicidade causada pela ifosfamida, tendo assim um importante papel no restabelecimento das reservas de GSH⁷⁷.

A NAC é usada em Pediatria como agente mucolítico e não apresenta efeitos colaterais significativos. Neste estudo, pacientes com cistinose nefropática receberam NAC na dose de 25 mg/Kg/dia, havendo uma redução do nível sérico de TBARS, assim como uma melhora dos marcadores de função renal (cistatina C e creatinina séricas e *clearance* de creatinina). Além disso, 3 e 6 meses após a retirada da NAC, houve uma redução da função renal glomerular, observada através da dosagem da creatinina sérica e *clearance* de creatinina. Este fato pode estar relacionado à evolução da doença. Assim, podemos sugerir que a NAC tem a capacidade de reduzir o *stress* oxidativo na cistinose nefropática e esta redução pode estar correlacionada à melhora da função renal, evidenciando seu potencial como medicação recomendada nesta doença para controle da progressão da doença renal em pacientes em uso de cisteamine. Adicionalmente não foram observados efeitos colaterais com o uso desta droga.

Entretanto, é importante ressaltar que a metodologia empregada para alcançar esta conclusão não é a mais adequada, sendo necessário maior número de casos, grupo controle e maior tempo de observação. Porém, este é

o primeiro estudo empregando uma droga antioxidante em pacientes com cistinose e pode funcionar como um estudo piloto para futuras investigações.

_____ 8 CONCLUSÕES

- A cistinose nefropática é uma doença sistêmica grave e progressiva e, mesmo com todo o tratamento adequado, a evolução para doença renal crônica terminal tem sido observada por diferentes autores. Acometimento extrarenal também tem sido observado em pacientes em uso correto de cisteamine.

- Em trabalhos realizados em modelos celulares, foi visto que na cistinose há um aumento do *stress* oxidativo, o que foi comprovado neste estudo, que é o primeiro a ser realizado *in vivo*, através da dosagem do TBARS no soro de pacientes com cistinose.

- O aumento do *stress* oxidativo observado neste grupo de pacientes não teve correlação com os parâmetros de função renal estudados, quais sejam a creatinina e uréia séricas e o *clearance* de creatinina estimado pela fórmula de Schwartz. Tal achado sugere que o aumento do *stress* oxidativo pode ter um papel importante na fisiopatologia da doença e, não ser apenas o resultado da falência renal.

- A avaliação e comparação entre diferentes marcadores de função glomerular nos pacientes com cistinose incluídos neste estudo, mostrou correlação estatística significativa entre todos os parâmetros de função renal glomerular estudados, creatinina sérica, cistatina C sérica e *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz, quando consideradas todas as 103 dosagens de 26 pacientes com graus diversos de função renal (estágios 1 a 4 do KDOQI). Tal achado nos permite usar a creatinina e o *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz como marcadores de função renal glomerular, já que a cistatina C não é um exame realizado de rotina em nosso laboratório e que apresenta custo elevado.

- Durante o período do estudo, foi utilizada a NAC como medicação antioxidante, e detectamos uma redução do *stress* oxidativo, evidenciado pela redução significativa do TBARS sérico e, uma significativa melhora da função renal glomerular, avaliada pela creatinina e cistatina C séricas e pelo *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz. Paralelamente, não foram observados

efeitos colaterais e as enzimas hepáticas mantiveram-se na faixa de normalidade.

- A associação de NAC ao tratamento convencional com cisteamine pode mostrar algum benefício na função renal glomerular dos pacientes com cistinose e, estudos mais amplos deveriam ser realizados.

---

9 REFERÊNCIAS

1. Nesterova G, Gahl W. Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease. *Pediatr Nephrol* 2008, 23:863–878
2. Midgley JP, El-Kares R, Mathieu F, Goodyer P. Natural history of adolescent-onset cystinosis. *Pediatr Nephrol* 2011; 26:1335-1337
3. Wilmer MJ, Schoeber JP, Van del Heuvel LP, Levtchenko EN. Cystinosis: practical tools for diagnosis and treatment. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 205-215
4. Foreman JW. Fanconi syndrome and cystinosis. In: Holliday MA, Barrat TM & Avner ED. *Pediatric Nephrology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994, p. 537-557
5. Wilmer MJ, Emma F, Levtchenko EN. The pathogenesis of cystinosis: mechanism beyond cystine accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299:905-916
6. Schneider JA, Antignac C, Levtchenko E, Dohil R. Second international cystinosis research symposium. *Pediatr Nephrol* 2010; 25:2195-2216
7. Schneider JA, Bradley K, Seegmiller JE. Increased cystine in leukocytes from individuals homozygous and heterozygous for cystinosis. *Science* 157:1321-1322, 1967
8. Thoene JO, Oshima RG, Crawhall JC, Olson DL & Schneider JÁ. Cystinosis: intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 58:180-189, 1976
9. Schneider JÁ; Rosembloom FM & Bradley KH. Increased free-cystine content of fibroblasts cultured from patients with cystinosis. *Biochem Biophys Res Commun* 29:527, 1967

- 10.** Gahl WA, Tietze F & Bashan W. Defective cystine exodus from isolated lysosome – rich fractions of cystinotic leukocytes. *J Biol Chem* 257:9570, 1982
- 11.** Schulman JD, Bradley KH & Seegmiller JE. Cystine: compartmentalization within lysosomes in cystinotic leukocytes. *Science* 166:1152, 1969
- 12.** Tietze F, Bradley KH & Schulman JD. Enzymatic reduction of cystine by subcellular fractions of cultured and peripheral leukocytes from normal and cystinotic individuals. *Pediatr Res* 6:649, 1972
- 13.** Wilmer MJ, de Graaf-Hess A, Blom HJ, Dijkman HB, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levtchenko EN (2005) Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337:610–614
- 14.** Sansanwal P, Yen B, Gahl WA, Ma Y, Ying L, Wong LJ, Sarwal MM: Mitochondrial autophagy promotes cellular injury in nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 272–283
- 15.** Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore AS, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W & Antignac C. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18 (4):319-24, 1998
- 16.** Anikster Y, Lucero C, Touchman JW, Huizing M, McDowell G, Shotelersuk V, Green ED & Gahl WA. Identification and Detection of the common 65-kB deletion Breakpoint in the Nephropathic cystinosis Gene. *Mol Genet Metab* 66:111-116, 1999
- 17.** Vaisbich MH, Koch VH. Report of a Brazilian multicenter study on nephropathic cystinosis. *Nephron Clin Pract* 2010;114:c12–c18
- 18.** Brunn DD, Vaisbich MH, Sá LCF, Koch VH. Cistinose nefropática: diferentes apresentações clínicas. *Pediatria (São Paulo)* 24 (1/2): 65-68, 2002

- 19.** Manz F & Gretz N. Progression of chronic renal failure in a historical group of patients with nephropathic cystinosis. *Pediatr Nephrol*, 1994; 8:466-471
- 20.** Besouw MTP, Van Dyck M, Francois I, Van Hoyweghen E, Levtchenko EN. Detailed studies of growth hormone secretion in cystinosis patients. *Pediatr Nephrol* 2012; 27:2123-2127
- 21.** Gahl WA. Cystinosis coming of age. *Adv paediatr* 33:95-126, 1986
- 22.** Elenberg E, Norling LL, Kleinman RE & Ingelfinger J. Feeding problems in cystinosis. *Pediatr Nephrol* 12:365-370, 1998
- 23.** Theodoropoulos D, Krasnewich D, Kaiser-Kupfer MI & Gahl WA. Classic Nephropathic Cystinosis as an adult disease. *JAMA* 270:2200-2204, 1993
- 24.** Filler G, Amendt P, von Bredow MA, Rohde W & Ehrich JHH. Slowly deteriorating insulin secretion and C-peptide production characterizes diabetes mellitus in infantile cystinosis. *Eur J Ped* 157 (9):738-742, 1998
- 25.** Traunner DA, Williams J, Ballantyne AO, Spilkin AM, Crowhurst J, Hesselink J. Neurological impairment in nephropathic cystinosis: motor coordination deficits. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 2061-2066
- 26.** Charnas LR, Luciano CA, dalakas M, Gilliat RW, Bernardini I, Ishak K, Cwik VA, Fraker D, Brushart TA & Gahl WA. Distal Vacuolar Myopathy in Nephropathic Cystinosis. *Ann Neurol* 35(2):181-188, 1994
- 27.** Willians BLH, Schneider JA, Trauner DA. Global Intellectual Deficits in Cystinosis. *Am J Med Genet* 49:83-87, 1994
- 28.** Scarvie KM, Ballantyne AO & Trauner DA. Visuomotor Performance in Children with Infantile Nephropathic Cystinosis. *Percept Mot Skills* 82:67-75, 1996

- 29.** Massy ZA, Mazière C, Kamel S, Brazier M, Choukroun G, Tribouilloy C, Slama M, Andrejak. Impact of inflammation and oxidative stress on vascular calcifications in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2005; 20:380-382
- 30.** Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:680-687
- 31.** Zatz R. Série Fisiopatologia Clínica Fisiopatologia-Renal (vol. 2) – São Paulo: Editora Atheneu, 2002
- 32.** Levtchenko E, Blom H, Wilmer M, Van den Heuvel, Monnens L. ACE inhibitor enalapril diminishes albuminuria in patients with cystinosis. *Clin Nephrol* 2003; 60(6):386-9
- 33.** Sachse A, Wolf G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2439-2446
- 34.** Mahoney CP, Striker GE, Hickman RO, Manning GB, Marchioro TL. "Renal transplantation for childhood cystinosis". *The New England Journal of Medicine*, vol. 283, no. 8, pp. 397–402, 1970
- 35.** Langlois V, Goodyer P, Geary D, Murray L, Champoux S, H'ebert D. "Polyuria and proteinuria in cystinosis have no impact on renal transplantation: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study". *Pediatric Nephrology*, vol. 15, no. 1-2, pp. 7–10, 2000
- 36.** World Health Organization: Oral Health Surveys-Basic Methods. 4. Ed. Geneva, 1997
- 37.** Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. *Pediatr Nephrol* 2013; 28:51-59
- 38.** Gahl WA, Kaiser-Kupfer MI. Complications of nephropathic cystinosis after renal failure. *Pediatr Nephrol* 1987; 3:260-268

- 39.** Besouw MTP, Bowker R, Dutertre JP, Emma F, Gahl W, Greco M, Lilien MR, McKiernan J, Nobili F, Schneider JA, Skovby F, van den Heuvel LP, Van't Hoff WG, Levtchenko E. Cysteamine toxicity in Patients with Cystinosis. *J Pediatr* 2011;159:1004-11
- 40.** Wenner WJ, Murphy JL. The effects of cysteamine on the upper gastrointestinal tract of children with cystinosis. *Pediatr Nephrol* 1997; 11:600-603
- 41.** Bendel-Stenzel MR, Steinke J, Dohil R, Kim Y. Intravenous delivery of cysteamine for treatment of cystinosis: association with hepatotoxicity. *Pediatr Nephrol* 2008; 23:311-315
- 42.** Cherqui S. Cysteamine therapy: a treatment for cystinosis, not a cure. *Kidney Int.* 2012; 81(2):127-129
- 43.** Besouw M, Levtchenko E. Pharmacokinetics of cysteamine in a cystinosis patient treated with hemodialysis. *Pediatr Nephrol* 2010; 21:401-403
- 44.** Levtchenko EN, de Graaf-Hess A, Blom HJ, Monnens LA (2002) Negligible urinary cysteamine loss in cystinosis patients with Fanconi syndrome. *Clin Nephrol* 57:349-351
- 45.** Daryl M, Himmerfarb O. Tipping the redox balance of oxidative stress in fibrogenic pathways in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2009; 24:2309-2319
- 46.** Wilmer MJ, Kluijtmans LA, van der Velden TJ, Willems PH, Scheffer PG, Masereeuw R, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levtchenko EN (2011). Cysteamine restores glutathione redox status in cultured cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1812, 643-651
- 47.** Dohil R, Cabrera BL. Treatment of cystinosis with delayed-release cysteamine: 6-year follow up. *Pediatr Nephrol* 2013; 28:507-510
- 48.** Gahl WA, Balog JZ, Kleta R. Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of cysteamine therapy. *Ann Intern Med* 2007; 147:242-250

49. Greco M, Brugnara M, Zaffanello M, Taranta A, Pastore A, Emma F. Long-term outcome of nephropathic cystinosis: a 20 year single Center experience. *Pediatr Nephrol* 2010; 25:2459-2467
50. Foreman JW, Benson LL. Effect of cystine loading on substrate oxidation by rat renal tubules. *Pediatr Nephrol* 1990; 3:236-239
51. Levtchenko E, Graaf-Hess A, Wilmer M, Van den Heuvel L, Monnens L, Blom H. Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2005; 20:1828-1832
52. Laube GF, Shah V, Stewart VC, Hargreaves IP, Haq MR, Heales SJ, Van't Hoff WG. Glutathione depletion and increased apoptosis rate in human cystinotic proximal tubules cells. *Pediatr Nephrol* 2006; 21:503-509
53. Park MA, Thoene JG. Potencial role of apoptosis in development of the cystinotic phenotype. *Pediatr Nephrol* 2005; 20:441-446
54. Levine B, Klionsky DJ: Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463–477, 2004
55. Lemasters JJ: Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* 8: 3–5, 2005
56. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y. Role of NADPH oxidase and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hipertension* 2005; 45:860-866
57. Rech VC, Feksa LR, Amaral MFA, Koch GW, Wayner M, Dutra-Filho CS, Wyse TS, Wannmacher CMD. Promotion of oxidative stress in kidney of rats loaded with cistine dimethyl ester. *Pediatr Nephrol* 2007; 22:1121-1128
58. Calbiochem® GSH/GSSG Ratio Assay Kit User Protocol 371757 Rev. 08-July-2010 RFH

59. Vitvitsky V, Witcher M, Banerjee R, Thoene J (2010) The redox status of cystinotic fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism* 99:384–388
60. Chol M, Nevo N, Cherqui S, Antignac C, Rustin P. Glutathione precursors replenish decreased glutathione pool in cystinotic cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324:231-235
61. Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, Balk E, Lau J, Levin A, Hausz AT, Eknoyan G, Levey AS. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease in Children and Adolescents: Evaluation, Classification and Stratification. *Pediatrics* 2003; 111:1416-21
62. Schwartz GJ, Work DF (2009) Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 4:1832-43
63. Kimmel M, Butscheid M, Kuhlmann U, Klotz U, Alscher DM. Improved estimation of glomerular filtration rate by serum cystatin C in preventing contrast induced nephropathy by N-acetylcysteine or zinc-preliminary results. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008; 23:1241-1245
64. Danilovic A, Lucon AM, Srougi M, Shimizu MH, Ianhez LE, Nahas WC, Seguro AC. Protective effect of N-acetylcysteine on early outcomes of deceased renal transplantation. *Transplant Proc.* 2011 Jun; 43(5): 1443-9
65. Vaisbich MH, Guimaraes LPF, Shimizu MHM, Seguro AC (2011) Oxidative Stress in Cystinosis Patients. *Nephron Extra* 1:73–77, 2011
66. Brodin-Sartorius, Tête MJ, Niaudet P, et al. Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults. *Kidney Int.* 2012; 81:179-189
67. Yeagy BA, Harrison F, Gubler MC, Koziol JA, Salomon DR, Cherqui S. Kidney preservation by bone marrow cell transplantation in hereditary nephropathy. *Kidney Int.* 2011Jun; 79 (11): 1198-206

- 68.** Syres K, Harrison F, Tadlock M ET AL. Successful treatment of the murine model of cystinosis using bone marrow cell transplantation. *Blood* 2009; 114: 2542-2552
- 69.** Pavlova EL, Lilova MI, Sarov VM. Oxidative stress in children with kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2005; 20:1599-1604
- 70.** Lee HS, Song CY. Oxidized low-density and oxidative stress in the development of glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 2009; 29:62-70
- 71.** Mishra OP, Pooniya V, Ali Z, Upadhyay RS, Prasad R. Antioxidant status of children with acute renal failure, *Pediatr Nephrol* 2008; 23:2047-2051
- 72.** Ece A, Gurkan F, Kervanciogeu M, Kocamaz H, Gunes A, Atamer Y, Selek S. Oxidative stress, inflammation and early cardiovascular damage in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 2006; 4:545-552
- 73.** Mishra OP, Gupta AK, Prasad K, Ali Z, Upadhyay RS, Mishra SP, Tiwary FS. Antioxidant status of children with nephritic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2011; 26:251-256
- 74.** Guimaraes LPF, Neri LAL, Sumita NM, Vaisbich MH. Marcadores práticos de função renal em pacientes com cistinose. *J Bras Nefrol* 2012;34(3):14-16
- 75.** Duru M, N Ahmet, Yonden Z, Kuvandik G, Helvaci M. Protective effects of N-acetylcysteine on cyclosporine-a-induced nephrotoxicity. *Informa Healthcare* 2008; 30:453-459
- 76.** Drager LF, Andrade L, Toledo JFB, Laurindo FRM, César LAM, Seguro AC. Renal effects of n-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1803-1807
- 77.** N Chen, K Aleska, C Woodland, M Rieder, G Koren. N-acetylcysteine prevents ifosfamide-induced nephrotoxicity in rats. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153:1364-1372

- 78.** Tariq M, Morais C, Sobki S, Al Sulaiman M, Al Khader A. N-acetylcysteine attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* 1999; 14:923-929
- 79.** Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* 2008; 73:994-1007
- 80.** Fuentes MC, Ayuso JMM, Fuentes NR, Palomares JFV, Peinado CA, Ortega O. Treatment with N-acetylcysteine in stable renal transplantation. *Transplant Proceedings* 2008; 40:2897-2899
- 81.** Birck R, Krzossok S, Markowetz F, Schnulle P, van der Woude FJ, Braun C. Acetylcysteine for prevention of contrast nephropathy: meta-analysis. *Lancet* 2003; 362: 598-603

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Uso de N-acetilcisteína (NAC) em pacientes portadores de Cistinose Nefropática.

.....
.....PESQUISADOR... Maria Helena
Vaisbich.....

CARGO/FUNÇÃO: .. médica..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº ..49436.....

UNIDADE DO HCFMUSP: ..... Instituto da
Criança.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : ...24 meses.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Prezado (a) senhor (a), como já lhe foi falado seu filho (a) é portador (a) de Cistinose, uma doença que afeta os rins e outros órgãos no decorrer da vida. Esta doença afeta primeiramente os rins provocando excesso de urina com perda de muitas substâncias que não deveriam ser perdidas. Com a evolução da doença, mesmo com o uso do Cystagon (medicamento específico para tratar a Cistinose) observa-se uma progressão da doença renal que no final faz com que o paciente necessite de diálise ou de transplante. Isto tem sido observado no mundo todo. Com o uso do Cystagon consegue-se retardar a progressão da doença nos rins e nos outros órgãos. Estudos recentes têm mostrado que existem algumas alterações nestes doentes que impedem que a progressão da doença renal seja alcançada. Estes estudos mostraram que estes pacientes tem aumento de algumas substâncias do chamado “stress oxidativo”. Existe um remédio usado para infecção de vias aéreas superiores onde haja tosse e catarro chamado N acetil cisteína, liberado para uso em crianças e sem contra-indicações, que consegue diminuir a produção das substâncias do chamado “stress oxidativo”, reduzindo assim os efeitos prejudiciais destas substâncias sobre os rins e com a possibilidade de retardar ainda mais a progressão da doença nos rins. Este estudo pretende medir estas substâncias do “stress oxidativo” para confirmar se realmente estão aumentadas na Cistinose e usar a Nacetilcisteína nos doentes com cistinose como seu filho (a) e medir estas substâncias novamente para saber se este medicamento diminui realmente estas substâncias nestes pacientes. Também vamos avaliar a função renal antes, durante e no final do tratamento para ver se a Nacetilcisteína pode contribuir para evitar a progressão da doença nos rins. Durante todo o tratamento vamos avaliar seu filho (a) frequentemente tanto clinicamente como através de exames de laboratório para detectar os benefícios do remédio assim como tentar detectar efeitos indesejáveis se ocorrerem. Porém, sabe-se que não existem efeitos indesejáveis graves, apenas pode levar a aumento de secreção nas vias aéreas. Caso ocorra algum efeito indesejável seu filho (a) será tratado adequadamente no Instituto da Criança. Para este estudo temos que colher sangue e urina de seu filho (a) periodicamente para realizar os exames, o que está programado para ocorrer a cada 3 meses. O sangue é colhido com agulha e seringa, usadas somente uma vez e jogadas fora (descartáveis), de uma veia sob a pele, e em pequena quantidade. No local da picada poderá sentir um pouco de dor e, às vezes, poderá ficar uma mancha roxa que depois de vários dias sumirá sozinha. A urina é colhida de preferência durante a micção ou por saco coletor. Se seu filho (a) já controlar a urina pode ser pedido exame em urina de 24 horas (colhida durante as 24 horas do dia). Se o (a) senhor (a) não quiser que seu filho (a) participe da pesquisa, tem todo o direito de se recusar e ele (a) receberá assim mesmo o tratamento mais adequado para sua doença. Este estudo terá a duração de 2 anos para termos tempo de avaliar os benefícios de preservar as funções dos rins; caso queira desistir durante o estudo, não haverá problema algum e o tratamento continuará sendo ofertado pelo nosso serviço da forma mais adequada possível. A qualquer momento estaremos disponíveis para relatar os resultados do estudo e para esclarecimento que você ache necessário.

5 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para o participante inicialmente. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que a Nacetilcisteína pode retardar a progressão da doença para insuficiência renal crônica terminal. Porém, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

6 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dra. Maria Helena Vaisbich** que pode ser encontrado no endereço **Rua Enéas Carvalho de Aguiar 740 Instituto da Criança** Telefone(s) .3069-8512 ou 3069-8586. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos

ANEXO B – Aprovação da CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Carta datada de 18/02/2010

Ao

Departamento de Pediatria

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/03/2010, tomou conhecimento da **Inclusão da Co-Autora Dra. Luciana Pache de Faria** no Protocolo de Pesquisa nº **0540/09**, intitulado: **"Uso de N-acetilcisteína (NAC) em pacientes portadores de Cistinose Nefropática"**, bem como tomou ciência do **Relatório de Andamento do Estudo.**

Pesquisador Responsável: **Dra. Maria Helena Vaisbich**

CAPPesq, 24 de março de 2010.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

*email
em 30/3/10*

Marcadores práticos de função renal em pacientes com cistinose

Practical markers of renal function in cystinosis patients

Autores

Luciana Pache de Faria
Guimaraes¹

Letícia Aparecida Lopes
Neri²

Nairo Massakazu Sumita³

Maria Helena Vaisbich⁴

¹ Mestranda em Pediatria
- Nefrologia - Instituto da
Criança - HCFMUSP.

² Bioquímica do Laboratório
Central - Setor de Bioquímica
- HCFMUSP.

³ Chefe do laboratório Central
- HCFMUSP.

⁴ Doutorado (Médica Assis-
tente Unidade de Nefrologia
Instituto da Criança - HCF-
MUSP).

Data de submissão: 18/11/2011.

Data de aprovação: 15/02/2012.

Correspondência para:

Maria Helena Vaisbich.
Hospital das Clínicas - HCFMUSP
Instituto da Criança.
Rua Carlos Steinen, nº 280,
apto 31, Paraíso. São Paulo,
SP, Brasil. CEP: 04004-011.
E-mail: vaisbich@terra.com.br
Tel/Fax: (011) 3051-2474.
Apoio financeiro: FAPESP
Processo 10/10622-0.

RESUMO

Introdução: Cistinose é uma doença sistêmica, autossômica recessiva, que leva à insuficiência renal crônica na infância, a não ser que o tratamento com cisteamina seja iniciado precocemente. Mesmo nestas condições, os pacientes evoluem para doença renal crônica terminal por volta da segunda década da vida. Portanto, a avaliação da função renal é essencial neste grupo de pacientes. **Objetivo:** Avaliar e correlacionar a cistatina C, creatinina sérica e o *clearance* de creatinina pela Fórmula de Schwartz em pacientes com cistinose, com diferentes graus de função renal. **Métodos:** Foram incluídos pacientes com menos de 18 anos de idade, com diferentes níveis de função renal, de acordo com o KDOQI em estágios 1 a 4. Nenhum dos pacientes estava em terapia de substituição renal. Foram medidos os seguintes parâmetros: cistatina C, creatinina sérica e o *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz. **Resultados:** Foram analisadas 103 amostras de sangue de 26 pacientes. Foi detectada correlação significativa entre creatinina sérica e cistatina C ($r = 0,81, p < 0,0001$), cistatina C e o *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz ($r = -0,84, p < 0,0001$) e creatinina sérica e *clearance* de creatinina ($r = -0,97, p < 0,0001$). **Conclusões:** A medida da cistatina não mostrou nenhuma vantagem sobre a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz em pacientes com cistinose para avaliar o ritmo de filtração glomerular. Este é o primeiro relato sobre o valor da creatinina sérica, do *clearance* de creatinina pela fórmula de Schwartz e da cistatina C em pacientes com cistinose.

Palavras-chave: cistatina C, cistinose, creatinina, testes de função renal.

ABSTRACT

Background: Cystinosis is an autosomal recessive systemic disease that leads to renal insufficiency early in life unless cysteamine be started early. Unfortunately, even in this situation the patients will develop chronic renal disease with need of renal replacement therapy about second decade of life. Therefore, the renal function evaluation is essential to these patients. The aim of this study was to evaluate cystatin C, serum creatinine and creatinine *clearance* estimated by stature (Schwartz Formula) in cystinosis patients, with different degrees of renal function, and to correlate these parameters. **Methods:** We studied cystinosis patients, aged lower than 18 years, with different degrees of renal function, classified according to KDOQI in Chronic Kidney Disease stage 1 to 4. No patient was under renal replacement therapy. In these patients we evaluate the serum creatinine, cystatin C and creatinine *clearance* according to Schwartz Formula. **Results:** We analyzed 103 blood samples of 26 patients. We detected a significant statistical correlation between serum creatinine and cystatin C ($r = 0.81, p < 0.0001$), cystatin C and creatinine *clearance* estimated by stature ($r = -0.84, p < 0.0001$) and between serum creatinine and creatinine *clearance* estimated by stature ($r = -0.97, p < 0.0001$). **Conclusions:** The expensive measurement of cystatin C showed no advantage in relation to serum creatinine and creatinine *clearance* according to Schwartz Formula in cystinosis patients to estimate the glomerular filtration rate. This is the first report checking the value of serum creatinine, creatinine *clearance* estimated by stature and cystatin C in cystinosis patients.

Keywords: creatinine, cystatin C, cystinosis, kidney function tests.

INTRODUÇÃO

Cistinose é uma doença autossômica recessiva sistêmica por depósito intralisossomal de cistina e determina doença renal crônica terminal (DRCT).¹ A avaliação da função renal é essencial. Não existe um método consagrado para avaliação do ritmo de filtração glomerular (RFG) e a creatinina sérica permanece o mais utilizado. Pacientes com cistinose são desnutridos, apresentam polidipsia, poliúria e anorexia, que podem influenciar a creatinina sérica. A cistatina C pode ser um marcador da função renal nestes pacientes, pois não sofre influência da massa muscular ou sexo como a creatinina, e é estável acima de 1 ano de idade.^{2,3} Entretanto, tem custo elevado e é passível de críticas.^{4,5}

O objetivo deste estudo foi correlacionar a cistatina C, a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina estimado pela Fórmula de Schwartz⁶ em pacientes com cistinose.

PACIENTES E MÉTODOS

Incluímos pacientes com idade inferior a 18 anos, em estágios 1 a 4 de função renal (KDOQI),⁷ com função tireoideana normal ou sob terapia de reposição hormonal, equilibrados metabólica e eletroliticamente, recebendo bitartrato de cisteamina e aderentes ao tratamento de acordo com a presença aos exames e consultas, e avaliamos os seguintes parâmetros: creatinina sérica, cistatina C e *clearance* de creatinina pela Fórmula de Schwartz.

A creatinina sérica foi medida pelo Método de Jaffé Modificado. O *clearance* de creatinina foi estimado pela Fórmula de Schwartz. Cistatina C foi medida pelo Método Nefelométrico, faixa normal = 0,7-1,38 mg/l.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média e desvio-padrão. Correlação de Pearson foi empregada para correlacionar os parâmetros com distribuição normal e, caso a normalidade tenha sido rejeitada, procedeu-se à transformação logarítmica. Significância foi definida quando $p < 0,05$.

O Comitê de Ética Local aprovou o estudo e o consentimento informado foi assinado pelos responsáveis.

RESULTADOS

Foram analisadas 103 amostras de sangue de 26 pacientes (16 meninos). Os parâmetros foram medidos a cada três meses, quatro vezes. A Tabela 1 mostra

as características dos pacientes, em relação ao sexo, idade na primeira medida e distribuição das medidas de acordo com o KDOQI. A Tabela 2 mostra os valores da creatinina sérica, da cistatina C e do *clearance* de creatinina. Considerando todas as medidas após a transformação logarítmica, foi detectada correlação estatística significativa entre a creatinina sérica e a cistatina C ($r = 0,81$, $p < 0,0001$), entre a cistatina C e o *clearance* de creatinina estimado ($r = -0,84$, $p < 0,0001$) e entre a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina estimado ($r = -0,97$, $p < 0,0001$). A Figura 1 mostra um Gráfico Bland-Altman comparando a creatinina sérica e a cistatina C e a Figura 2 mostra um Gráfico Bland-Altman comparando a cistatina C e o *clearance* de creatinina estimado.

TABELA 1

DADOS DE 26 PACIENTES COM CISTINOSE INCLuíDOS NESTE ESTUDO E A DISTRIBUIÇÃO DAS 103 MEDIDAS DE ACORDO COM OS ESTÁGIOS DO KDOQI DE DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

Idade (X $\pm$ DP) anos	7,8 $\pm$ 3,7
Sexo (masculino/feminino)	16/10
Número de medidas no estágio DRC 1	28
Número de medidas no estágio DRC 2	31
Número de medidas no estágio DRC 3	33
Número de medidas no estágio DRC 4	11

ESTRATIFICANDO POR GRUPO DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE DRC

No grupo DRC 1, a creatinina sérica e a cistatina C tiveram distribuição normal e o *clearance* de creatinina após a transformação logarítmica. Não foi detectada correlação significativa entre cistatina C e creatinina sérica ($r = 0,35$, $p = 0,06$); mas, foi detectada entre cistatina C e *clearance* de creatinina ($r = -0,38$, $p = 0,04$) e entre creatinina sérica e *clearance* de creatinina ($r = -0,95$, $p < 0,0001$).

No grupo DRC 2, a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina tiveram distribuição normal, e a cistatina C após transformação logarítmica. Não foi detectada correlação significativa entre creatinina sérica e cistatina C ($r = 0,21$, $p = 0,24$), entre cistatina C e *clearance* de creatinina ($r = -0,18$, $p = 0,32$); entretanto, entre creatinina sérica e *clearance* de creatinina a correlação foi significativa ($r = -0,80$, $p < 0,0001$).

No grupo DRC 3, os três parâmetros tiveram distribuição normal. A creatinina sérica e a cistatina C ($r = 0,66$, $p < 0,0001$), a cistatina C e o *clearance* de

TABELA 2 CREATININA SÉRICA (MG/DL), CISTATINA C (MG/L) E CLEARANCE DE CREATININA ESTIMADO PELA ESTATURA EM MEDIDAS SÉRIADAS DE 26 PACIENTES PORTADORES DE CISTINOSE NEFROPÁTICA DISTRIBUÍDAS SEGUNDO O ESTÁGIO DE DOENÇA RENAL CRÔNICA, DE ACORDO COM O KDOQI

	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	Todos
Creatinina sérica (mg/dl) (X ± DP)	0,44 ± 0,10	0,89 ± 0,18	1,48 ± 0,43	2,90 ± 0,54	1,17 ± 0,79
Cistatina C (mg/l) (X ± DP)	0,83 ± 0,19	1,07 ± 0,25	1,70 ± 0,56	2,75 ± 0,50	1,39 ± 0,70
Clearance de creatinina (ml/min/1,73 m ² SC) (X ± DP)	125 ± 28	71,78 ± 9,20	44,37 ± 10,41	22,24 ± 4,84	72,33 ± 39,68

Figura 1. Gráfico Bland - Altman mostrando a distribuição dos dados da creatinina sérica(mg/dl) e cistatina C (mg/l) em pacientes com cistinose.

Figura 2. Gráfico Bland - Altman mostrando a relação entre cistatina C e Clearance de creatinina em pacientes com cistinose.

creatinina ($r = -0,79$, $p < 0,0001$) e a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina ($r = 0,81$, $p < 0,001$) apresentaram correlação significativa.

No grupo DRC 4, os parâmetros obedeceram a distribuição normal. A correlação entre creatinina sérica e cistatina C não foi significativa ($r = 0,39$, $p = 0,22$); porém, entre a cistatina C e o *clearance* de creatinina ($r = -0,61$, $p = 0,04$) e entre a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina ($r = -0,92$, $p < 0,0001$) foram significativas.

DISCUSSÃO

Um marcador do RFG prático vem sendo investigado. O mais utilizado é a creatinina sérica, pela facilidade de execução e baixo custo; entretanto, esta sofre influência do sexo, massa muscular e idade e apresenta secreção tubular, que pode superestimar o RFG⁸. Em adição, o método de dosagem mais empregado é o colorimétrico de Jaffé, que pode sofrer influência de outros cromógenos e superestimar a creatinina em cerca de 15% a 25%.⁹ O *clearance* de creatinina endógena depende de coleta cronometrada de urina e tem o mesmo inconveniente do método para medir a creatinina. Pacientes com cistinose são poliúricos, o que dificulta a coleta de urina cronometrada.

Os métodos confiáveis para avaliar o RFG são o *clearance* de inulina, do Cromo EDTA, DTPA ou do Iohexol, entre outros.^{2,5} Entretanto, são complicados, custosos, não totalmente livres de efeitos colaterais e difíceis de serem aplicados na prática. O *clearance* de creatinina pela Fórmula de Schwartz seria outra opção, mas depende da creatinina sérica e da estatura, a qual está comprometida nestes pacientes.¹⁰ A cistatina C tem o potencial de ser um bom marcador quando há perda de massa muscular.¹¹⁻¹³ Pacientes com cistinose apresentam massa muscular reduzida, o que pode comprometer a medida da creatinina.¹⁴ Apesar das restrições à cistatina C, objetivamos correlacionar os métodos práticos de medida do RFG.

Foi detectada boa correlação entre creatinina sérica e *clearance* de creatinina pela Fórmula de Schwartz com a cistatina C em todas as medidas em diferentes estágios de DRC. Nos grupos de estratificados, a melhor correlação foi detectada no grupo DRC 3. Uma explicação para a falta de correlação entre os parâmetros nos grupos pode ser o pequeno número de medidas.

Assim, a medida da cistatina C não mostrou vantagem sobre a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina estimado nestes pacientes. A busca por um

marcador do RFG continua e sugerimos que os parâmetros empregados sejam adaptados às características de cada doença. Este é o primeiro relato avaliando a cistatina C, creatinina sérica e *clearance* de creatinina em pacientes com cistinose.

REFERÊNCIAS

1. Gahl WA, Tietze F, Bashan N, Steinherz R, Schulman JD. Defective cystic exodus from isolated lysosome-rich fractions of cystinotic leukocytes. *J Biol Chem* 1982;257:9570-5.
2. Chew JS, Saleem M, Florkowski CM, George PM. Cystatin C -- a paradigm of evidence based laboratory medicine. *Clin Biochem Rev* 2008;29:47-62.
3. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, et al. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int* 1995;47:312-8.
4. Madureira e Silva MV, Moscoso Solorzano G, Nishida SK, Kirsztajn GM. Os níveis de cistatina C sofrem influência da dose de corticoide em pacientes com nefrite lúpica? *J Bras Nefrol* 2011;33:306-12.
5. Gabriel IC, Nishida SK, Kirsztajn GM. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? *J Bras Nefrol* 2011;33:261-7.
6. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM Jr, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 1976;58:259-63.
7. Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al.; National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics* 2003;111:1416-21.
8. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992;38:1933-53.
9. Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, et al.; National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem* 2006;52:5-18.
10. Filler G, Lepage N. Should the Schwartz formula for estimation of GFR be replaced by cystatin C formula? *Pediatr Nephrol* 2003;18:981-5.
11. Roos JF, Doust J, Tett SE, Kirkpatrick CM. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children--a meta-analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383-91.
12. Hari P, Bagga A, Mahajan P, Lakshmy R. Effect of malnutrition on serum creatinine and cystatin C levels. *Pediatr Nephrol* 2007;22:1757-61.
13. Bökenkamp A, Domanetski 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;101:875-81.
14. Gahl WA, Balog JZ, Kleta R. Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Ann Int Med* 2007;147:242-50.

Original Paper

Oxidative Stress in Cystinosis Patients

Maria Helena Vaisbich^a Luciana Pache de Faria Guimaraes^a
 Maria Heloisa Mazzola Shimizu^b Antonio Carlos Seguro^b

^aPediatric Nephrology Unit, Instituto da Criança, and ^bMedical Investigation Laboratory 12, Department of Nephrology, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key Words

Biomarkers • Chronic kidney disease • Cysteamine • Cystinosis • End-stage renal disease • Oxidative stress • Thiobarbituric acid

Abstract

Background/Aims: Nephropathic cystinosis (NC) is a severe systemic disease and cysteamine improves its prognosis. Lysosomal cystine accumulation is the hallmark of cystinosis and is regarded as the primary defect due to mutations in the *CTNS* gene. However, there is great evidence that cystine accumulation itself is not responsible for all abnormalities observed in NC. Studies have demonstrated altered ATP metabolism, increased apoptosis, and cell oxidation. An increased number of autophagosomes and autophagic vacuoles have been observed in cystinotic fibroblasts and renal epithelial cells, suggesting that altered autophagy plays a role in NC, leading to increased production of reactive oxygen species. Therefore, cystinosis patients can be more susceptible to oxidative stress (OS) and it can contribute to the progression of the renal disease. Our goal was to evaluate a marker of OS (serum TBARS) in NC children, and to compare the results with those observed in healthy controls and correlated with renal function parameters. **Methods:** The study included patients aged under 18 years, with good adherence to the treatment and out of renal replacement therapy. The following parameters were evaluated: serum creatinine, BUN, creatinine clearance estimated by stature and serum TBARS levels. **Results:** We selected 20 patients aged 8.0 ± 3.6 years and observed serum TBARS levels of 4.03 ± 1.02 nmol/ml. Serum TBARS levels in the 43 healthy controls, aged 7.4 ± 1.1 years, were 1.60 ± 0.04 nmol/ml. There was a significant difference between the plasma TBARS levels among the 2 groups ($p < 0.0001$). We detected no significant correlation between plasma TBARS levels and renal function. **Conclusion:** An increased level of serum TBARS in patients with NC was observed and this abnormality was not correlated with the renal function status degree. This is the first report that shows increased oxidative stress in serum of NC patients.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Maria Helena Vaisbich, MD

Rua Carlos Steinen 280, apto 31
 São Paulo, SP 04004-011 (Brazil)
 E-Mail vaisbich@terra.com.br

Introduction

Nephropathic cystinosis is a severe systemic progressive disease. It involves several organs throughout life. First, the kidneys are affected by proximal tubular dysfunction and Fanconi's syndrome. During childhood, there is also frequent hypothyroidism and ocular involvement, leading to photophobia. Renal glomerular damage generally becomes apparent between 2 and 5 years of age and results in end-stage renal disease between 9 and 10 years of age, unless treatment with a cystine-depleting drug, cysteamine, is initiated early in life [1]. Patients without this treatment, besides presenting glomerular damage and chronic renal insufficiency, can also present pancreatic problems, e.g. diabetes mellitus and high levels of amylase, hepatic involvement, gastrointestinal complications, e.g. vomiting or gastric ulcers, muscular wasting and weakness, and various degrees of central nervous system involvement [1, 2]. However, although lysosomal cystine accumulation is the hallmark of cystinosis and is regarded as the primary defect due to mutations in the *CTNS* gene, there is great evidence that cystine accumulation itself is not responsible for all abnormalities observed in cystinosis. Several studies have recently demonstrated altered ATP metabolism, increased apoptosis, and cell oxidation. For the most part, these abnormalities were observed using cell models and are not necessarily mutually exclusive [3]. Moreover, an increased number of autophagosomes and autophagic vacuoles have been observed in cystinotic fibroblasts and renal epithelial cells, suggesting that altered autophagy also plays a role in cystinosis [4]. These observations were associated with structural mitochondrial abnormalities and increased production of reactive oxygen species (ROS). Taken together, these findings suggest that cystinosis patients can be more susceptible to oxidative stress, which can contribute to the progression of renal disease in cystinosis patients even when they show a good response to treatment with cysteamine [5, 6].

Our aim was to evaluate a marker of oxidative stress in pediatric cystinosis and compare the results obtained in cystinotic children with those observed in healthy normal controls. We also correlated the oxidative stress marker with renal function parameters in these patients. Of note, this is the first documentation of increased oxidative stress in the serum of cystinotic patients.

Patients and Methods

Patients

The study cohort was selected from cystinosis patients aged <18 years. Inclusion criteria were parental consent for participation in the study and good adherence to the treatment, including their attendance at the follow-up examinations and clinical evaluations, and no renal replacement therapy. Only patients with chronic kidney disease (CKD) in stage 1–4 (based on KDOQI guidelines [7]) were included.

All patients selected had taken cysteamine at a recommended dosage of 60–90 mg/kg/day [5]. Sample collections to measure the parameters of the study were done at the time when patients were under metabolic and electrolyte control, and free of infections.

Methods

The following renal function parameters were evaluated: serum creatinine, BUN and creatinine clearance estimated by the Schwartz formula [8].

Serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), which are markers of lipid peroxidation, were determined using the TBARS assay. In brief, 0.2 ml of serum sample was diluted in 0.8 ml of distilled water. Immediately thereafter, 1 ml of 17.5% trichloro-

Table 1. Cystinosis patients (n = 20) according to CKD stage

CKD stage 1	9 patients
CKD stage 2	5 patients
CKD stage 3	5 patients
CKD stage 4	1 patient

Table 2. Parameters measured in the 20 cystinosis patients

Serum creatinine, $\mu\text{mol/l}$	
Median	59.5
Interquartile range	39.6–93.0
Geometric mean, log transformed	61.0
BUN, mmol/l	10.3 ± 5.7
eGFR (Schwartz formula), ml/min/1.73 m ²	84.0 ± 41.5
Serum TBARS, nmol/ml	4.03 ± 1.02

acetic acid was added. Following the addition of 1 ml of 0.6% thiobarbituric acid, pH 2, the sample was placed in a boiling water bath for 15 min, after which it was allowed to cool. Subsequently, 1 ml of 70% trichloroacetic acid was added, and the mixture was incubated for 20 min. The sample was then centrifuged for 15 min at 2,000 r.p.m. The optical density of the supernatant was read at 534 nm against a reagent blank using a spectrophotometer. The quantity of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Serum levels of TBARS (expressed as nmol/ml [9]) were compared between patients and healthy controls, and associations between this parameter and parameters of renal function were assessed.

Statistical Analysis

Homogenous data are expressed as means $\pm$ SD, and non-homogenous data are expressed as medians (interquartile ranges). The independent sample t test was employed to compare serum levels of TBARS between the patients and healthy control children, and Pearson's correlation coefficient was used to correlate serum TBARS with renal function parameters. This study was approved by the local ethics committee. Informed consent was obtained from the parents of all children for participation in this study.

Results

We selected 20 cystinosis patients (6 females) aged 8.0 ± 3.6 years (mean $\pm$ SD) in CKD stage 1–4 with good adherence to the treatment comprising cysteamine. The distribution of the patients according to CKD stage is shown in table 1. The dosage of cysteamine was $72.06 \pm 5.22 \text{ mg/kg/day}$ and was divided every 6 h.

Table 2 shows the results found in these cystinosis patients. In the 43 healthy controls aged 7.4 ± 1.1 years (mean $\pm$ SD), serum levels of TBARS were $1.60 \pm 0.04 \text{ nmol/ml}$ (mean $\pm$ SD); in cystinosis patients, serum TBARS levels were $4.03 \pm 1.02 \text{ nmol/ml}$ (mean $\pm$ SD). There was no statistical difference between patients and healthy controls regarding age, but

Fig. 1. Correlation between plasma TBARS and serum creatinine (**a**, **c**), BUN (**b**) and creatinine clearance estimated by stature [eGFR (Schwartz formula); **d**] in nephropathic cystinosis patients. **a** $r = -0.04$, $p = 0.86$. **b** $r = 0.02$, $p = 0.93$. **c** $r = -0.10$, $p = 0.65$. **d** $r = 0.17$, $p = 0.46$.

there was a significant difference between the plasma TBARS levels between both groups ($p < 0.0001$).

To determine the effect of renal function impairment on serum TBARS, we correlated this parameter with serum creatinine, BUN, creatinine clearance estimated by stature and CKD stage. No significant correlations between plasma TBARS and all these parameters were detected (fig. 1).

Discussion

Nephropathic cystinosis is a severe disease. Although cysteamine treatment improves its prognosis, renal failure is not completely abolished. Gahl et al. [6] emphasized that cysteamine is not 100% effective, even taking all appropriate steps, since some patients present extrarenal complications and renal failure at the age of 20 years. Likewise, Greco et al. [10] have also demonstrated that end-stage renal failure cannot be prevented in most patients but is only postponed to the 2nd or 3rd decade of life; late-onset complications ultimately develop in a substantial proportion of patients. Ergo, nephropathic cystinosis remains a challenge for the treating physician.

Recently, several studies have demonstrated altered ATP metabolism, and increased apoptosis and cell oxidation in cystinosis [3]. In addition, increased autophagy is involved leading to increased ROS production [4]. Most of the studies have been conducted in cell

models, but a study assessing oxidative stress in the serum of the patients has not been published to date. Therefore, our aim was to evaluate serum TBARS levels in pediatric cystinosis patients. Using this simple methodology, we observed that plasma TBARS, a biomarker of oxidative stress, was increased in patients with nephropathic cystinosis. The balance between oxidants and antioxidants is considerably distorted in patients with chronic renal insufficiency. Evidence suggests that ROS are not merely the consequence of treatment or progressing disease but also one of the causal agents of chronic renal impairment, and that oxidative stress can occur even in the absence of hemodialysis. Patients with uremia have diminished response to oxidative stress probably due to a decrease in the antioxidant capacity; the mechanisms underlying this decrease, however, remain to be elucidated [11]. However, in this study, we could not correlate TBARS levels with creatinine clearance, CKD stage, serum creatinine or BUN. Therefore, in cystinosis patients oxidative stress could be a result of the intrinsic mechanism of the disease [3]. Oxidative stress results in the formation of highly reactive and unstable lipid hydroperoxides, and decomposition of unstable peroxides derived from polyunsaturated fatty acids results in the formation of malondialdehyde, which is measured by the TBARS assay. However, a drawback of this assay is that there may be other sources of malondialdehyde. Thus, this test is not specific for lipid peroxidation.

The limitations of our study are the small number of patients and the fact that TBARS is not the best oxidative stress marker. Although this is only a pilot study, it is of paramount importance since it is the first report proving that oxidative stress is increased in the serum of patients with cystinosis independent of the state of renal function. Therefore, we intend to assess more specific markers in future studies.

This knowledge may have implications on the treatment of cystinosis patients, since oxidative stress is involved in the progression of renal disease, especially in these patients [11].

References

- 1 Gahl WA: Cystinosis coming of age. *Adv Paediatr* 1986;33:95–126.
- 2 Gahl WA, Thoene MD, Schneider JA: Cystinosis. *N Engl J Med* 2002;347:111–120.
- 3 Wilmer MJ, Emma F, Levtchenko EN: The pathogenesis of cystinosis: mechanisms beyond cystine accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299:F905–F916.
- 4 Sansanwal P, Yen B, Gahl WA, Ma Y, Ying L, Wong LJ, Sarwal MM: Mitochondrial autophagy promotes cellular injury in nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:272–283.
- 5 Vaisbich MH, Koch VH, Brazilian Cystinosis Study Group: Report of a Brazilian multicenter study on nephropathic cystinosis. *Nephron Clin Pract* 2010;114:c12–c18.
- 6 Gahl WA, Balog JZ, Kleta R: Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Ann Intern Med* 2007;147:242–250.
- 7 Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, Balk E, Lau J, Levin A, Kausz AT, Eknoyan G, Levey AS: National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics* 2003;111:1416–1421.
- 8 Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM Jr, Spitzer A: A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 1976;58:259–263.
- 9 Shimizu MHM, Coimbra TM, Araujo M, Menezes LF, Seguro AC: N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int* 2005;68:2208–2217.
- 10 Greco M, Brugnara M, Zaffanello M, Taranta A, Pastore A, Emma F: Long-term outcome of nephropathic cystinosis: a 20-year single-center experience. *Pediatr Nephrol* 2010;25:2459–2467.
- 11 Romeu M, Nogues R, Marcas L, Sánchez-Martos V, Mulero M, Martinez-Vea A, Mallol J, Giral M: Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. *BMC Res Notes* 2010;3:20.

N-acetyl-cysteine is associated to renal function improvement in patients with nephropathic cystinosis

**Luciana Pache de Faria Guimaraes,
Antonio Carlos Seguro, Maria Heloisa
Mazzola Shimizu, Letícia Aparecida
Lopes Neri, et al.**

Pediatric Nephrology
Journal of the International Pediatric
Nephrology Association

ISSN 0931-041X

Pediatr Nephrol
DOI 10.1007/s00467-013-2705-3

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by IPNA. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

***N*-acetyl-cysteine is associated to renal function improvement in patients with nephropathic cystinosis**

Luciana Pache de Faria Guimaraes · Antonio Carlos Seguro ·
Maria Heloisa Mazzola Shimizu · Letícia Aparecida Lopes Neri ·
Nairo Massakasu Sumita · Ana Carolina de Bragança · Rildo Aparecido Volpini ·
Talita Rojas Cunha Sanches · Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca ·
Carlos Alberto Moreira Filho · Maria Helena Vaisbich

Received: 23 January 2013 / Revised: 25 October 2013 / Accepted: 11 November 2013
© IPNA 2013

Abstract

Background Nephropathic cystinosis is an autosomal recessive systemic severe disease characterized by intralysosomal cystine storage. Cysteamine is an essential component of treatment. There is solid evidence that cystine accumulation itself is not responsible for all abnormalities in cystinosis; there is also a deficiency of glutathione in the cytosol. Patients with cystinosis can be more susceptible to oxidative stress. **Case-Diagnosis/Treatment** The patient cohort comprised 23 cystinosis patients (16 males) aged <18 years (mean age 8.0 ± 3.6 years) with chronic kidney disease class I–IV with good adherence to treatment, including cysteamine. Oxidative stress was evaluated based on the levels of serum thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and renal function

was evaluated based on serum creatinine and cystatin C levels and creatinine clearance (Schwartz formula). *N*-Acetylcysteine (NAC), an antioxidant drug was given to all patients for 3 months (T1) at 25 mg/kg/day divided in three doses per day. The measured values at just before the initiation of NAC treatment (T0) served as the control for each patient. **Results** Median serum TBARS levels at T0 and T1 were 6.92 (range 3.3–29.0) and 1.7 (0.6–7.2) nmol/mL, respectively ($p < 0.0001$). In terms of renal function at T0 and T1, serum creatinine levels (1.1 ± 0.5 vs. 0.9 ± 0.5 mg/dL, respectively; $p < 0.0001$), creatinine clearance (69.7 ± 32.2 vs. $T1 = 78.5 \pm 33.9$ mL/min/1.73 m², respectively; $p = 0.006$), and cystatin c level (1.33 ± 0.53 vs. 1.15 ± 0.54 mg/l, respectively; $p = 0.0057$) were all significantly different at these two time points. Serum creatinine measurements at 6 (T–6) and 3 months (T–3) before NAC initiation and at 3 (T +3) and 6 months (T +6) after NAC had been withdrawn were also evaluated. **Conclusion** During the 3-month period that our 23 cystinosis patients were treated with NAC, oxidative stress was reduced and renal function significantly improved. No side-effects were detected. Larger and controlled studies are needed to confirm these findings.

L. Pache de Faria Guimaraes · M. H. Vaisbich
Pediatric Nephrology Unit, Instituto da Criança, Hospital das
Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São
Paulo, Brazil

A. C. Seguro · M. H. M. Shimizu · A. C. de Bragança ·
R. Aparecido Volpini · T. R. Cunha Sanches
Medical Investigation Laboratory 12, Department of Nephrology,
Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São
Paulo, São Paulo, Brazil

L. A. Lopes Neri · N. M. Sumita
Central Laboratory, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

F. A. Macaferri da Fonseca · C. A. Moreira Filho
Medical Investigation Laboratory 36, Instituto da Criança, Hospital
das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo,
São Paulo, Brazil

M. H. Vaisbich (✉)
Rua Carlos Steinen 280/31, 04004-011 São Paulo, SP, Brazil
e-mail: vaisbich@terra.com.br

Keywords Nephropathic cystinosis · Oxidative stress ·
Glomerular filtration rate · *N*-Acetylcysteine · Cysteamine

Introduction

Nephropathic cystinosis is a severe autosomal recessive systemic disease that is characterized by intralysosomal cystine storage [1] due to a defect in cystinosin, a lysosomal cystine carrier, caused by a mutation in the *CTNS* gene [2]. Patients present with Fanconi syndrome by the age of 6 months, and

without specific treatment with cysteamine (a depleting-drug of cystine storage) [3], the glomerular filtration rate (GFR) progressively deteriorates towards end stage renal disease (ESRD) during approximately the first decade of life. Other organs, such as the eyes and thyroid, and, subsequently, the central nervous system, muscles, and pancreas are involved, among others [3].

Unfortunately, even when cysteamine treatment begins early, the patients usually develop ESRD by approximately their second or third decade of life, and they can also present extrarenal compromise [4–6]. Experimental evidence indicates that cystine accumulation itself is not responsible for all of the abnormalities in cystinosis, and several in vitro studies of cellular models have shown a link among a variety of factors, including cystine accumulation, altered adenosine triphosphate (ATP) metabolism, increased apoptosis, and cell oxidation [7, 8]. Wilmer et al. [9] demonstrated increased levels of oxidized glutathione (GSSG) in cystinotic proximal tubular epithelial cell lines; similarly, Levchenko et al. did not observe a decrease in the total intracellular reduced glutathione (GSH) content in cystinotic cells, although they did observe elevated GSSG levels in cystinotic cells, resulting in an increased GSSG/total GSH (%) ratio [10]. Conversely, Vitvitsky et al. did not observe an abnormal redox status in cystinotic cells [11]. Taken together, these findings may suggest that cystinosis patients can be more susceptible to oxidative stress, particularly under stressful conditions, and that this susceptibility can contribute to the progression of renal disease. In a previous study, we demonstrated increased levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), which are markers of lipid peroxidation (oxidative stress), in the sera of cystinosis patients [12]; this observation suggests that the increased oxidative stress plays a role in the pathogenesis of the disease. This hypothesis is corroborated by the fact that this disease is accompanied by a deficiency of glutathione, the major intracellular antioxidant, in the cytosol.

N-Acetylcysteine (NAC) is an antioxidant drug; its potential to decrease oxidative stress has been already demonstrated in several situations, such as with ifosfamide toxicity [13], cyclosporine toxicity [14], and cisplatin nephrotoxicity [15], as well as in oxidant-stress-mediated renal tubular injuries in patients at high risk of contrast nephropathy [16].

The aim of this study was to evaluate the effect of NAC on the renal functions of cystinosis patients treated with cysteamine and to detect the side-effects.

Patients and methods

Male and female cystinosis patients with chronic kidney disease classes I–IV [17] and younger than 18 years who showed good adherence to treatment, including cysteamine, were enrolled in the study. The diagnosis was based on clinical findings, Fanconi syndrome and results of the ophthalmologic exams. During the study, all patients were under metabolic and hydro electrolyte

control, i.e., they were clinically stable, and the results of laboratory tests fell within the normal range or close to it.

The renal function evaluation was based on measurements of serum cystatin C and creatinine levels, and the creatinine clearance was estimated using the Schwartz formula [18]. We chose the Schwartz formula because the 24-h urine collection is difficult to accomplish in polyuric patients. Cystatin C and serum creatinine were measured using the nephelometric method and a modified Jaffe's method, respectively.

Oxidative stress was evaluated using the TBARS assay [19]. Briefly, 0.2 ml of serum was diluted in 0.8 ml of distilled water, followed immediately by the addition of 1 ml of 17.5 % trichloroacetic acid. Thereafter, 1 ml of 0.6 % thiobarbituric acid, pH 2, was added to the sample which was then placed in a boiling water bath for 15 min, after which it was allowed to cool. Subsequently, 1 ml of 70 % trichloroacetic acid was added, and the mixture was incubated for 20 min, then centrifuged for 15 min at 2,000 rpm. The optical density of the supernatant was read on a spectrophotometer at 534 nm against a reagent blank. The quantity of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The normal range is $1.60 \pm 0.04 \text{ nmol/ml}$ [12].

The levels of the hepatic enzymes alanine transaminase and aspartate transaminase levels were determined to detect possible hepatotoxicity by NAC. We also asked each patient if they had complaints.

The intraleukocyte cystine content was measured by high-performance liquid chromatography at the UCSD Biochemical Genetics Laboratory, San Diego, California, USA, to verify whether the cysteamine dosage used was effective in reducing the intracellular cystine content and also to check treatment adherence.

NAC protocol

In this type of study, it is difficult to have a control group because cystinosis is a rare disease. Therefore, we considered each patient as his/her own control.

We employed a 25 mg/kg/day dosage of NAC, which was divided into three doses and administered to all patients; after 3 months of NAC treatment, we observed the results. This dosage was chosen based on a previous study of renal transplant adult patients who demonstrated the benefits of NAC in preserving renal function at a dosage of 600 mg twice daily without side-effects [20]; based on dosage for an adult patient weighing 50 kg, we considered that 25 mg/kg/day could be employed in children at a maximum dosage of approximately 1200 mg/day.

Time points of the study

The time points used in this study were T-6 and T-3, 6 and 3 months, respectively, before initiation of NAC treatment; T0, the time immediately prior to the initiation of NAC treatment;

T1, 3 months of NAC use; T +3 and T +6, 3 and 6 months, respectively after NAC treatment had been withdrawn.

Variables

The following variables were measured at T0 and T1: serum creatinine, creatinine clearance using the Schwartz formula, serum cystatin C, serum TBARS levels, and hepatic enzymes. To compare the results, we also evaluated the serum creatinine and creatinine clearance data at T −3 and T −6 and at T +3 and T +6. We did not measure the cystatin C levels after NAC treatment was withdrawn.

Statistical analysis

Homogenous data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation, and non-homogenous data are expressed as the median and range. A paired *t* test was employed to compare the variables with a normal distribution, and the Wilcoxon test was used to compare the variables without normal distribution. To evaluate all times of serum creatinine collection before, during, and after the NAC had been withdrawn, we used an analysis of variance. $p < 0.05$ indicated a statistically significant difference.

The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from the parents of all patients before they were included in the study. The study is registered in clinicaltrials.gov under the identification number NCT01614431.

Results

The patient cohort comprised 23 patients (16 males) aged 8.0 ± 3.6 years. Table 1 shows the characteristics (e.g., the patient gender, age at the diagnosis, age at the cysteamine initiation, and age at beginning the protocol) of the study participants. All patients were under metabolic and electrolyte control, and cysteamine (Cystagon®) was administered at a mean dosage of 72.06 ± 5.22 mg/kg/day, in three doses delivered every 6 hours. During the 3 months of the study, the cysteamine

dosage remained the same. We measured the intraleukocyte cystine levels just once, at 1.5 months after initiating NAC treatment. The median intraleukocyte cystine levels during the NAC treatment were 1.2 (range 0.8–2.8) nmol $\frac{1}{2}$ cystine/mg protein.

Serum TBARS and renal function measurements

The median measured serum TBARS levels at T0 and T1 were 6.92 (3.3–29.0) and 1.7 (0.6–7.2) nmol/ml, respectively. These measurements were significantly different ($p < 0.0001$), as shown in Fig. 1. In terms of renal function, serum creatinine levels at T0 and T1 were significantly different (1.1 ± 0.5 vs. 0.9 ± 0.5 mg/dl, respectively; $p < 0.0001$) (Fig. 2), and creatinine clearance values estimated by the Schwartz formula at T0 and T1 were significantly different (69.7 ± 32.2 ; vs. 78.5 ± 33.9 ml/min/1.73 m², respectively; $p = 0.006$) (Fig. 3). The cystatin C analysis also showed a significant difference between cystatin C levels at T0 and T1 (1.33 ± 0.53 vs. 1.15 ± 0.54 mg/l, respectively; $p = 0.0057$) (Fig. 4).

To better compare the renal function prior to NAC administration and after NAC withdrawal, Figs. 2 and 3 include measurement data obtained at 3 and 6 months prior to initiating NAC treatment (T −3 and T −6, respectively) and at 3 (T +3) and 6 months (T +6) after NAC treatment had been withdrawn. The serum creatinine level (in mg/dl) was 0.88 ± 0.50 at T −6, 0.93 ± 0.55 at T −3, 1.10 ± 0.50 at T0, 0.90 ± 0.50 at T1, 1.17 ± 0.50 at T +3, and 1.34 ± 0.50 at T +6 (Fig. 2). Creatinine clearance (in mL/min/1.73 m²BS) was 82.3 ± 40.6 at T −6, 80.6 ± 38.9 at T −3, 69.7 ± 32.2 at T0, 78.5 ± 33.9 at T1, 59.1 ± 18.8 at T +3, and 52.1 ± 16.3 at T +6.

Hepatic enzymes

The levels of hepatic enzymes were normal before the NAC treatment and remained normal.

No side-effects were observed.

Table 1 Patient's clinical data

Variables ^a	Results
Total number of patients	23
Gender, male/female (<i>n</i>)	16/7
Age at cystinosis diagnosis (months)	19 (5–109)
Age at initiation of cysteamine treatment (months)	20 (7.3–111)
Age at initiation of <i>N</i> -acetylcysteine (NAC) treatment (months)	94 ± 38

^a Data are presented as the median with the range in parenthesis or as the mean $\pm$ standard deviation, unless indicated otherwise

Fig. 1 Levels of serum thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in 23 cystinosis patients at just before the initiation of cysteamine treatment (T0) and after 3 months of *N*-acetylcysteine (NAC) treatment (T1)

Fig. 2 Serum creatinine levels in 23 cystinosis patients at 6 (T_0) and 3 months (T_1) prior to initiating *N*-acetylcysteine (NAC) treatment, at the time of initiating NAC treatment (T_2), at 3 months of NAC treatment (T_3), and at 3 (T_4) and 6 months (T_5) after withdrawal of NAC treatment. Analysis of variance $p < 0.0001$. Bars represent 95 % CI

Discussion

Nephropathic cystinosis is a severe disease. Although cysteamine treatment improves its prognosis, it does not completely abolish renal failure. Gahl et al. [5] emphasized that “cysteamine is not 100 % effective” even after taking all of the appropriate steps because some patients present extrarenal complications and renal failure at the age of 20 years. Likewise, Greco et al. [6] also demonstrated that ESRD cannot be prevented in most patients but that it is only postponed to the second or third decade of life; late-onset complications ultimately develop in a substantial proportion of patients. In addition, cysteamine compliance is challenging because of inconvenient dosing requirements and barely tolerable side-

effects [4]. Ergo, nephropathic cystinosis is still challenging for treating physicians.

New treatments have been explored for cystinosis [21, 22], but currently the most important objective is to preserve renal function and avoid extrarenal compromise. In this sense, knowledge about the disease pathogenesis can help to improve interventions. Several recent studies have demonstrated altered ATP metabolism and increased apoptosis and cell oxidation in cystinosis [7]. Increased autophagy is involved and leads to increased reactive oxygen species (ROS) production [8].

In a previous study by our group, we compared serum TBARS levels in healthy children who had been matched with cystinosis patients and detected a significant difference, with increased levels of serum TBARS in the cystinosis

Fig. 3 Creatinine clearance in 23 cystinosis patients by determined by the Schwartz formula at 6 ($T-6$) and 3 months ($T-3$) prior to initiating *N*-acetylcysteine (NAC) treatment, at the time of initiating NAC treatment (T_0), at 3 months of NAC treatment (T_1), and at 3 ($T+3$) and 6 months ($T+6$) after NAC treatment had been withdrawn. Bars represent 95 % CI

Fig. 4 Serum cystatin C levels in 23 cystinosis patients at 6 (T_0) and 3 months (T_1) prior to initiating *N*-acetylcysteine (NAC) treatment, at the time of initiating *N*-acetylcysteine (NAC) treatment (T_2), and at 3 months of treatment with NAC (T_3). Bars represent 95 % CI

patients. This abnormality was not correlated with the degree of renal insufficiency. [12].

Interestingly, it has been recently shown that cysteamine, aside from its cystine-depleting benefits, can increase intracellular GSH levels and restore cellular redox status, a mechanism which has been previously hypothesized to be responsible for the preservation of the kidney function of cystinosis patients treated with this drug [23]. This mechanism further points to the possibility of using GSH precursors to preserve renal function in cystinosis patients. However, the mechanisms by which GSH restoration in cystinotic cells promotes the preservation of kidney function must still be determined.

Cysteamine is a potent antioxidant, and we hypothesized that by the addition of another anti-oxidant drug to the treatment regimen, such as NAC, might potentially decrease oxidative stress and preserve renal function. NAC is generally employed as a mucolytic agent. It has a thiol group that is a source of *L*-cysteine and reduced glutathione and serves as an antioxidant by virtue of its interaction with ROS [13]. There are several reports of the benefits of NAC in decreasing oxidative stress in different situations; most of these studies evaluated serum levels of TBARS [13–16, 20, 24, 25].

Therefore, we decided to add NAC (at a dosage of 25 mg/kg/day) to the treatment regimen of cystinosis patients already receiving cysteamine. We observed that the level of serum TBARS fell and that renal function markers, serum cystatin C and creatinine levels, and creatinine clearance all improved. We also observed that 3 and 6 months after NAC had been withdrawn, there was a decline in the renal function status, as measured by serum creatinine and creatinine clearance. We believe this result was due to disease evolution.

Cystatin C was not measured after NAC was withdrawn. However, in a previous study by our group, we analyzed 103 blood samples from 26 patients and found a significant statistical correlation between serum creatinine and cystatin C levels ($r=0.81$, $p<0.0001$), between cystatin C level and creatinine clearance, as estimated by the Schwartz formula ($r=-0.84$, $p<0.0001$), and between serum creatinine level and creatinine clearance ($r=-0.97$, $p<0.0001$). We concluded that the expensive measurement of cystatin C had no advantages over the use of the other GFR markers [26].

The serum level of TBARS has been considered to be a good marker of oxidative stress in previous studies [16, 20, 24]. Therefore, in this study, we considered this method to be reliable for evaluating oxidative stress. Although, theoretically, this assay mainly measures malondialdehyde, it also measures other aldehydes that can react with TBA. It is important to keep this fact in mind when our results are being interpreted.

In conclusion, over a 3-month period, we used cysteamine and NAC in cystinosis patients without renal replacement therapy and observed reduced oxidative stress and significantly improved renal function. In addition, no side-effects were observed. Our results, although derived from a small,

uncontrolled study, might indicate that the addition of NAC to conventional treatment with cysteamine may have some transient beneficial effect on the renal function of cystinosis patients. The absence of long-term follow-up data on the efficiency and toxicity of NAC precludes its routine use in cystinosis patients and warrants further study.

Acknowledgements This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) process number 2010/10622-0.

References

1. Gahl WA, Tietze F, Bashan W (1982) Defective cystic exodus from isolated lysosome-rich fractions of cystinotic leukocytes. *J Biol Chem* 257(16):9570–9575
2. Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18(4):319–324
3. Vaisbich MH, Koch VH, The Brazilian Cystinosis Study Group (2010) Report of a Brazilian multicenter study on nephropathic cystinosis. *Nephron Clin Pract* 114:c12–c18
4. Brodin-Sartorius A, Tête MJ, Niaudet P, Antignac C, Guest G, Ottolenghi C, Charbit M, Moyse D, Legendre C, Lesavre P, Cochat P, Servais A (2012) Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults. *Kidney Int* 81: 179–189
5. Gahl WA, Balog JZ, Kleta R (2007) Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Ann Int Med* 147:242–250
6. Greco M, Brugnara M, Zaffanello M, Taranta A, Pastore A, Emma F (2010) Long-term outcome of nephropathic cystinosis: a 20-year single-center experience. *Pediatr Nephrol* 25:2459–2467
7. Wilmer MJ, de Graaf-Hess A, Blom HJ, Dijkman HB, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levchenko EN (2005) Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 337:610–614
8. Sansanwal P, Yen B, Gahl WA, Ma Y, Ying L, Wong LJ, Sarwal MM (2010) Mitochondrial autophagy promotes cellular injury in nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 21:272–283
9. Wilmer MJ, Emma F, Levchenko EN (2010) The pathogenesis of cystinosis: mechanisms beyond cystine accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F905–F916
10. Levchenko E, de Graaf-Hess A, Wilmer M, van den Heuvel L, Monnens L, Blom H (2005) Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrol Dial Transplant* 20:1828–1832
11. Vitvitsky V, Witcher M, Banerjee R, Thoene J (2010) The redox status of cystinotic fibroblasts. *Mol Genet Metabol* 99:384–388
12. Vaisbich MH, Guimaraes LPF, Shimizu MHM, Seguro AC (2011) Oxidative stress in cystinosis patients. *Nephron Extra* 1:73–77
13. Hanly LN, Chen N, Aleksa K, Cutler M, Bajcetic M, Palassery R, Regueira O, Turner C, Baw B, Malkin B, Freeman D, Rieder MJ, Vasylyeva TL, Koren G (2012) *N*-acetylcysteine as a novel prophylactic treatment for ifosfamide-induced nephrotoxicity in children: translational pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol* 52(1):55–64
14. Duru M, Nacar A, Yönden Z, Kuvandik G, Helvacı MR, Koç A, Akaydin Y, Oksüz H, Söğüt S (2008) Protective effects of *N*-acetylcysteine on cyclosporine-A-induced nephrotoxicity. *Ren Fail* 30:453–459

15. Luo J, Tsuji T, Yasuda H, Sun Y, Fujigaki Y, Hishida A (2008) The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by *N*-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant* 23: 2198–2205
16. Drager LF, Andrade L, Toledo JFB, Laurindo FRM, Cesar LAM, Seguro AC (2004) Renal effects of *N*-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol Dial Transplant* 19:1803–1807
17. Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, Balk E, Lau J, Levin A, Kausz AT, Eknoyan G, Levey AS (2003) National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics* 111:1416–1421
18. Schwartz GJ, Work DF (2009) Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:1832–1843
19. Shimizu MHM, Coimbra TM, Araujo M, Menezes LF, Seguro AC (2005) *N*-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int* 68:2208–2217
20. Danilovic A, Lucon AM, Srougi M, Shimizu MH, Ianhez LE, Nahas WC, Seguro AC (2011) Protective effect of *N*-acetylcysteine on early outcomes of deceased renal transplantation. *Transplant Proc* 43(5): 1443–1449
21. Dohil R, Fidler M, Gangoiti JA, Kaskel F, Schneider JA, Barshop BA (2010) Twice-daily cysteamine bitartrate therapy for children with cystinosis. *J Pediatr* 156(1):71–75, e3
22. Yeagy BA, Harrison F, Gubler MC, Koziol JA, Salomon DR, Cherqui S (2011) Kidney preservation by bone marrow cell transplantation in hereditary nephropathy. *Kidney Int* 79(11): 1198–1206
23. Wilmer MJ, Kluijtmans LA, van der Velden TJ, Willems PH, Scheffer PG, Masereeuw R, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levchenko EN (2011) Cysteamine restores glutathione redox status in cultured cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1812:643–651
24. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM (1989) The antioxidant action of *N*-acetylcysteine: its action with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6:593
25. Ruiz Fuentes MC, Moreno Ayuso JM, Ruiz Fuentes N, Vargas Palomares JF, Asensio Peinado C, Osuna Ortega A (2008) Treatment with *N*-acetylcysteine in stable renal transplantation. *Transplant Proc* 40:2897–2899
26. Guimarães LPF, Neri LAL, Sumita NM, Vaisbich MH (2011) Practical markers of renal function among patients with cystinosis. *J Bras Nefrol* 33(3):1–4