ALEXANDRE DANILOVIC

**Efeito protetor da N-acetilcisteína na evolução
precoce de receptores de transplante renal com
doador falecido**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Marmo Lucon

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Danilovic, Alexandre

Efeito protetor da N-acetilcisteína na evolução precoce de receptores de transplante renal com doador falecido / Alexandre Danilovic. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Antônio Marmo Lucon.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Estresse oxidativo 3.Acetilcisteína
4.Rejeição de enxerto

USP/FM/SBD-479/09

A minha esposa Debora, pelo amor e
apoio constante;

A minha filha Ana Carolina, pela
alegria e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ana e Nicolau, que me criaram com amor e dedicação, iluminando meu caminho, e que me ensinaram o valor do questionamento e do conhecimento.

A Debora, minha esposa, com quem compartilho minha vida, eu agradeço pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência durante a confecção desta tese.

Agradeço a Ana Carolina, minha filha, pelo brilho que trouxe a minha vida.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Seguro, sou grato pelo exemplo de médico e pesquisador e por co-orientar essa pesquisa.

Agradeço o Prof. Dr. Antônio Marmo Lucon por me acompanhar desde meus primeiros passos na urologia e pela orientação nessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, sou grato pela oportunidade de me desenvolver na urologia e pelo estímulo à pesquisa e à busca do conhecimento.

Devo gratidão ao Prof. Dr. Francisco Rafael Laurindo e ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Alves Ferreira por me iniciarem na pesquisa científica.

A Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu, agradeço por me introduzir nas técnicas de laboratório.

Agradeço ao Dr. Ioannis Antonopoulos e ao Dr. Davi Machado pelas sugestões durante a qualificação desta tese.

Sou grato ao Prof. Dr. Luiz Estevan Ianhez e aos clínicos da UTR pelo apoio durante esse estudo e pelo brilhantismo com que cuidam dos pacientes.

Ao Prof. Dr. William Carlos Nahas e cirurgiões da UTR, sou grato pelo apoio durante esse estudo e por me ensinarem o que sei sobre transplante renal.

Ao Prof. Dr. Eduardo Mazzucchi, agradeço a amizade e sugestões na redação desta tese.

As enfermeiras Eliza Midori Vagyu, Lucia Maria Tributino, Maria Vicencia da Conceição, Solange Tempori, Maria Dantas e Lígia Vitória e corpo de enfermagem da UTR, sou grato pela dedicação constante aos pacientes e pelo carinho com que me tratam.

A enfermeira Fabiana Avena, as farmacêuticas Luciana Mariotti Fadel e Melissa Yatie Sato e ao secretário Rafael Santos Nascimento, que trabalham na pesquisa clínica da urologia, sou grato pelo apoio logístico.

Agradeço aos residentes da urologia e da nefrologia pela dedicação aos pacientes transplantados.

Agradeço a FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido a este estudo.

Agradeço aos pacientes, razão maior desta pesquisa clínica.

**Esta tese foi financiada pela
FAPESP, processo 06/52046-0**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3. OBJETIVO.....	13
4. CASUÍSTICA E MÉTODO	15
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS.....	49

Apêndice

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IgA	Imunoglobulina A
NAC	N-acetilcisteína
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TBARS	<i>Tiobarbituric Acid Reactive Substances</i>

RESUMO

Danilovic, A. *Efeito protetor da N-acetilcisteína na evolução precoce de receptores de transplante renal com doador falecido* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

INTRODUÇÃO

As taxas de sobrevida do enxerto em transplante renal de doador falecido são menores que aquelas de doadores vivos. Acredita-se que metabólitos de estresse oxidativo sejam importantes mediadores de varias formas de lesão renal aguda, como insuficiência renal isquêmica, nefrotoxicidade por contraste e obstrução ureteral. O objetivo deste estudo é investigar os efeitos terapêuticos do antioxidante N-acetilcisteína na evolução precoce de receptores de transplante renal de doador falecido quanto à função do enxerto e ao estresse oxidativo.

MÉTODO

Entre abril de 2005 e junho de 2008, 74 receptores adultos de primeiro transplante renal de doador falecido foram distribuídos aleatoriamente em grupo tratado com N-acetilcisteína (n=38) ou controle (n=36) e avaliados prospectivamente por 90 dias. O grupo tratado com N-acetilcisteína (NAC) recebeu 600 mg por via oral, em duas tomadas diárias, por 7 dias, iniciado no dia do transplante. A rejeição aguda comprovada por biópsia foi avaliada em até 30 dias de pós-operatório (PO). A função renal foi determinada por dosagem de creatinina sérica, cálculo do clearance de creatinina pela fórmula de Cockcroft-Gault no 7º, 15º, 30º, 60º e 90º PO e comparação de número de dias em diálise ao longo do tempo após o transplante através de estimativa de Kaplan-Meier. A dosagem de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são marcadores de peroxidação lipídica e estresse oxidativo, foi determinada do 0-7º PO. A análise estatística foi realizada com auxílio do SPSS 16.0 e Qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste t de Student, teste Mann-Whitney, ANOVA e teste log rank foram aplicados conforme indicado.

RESULTADOS

A rejeição aguda comprovada por biópsia foi menos freqüente, embora não significativa ($p=0,203$), entre os pacientes tratados com NAC (3/38 7,9% vs. 7/36 19,4%). O grupo tratado com NAC apresentou uma menor creatinina média durante o seguimento ($p=0,026$). A depuração de creatinina calculada foi maior para o grupo NAC ($p=0,029$). O número de dias em diálise de receptores ao longo do tempo após o transplante foi menor no grupo tratado com NAC ($p=0,008$). O estresse oxidativo foi significativamente reduzido ($p<0,001$) com NAC até o 7º PO.

CONCLUSÃO

A N-acetilcisteína melhorou a evolução precoce dos pacientes submetidos a transplante renal de doador falecido pela recuperação mais rápida e mantida da função renal, através da atenuação do estresse oxidativo.

Descritores: 1. Transplante de rim 2. Estresse oxidativo 3. Acetilcisteína 4. Rejeição de enxerto

SUMMARY

Danilovic, A. *Protective effect of N-acetylcysteine on early outcomes of deceased renal transplant* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

INTRODUCTION

Deceased renal transplant graft survival rates are worse than those from living donors. Reactive oxygen metabolites are believed to be important mediators of various forms of acute kidney injury, such as ischaemic renal failure, radiocontrast nephrotoxicity and ureteral obstruction. The aim of this study is to investigate the therapeutic effects of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) on early outcomes of deceased renal transplant patients regarding graft function and oxidative stress.

METHOD

Between April 2005 and June 2008, 74 adult primary graft recipients of deceased renal donors were randomly assigned to treatment (NAC) (n=38) or control (n=36) group and prospectively evaluated for 90 days. Treatment group received N-acetylcysteine 600 mg bid po from 0 to 7th postoperative day (PO). Renal function was determined by serum creatinine, Cockcroft-Gault estimated GFR (eGFR) at 7th, 15th, 30th, 60th and 90th PO and dialysis free Kaplan-Meier estimate curve. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which are markers of lipid peroxidation and oxidative stress, were determined using the thiobarbituric acid assay from 0-7th PO. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 and Chi-square test, Fisher's exact test, Student t test, Mann-Whitney test, ANOVA and log rank test were applied as indicated.

RESULTS

Biopsy confirmed acute rejection was less frequent, albeit not significant, with NAC (3/38 7.9% vs. 7/36 19.4%, p=0.203). NAC group presented a lower mean serum creatinine during follow-up (p=0.026). NAC group presented a higher mean eGFR (p=0.029). Kaplan-Meier estimate for dialysis free recipients presented less days of dialysis for the NAC group (p=0.008). Oxidative stress was significantly attenuated with NAC (p<0.001).

CONCLUSION

Our results suggest that N-acetylcysteine enhance deceased renal transplant outcomes by attenuating oxidative stress.

Descriptors: 1. Kidney transplantation 2. Oxidative stress 3. Acetylcysteine 4. Graft rejection

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal com doador falecido representa 46% dos transplantes renais realizados em São Paulo¹. A sobrevida do enxerto nesses casos é menor quando comparada ao doador vivo, mesmo quando o doador não é relacionado^{2, 3}.

Fatores próprios do receptor influenciam a sobrevida do enxerto. A sensibilização do receptor com determinados antígenos⁴⁻⁶ e a presença de anticorpos pré-formados HLA doador-específico⁷ são fatores conhecidos que determinam um efeito adverso na evolução do enxerto. Como esses fatores são comuns entre receptores de rins de doadores vivos e de falecidos, a diferença de sobrevida é determinada, em parte, pelos efeitos lesivos da isquemia fria sobre o enxerto de doadores falecidos⁸⁻¹⁰.

O paciente com insuficiência renal crônica já apresenta condição clínica grave com estado micro-inflamatório em que há aumento de estresse oxidativo¹¹, a qual se soma o estresse oxidativo gerado no processo de isquemia e reperfusão do transplante¹². Por representar um novo alvo para intervenção terapêutica, o estudo do estresse oxidativo tem despertado grande interesse.

Embora o uso de antioxidantes tenha se mostrado eficiente na prevenção de insuficiência renal aguda induzida por contraste iodado¹³⁻¹⁹ e estudos experimentais tenham mostrado atenuação de lesão de isquemia e reperfusão através da administração de N-acetilcisteína²⁰, atualmente é pouco conhecida a influência da administração de antioxidantes em humanos submetidos a transplante renal^{21, 22}.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da N-acetilcisteína, que é uma das substâncias antioxidantes, na evolução precoce de receptores de transplante renal com doador falecido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

A evolução do paciente acometido por uma doença grave depende de uma resposta imunológica complexa e organizada. De uma forma geral, uma resposta imunológica disfuncional se apresenta de duas maneiras diferentes: (a) ativação excessiva de resposta celular imune, manifestada clinicamente como síndrome de resposta inflamatória sistêmica, e (b) falha na ativação da resposta imunológica, causando o aumento na susceptibilidade a infecção²³.

O excesso de produção de radicais livres contribui para uma resposta inflamatória exacerbada e lesão tecidual²³. A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte de radicais livres do organismo, que ocorre via redução univalente de oxigênio molecular pelo sistema da nicotinamida adenina dinucleotídeo-P oxidase (NADPH) ao ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), fórmula (a), que é instável e é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), fórmula (b). Ambos, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio são precursores de oxidantes mais poderosos. O ânion superóxido reage com óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($NO_3^{\cdot-}$), fórmula (c), enquanto peróxido de hidrogênio produz radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), fórmula (d) e fórmula (e)²⁴, que é responsável pela degradação da membrana celular lipídica e lesão ao DNA²⁵ (Figura 1).

Figura 1 – Geração de radicais livres.

As células têm diversos mecanismos de defesa antioxidante, que incluem vitaminas C e E, e enzimas como a superóxido dismutase, que através da dismutação de superóxido produz peróxido de hidrogênio, fórmula (f), a catalase, que catalisa o peróxido de hidrogênio em água fórmula (g) e a glutathione peroxidase, que através da conversão de glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG) transforma peróxido de hidrogênio em água, fórmula (h) (Figura 2)^{26, 27}.

Figura 2 – Mecanismos de defesa antioxidante.

Os radicais livres servem como sinalizadores de uma variedade de vias de expressão genética^{28, 29}, porém, em excesso, podem modificar ou lesar macromoléculas nas células, incluindo a oxidação e peroxidação do DNA³⁰. O estresse oxidativo é gerado quando há um desequilíbrio entre os

mecanismos oxidantes e antioxidantes. O estresse oxidativo produzido durante uma doença grave pode estar relacionado à ativação de fagócitos (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos), produção de óxido nítrico e produção de metaloproteínas³¹.

Diversos métodos foram desenvolvidos para monitorizar o estresse oxidativo³² e por serem compostos instáveis com meia-vida de segundos³³, os métodos indiretos, que medem produtos estáveis do metabolismo do oxigênio, são os mais utilizados. Eles incluem os produtos da lipoperoxidação como substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico, isoprostanos e LDL oxidado e a medida do dano ao DNA, que é feita com cromatografia líquida de alta performance³⁴.

A principal dificuldade na escolha do marcador de estresse oxidativo deriva da complexidade dos métodos. Em pacientes com insuficiência renal crônica, alguns marcadores de estresse oxidativo podem ser positivos *in vitro*, mas não *in vivo*, como é o caso do LDL oxidado³⁵. A dosagem de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico tem sido menos complexa para a medida do estresse oxidativo nos laboratórios clínicos. Durante a peroxidação lipídica, hidroxiperoxídeos instáveis são transformados em produtos mais estáveis como as substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico³³. Níveis elevados de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico são indicativos de estresse oxidativo em pacientes urêmicos³⁶. F2-isoprostano é um produto da oxidação de ácido aracdônico e serve como marcador estável de ataque de radicais livres à membrana fosfolipídica *in vivo*³⁷. Entretanto, poucos laboratórios possuem os caros aparelhos para dosar o F₂-isoprostano³⁸. Alfa glutathione S-transferase é um marcador

específico de lesão do túbulo proximal³⁹.

A terapia antioxidante pode ser feita pela reposição de antioxidantes endógenos, como superóxido dismutase recombinante³², pela suplementação exógena com agentes com propriedades antioxidantes, como N-acetilcisteína⁴⁰, ou pela administração de drogas que reduzem a produção oxidante, como alopurinol²¹.

Evidências experimentais sugerem a ocorrência de estresse oxidativo após injeção intrarrenal de contraste iodado e sua redução com alopurinol ou superóxido dismutase, através da diminuição da concentração de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e melhora do ritmo de filtração glomerular⁴¹. O antioxidante alopurinol foi investigado em transplante com doador falecido. A adição de alopurinol ao esquema de manutenção de imunossupressão reduziu os episódios de rejeição aguda²¹.

A perda da capacidade antioxidante em uma célula oxidada é devida principalmente a um decréscimo de glutathione, pois é o tiol livre intracelular mais abundante. O estresse oxidativo *in vivo* é traduzido como deficiência de glutathione ou de seu precursor, cisteína. O antioxidante mais eficaz que vem sendo estudado é a N-acetilcisteína, que é um precursor de glutathione⁴². Quimicamente, a N-acetilcisteína é similar a cisteína. A presença do meio acetil reduz a reatividade desse tiol comparado a cisteína. A N-acetilcisteína é menos tóxica, menos suscetível a oxidação e dimerização e é mais solúvel em água, fazendo dele uma fonte melhor de cisteína que a própria administração parenteral de cisteína⁴³.

A N-acetilcisteína é um tiol, um agente mucolítico e precursor de L-cisteína e glutathione reduzida. N-acetilcisteína é uma fonte de grupos sulfidril nas células e combate os radicais livres através de sua interação com radical hidroxila e peróxido de hidrogênio⁴⁴. As propriedades farmacológicas antioxidantes da N-acetilcisteína são a restauração dos estoques reduzidos de glutathione, a vasodilatação pela reposição de óxido nítrico através do aumento de sulfidrilas e a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 8 e fator de necrose tumoral⁴⁰.

Pacientes urêmicos possuem altos níveis de marcadores de estresse oxidativo^{36, 45, 46}. Estudos experimentais e clínicos demonstraram que a aterosclerose é associada à lesão glomerular e intersticial, levando a perda de função renal^{47, 48, 49}. Um dos estágios mais precoces do desenvolvimento da aterosclerose é a perda da capacidade de relaxamento vascular endotelial e o aumento da adesão endotelial devido à expressão de moléculas de adesão como molécula de adesão vascular celular 1 (VCAM-1), molécula de adesão inter-celular 1 (ICAM-1) e E-selectina, que servem como receptores dos leucócitos que circulam nas artérias⁵⁰. A relação entre os níveis de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico como indicador de estresse oxidativo e o desenvolvimento de aterosclerose foi demonstrado em pacientes com insuficiência renal crônica⁵¹.

A propriedade de relaxamento vascular de um vaso é determinada por um equilíbrio entre a geração de superóxido e óxido nítrico no endotélio. Uma vez que o superóxido pode reagir com o vasodilatador óxido nítrico para produzir peroxinitrito, um potente oxidante, a produção exagerada de superóxido pode inibir a propriedade de relaxamento vascular endotelial pela

diminuição do óxido nítrico disponível. A N-acetilcisteína pode promover as propriedades de relaxamento vascular endotelial pela supressão dos níveis de radicais livres, incluindo superóxido, e dessa forma aumentando a disponibilidade de óxido nítrico⁵⁰.

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) estimulam a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina nas células endoteliais. A N-acetilcisteína reduz a expressão de VCAM-1 em 90 % através da inibição da ligação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) no receptor κ B de VCAM-1⁵⁰. A N-acetilcisteína também inibe a expressão de VCAM-1 e E-selectina estimulada pela IL-1 através de mecanismos ainda não elucidados⁵². A N-acetilcisteína, através do aumento dos níveis de glutathione, promove a indução da transcrição do gene óxido nítrico sintase induzido (iNOS) e a expressão do RNA mensageiro (mRNA)⁴². O peroxinitrito gerado pela interação entre óxido nítrico e ânion superóxido leva a produção de radicais hidroxila, indução de heme-oxigenase e apoptose de células endoteliais. A N-acetilcisteína abole completamente a atividade e o aumento de heme-oxigenase⁵³. Esses estudos sugerem que a N-acetilcisteína pode melhorar a função endotelial e pode atenuar o processo inflamatório vascular através do antagonismo dos efeitos intracelulares da geração de radicais livres, pelo aumento do óxido nítrico biodisponível e pela redução da adesão leucocitária ao endotélio⁴².

A N-acetilcisteína confere uma proteção a ratos submetidos à lesão por isquemia e reperfusão em parte pela inibição de moléculas de adesão, como VCAM-1 e ICAM-1⁵⁴. Ratos submetidos à isquemia renal foram completamente protegidos de insuficiência renal aguda através de

administração de N-acetilcisteína associada à suplementação de magnésio¹⁷. Estudos experimentais mostraram que N-acetilcisteína melhora a função renal e reduz a inflamação intersticial em ratos submetidos à lesão por isquemia e reperfusão. Esses efeitos são associados ao aumento de glutathiona renal, sugerindo que N-acetilcisteína atenua o estresse oxidativo renal e sistêmico neste modelo⁵⁵. Em modelo experimental de insuficiência renal crônica, a N-acetilcisteína também mostrou um papel protetor atribuído à diminuição de peroxidação lipídica levando a melhora da função renal⁵⁶. Recentemente, através de estudos experimentais em ratos, demonstrou-se que a administração de N-acetilcisteína também promove uma significativa proteção contra o declínio do ritmo de filtração glomerular e da redução do fluxo sanguíneo renal após desobstrução ureteral bilateral, através da supressão de expressão de aquaporinas tipo 2 e óxido nítrico sintase tecidual¹³.

O uso de N-acetilcisteína associado à hidratação reduz em 56% o risco relativo de nefropatia por contraste iodado em pacientes com insuficiência renal crônica através de supressão do estresse oxidativo mediado por lesão do túbulo proximal^{57,58,18}. N-acetilcisteína protege de modo dose dependente⁵⁹ pacientes com insuficiência renal crônica não dialítica (depuração de creatinina < 60 ml/min/1,73 m²) contra piora de função renal induzida por contraste após procedimento de angiografia coronária⁵⁷. A administração de 600 mg de N-acetilcisteína por via oral a cada 12h por 14,5 meses reduziu a ocorrência de infarto do miocárdio, a necessidade de angioplastia e de revascularização miocárdica, acidente

vascular cerebral e necessidade de amputação de membros de pacientes em hemodiálise⁴⁵. Estudos clínicos demonstram a atenuação do estresse oxidativo medido por substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e homocisteína em pacientes com insuficiência renal dialítica, submetidos à administração de N-acetilcisteína⁴⁶.

Há poucos estudos em humanos sobre os efeitos do antioxidante N-acetilcisteína em transplantes. A administração intra-operatória de N-acetilcisteína em receptores de transplante de fígado causou a elevação de interleucinas 4 e 10, que têm papel protetor contra lesão de reperfusão⁶⁰. Mais recentemente, Ruiz Fuentes e colaboradores relataram que a N-acetilcisteína pode melhorar a depuração de creatinina em receptores de transplante renal sem diabetes, mesmo em uma fase estável do transplante⁶¹.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi verificar se a administração de 600 mg de N-acetilcisteína por via oral duas vezes ao dia em receptores de transplante renal com doador falecido altera:

3.1. O estresse oxidativo em até 7 dias após o transplante;

3.2. A função renal pós-operatória em até 90 dias após o transplante;

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pela 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 sob o nº 076/05 e está registrado sob número NCT00994305 no endereço eletrônico www.clinicaltrials.gov.

Cento e cinquenta e nove pacientes, com idade acima de 18 anos, receptores de primeiro transplante renal de doador falecido foram operados na Unidade de Transplante Renal da Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, entre abril de 2005 e junho de 2008. Setenta e cinco pacientes não puderam ser incluídos neste estudo por participarem de outros estudos com drogas imunossupressoras. Oitenta e quatro pacientes foram randomizados através de sorteio realizado previamente à entrada no estudo e distribuídos em grupo controle e grupo tratamento com N-acetilcisteína na dose oral de 600 mg administrada duas vezes ao dia por sete dias consecutivos, iniciando no dia do transplante.

Após a randomização, dez pacientes foram excluídos por apresentarem critérios de exclusão previamente estabelecidos: impossibilidade de ingerir a droga estudada e participação em outro estudo clínico. Cinco pacientes (três do grupo controle e dois do grupo tratamento com N-acetilcisteína) permaneceram em unidade de tratamento intensivo no pós-operatório do transplante renal. Quatro pacientes foram submetidos à nova operação no período dos 7 dias iniciais do transplante renal por complicações cirúrgicas,

dos quais dois pacientes (um em cada grupo) apresentaram fístula urinária e foram submetidos à reconstrução da anastomose ureterovesical e dois pacientes do grupo controle apresentaram hematoma de fossa ilíaca, com necessidade de tratamento cirúrgico. Um paciente do grupo tratamento com N-acetilcisteína recebeu rim que foi perfundido por máquina pulsátil para manutenção do enxerto durante o período de isquemia fria. Setenta e quatro receptores de transplante renal de doador falecido participaram do estudo.

Os dados sobre os doadores falecidos foram fornecidos pela Secretaria Estadual da Saúde – Sistema Estadual de Transplantes, através do formulário denominado Informações sobre o Doador de Múltiplos Órgãos, preenchido pela enfermeira da Organização de Procura de Órgãos local. As características dos doadores estudadas foram: sexo, raça categorizada em branca, parda, negra, e amarela, idade em anos, índice de massa corpórea (IMC) em kg/m², dias de permanência em unidade de terapia intensiva (UTI) antes da doação, antecedente pessoal de *diabetes mellitus*, antecedente pessoal de hipertensão arterial e dosagem sérica de creatinina terminal (última dosagem antes da doação), em mg/dl. Os doadores falecidos sob o critério de morte encefálica foram alocados em duas categorias:

- Doador falecido sem critério expandido.
- Doador falecido com critério expandido: doadores com mais de 60 anos ou com idade entre 50 e 60 anos e duas das seguintes características: dosagem de creatinina sérica acima de 1,5 mg/dl, história de hipertensão arterial e acidente vascular cerebral como causa do óbito.

O doador falecido foi heparinizado antes do clampeamento da aorta. Através de uma cânula colocada na aorta distal, os rins foram mantidos resfriados por um fluxo *in situ* de solução da Universidade de Wisconsin de preservação intracelular. Após a remoção dos órgãos torácicos e do abdômen superior, a aorta e a veia cava acima dos rins foram então seccionadas e ambos os rins foram removidos em bloco e colocados em solução gelada salina. As artérias renais foram re-perfundidas com 250 ml de solução de preservação de Euro-Collins e heparina 2 ml e os rins foram armazenados com essa mesma solução gelada.

Os dados dos receptores foram obtidos pelo pesquisador através de entrevista com o paciente e consulta aos dados da Secretaria do Estado da Saúde – Sistema Estadual de Transplantes. Os receptores do transplante de rim de doador falecido foram estudados quanto as suas características pré-operatórias de idade em anos; sexo, raça, categorizada em negra, branca e amarela, índice de massa corpórea (IMC) em kg/m², doença causadora de insuficiência renal terminal, número de comorbidades, definidas como doença com necessidade de tratamento específico, como hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência coronariana, lúpus sistêmico, artrite reumatóide, hepatopatia, litíase renal, osteoporose, alcoolismo, tabagismo e politransfusão sanguínea, exceto a doença causadora da insuficiência renal terminal, priorização para transplante renal, diurese pré-operatória, painel de anticorpos HLA classe I ou II mais recente, categorizado em 0 %, 1 a 50 % e > 50 %, número de

incompatibilidade HLA A, B, DR, presença de HLA DR idêntico e tempo de isquemia fria, avaliada em horas desde a perfusão do enxerto com solução de preservação gelada até perfusão do enxerto pelo sangue do receptor.

Todos os pacientes receberam no pré-operatório imediato metilprednisolona 500 mg, dissolvido em 250 ml de solução glicosada a 5%⁶². Todos os receptores tiveram a imunossupressão iniciada com anticorpo policlonal Thymoglobulin® (Genzyme Transplant Cambridge, MA, USA) dose máxima de 6mg/kg intravenoso divididos em 5 a 10 dias ou com anticorpos bloqueadores de receptores de interleucina 2 basiliximab – Simulect® (Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ, USA) 20 mg intravenoso 2 h antes do transplante e repetido após 4 dias ou daclizumab – Zenapax® (Hoffmann-La Roche Inc. Nutley, NJ, USA) 2 mg/kg intravenoso iniciado na indução anestésica e repetido 1mg/kg no 7º pós-operatório. No grupo controle, 22% (8/36) dos receptores foram induzidos com ATG, 61% (22/36) com basiliximab, 17% (6/36) com daclizumab. No grupo tratado com N-acetilcisteína, 23% (9/38) dos receptores foram induzidos com ATG, 61% (23/38) com basiliximab e 16% (6/38) com daclizumab.

O enxerto foi transplantado na fossa ilíaca por acesso retroperitoneal. A veia renal foi anastomosada na veia ilíaca externa, de modo término-lateral, com sutura contínua de polipropileno 5-0. A artéria renal foi anastomosada na artéria ilíaca externa, de modo término-lateral, com sutura contínua ou

pontos separados de polipropileno 6-0. Imediatamente antes do término das anastomoses arteriais, o receptor recebeu furosemida 1mg/Kg e 250 ml de manitol 20%. Após a reperfusão do rim, o ureter foi implantado na bexiga por técnica extravesical com sutura contínua de polidioxanona 5-0, sem o uso de cateter ureteral.

A manutenção da imunossupressão foi feita baseada no regime de três drogas. No grupo de tratamento com N-acetilcisteína todos os pacientes receberam tacrolimo (0,2 mg/kg via oral duas vezes ao dia, ajustado para atingir um nível de 10 a 15 ng/ml no primeiro mês e 5 a 8 ng/ml após), micofenolato de mofetila (1 g via oral duas vezes ao dia) ou micofenolato de sódio (720 mg via oral duas vezes ao dia) e prednisona (1 mg/kg via oral por dia e ajustado semanalmente até atingir a dose mínima de 0,1 mg/kg ao final do segundo mês). No grupo controle todos os pacientes, exceto três, seguiram esse mesmo regime. Nestes três pacientes, foi administrado ciclosporina Neoral® (Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ, USA) na dose de 8 mg/kg via oral, divididos em duas vezes por dia, para atingir um pico de C₂ de 1200 a 1400 ng/ml e sirolimo - Rapamycin® (A.G. Scientific, Inc., SanDiego, USA) 6 mg em dose de ataque em um dia e a seguir, 2 mg/d, mantendo nível sanguíneo de 10 ng/ml, na substituição do tacrolimo e do micofenolato.

No grupo controle, a manutenção da imunossupressão dos receptores foi feita com ciclosporina, sirolimo e prednisona em 8% (3/36), micofenolato de mofetila, tacrolimo e prednisona em 50% (18/36) e micofenolato de sódio, tacrolimo e prednisona em 42% (15/36). No grupo tratado com N-

acetilcisteína, a manutenção foi feita com tacrolimo, micofenolato de mofetila e prednisona em 95% (36/38) e tacrolimo, micofenolato de sódio e prednisona em 5% (2/38).

Foram estudados as características clínicas dos doadores, as características clínicas dos receptores, o estresse oxidativo, os episódios de rejeição aguda e a função renal pós-operatória.

O estresse oxidativo foi medido pelas taxas de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)⁵⁶. A dosagem de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico foi realizada utilizando a seguinte maneira: em 1 ml de plasma diluído foi acrescentado 1 ml ácido tricloroacético (Acido Tricloroacético 99% PA ACS Sigma®) a 17,5%, colocando-se em gelo. A seguir foi adicionado 1 ml do ácido tiobarbitúrico numa concentração de 0,6%, pH 2. O homogenato foi colocado em banho de água fervente por 15 minutos e em seguida foi adicionado 1 ml de tricloroacético a 70% à mistura e incubado por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 RPM e a densidade óptica do sobrenadante foi lida num comprimento de onda 534 nm contra um *blank*, utilizando-se espectrofotômetro. A quantidade de TBARS foi calculada utilizando-se coeficiente de extinção $1,56 \times 10^5$ mol/cm. O conteúdo de TBARS foi expresso em nanomoles de TBARS por ml. A avaliação dos resultados foi feita pela curva das médias de TBARS do pré-operatório e diariamente até o sétimo dia de pós-operatório.

A insuficiência renal persistente após o transplante é denominada função retardada do enxerto. No presente estudo definimos função retardada do enxerto como a necessidade de diálise na primeira semana após o transplante⁶³. A função renal foi avaliada através da medida da concentração de creatinina sérica, da depuração de creatinina calculada pela fórmula de Cockcroft-Gault⁶⁴ no 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias de período pós-operatório e a curva de número de dias em que os pacientes permaneceram em diálise no pós-operatório, denominada curva de pacientes livres de diálise. A rejeição aguda foi diagnosticada através de biópsia do enxerto^{65, 66}. Não foram realizadas biópsias protocolares. A biópsia do enxerto foi realizada em caso de anúria até o 15º pós-operatório em pacientes com ultrassom Doppler do enxerto demonstrando ausência de complicações cirúrgicas como hidronefrose, estenose ou trombose vascular⁶⁷. A biópsia do enxerto também foi realizada em caso de suspeita clínica por elevação da concentração de creatinina sérica em até 30 dias do transplante renal. A sobrevida do enxerto e a sobrevida do paciente foram avaliadas levando-se em conta que perda do enxerto foi considerada a evolução do paciente para diálise definitiva e que o óbito do paciente com enxerto funcionante não foi considerado perda de enxerto.

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com auxílio do programa Excel em Windows XP (Microsoft Corporation®, Califórnia, EUA).

As análises estatísticas foram feitas com o programa SPSS® versão

16.0 (SPSS[®] Inc; Illinois, EUA). Os dados foram relatados como média $\pm$ desvio padrão. Variáveis categóricas foram analisadas com teste exato de Fisher e teste Qui-quadrado. Variáveis não pareadas foram analisadas com teste t não pareado e teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Foi ajustado um modelo de análise de variância (ANOVA) com medida repetida com auxílio do software SAS[®] para análise das medidas repetidas de TBARS, creatinina e depuração de creatinina ao longo do tempo. A estimativa de Kaplan-Meier foi utilizada para construção de curvas de pacientes livres de diálise ao longo do tempo e a análise estatística utilizada para comparar os grupos foi o teste de log rank (Mantel-Cox). O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

As características clínicas dos doadores que foram estudadas estão resumidas na Tabela 1. Não se observou diferença significativa entre as características dos doadores do grupo controle e naquele tratado com N-acetilcisteína (NAC).

Tabela 1 – Características clínicas dos doadores falecidos dos grupos controle e do que recebeu N-acetilcisteína (NAC).

Características	Controle (n=36)	NAC (n=38)	p
Sexo (% Masculino)	55,6	44,7	0,352
Raça (Branco/Pardo/Negro/Amarelo)	23/7/6/0	24/8/5/1	0,771
Idade (anos, média $\pm$ DP)	50,2 $\pm$ 11,5	49,2 $\pm$ 11,1	0,698
IMC (Kg/m ² , média $\pm$ DP)	25,7 $\pm$ 3,2	26,4 $\pm$ 3,2	0,341
Critério expandido (%)	36,1	34,2	0,864
Dias de UTI (n, média $\pm$ DP)	7,6 $\pm$ 6,0	5,5 $\pm$ 4,7	0,118
<i>Diabetes mellitus</i> (%)	5,6	10,5	0,661
Hipertensão arterial sistêmica (%)	38,9	39,5	0,959
Creatinina (mg/dl, média $\pm$ DP)	1,4 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,9	0,976

Os receptores dos grupos controle (n = 36) e NAC (n = 38) apresentaram características clínicas similares. Os grupos controle e NAC também não foram diferentes do ponto de vista imunológico, analisado por painel de reatividade de anticorpos (PRA) e número de incompatibilidade de HLA A, B, DR (Tabela 2).

Tabela 2 - Características clínicas dos receptores de transplante renal dos grupos controle e do que recebeu N-acetilcisteína (NAC).

Características	Controle (n=36)	NAC (n=38)	p
Sexo (Masculino, %)	55,6	34,2	0,065
Raça (Branco/Negro/Amarelo)	18/17/1	23/11/4	0,162
Idade (anos, média $\pm$ DP)	48,8 $\pm$ 11,1	50,7 $\pm$ 11,8	0,479
IMC (Kg/m ² , média $\pm$ DP)	25,1 $\pm$ 4,4	25,3 $\pm$ 4,7	0,825
Causa de insuficiência renal (%)			0,163
Nefroesclerose	50,0	42,1	
Nefropatia diabética	19,4	15,8	
Glomerulonefrite crônica	16,7	5,3	
Doença renal policística	5,6	18,4	
Outras	8,3	18,4	
Comorbidades (média $\pm$ DP)	2,0 $\pm$ 1,1	2,2 $\pm$ 1,1	0,281
Diurese pré-operatória (%)	61,1	39,5	0,063
Priorização (%)	11,1	23,7	0,155
PRA (%)			0,608
0%	66,7	76,3	
1-50%	19,4	15,8	
>50%	13,9	7,9	
Incompatibilidade HLA (média $\pm$ DP)	3,3 $\pm$ 1,4	2,9 $\pm$ 1,4	0,280
DR idêntico (%)	50,0	44,7	0,583
Isquemia fria (h, média $\pm$ DP)	22,8 $\pm$ 7,5	25,1 $\pm$ 5,4	0,130

A medida do estresse oxidativo através da curva das médias de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) revelou valores significativamente menores para o grupo NAC quando comparados ao controle (Figura 3). De acordo com a Figura 3, pode-se observar que os dois grupos no momento pré-transplante apresentam média de TBARS semelhante. A partir do instante 3^o PO os grupos passam a apresentar

comportamento distinto. No grupo NAC ocorre um decréscimo na média de TBARS, observado até o 7º PO. Já o grupo controle apresenta um acréscimo na média de TBARS, observado até o 7º PO.

Foi ajustado um modelo de análise de variância (ANOVA) com medida repetida com auxílio do software SAS® que demonstrou um efeito estatisticamente significativo da interação entre grupo e tempo ($p < 0,001$). Ou seja, os dois grupos não apresentaram comportamento semelhante de TBARS ao longo do tempo. Como houve efeito significativo da interação entre grupo e tempo prosseguiu-se a análise através da construção de contrastes que permitissem avaliar onde se encontram as diferenças entre os dois grupos ao longo do tempo.

Figura 3 – Média $\pm$ erro padrão de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em receptores de transplante renal nos grupos controle e no que recebeu N-acetilcisteína.

A Tabela 3 apresenta as médias de TBARS em cada um dos instantes de avaliação de acordo com o grupo. Verifica-se que em ambos os grupos houve efeito significativo de tempo ($p < 0,001$). Ou seja, a variação na média de TBARS observada na Figura 3 mostrou-se significativa do ponto de vista estatístico. O poder do estudo na análise do TBARS foi de 0,975.

Tabela 3 - Média $\pm$ desvio padrão de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos 7 primeiros dias após o transplante, nos grupos controle e no que recebeu N-acetilcisteína.

	pré	1º PO	2º PO	3º PO	4º PO	5º PO	6º PO	7º PO	p
Controle (nmol/ml)	3,8 $\pm$ 1,0	3,9 $\pm$ 1,1	4,4 $\pm$ 1,2	4,9 $\pm$ 1,5	5,0 $\pm$ 1,6	5,2 $\pm$ 1,5	5,1 $\pm$ 1,6	5,4 $\pm$ 1,8	<0,001
NAC (nmol/ml)	3,8 $\pm$ 1,4	3,4 $\pm$ 1,4	3,8 $\pm$ 1,5	4,2 $\pm$ 1,4	4,0 $\pm$ 1,7	3,7 $\pm$ 1,5	3,6 $\pm$ 1,5	3,2 $\pm$ 1,3	0,003
p	0,916	0,079	0,105	0,014	0,012	<0,001	<0,001	<0,001	

Não houve diferença significativa quanto à proporção de pacientes que evoluíram com função retardada do enxerto em ambos os grupos ($p = 0,084$). O grupo controle apresentou uma função retardada do enxerto em 83,3 % dos pacientes (30/36) e o grupo tratado com NAC em 65,8 % dos pacientes (25/38).

Entretanto, ao longo de todo o acompanhamento, o grupo controle apresentou média de creatinina maior do que a apresentada pelo grupo

tratado com NAC (Figura 4). Em ambos os grupos observa-se que do 7º PO ao 30º PO ocorre um decréscimo na média de creatinina. Do 30º PO ao 90º PO observa-se que para o grupo NAC não parece ocorrer variação na média de creatinina. Já para o grupo controle ainda se observa um decréscimo na média de creatinina do 30º PO para o 60º PO, entretanto a média de creatinina do grupo controle ainda é maior do que a do grupo NAC.

Foi ajustado um modelo de análise de variância (ANOVA) com medida repetida para avaliar se a creatinina diferencia estatisticamente os dois grupos ao longo do tempo. De acordo com esse ajuste observou-se efeito estatisticamente significativo da interação entre grupo e tempo ($p = 0,026$), ou seja, os dois grupos não apresentaram o mesmo comportamento de creatinina ao longo do tempo.

Figura 4 - Média + erro padrão da creatinina ao longo do tempo nos grupos controle e no que recebeu N-acetilcisteína.

A Tabela 4 apresenta os valores médios de creatinina em cada um dos instantes de avaliação de acordo com o grupo de onde se pode observar que em ambos ocorreu efeito estatisticamente significativo do tempo ($p < 0,001$), ou seja, a variação observada na média de creatinina da Figura 4 foi significativa do ponto de vista estatístico. Observa-se na Tabela 4 que os dois grupos não se diferenciam em termos de média de creatinina no 7º PO ($p = 0,087$). A partir do 15º PO o grupo controle apresentou média de creatinina estatisticamente maior do que a apresentada pelo grupo NAC ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Média $\pm$ desvio padrão de creatinina ao longo do acompanhamento nos grupos controle e no que recebeu N-acetilcisteína.

	7º PO	15º PO	30º PO	60º PO	90º PO	p
Controle (n) (mg/dl)	5,6 $\pm$ 3,3 (10)	3,2 $\pm$ 1,8 (24)	3,0 $\pm$ 2,4 (30)	2,2 $\pm$ 1,4 (34)	1,9 $\pm$ 0,6 (34)	<0,001
NAC (n) (mg/dl)	5,4 $\pm$ 4,0 (21)	2,4 $\pm$ 1,4 (28)	1,7 $\pm$ 0,6 (37)	1,6 $\pm$ 0,7 (38)	1,4 $\pm$ 0,5 (36)	<0,001
p	0,087	0,004	0,001	0,023	0,004	

De acordo com a Figura 5, observa-se que ao longo de todo o acompanhamento o grupo NAC apresentou média de depuração de creatinina maior do que a apresentada pelo grupo controle. No grupo NAC observa-se um acréscimo na média de depuração de creatinina ao longo de todo o período estudado. No intervalo do 30º PO para o 90º PO, este acréscimo foi menor do que o observado até o 30º PO. Para o grupo controle observa-se um acréscimo na média do 7º PO até o 60º PO. Não houve variação na média do 60º PO para o 90º PO.

Foi ajustado um modelo de análise de variância (ANOVA) com medida repetida para avaliar se a depuração de creatinina diferencia estatisticamente os dois grupos ao longo do tempo. De acordo com esse ajuste, observou-se que o grupo com N-acetilcisteína apresentou depuração de creatinina estatisticamente maior do que a apresentada pelo grupo controle ($p = 0,029$). Além disso, foi observado efeito estatisticamente significativo de tempo ($p < 0,001$).

Figura 5 - Média $\pm$ erro padrão de depuração de creatinina calculado de receptores de transplante renal dos grupos controle e do que recebeu N-acetilcisteína.

A Tabela 5 apresenta os valores médios de depuração de creatinina em cada um dos instantes de avaliação de acordo com o grupo. Observa-se

que em ambos os grupos ocorreu efeito estatisticamente significativo do tempo ($p < 0,001$). Também se observa na Tabela 5 que os dois grupos não se diferenciam em termos de média de depuração de creatinina no 7º PO ($p = 0,554$) e no 60º PO ($p = 0,221$). No 15º PO, no 30º PO e no 90º PO observou-se que o grupo NAC apresentou média estatisticamente maior do que a apresentada pelo grupo controle ($p = 0,028$, $p = 0,037$ e $p = 0,048$, respectivamente).

Tabela 5 - Média $\pm$ desvio padrão de depuração de creatinina ao longo do acompanhamento nos grupos controle e no que recebeu N-acetilcisteína (NAC).

	7º PO	15º PO	30º PO	60º PO	90º PO	p
Controle(n) (ml/min/1,73m ²)	21,3 $\pm$ 15,2 (10)	30,0 $\pm$ 17,6 (24)	36,8 $\pm$ 19,4 (30)	44,0 $\pm$ 19,4 (34)	44,9 $\pm$ 14,4 (34)	<0,001
NAC(n) (ml/min/1,73m ²)	23,7 $\pm$ 15,2 (21)	37,7 $\pm$ 17,7 (28)	44,8 $\pm$ 15,4 (37)	49,6 $\pm$ 19,4 (38)	54,6 $\pm$ 20,0 (36)	<0,001
p	0,554	0,028	0,037	0,221	0,048	

A comparação com teste de log rank (Mantel-Cox) entre as curvas da estimativa de Kaplan-Meier de pacientes livres de diálise dos grupos mostrou que os pacientes tratados com NAC necessitaram de diálise por um tempo menor ($p = 0,008$) (Figura 6). A mediana e o intervalo de confiança (95 %) da estimativa de Kaplan-Meier dos grupos controle e N-acetilcisteína para dias em diálise dos pacientes foram de 13 [10,8 – 15,2] e 3 [0,6 – 5,4], respectivamente.

Figura 6 – Estimativa de Kaplan-Meier de pacientes livres de diálise ao longo do tempo para receptores de transplante renal dos grupos controle e do que recebeu N-acetilcisteína.

No grupo controle, 28 pacientes foram submetidos a biópsias e foram diagnosticados cinco episódios de rejeição celular aguda, dois de rejeição humoral aguda, 16 casos de necrose tubular aguda, um de toxicidade por ciclosporina, um de toxicidade por tacrolimo, um de arterioesclerose hialina e dois de glomeruloesclerose segmentar e focal. No grupo NAC, 24 pacientes foram submetidos a biópsias com três diagnósticos de rejeição celular aguda e vinte e um de necrose tubular aguda. Houve duas perdas de enxerto no período de 90 dias. Ambas ocorreram no grupo controle e uma

com diagnóstico de rejeição celular aguda comprovada por biópsia em até 30 dias do transplante.

A proporção de rejeição aguda comprovada por biópsia em até 30 dias após o transplante foi menor no grupo tratado com NAC (3/38 7,9%) quando comparado ao grupo controle (7/36 19,4%), embora estatisticamente não significativa ($p = 0,203$).

Não houve diferenças quanto às proporções de sobrevida do enxerto ($p = 0,610$) e mortalidade ($p = 1,000$). A sobrevida do enxerto no grupo controle foi de 94,4 % (34/36) e no grupo NAC foi de 97,4 % (37/38). A mortalidade no grupo controle foi de 5,6 % (2/36) e de 5,3 % (2/38) no grupo NAC.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O estudo da intervenção com antioxidante em transplante de rim com doador falecido é importante, pois é uma nova possibilidade terapêutica em um grupo de pacientes que experimentam sofrimento físico e psicológico. Mesmo após o transplante, esses pacientes ainda têm menor sobrevida do enxerto do que pacientes submetidos a transplante de rim com doador vivo. Isso demonstra o valor intrínseco desta pesquisa, bem como um novo roteiro de estudos e descobertas que permitam melhorar a abordagem terapêutica destes doentes e sua qualidade de vida. Este é um estudo prospectivo randomizado controlado. O placebo não foi utilizado, pois as avaliações através da dosagem sérica de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e creatinina, rejeição aguda, sobrevida do enxerto e mortalidade eram todas de caráter objetivo, o receptor de rim de doador falecido faz uso de inúmeras medicações no pós-operatório e o pesquisador não tinha qualquer influência sobre os dados pesquisados.

Foram incluídos no estudo 84 pacientes com idade acima de 18 anos e listados para receptor de rim de doador falecido no HCFMUSP como primeiro transplante. Dessa forma, o grupo estudado tinha um número grande de participantes e era homogêneo, permitindo a comparação de resultados. No entanto, dez pacientes foram excluídos do estudo. Cinco pacientes permaneceram na unidade de terapia intensiva no pós-operatório, um paciente recebeu enxerto perfundido por máquina pulsátil e quatro pacientes foram submetidos à re-operação no período de sete dias de pós-operatório. A permanência na unidade de terapia intensiva poderia

desequilibrar um dos grupos com pacientes mais graves e com maior estresse oxidativo, além dos pacientes estarem sem condições clínicas para ingerir a droga avaliada. O uso de máquina de perfusão pulsátil poderia alterar os resultados, pois também está sendo investigada para melhorar os resultados do transplante de doador falecido⁶⁸. Os pacientes submetidos à re-operação permaneceram um período em jejum sem possibilidade de ingerir a droga avaliada e também poderiam apresentar uma evolução desfavorável por motivos técnicos cirúrgicos.

A obtenção dos dados dos doadores seguiu um formulário previamente padronizado. Isso favoreceu a uniformidade dos dados. Adicionalmente, os doadores falecidos foram alocados em duas categorias. Doador de critério não expandido e de critério expandido. A sobrevida do enxerto se correlaciona diretamente com a melhor qualidade do rim doado⁶⁹, que foi equivalente nos dois grupos. A taxa de sobrevida do enxerto proveniente de doador falecido é influenciada pela causa de óbito do doador e pela história de comorbidades, como hipertensão e diabetes⁹. Dados demonstram que rins de vítimas de acidente vascular cerebral apresentam menor sobrevida de enxerto em 1 ano comparado à taxa dos demais doadores (79 % versus 84 %)⁷⁰. A taxa de sobrevida do enxerto em 3 meses neste trabalho foi de 94,4 % para o grupo controle e 97,4 % para o grupo N-acetilcisteína ($p = 0,610$), mesmo com uma expressiva proporção de doadores de critério expandido de 36,1 % no grupo controle e de 34,2 % no grupo N-acetilcisteína ($p = 0,864$).

Os dados analisados dos receptores foram aqueles com impacto em função retardada do enxerto, rejeição aguda e função do enxerto. Os grupos

se mostraram similares previamente a intervenção com N-acetilcisteína, tornando mais claros os efeitos da intervenção.

Anticorpos contra antígenos HLA classe I (A, B, C) ou classe II (DR, DQ) são encontrados em pacientes previamente expostos a essas glicoproteínas na gestação, por transfusão sanguínea, ou em transplante prévio. Pacientes muito sensibilizados apresentam diminuição da chance estatística de serem transplantados devido à maior probabilidade de prova cruzada positiva. A sensibilização a antígenos, mensurado pelo painel de reatividade de anticorpos, aumenta progressivamente o risco de perda do enxerto⁷¹. Um maior grau de incompatibilidade HLA é associado a um maior risco de perda crônica de enxerto. O número de incompatibilidades HLA foi similar entre o grupo controle e N-acetilcisteína ($3,3 \pm 1,4$ e $2,9 \pm 1,4$ $p = 0,280$, respectivamente). O painel de reatividade de anticorpos também foi similar entre o grupo controle e N-acetilcisteína ($p = 0,608$). Há maior impacto na incompatibilidade dos antígenos DR quando comparado aos demais antígenos do sistema HLA⁷². Em nosso estudo, a proporção de pacientes com DR idêntico foi equivalente entre os grupos (50,0% controle e 44,7% N-acetilcisteína, $p = 0,583$). Quando o órgão é distribuído baseado na compatibilidade HLA, uma preocupação é o efeito do tempo de isquemia fria na sobrevida tardia do enxerto⁷³. Quando o enxerto é exposto a mais de 36 horas de tempo de isquemia fria, o benefício da compatibilidade HLA não é verificado⁷⁴. Por outro lado, a melhora dos regimes de imunossupressão parece ter causado uma diminuição progressiva do impacto da incompatibilidade HLA na sobrevida do enxerto⁷⁵.

O efeito prejudicial do prolongamento do tempo de isquemia fria é

evidente em receptores de enxertos com incompatibilidade HLA. Há uma redução progressiva de 1 % a 2 % na sobrevida do enxerto associada com o incremento de 12 horas no tempo de isquemia fria⁷⁶. O tempo de isquemia fria foi elevado em nosso estudo e equivalente entre os grupos controle e N-acetilcisteína (respectivamente $22,8 \pm 7,5$ h e $25,1 \pm 5,4$ h, $p = 0,130$), o que pode ter contribuído para as altas taxas de função retardada do enxerto.

A indução da imunossupressão significativamente reduz os episódios de rejeição aguda^{62, 77}. A indução da imunossupressão é utilizada em pacientes de alto risco para rejeição aguda como indivíduos da raça negra, tempo de isquemia fria prolongada maior que 24 horas e pacientes sensibilizados^{78, 79}. Todos os nossos receptores receberam indução de imunossupressão.

A manutenção da imunossupressão é fundamental na prevenção da rejeição aguda e perda do enxerto. A terapia de manutenção ótima ainda não está estabelecida²¹. Os principais agentes de imunossupressão são corticosteróides, micofenolato mofetil, micofenolato de sódio, ciclosporina, tacrolimo e sirolimo. Nos Estados Unidos da América, os agentes mais utilizados na alta hospitalar são: corticosteróides (74 %), tacrolimo (79 %), ciclosporina (15 %), micofenolato (87 %) e sirolimo (9 %). Os esquemas convencionais de manutenção de imunossupressão consistem em uma combinação de agentes com diferentes mecanismos de ação. Essa estratégia minimiza morbidade e mortalidade associada a cada classe de agentes enquanto maximiza a efetividade geral. Assim como a maioria dos centros transplantadores, utilizamos um regime de terapia tripla consistindo em inibidor de calcineurina (tacrolimo ou ciclosporina), um antimetabólito

(micofenolato de mofetila) e corticóide (prednisona). Nossos receptores utilizaram predominantemente o esquema triplo com tacrolimo, micofenolato e prednisona, exceto três pacientes do grupo controle que receberam ciclosporina e sirolimo em substituição ao tacrolimo e micofenolato.

A maior parte das evidências aponta para uma menor taxa de rejeição aguda em pacientes que recebem tacrolimo ao invés de ciclosporina⁸⁰, mas no presente estudo nenhum dos três pacientes que recebeu ciclosporina apresentou rejeição aguda. O esquema de manutenção de imunossupressão com três drogas é geralmente associado a uma taxa de rejeição aguda de 20 %⁸¹⁻⁸³. De fato, observamos uma taxa de rejeição aguda de 19,4 % em nosso grupo controle, que foi maior que a taxa de 7,9 % do grupo tratado com N-acetilcisteína, mas não foi estatisticamente significativa ($p = 0,203$).

O estado inflamatório dos pacientes renais crônicos tem um papel bem definido na causa do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é aumentado em transplantados renais, embora reduzido em comparação a renais crônicos. Há uma coexistência de estado inflamatório sistêmico e elevado estresse oxidativo em transplantados renais⁸⁴. A inflamação sistêmica pré-transplante, manifestada por nível elevado de proteína C reativa prediz de modo independente o risco de rejeição aguda após o transplante renal e pode ser usada para a estratificação de risco e individualização da imunossupressão⁸⁵. O estado inflamatório também é um fator de risco para função retardada do enxerto⁸⁶.

Terapias para minimizar os efeitos prejudiciais da isquemia e reperfusão têm sido investigadas⁸⁷. O uso de albumina intra-operatória em transplante de doador falecido reduz a incidência de função retardada do

enxerto⁸⁸. Adicionalmente, albumina intra-operatória em altas doses (1,2 – 1,6 g/kg peso) aumenta a diurese imediata pós-operatória e diminui a creatinina em 7 dias após o transplante em comparação com baixas doses (0 – 0,4 g/kg de peso). As doses intermediárias de albumina intra-operatória apresentam efeitos intermediários, sugerindo uma relação linear⁸⁸. A administração de albumina intra-operatória em altas doses causa uma expansão do volume intravascular, minimizando a lesão por hipóxia. Outros efeitos da albumina não relacionados ao volume intravascular também podem existir, uma vez que colóides sintéticos não produzem esse mesmo efeito⁸⁹. Os receptores do nosso estudo receberam albumina endovenosa em altas doses durante o intra-operatório (1,0 g/kg peso).

O manitol é um diurético osmótico. Esse diurético é administrado antes do desclampamento dos vasos durante a cirurgia de transplante renal de doador falecido e é associado com a diminuição de necrose tubular aguda⁹⁰. Os efeitos benéficos postulados do manitol incluem incremento do volume intravascular com a melhora da pré-carga e débito cardíaco, aumento do fluxo sanguíneo renal secundário a liberação de peptídeo atrial natriurético e prostanoídes intrarenais vasodilatadores, aumentando o débito urinário, facilitando a lavagem de detritos dos túbulos renais e diminuindo o edema celular endotelial, o que promove um melhor fluxo sanguíneo intrarenal⁹¹. Manitol também é um antioxidante, com efeitos que possivelmente atenuam a lesão pela reperfusão renal⁹². Todos os pacientes de nosso estudo receberam 250 ml de manitol a 20% antes do desclampamento dos vasos.

Os pacientes transplantados de rim estão sujeitos a lesão por radicais livres, pois apresentam um maior estresse oxidativo, evidenciado por maior

concentração de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), quando comparados a controles normais¹². Não há a influência de regimes de imunossupressão, duração do transplante, ou concentração de creatinina na concentração de TBARS destes pacientes¹².

No presente estudo optamos por investigar a ação do antioxidante N-acetilcisteína na função renal precoce de receptores de rim de doador falecido. A N-acetilcisteína foi administrada durante a primeira semana após o transplante, pois outros autores sugeriram que a atenuação de estresse oxidativo gerado no período perioperatório pode prevenir a peroxidação lipídica e vasculopatia⁹³. N-acetilcisteína é um antioxidante bastante estudado e com baixa incidência de efeitos colaterais^{94, 95}. Não são conhecidos efeitos colaterais clinicamente significantes em administração oral de N-acetilcisteína em dose de até 8000 mg/dia⁹⁶. Recentemente, Hoffmann e colaboradores, sugeriram que a N-acetilcisteína pudesse promover uma alteração da creatinina sérica sem afetar a taxa de filtração glomerular⁹⁷. No entanto, evidências demonstraram que a N-acetilcisteína em dose de até 2400 mg/d não altera creatinina sérica ou dosagem de cistatina C^{15, 98-100}. Nosso estudo apresenta um longo tempo de observação após a administração da N-acetilcisteína, que evidencia os efeitos sustentados da droga no enxerto renal de doador falecido.

A via de administração de N-acetilcisteína escolhida foi a via oral pois a via endovenosa não faz a primeira passagem metabólica no fígado e rins, levando a menor produção de glutathione¹⁴ e a administração endovenosa de N-acetilcisteína pode provocar reação anafilática¹⁰¹. A administração oral de N-acetilcisteína é rapidamente absorvida no estômago e levada ao fígado

pela via portal onde é convertida em cisteína¹⁰². O fígado incorpora a cisteína em glutathione que é secretada na circulação^{103, 104}.

O uso de N-acetilcisteína em transplantes tem sido investigado para diminuir os efeitos prejudiciais da isquemia e reperfusão. O suplemento de N-acetilcisteína em solução de perfusão para enxerto hepático de doador falecido provou ter a melhor preservação de viabilidade celular, capacidade funcional, nível de glutathione e glicogênio¹⁰⁵.

Em nosso estudo, a administração de N-acetilcisteína em receptores de transplante renal de doador falecido preveniu o aumento do estresse oxidativo, medido por TBARS sérico. O poder do estudo na análise do TBARS foi de 0,975. Isso significa que a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa é de 97,5%, ou em outras palavras, o estudo tem uma probabilidade de 97,5% de detectar uma diferença quando ela existe. A partir do 3º PO até o 7º PO há uma diferença do comportamento do TBARS médio entre o grupo controle e o grupo NAC. No grupo tratado houve uma redução do estresse oxidativo em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$), o que pode explicar uma evolução melhor do enxerto neste grupo quanto à função renal precoce.

A presença de função retardada do enxerto tem um efeito adverso sobre sua sobrevivência precoce e tardia. Quiroga e colaboradores revelaram ser a função retardada do enxerto o principal fator de perda do enxerto em um ano¹⁰⁶. A causa mais comum de disfunção precoce do enxerto é necrose tubular aguda pós-isquêmica¹⁰⁷. A incidência aumenta com o aumento do tempo de isquemia fria maior que 24 horas, idade avançada do doador e preservação do enxerto em solução de Euro-Collins^{108, 109}. No presente

estudo a taxa de função retardada do enxerto foi elevada⁶³: 65,8 % para o grupo N-acetilcisteína e 83,3 % para o grupo controle ($p = 0,084$), embora compatível com as condições do enxerto com idade média elevada dos doadores ($50,2 \pm 11,5$ vs. $49,2 \pm 11,1$, respectivamente para o grupo N-acetilcisteína e o grupo controle $p = 0,698$) e prolongado tempo médio de isquemia fria em horas ($22,8 \pm 7,5$ vs. $25,1 \pm 5,4$, $p = 0,130$, respectivamente para grupo controle e N-acetilcisteína).

Pacientes com história de episódios de rejeição aguda são mais propensos a perda tardia do enxerto^{110, 111}. Apesar da taxa de rejeição aguda ter diminuído com os anos, não houve um aumento na sobrevida do enxerto compatível^{62, 112}. Isso nos leva a crer que outros fatores podem estar envolvidos, como a produção de radicais livres no processo de isquemia e reperfusão. A redução, embora não estatisticamente significativa, dos episódios de rejeição aguda no grupo tratado com N-acetilcisteína (7,9 % vs. 19,4 %, $p = 0,203$) pode ser um indicativo que a diminuição do estresse oxidativo e dos mecanismos inflamatórios interfere nos mecanismos imunológicos que levam a rejeição aguda.

A N-acetilcisteína pode atenuar o processo inflamatório vascular através do antagonismo dos efeitos intracelulares da geração de radicais livres, pelo aumento do óxido nítrico biodisponível e pela redução da adesão leucocitária ao endotélio⁴². Estudos de modelo de lesão renal por isquemia e reperfusão demonstram a ação da N-acetilcisteína na inibição de moléculas de adesão, como VCAM-1 e ICAM-1 e na redução da inflamação intersticial. Esses efeitos são associados ao aumento de glutathione renal, sugerindo que

N-acetilcisteína atenua o estresse oxidativo renal e sistêmico neste modelo^{54, 55}.

A função renal precoce em até 90 dias após o transplante renal evoluiu de modo mais favorável no grupo tratado com N-acetilcisteína que no grupo controle. A curva da creatinina média do grupo tratado com N-acetilcisteína apresentou um decréscimo mais acentuado e mais rápido que a do grupo controle durante todo o acompanhamento ($p = 0,026$). Ao longo de todo o acompanhamento, o grupo NAC apresentou média de depuração de creatinina calculada pela fórmula de Cockcroft-Gault maior do que a apresentada pelo grupo controle ($p = 0,029$). A curva de Kaplan-Meier para pacientes livres de diálise ao longo do tempo demonstrou uma menor necessidade de diálise após o transplante para o grupo tratado com N-acetilcisteína ($p = 0,008$). Dessa forma, observamos um efeito favorável na recuperação da função renal com o uso de N-acetilcisteína no peri-operatório que se manteve ao longo de 90 dias do transplante.

O transplante de rim de doador falecido é uma questão de saúde pública. O controle de doenças crônicas leva a um aumento do número de pacientes portadores de insuficiência renal terminal. Infelizmente, não são todos os que contam com doadores vivos e muitos necessitam de doadores falecidos. Considerando que a sobrevida do enxerto de doador falecido é significativamente menor que de doador vivo, mesmo após o advento das atuais terapias de imunossupressão, novas estratégias terapêuticas necessitam ser investigadas. É neste cenário que o uso terapêutico de antioxidantes em transplante de rim de doador falecido foi estudado com o uso de N-acetilcisteína. Os resultados de melhora da evolução da função

renal através da atenuação do estresse oxidativo revelam uma nova oportunidade terapêutica e de investigação.

As perspectivas futuras de nosso estudo são o início da aplicação da N-acetilcisteína em receptores de transplante renal com doador falecido e a avaliação do efeito da administração da N-acetilcisteína na sobrevida do enxerto e do paciente a longo prazo. A avaliação do efeito antioxidante dose dependente deve ser realizada em novos estudos com doses mais elevadas de N-acetilcisteína¹¹³. A administração de N-acetilcisteína no doador falecido e na solução de preservação do enxerto também deve ser estudada.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

As conclusões referentes à administração de N-acetilcisteína por via oral na dose de 600 mg em duas vezes ao dia para o receptor de transplante com doador falecido obtidas na presente pesquisa foram:

7.1. O estresse oxidativo no pós-operatório em até 7 dias após o transplante foi reduzido em relação ao controle ($p < 0,001$);

7.2. A função renal pós-operatória em até 90 dias após o transplante evoluiu com recuperação mais favorável, rápida e mantida em relação ao controle. Houve redução na creatinina sérica ($p = 0,026$), elevação na depuração de creatinina calculada pela fórmula de Cockcroft-Gault ($p = 0,029$) e maior proporção de pacientes livres de diálise após o transplante ($p = 0,008$) em relação ao controle;

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1.

http://www.saude.sp.gov.br/resources/gestor/informacoes_de_saude/transplantes_em_dados/censo_2008/censo_rim_2008.pdf. 2008.
2. Chkhotua AB, Klein T, Shabtai EL, Yussim A, Bar-Nathan N, Shaharabani E, Lustig S, Mor E. Kidney transplantation from living donors: comparison of results between related and unrelated donor transplants under new immunosuppressive protocols. *Isr Med Assoc J*. 2003;5(9):622-5.
3. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Trends and results for organ donation and transplantation in the United States, 2004. *Am J Transplant*. 2005;5(4 Pt 2):843-9.
4. Ianhez L, Saldanha LB, Paula FJ, David Neto E, Sabbaga E, Arap S, Marin ML, Rosales C, Guilherme L, Rodrigues H, et al. Humoral rejection with negative crossmatches. *Transplant Proc*. 1989;21(1 Pt 1):720-1.
5. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation*. 2005;80(9):1194-7.
6. Mazzucchi E, Danilovic A, Antonopoulos IM, Piovesan AC, Nahas WC, Lucon AM, Srougi M. Surgical aspects of third and subsequent renal transplants performed by the extraperitoneal access. *Transplantation*. 2006;81(6):840-4.
7. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, Gautreau C, Charron D, Glotz D. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8(2):324-31.
8. Schold JD, Kaplan B, Baliga RS, Meier-Kriesche HU. The broad spectrum of quality in deceased donor kidneys. *Am J Transplant*. 2005;5(4 Pt 1):757-65.

9. Ojo AO, Leichtman AB, Punch JD, Hanson JA, Dickinson DM, Wolfe RA, Port FK , Agodoa LY. Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis.* 2000;36(1):153-9.
10. Nahas WC, Lucon AM, Mazzucchi E, Scafuri AG, Neto ED, Ianhez LE , Arap S. Kidney transplantation: the use of living donors with renal artery lesions. *J Urol.* 1998;160(4):1244-7.
11. Zoccali C. Cardiovascular risk in uraemic patients-is it fully explained by classical risk factors? *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(4):454-7.
12. Taylor JE, Scott N, Hill A, Bridges A, Henderson IS, Stewart WK , Belch JJ. Oxygen free radicals and platelet and granulocyte aggregability in renal transplant patients. *Transplantation.* 1993;55(3):500-4.
13. Shimizu MH, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Liborio AB, Sanches TR , Seguro AC. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(10):3067-73.
14. Shalansky SJ, Pate GE, Levin A , Webb JG. N-acetylcysteine for prevention of radiocontrast induced nephrotoxicity: the importance of dose and route of administration. *Heart.* 2005;91(8):997-9.
15. Rehman T, Fought J , Solomon R. N-acetylcysteine effect on serum creatinine and cystatin C levels in CKD patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(6):1610-4.
16. Tepel M. Acetylcysteine for the prevention of radiocontrast -induced nephropathy. *Minerva Cardioangiol.* 2003;51(5):525-30.
17. de Araujo M, Andrade L, Coimbra TM, Rodrigues AC, Jr. , Seguro AC. Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3339-49.
18. Drager LF, Andrade L, Barros de Toledo JF, Laurindo FR, Machado Cesar LA , 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(7):1803-7.

19. Andrade L, Campos SB , Seguro AC. Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: protective role of L-arginine. *Kidney Int*. 1998;53(6):1736-42.
20. Lin A, Sekhon C, Sekhon B, Smith A, Chavin K, Orak J, Singh I , Singh A. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in a canine model of autologous renal transplantation. *Transplantation*. 2004;78(5):654-9.
21. Chocair P, Duley J, Simmonds HA, Cameron JS, Ianhez L, Arap S , Sabbaga E. Low-dose allopurinol plus azathioprine/cyclosporin/prednisolone, a novel immunosuppressive regimen. *Lancet*. 1993;342(8863):83-4.
22. Assis SM, Monteiro JL , Seguro AC. L-Arginine and allopurinol protect against cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*. 1997;63(8):1070-3.
23. Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ , Napoli C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(3):398-406.
24. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994;97(3A):5S-13S; discussion 22S-28S.
25. Descamps-Latscha B , Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int Suppl*. 2001;78(S108-13).
26. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74(1):139-62.
27. Gutteridge JM , Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull*. 1999;55(1):49-75.
28. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J*. 1997;11(2):118-24.

29. Adler V, Yin Z, Tew KD , Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999;18(45):6104-11.
30. Beckman KB , Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997;272(32):19633-6.
31. Oldham KM , Bowen PE. Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc*. 1998;98(9):1001-8.
32. Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP , Laurindo FR. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):2197-202.
33. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol*. 1986;48(657-67).
34. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M , Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000;3(5):373-84.
35. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Thevenin M, Touam M, Lambrey G, Lacour B, Drueke TB , Descamps-Latscha B. Critical evaluation of plasma and LDL oxidant-trapping potential in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;56(2):747-53.
36. Gotoh M, Nagase S, Aoyagi K, Hirayama A, Takemura K, Ueda A, Tomida C, Kikuchi H , Koyama A. Thiobarbituric acid reactive substances are increased in the subcutaneous fat tissue of patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(4):713-7.
37. Handelman GJ. Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif*. 2000;18(4):343-9.
38. Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Dallal GE, Levin NW , Blumberg JB. Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int*. 2001;59(5):1960-6.
39. Branten AJ, Mulder TP, Peters WH, Assmann KJ , Wetzels JF. Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with

proteinuria: reflection of the site of tubular injury. *Nephron*. 2000;85(2):120-6.

40. Paterson RL, Galley HF , Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31(11):2574-8.
41. Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD , Burnett JC, Jr. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 1990;258(1 Pt 2):F115-20.
42. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J , Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(1):6-20.
43. Bonanomi L , Gazzaniga A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1980;111(45-51).
44. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM , Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(6):593-7.
45. Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J , Zidek W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation*. 2003;107(7):992-5.
46. Trimarchi H, Mongitore MR, Baglioni P, Forrester M, Freixas EA, Schropp M, Pereyra H , Alonso M. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients--a pilot study. *Clin Nephrol*. 2003;59(6):441-6.
47. Keane WF, Kasiske BL , O'Donnell MP. Lipids and progressive glomerulosclerosis. A model analogous to atherosclerosis. *Am J Nephrol*. 1988;8(4):261-71.

48. **Pai R, Kirschenbaum MA , Kamanna VS.** Low-density lipoprotein stimulates the expression of macrophage colony-stimulating factor in glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1995;48(4):1254-62.
49. **Samuelsson O, Mulec H, Knight-Gibson C, Attman PO, Kron B, Larsson R, Weiss L, Wedel H , Alaupovic P.** Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12(9):1908-15.
50. **Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW , Medford RM.** Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1866-74.
51. **Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M , Smetana S.** Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int.* 1999;56(3):1078-83.
52. **Faruqi RM, Poptic EJ, Faruqi TR, De La Motte C , DiCorleto PE.** Distinct mechanisms for N-acetylcysteine inhibition of cytokine-induced E-selectin and VCAM-1 expression. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 2):H817-26.
53. **Foresti R , Motterlini R.** The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res.* 1999;31(6):459-75.
54. **Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A , Caputi AP.** Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):537-48.
55. **Nitescu N, Ricksten SE, Marcussen N, Haraldsson B, Nilsson U, Basu S , Guron G.** N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(5):1240-7.
56. **Shimizu MH, Coimbra TM, de Araujo M, Menezes LF , Seguro AC.** N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int.* 2005;68(5):2208-17.

57. Kay J, Chow WH, Chan TM, Lo SK, Kwok OH, Yip A, Fan K, Lee CH , Lam WF. Acetylcysteine for prevention of acute deterioration of renal function following elective coronary angiography and intervention: a randomized controlled trial. *Jama*. 2003;289(5):553-8.
58. 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(9384):598-603.
59. Marenzi G, Assanelli E, Marana I, Lauri G, Campodonico J, Grazi M, De Metrio M, Galli S, Fabbicocchi F, Montorsi P, Veglia F , Bartorelli AL. N-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy in primary angioplasty. *N Engl J Med*. 2006;354(26):2773-82.
60. Santiago FM, Bueno P, Olmedo C, Muffak-Granero K, Comino A, Serradilla M, Mansilla A, Villar JM, Garrote D , Ferron JA. Effect of N-acetylcysteine administration on intraoperative plasma levels of interleukin-4 and interleukin-10 in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2008;40(9):2978-80.
61. Ruiz Fuentes MC, Moreno Ayuso JM, Ruiz Fuentes N, Vargas Palomares JF, Asensio Peinado C , Osuna Ortega A. Treatment with N-acetylcysteine in stable renal transplantation. *Transplant Proc*. 2008;40(9):2897-9.
62. Mazzucchi E, Lucon AM, Nahas WC, Neto ED, Saldanha LB, Sabbaga E, Ianhez LE , Arap S. Histological outcome of acute cellular rejection in kidney transplantation after treatment with methylprednisolone. *Transplantation*. 1999;67(3):430-4.
63. Azevedo LS, Castro MC, Monteiro de Carvalho DB, d'Avila DO, Contieri F, Goncalves RT, Manfro R , Ianhez LE. Incidence of delayed graft function in cadaveric kidney transplants in Brazil: a multicenter analysis. *Transplant Proc*. 2005;37(6):2746-7.
64. Cockcroft DW , Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31-41.

65. Nahas WC, Mazzucchi E, Henrique A, Ianhez LE, Saldanha LB, Sabbaga E , Arap S. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft using the automated needle system: evaluation of 87 procedures. *J Urol.* 1993;150(2 Pt 1):313-5.
66. Antonopoulos IM, Nahas WC, Mazzucchi E, Ianhez LE, Saldanha LB , Arap S. Comparison of palpation-guided and ultrasound-guided biopsies in transplanted kidneys. *Clin Transplant.* 2001;15(6):393-6.
67. Castro MC, David DS, Saldanha LB, Sabbaga E, Arap S , Ianhez LE. Acute vascular rejection: a clinical and morphological study. *Transpl Int.* 1998;11 Suppl 1(S15-8.
68. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, van Kasterop-Kutz M, van der Heide JJ, Squifflet JP, van Heurn E, Kirste GR, Rahmel A, Leuvenink HG, Paul A, Pirenne J , Ploeg RJ. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360(1):7-19.
69. Schold JD, Kaplan B, Chumler NR, Howard RJ, Srinivas TR, Ma L , Meier-Kriesche HU. Access to quality: evaluation of the allocation of deceased donor kidneys for transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):3121-7.
70. Port FK, Dykstra DM, Merion RM , Wolfe RA. Organ donation and transplantation trends in the USA, 2003. *Am J Transplant.* 2004;4 Suppl 9(7-12.
71. Opelz G. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet.* 2005;365(9470):1570-6.
72. Doxiadis, II, de Fijter JW, Mallat MJ, Haasnoot GW, Ringers J, Persijn GG , Claas FH. Simpler and equitable allocation of kidneys from postmortem donors primarily based on full HLA-DR compatibility. *Transplantation.* 2007;83(9):1207-13.
73. Helou CM, Seguro AC , Rocha Ados S. Evaluation of human kidney viability during cold storage. *Ren Fail.* 1993;15(1):85-91.

74. Lee CM, Carter JT, Alfrey EJ, Ascher NL, Roberts JP , Freise CE. Prolonged cold ischemia time obviates the benefits of 0 HLA mismatches in renal transplantation. *Arch Surg.* 2000;135(9):1016-9; discussion 1019-20.
75. Su X, Zenios SA, Chakkera H, Milford EL , Chertow GM. Diminishing significance of HLA matching in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4(9):1501-8.
76. Giblin L, O'Kelly P, Little D, Hickey D, Donohue J, Walshe JJ, Spencer S , Conlon PJ. A comparison of long-term graft survival rates between the first and second donor kidney transplanted--the effect of a longer cold ischaemic time for the second kidney. *Am J Transplant.* 2005;5(5):1071-5.
77. Taber DJ, Weimert NA, Henderson F, Lin A, Bratton CF, Chavin KD , Baliga PK. Long-term efficacy of induction therapy with anti-interleukin-2 receptor antibodies or thymoglobulin compared with no induction therapy in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2008;40(10):3401-7.
78. Castro MC, Araujo LM, Nahas WC, Arap S, David-Neto E , Ianhez LE. Induction versus noninduction therapy in kidney transplantation: considering different PRA levels and different induction therapies. *Transplant Proc.* 2004;36(4):874-6.
79. Kirk AD. Induction immunosuppression. *Transplantation.* 2006;82(5):593-602.
80. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR , Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *Bmj.* 2005;331(7520):810.
81. Shapiro R, Jordan ML, Scantlebury VP, Vivas C, Marsh JW, McCauley J, Johnston J, Randhawa P, Irish W, Gritsch HA, Naraghi R, Hakala TR, Fung JJ , Starzl TE. A prospective, randomized trial of tacrolimus/prednisone versus tacrolimus/prednisone/mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1999;67(3):411-5.

82. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*. 1995;60(3):225-32.
83. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation*. 1996;61(7):1029-37.
84. Cottone S, Palermo A, Vaccaro F, Vadala A, Buscemi B , Cerasola G. Oxidative stress and inflammation in long-term renal transplanted hypertensives. *Clin Nephrol*. 2006;66(1):32-8.
85. Perez RV, Brown DJ, Katznelson SA, Dubin JA, Muller HG, Chang T, Rudich SM, McVicar JP , Kaysen GA. Pretransplant systemic inflammation and acute rejection after renal transplantation. *Transplantation*. 2000;69(5):869-74.
86. Lauzurica R, Pastor MC, Bayes B, Hernandez JM, Bonet J, Dolade M, Navarro M , Romero R. Pretransplant inflammation: a risk factor for delayed graft function? *J Nephrol*. 2008;21(2):221-8.
87. Ventura CG, Coimbra TM, de Campos SB, de Castro I, Yu L , Seguro AC. Mycophenolate mofetil attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(10):2524-33.
88. Dawidson I, Coorpender L, Drake D, Helderma H, Hull A, Peters P, Sagalowsky A , Reisch J. Intraoperative albumin improves the outcome of cadaver renal transplantation. *Transplant Proc*. 1987;19(5):4137-9.
89. Dawidson IJ, Sandor ZF, Coorpender L, Palmer B, Peters P, Lu C, Sagalowsky A, Risser R , Willms C. Intraoperative albumin administration affects the outcome of cadaver renal transplantation. *Transplantation*. 1992;53(4):774-82.
90. van Valenberg PL, Hoitsma AJ, Tiggeler RG, Berden JH, van Lier HJ , Koene RA. Mannitol as an indispensable constituent of an intraoperative

hydration protocol for the prevention of acute renal failure after renal cadaveric transplantation. *Transplantation*. 1987;44(6):784-8.

91. Better OS , Rubinstein I. Management of shock and acute renal failure in casualties suffering from the crush syndrome. *Ren Fail*. 1997;19(5):647-53.
92. Magovern GJ, Jr., Bolling SF, Casale AS, Bulkley BH , Gardner TJ. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger? *Circulation*. 1984;70(3 Pt 2):I91-5.
93. Hasegawa T, Iwanaga K, Hultquist DE, Liao H, Visovatti SH , Pinsky DJ. Suppression of nitrosative and oxidative stress to reduce cardiac allograft vasculopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(4):H1007-16.
94. Brown M, Bjorksten A, Medved I , McKenna M. Pharmacokinetics of intravenous N-acetylcysteine in men at rest and during exercise. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004;60(10):717-23.
95. Kao LW, Kirk MA, Furbee RB, Mehta NH, Skinner JR , Brizendine EJ. What is the rate of adverse events after oral N-acetylcysteine administered by the intravenous route to patients with suspected acetaminophen poisoning? *Ann Emerg Med*. 2003;42(6):741-50.
96. De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, Mitra D, Watanabe N, Nakamura H, Tjioe I, Deresinski SC, Moore WA, Ela SW, Parks D , Herzenberg LA. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(10):915-29.
97. Hoffmann U, Fischereder M, Kruger B, Drobnik W , Kramer BK. The value of N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast agent-induced nephropathy seems questionable. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(2):407-10.
98. Haase M, Haase-Fielitz A, Ratnaike S, Reade MC, Bagshaw SM, Morgera S, Dragun D , Bellomo R. N-Acetylcysteine does not artifactually lower plasma creatinine concentration. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(5):1581-7.

99. Kimmel M, Butscheid M, Brenner S, 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. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(4):1241-5.
100. Hoek FJ, Kemperman FA , Krediet RT. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(10):2024-31.
101. Prescott L. Oral or intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen poisoning? *Ann Emerg Med*. 2005;45(4):409-13.
102. Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*. 1997;38(205-27.
103. Griffith OW , Meister A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(11):5606-10.
104. Atkuri KR, Mantovani JJ , Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(4):355-9.
105. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Jimenez N, Bonora A, Castell JV , Donato MT. Evaluation of drug-metabolizing and functional competence of human hepatocytes incubated under hypothermia in different media for clinical infusion. *Cell Transplant*. 2008;17(8):887-97.
106. Quiroga I, McShane P, Koo DD, Gray D, Friend PJ, Fuggle S , Darby C. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(6):1689-96.
107. de Castro MC, Saldanha LB, Nahas W, David DS, Arap S, David-Neto E, Sabbaga E , Ianhez LE. Post-transplant neutrophilic interstitial nephritis--an important cause of graft dysfunction. *Transpl Int*. 1998;11 Suppl 1(S144-6.
108. Cravedi P, Codreanu I, Satta A, Turturro M, Sghirlanzoni M, Remuzzi G , Ruggenenti P. Cyclosporine prolongs delayed graft function in kidney

transplantation: are rabbit anti-human thymocyte globulins the answer?
Nephron Clin Pract. 2005;101(2):c65-71.

109. Lechevallier E, Dussol B, Luccioni A, Thirion X, Vacher-Copomat H, Jaber K, Brunet P, Leonetti F, Lavelle O, Coulange C , Berland Y. Posttransplantation acute tubular necrosis: risk factors and implications for graft survival. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(6):984-91.
110. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Cibrik DM, Pugh JD, Leichtman AB , Kaplan B. Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. *Transplantation.* 2000;70(7):1098-100.
111. Cole EH, Johnston O, Rose CL , Gill JS. Impact of acute rejection and new-onset diabetes on long-term transplant graft and patient survival. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):814-21.
112. Meier-Kriesche HU, Schold JD , Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant.* 2004;4(8):1289-95.
113. Briguori C, Colombo A, Violante A, Balestrieri P, Manganelli F, Paolo Elia P, Golia B, Lepore S, Riviezzo G, Scarpato P, Focaccio A, Librera M, Bonizzoni E , Ricciardelli B. Standard vs double dose of N-acetylcysteine to prevent contrast agent associated nephrotoxicity. *Eur Heart J.* 2004;25(3):206-11.

APÊNDICE

APÊNDICE

Trabalho relacionado à tese apresentado em congresso internacional:

AUA Annual Meeting 2009 – recebeu prêmio de Best of Posters

N-acetylcysteine attenuates oxidative stress in deceased renal transplantation

Danilovic A, Lucon AM, Seguro AC, Shimizu MH, Ianhez LE, Nahas WC, Srougi M. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress in deceased renal transplantation. *J Urol*.2009;181(4,Suppl):740.