



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**André Lopes Silva**

**Efeito do Sirolimo no perfil cardiovascular do  
paciente idoso transplantado renal**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
“Fisiopatologia em Clínica Médica” da  
Faculdade de Medicina de Botucatu da  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
para obtenção do título de Mestre em  
Fisiopatologia em Clínica Médica.

**Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Modelli de Andrade**

**Botucatu**

**2018**



# **Efeito do Sirolimo no perfil cardiovascular do paciente idoso transplantado renal**

**Universidade Estadual Paulista - UNESP**

**Hospital das Clínicas de Botucatu**

**Programa de Fisiopatologia em Clínica Médica**

**2018**

**ANDRÉ LOPES SILVA**

**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

**Efeito do Sirolimo no perfil cardiovascular do  
paciente idoso transplantado renal**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em “Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP) para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

**Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Modelli de Andrade**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Silva, Andre Lopes da.

Efeito do sirolimo no perfil cardiovascular do paciente idoso transplantado renal / Andre Lopes da Silva. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luis Gustavo Modelli de Andrade  
Capes: 40101134

1. Aterosclerose. 2. Transplante de rins. 3. Agentes imunossupressores. 4. Artérias carótidas.

Palavras-chave: Alvo de inibidores de rapamicina em mamíferos; Aterosclerose; Espessura médio intimal da carótida; Sirolimo; Transplante renal.



## RESUMO

SILVA AL. **Efeito do Sirolimo no perfil cardiovascular do paciente idoso transplantado renal.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, 2018.

**Introdução:** Os inibidores do alvo de rapamicina em mamíferos (mTORI) podem conferir vantagens cardioprotetoras. Em modelos animais, o mTORI pode prevenir a aterogênese pela regulação da homeostase do colesterol e pela redução da resposta inflamatória. Além disso, a administração de mTORI pode levar à redução da massa ventricular esquerda. O objetivo deste estudo é comparar a espessura médio intimal da carótida (cIMT) e a massa ventricular esquerda indexada (LVMI) entre o grupo de tacrolimus associado a micofenolato (grupo micofenolato) e tacrolimo associado a sirolimo (grupo sirolimo) em baixas doses. A cIMT é considerada um marcador substituto da aterosclerose. **Métodos:** Nós avaliamos a cIMT e a LVMI no início e aos 6 e 12 meses após o transplante renal. Foram randomizados prospectivamente todos os receptores de transplante renal com mais de 60 anos para um dos dois grupos: tacrolimus / sirolimus (n = 21) ou tacrolimus / micofenolato (n = 23). A cIMT foi avaliada por ultrassonografia na parede da artéria carótida comum e o LVMI pelo ecocardiograma. **Resultados:** Os níveis de colesterol total e de lipoproteína de alta densidade (HDL) foram maiores no grupo do sirolimus aos 6 e 12 meses. O cIMT diminuiu com o tempo aos 6 e 12 meses no grupo do sirolimus (p = 0,012); esta diminuição continuou a ser significativa em um modelo ajustado para idade, sexo, presença de diabetes, uso de estatina e tabagismo. Houve redução ao longo do tempo na massa ventricular esquerda indexada, mas não houve diferenças entre os grupos

sugerindo ausência de efeito de classe do sirolimus. **Conclusões:** O uso de sirolimus com tacrolimus de novo no transplante renal está associado com uma redução na cIMT após 12 meses, uma diminuição mais significativa do que a observada com a combinação de micofenolato mais tacrolimus. Isto sugere um efeito de classe do mTORI na prevenção da aterosclerose. Não houve efeito do sirolimus na redução da massa ventricular esquerda.

**Palavras-chave:** transplante renal; alvo de inibidores de rapamicina em mamíferos; Sirolimo; Aterosclerose; Espessura Médio Intimal da Carotida.

## ABSTRACT

SILVA AL. **Effect of Sirolimus on the cardiovascular profile of elderly renal transplant patients.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, 2018.

**Background:** Mammalian target of rapamycin inhibitors (mTORI) may confer cardioprotective advantages. In animal models, the mTORI may prevent atherogenesis by the regulation of homeostasis of cholesterol and by a reduced inflammatory response. In addition, the administration of mTORI may lead to reduction of left ventricular mass. The aim of this study is to compare the carotid intima-media thickness (cIMT) and left ventricular mass index (LVMI) between de novo tacrolimus/mycophenolate and tacrolimus/sirolimus at low doses. The cIMT is considered a surrogate marker of atherosclerosis. **Methods:** We evaluated cIMT and LVMI at baseline and at 6 and 12 months after kidney transplantation. We prospectively randomly assigned kidney transplant recipients older than 60 years of age to one of two groups: tacrolimus/sirolimus (n=21) or tacrolimus/mycophenolate (n=23). The cIMT was evaluated by using ultrasound in the common carotid artery wall in both sides and the LVMI by echocardiogram. **Results:** The total and high-density lipoprotein cholesterol levels were higher in the sirolimus group at 6 and 12 months. The cIMT decreased over time at 6 and 12 months in the sirolimus group ( $p = 0.012$ ); this decrease continued to be significant in a model adjusted for age, sex, presence of diabetes, statin use and smoking. There was a reduction over time in LVMI, but there were no differences between groups suggesting absence of sirolimus class effect.



**Conclusions:** The use of sirolimus plus tacrolimus de novo in kidney transplantation is associated with a reduction in cIMT after 12 months, a decrease more significant than seen with the combination of mycophenolate plus tacrolimus. This suggests a class effect of mTORI in the prevention of atherosclerosis. There was no effect of sirolimus on the reduction of left ventricular mass.

**Keywords:** kidney transplantation; mammalian target of rapamycin inhibitors; Sirolimus; Atherosclerosis; Carotid Intima-Media Thickness.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

<b>BRA</b>	Bloqueador do receptor da angiotensina II
<b>cIMT</b>	Espessura médio intimal da carótida
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CT</b>	Colesterol Total
<b>eGFR</b>	Taxa de filtração glomerular estimada
<b>ERP</b>	Espessura Relativa da Parede do ventrículo esquerdo
<b>FE</b>	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
<b>HDL</b>	Lipoproteína de Alta densidade
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário Humano
<b>HVE</b>	Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo
<b>IECA</b>	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina
<b>IMC</b>	Índice de massa corporea
<b>IMT</b>	Espessura Médio Intimal
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baixa densidade
<b>LVM</b>	Massa Ventricular Esquerda
<b>LVMi</b>	Massa Ventricular Esquerda Indexada
<b>MDRD</b>	modification of diet in renal disease
<b>mTOR</b>	alvo de ligação da rapamicina em mamíferos
<b>mTORC1</b>	Complexo 1 do alvo de ligação da rapamicina em mamíferos
<b>mTORC2</b>	Complexo 2 do alvo de ligação da rapamicina em mamíferos
<b>mTORI</b>	Inibidores do alvo de ligação da rapamicina em mamíferos
<b>pp65</b>	Antigenemia para Citomegalovírus
<b>TCE</b>	Traumatismo Crâneo Encefálico
<b>TG</b>	Triglicerídeos

## SUMÁRIO

### Conteúdo

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>Perfil de Segurança dos inibidores da mTOR</b> .....	3
<b>Benefícios Cardiovasculares associados aos mTOR</b> .....	4
<b>Diminuição do Risco de Infecção por citomegalovírus (CMV) associado aos mTORI</b> .....	6
<b>Diminuição do Risco Neoplasias associadas aos inibidores da mTOR</b> .....	6
<b>1.1 HIPÓTESE DO ESTUDO</b> .....	9
<b>2.1. OBJETIVO PRIMÁRIO (PERFIL CARDIOVASCULAR)</b> .....	11
<b>2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS</b> .....	11
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	13
<b>Critérios de Inclusão</b> .....	14
<b>Intervenção</b> .....	15
<b>Níveis séricos dos imunossupressores</b> .....	17
<b>Desfecho Primário (Perfil Cardiovascular)</b> .....	17
Desfechos secundários .....	20
Análises Estatísticas.....	23
<b>5. RESULTADOS</b> .....	26
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49
<b>9. ANEXOS</b> .....	59
<b>10. PUBLICAÇÃO</b> .....	63
<sup>†</sup> Participated in the performance of the research .....	63
<sup>§</sup> Conception and design; Final approval of the version to be published.....	63



## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida no decorrer dos últimos anos a doença renal crônica tem aumentado sua incidência, principalmente nos pacientes com idade superior aos 60 anos. No Brasil, em 2014, o número estimado de pacientes em diálise foi de 112.004, com taxa de incidência de 36.568 pacientes, sendo que 27,9% destes pacientes tinham idade igual ou superior a 65 anos<sup>1</sup>. Dados do US Renal Data System mostraram que em 2009 a incidência de insuficiência renal crônica em pacientes com 65 anos ou mais foi de 48% sendo que 36% dos pacientes tinham 70 anos ou mais<sup>2</sup>.

O transplante renal é a melhor terapia renal substitutiva, pois, quando comparado à diálise, promove substancial redução da mortalidade geral e de eventos cardiovasculares, bem como melhora relevante na qualidade de vida de pacientes portadores de doença renal crônica dialítica<sup>3</sup>.

Estes benefícios foram também observados entre populações de maior risco como os idosos, sendo que o transplante renal é considerado uma opção segura para pacientes com 60 anos ou mais<sup>4-5</sup>. Assim, há incremento de 61 a 68% na sobrevida dos transplantados idosos em relação aos idosos que permanecem em lista de espera<sup>2,4</sup>. Mesmo quando analisamos receptores mais idosos com idade acima de 70 anos o transplante renal confere aumento da sobrevida em relação a permanecer em hemodiálise<sup>5</sup>.

Embora os benefícios do transplante renal nesta população estejam bem estabelecidos não existe ainda consenso na literatura quanto ao esquema de

imunossupressão ideal para os idosos<sup>2, 6, 7, 8</sup>. Este fato é decorrente das particularidades destes pacientes que apresentam menor risco de rejeição, maior chance de infecção e neoplasia, além de diferenças no metabolismo e farmacocinéticas das drogas devido a alterações fisiológicas que ocorrem com o avanço da idade<sup>6-7</sup>.

O esquema terapêutico mais utilizado atualmente é a combinação de inibidor e calcineurina com micofenolato e prednisona<sup>9</sup>. Embora exista questionamento se na população idosa o uso de micofenolato predisporia a maior risco de infecções em relação a azatioprina, estudos recentes apontam para o benefício da utilização de micofenolato pela menor taxa de rejeição e melhor sobrevida do enxerto<sup>10</sup>.

Uma opção terapêutica para esta população seriam os inibidores do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORI) devido aos seus potenciais benefícios na redução do risco cardiovascular, de infecções e da incidência de neoplasias<sup>11</sup>. Os inibidores mTOR (sirolimo e everolimus) inibem a via da mTOR que é uma importante quinase responsável pelo processo de síntese, divisão e crescimento celular, incluindo a proliferação de células do sistema imune e células neoplásicas<sup>12</sup>.

## Perfil de Segurança dos inibidores da mTOR

Na comparação entre o esquema padrão de imunossupressão com inibidores de calcineurina somados ao micofenolato o uso de inibidores da mTOR em substituição ao micofenolato mostra taxas semelhantes de rejeição aguda e sobrevida do enxerto. No estudo de Lorber e colaboradores, ciclosporina associado à micofenolato e prednisona foram comparados com ciclosporina, everolimus e prednisona mostrando taxas semelhantes de rejeição e sobrevida do enxerto porém com maior incidência de efeitos adversos no grupo everolimus<sup>13</sup>. Estudo semelhante conduzido por Vitko e colaboradores, mostra segurança no uso de everolimus junto com ciclosporina em comparação com micofenolato associado a ciclosporina<sup>14</sup>.

Contrariamente a estes estudos Guerra e colaboradores, mostraram que a combinação de tacrolimo com sirolimo foi inferior à combinação de tacrolimo com micofenolato quanto a taxa de rejeição aguda e incidência de efeitos colaterais. Este estudo, entretanto, analisou uma população mais jovem e, portanto com maior risco imunológico<sup>15</sup>. Outros estudos apontam resultados negativos da combinação de tacrolimo com sirolimo em relação a combinação com micofenolato, porém, estes estudos utilizaram níveis séricos mais elevados de tacrolimo e sirolimo<sup>16,17</sup>.

Assim o perfil de segurança dos inibidores da mTOR quando usado em substituição ao micofenolato é seguro quanto aos principais desfechos do transplante renal (rejeição aguda comprovada por biópsia e sobrevida do enxerto e paciente). Quanto aos efeitos colaterais eles são dose dependente e a tendência atual é utilizar menores doses dos inibidores da calcineurina e dos inibidores da mTOR quando associados reduzindo assim a incidência de efeitos adversos.

## **Benefícios Cardiovasculares associados aos mTOR**

No coração o sirolimo inibe a via da mTOR que regula a síntese de proteínas intracelulares envolvidas com a hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) em resposta ao estímulo pressórico. A administração de sirolimo em camundongos submetidos a estresse hipervolêmico resultou numa redução de 50% do crescimento de células do miocárdio em relação ao grupo controle<sup>18</sup>.

Estudos em humanos onde o inibidor da calcineurina foi substituído por sirolimo houve uma importante redução da hipertrofia do ventrículo esquerdo (aproximadamente 30%)<sup>19</sup>.

A HVE é um fator de risco cardiovascular muito prevalente na população de pacientes transplantados renais. Ocorre como uma resposta adaptativa do coração a sobrecarga, tanto de volume como pressórica. Competem para isso, inúmeros fatores de risco para o desenvolvimento de hipertrofia ventricular tais como hipertensão, idade, diabetes, tabagismo e anemia dentre outros<sup>20</sup>.

A redução dos níveis pressóricos juntamente com o uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) produz regressão da HVE e fazem parte do tratamento padrão ao transplantado. O sirolimo mostrou redução da espessura da parede do ventrículo esquerdo e seu efeito foi além do esperado pela redução da pressão ou do uso de IECA. Este efeito parece estar ligado à inibição da síntese de proteínas do miocárdio com consequente bloqueio do crescimento dos miócitos<sup>21</sup>.



Portanto, os mTORI parecem exercer efeito de classe independente da resposta pressórica e do uso de IECA contribuindo na regressão da HVE.

Quanto ao efeito sobre os lípides a classe dos inibidores da mTOR induz dislipidemia o que poderia contribuir para o aumento do risco cardiovascular. Entretanto, em modelo animal com camundongos Knockout para apolipoproteína E, a administração de sirolimo levou a redução da ateromatose aórtica em mais de 50% dos casos, a despeito do aumento dos lípides. Este processo foi acompanhado pela redução da expressão de interleucinas envolvidas no processo de aterosclerose<sup>22</sup>. Em estudo semelhante utilizando camundongos deficientes em receptores de LDL o uso de everolimus reduziu a aterosclerose aórtica a despeito do aumento dos lípides séricos<sup>23</sup>.

Assim, apesar do aumento dos níveis séricos do colesterol sugere-se que os mTORI poderiam prevenir a deposição de colesterol nas artérias tanto pela regulação da homeostase do colesterol quanto pela modificação da resposta inflamatória<sup>24</sup>.

Em resumo o uso dos inibidores de mTOR pode levar a redução da aterosclerose e HVE por mecanismos específicos de classe contribuindo para a melhora da morbidade e mortalidade associada a estes fatores de riscos muito prevalentes no pós-transplante renal.

## **Diminuição do Risco de Infecção por citomegalovírus (CMV) associado aos mTORI**

O risco de infecções aumenta nos receptores idosos tornando a escolha do esquema de imunossupressão um desafio adicional nesta população<sup>25</sup>. Especialmente relevante no pós-transplante renal é a infecção por citomegalovírus (CMV) sendo este o mais importante patógeno após o transplante e um causador de significativa morbidade e mortalidade. Na ausência de medidas profiláticas 40 a 100% dos pacientes no pós-transplante podem desenvolver infecção por CMV<sup>26</sup>.

Vários estudos observaram redução do risco relativo para o desenvolvimento de infecção por CMV nos esquemas que utilizamos inibidores da mTORI<sup>27,28</sup>. Até mesmo em população de alto risco para desenvolvimento de CMV, que utilizaram terapia de indução com timoglobulina, houve menor incidência de CMV no grupo sirolimo<sup>29</sup>.

Assim parece que esta classe de droga exerce efeito de proteção com redução da incidência desta importante infecção no pós-transplante renal.

## **Diminuição do Risco Neoplasias associadas aos inibidores da mTOR**

Os receptores de transplante renal têm risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias após o transplante sendo os tumores cutâneos os mais frequentes<sup>30</sup>. Estudos têm mostrado que os inibidores da mTOR podem contribuir reduzindo o risco de neoplasias no pós-transplante. As proteínas do grupo mTORI estimulam a produção dos fatores VEGF, TNF-alfa e PDGF-alfa todos envolvidos na angiogênese e proliferação

celular. Assim bloqueando esta via com os inibidores da mTOR ocorre menor produção dos fatores angiogênicos e conseqüente menor proliferação tumoral sendo este um dos principais mecanismos anti-neoplásicos dos inibidores da mTOR<sup>31, 32</sup>.

O uso de inibidores da mTOR também está associado à redução da incidência de tumores associados à atividade viral como o Epstein-Barr e o Herpes vírus<sup>12</sup>. O uso de sirolimo pode causar a regressão da doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) frequentemente associada à replicação do Epstein-Barr vírus<sup>33</sup>. O sarcoma de Kaposi, relacionado ao Herpes vírus tipo 8, também responde a conversão para sirolimo sendo este o tratamento de escolha com regressão total da neoplasia<sup>34</sup>.

Estudo observacional do Registro Americano de Transplantes com mais de 30.000 pacientes mostrou que o tratamento imunossupressor com everolimus ou sirolimo reduziu o risco de neoplasias cutâneas e não cutâneas em cerca de 60% quando comparados ao tratamento com inibidores da calcineurina sem o uso dos inibidores da mTOR<sup>35</sup>.

Também a avaliação da incidência de neoplasia após dois anos de transplante com o sirolimo em diferentes regimes mostrou que tanto a associação com ciclosporina quanto o uso isolado retardou a ocorrência dos tumores. O uso de ciclosporina sem sirolimo associou-se a 5% de incidência de tumores neste período, ciclosporina com sirolimo resultou em menor incidência e no grupo sirolimo isoladamente não houve nenhum caso de neoplasia<sup>36</sup>.

Em estudo, prospectivo e randomizado, a conversão de inibidores da calcineurina para sirolimo resultou em menor número de tumores cutâneos em

comparação ao grupo controle ao fim do período de estudo de um ano, além da regressão de tumores cutâneos já existentes<sup>37</sup>.

Assim parece que esta classe de droga exerce efeito protetor sobre neoplasias cutâneas e não cutâneas especialmente aquelas que têm início ou são resultado da atividade viral. Seu mecanismo anti-angiogênico também pode levar a regressão ou mesmo a progressão mais lenta de neoplasias pré-existentes.

## 1.1 HIPÓTESE DO ESTUDO

Dado o exposto, não existe consenso na literatura quanto ao esquema de imunossupressão para o paciente idoso e levando-se em conta as particularidades desta população, propomos um estudo onde incluímos os inibidores da mTOR como parte do esquema imunossupressor.

O objetivo foi avaliar os parâmetros cardiovasculares e a eficácia e segurança da associação de tacrolimo e sirolimo em baixas doses em idosos transplantados renais comparados a associação micofenolato e tacrolimo. Esta combinação foi realizada com doses reduzidas dos imunossupressores visando minimizar os efeitos colaterais e respeitando os mais recentes estudos de minimização<sup>38</sup>.

## 2. OBJETIVOS

## 2.1. OBJETIVO PRIMÁRIO (PERFIL CARDIOVASCULAR)

O objetivo primário foi avaliar o efeito do uso de sirolimo associado ao tacrolimo em baixas doses na variação da espessura médio intimal da carótida e da massa ventricular esquerda indexada após 6 e 12 meses de transplante renal.

## 2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

O objetivo secundário foi avaliar a função renal medida pela taxa de filtração glomerular estimada pela formula 4 de MDRD após 6 e 12 meses do transplante renal no receptor idoso.

Outro objetivo foi avaliar e comparar a incidência de infecção por CMV através da antigenemia para CMV (pp65) em ambos os grupos.

Também foram analisados a sobrevida do paciente e do enxerto, a incidência de rejeição aguda comprovada por biópsia e incidência de retardo de função do enxerto.

### 3. PACIENTES E MÉTODOS



### 3. PACIENTES E MÉTODOS

Tratou-se de ensaio clínico, aberto, randomizado de centro único que avaliou o efeito do uso de sirolimo associado ao tacrolimo em baixas doses somados a prednisona no perfil cardiovascular avaliado através da variação da espessura médio intimal da carótida (cIMT) e da massa ventricular esquerda indexada (LVMI) após 6 e 12 meses de transplante renal no receptor idoso.

#### População

Foram avaliados pacientes com idade igual ou superior a 60 anos e submetidos a transplante renal com doador falecido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os pacientes elegíveis foram randomizados no momento do transplante e seguidos por 12 meses de março de 2013 a outubro de 2015. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa local sob o número 16966913.6.0000.5411. Este estudo foi registrado no Clinical Trials em ClinicalTrials.gov (NCT02683291). A admissão ao estudo foi feita mediante a aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido no momento do transplante renal (Anexo I).

#### Randomização

Os pacientes elegíveis foram incluídos no estudo na razão de 1:1. A randomização foi realizada por blocos de 10 pacientes, por grupo de tratamento, gerado por software validado acessível no website [www.randomization.com](http://www.randomization.com). O sigilo da randomização foi garantido por envelopes opacos de forma a impedir que os

pesquisadores responsáveis pela inclusão dos pacientes não puderam prever para qual grupo o paciente foi alocado.

### **Critérios de Inclusão**

Os pacientes foram considerados elegíveis no momento do transplante foram aqueles que preencheram os seguintes critérios:

- 1- Idade maior ou igual a 60 anos
- 2- Ter sido submetido a transplante renal com doador falecido.

### **Critérios de Exclusão**

No momento do transplante, foram excluídos:

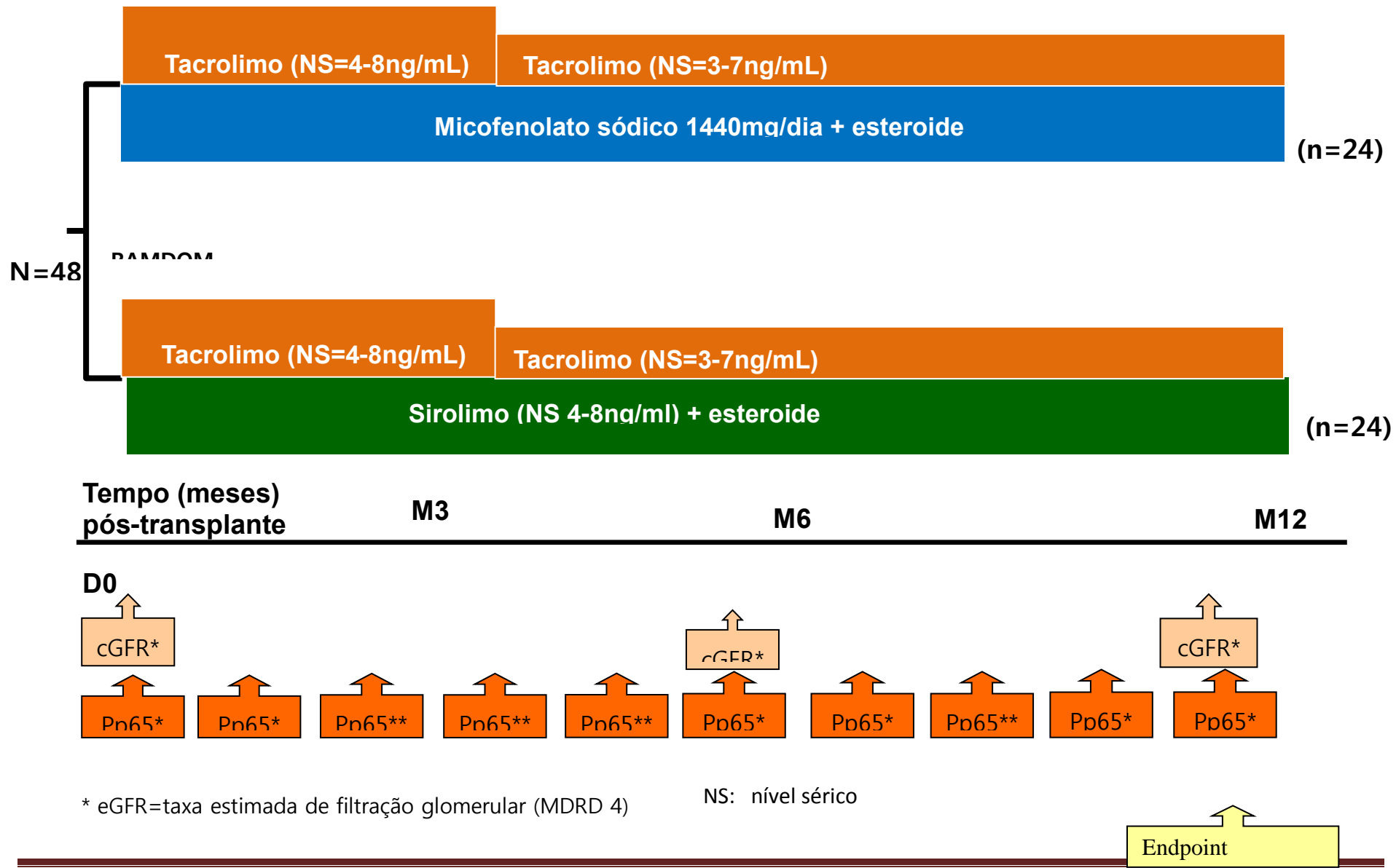
- 1-Receptores de múltiplos órgãos
- 2-Doadores ABO incompatíveis; doadores de coração parado; ou ainda aqueles com doadores com idade inferior a 5 anos ou superior a 65 anos.
- 3- Pacientes com Índice de Massa Corpórea (IMC) > 35

## Intervenção

**Grupo controle (Micofenolato):** Tacrolimo (começando com 0,1mg/kg/dia dividido em duas tomadas ajustadas segundo nível sérico objetivando níveis de 4-8ng/ml até o terceiro mês e 3-7ng/ml do terceiro ao término do estudo), micofenolato sódico 1440mg/dia dividido em duas tomadas e prednisona 30mg/dia (no primeiro mês com reduções semanais até atingir 5mg/dia ao fim do terceiro mês). Basiliximabe 20mg no dia do transplante e no quarto dia. Pacientes com painel de reatividade maior que 50% receberam Timoglobulina (imunoglobulina humana antitimócitos) em substituição ao Basiliximabe na dose de 1mg/kg/dia por 5 dias. Foi aceito a redução da dose do micofenolato sódico até 720 mg/d devido a possíveis efeitos colaterais da droga.

**Grupo Tratamento (Sirolimo):** Tacrolimo (começando com 0,1mg/kg/dia dividido em duas tomadas ajustadas segundo nível sérico objetivando níveis de 4-8 ng/ml até o terceiro mês e 3-7 ng/ml do terceiro ao término do estudo), sirolimo 2mg/dia (ajustado segundo nível sérico objetivando níveis de 4-8 ng/ml em todo período do estudo) e prednisona 30mg/dia (no primeiro mês com reduções semanais até atingir 5mg/dia ao fim do terceiro mês). Basiliximabe 20mg no dia do transplante e no quarto dia. Pacientes com painel de reatividade maior que 50% receberão Timoglobulina (imunoglobulina humana antitimócitos) em substituição ao Basiliximabe na dose de 1mg/kg/dia por 5 dias.

Figura 01- Delineamento do Estudo transplante renal com paciente idoso



## Níveis séricos dos imunossupressores

As doses do inibidor da via da calcineurina (tacrolimo utilizadas no presente estudo seguem as mais recentes recomendações do estudo ELITE-SYMPHONY<sup>38</sup> visando minimização da imunossupressão. As doses de tacrolimo no estudo SYMPHONY estão entre 3-7ng/ml junto com micofenolato e indução com bloqueadores do receptor da interleucina 2. Utilizamos a dose de 4-8ng/ml até o terceiro mês e após 3-7ng/ml até o fim do estudo conjuntamente com bloqueadores do receptor da interleucina 2 (Basiliximabe).

A administração simultânea de tacrolimo com sirolimo mostrou-se segura<sup>39</sup> e a dose preconizada de sirolimo quando administrado conjuntamente com inibidores de calcineurina deve ser menor. A dose de 2mg/dia juntamente com tacrolimo mostrou-se a melhor dose inicial segundo o estudo de Vitko e colaboradores mantendo níveis séricos em torno de 4ng/ml<sup>40</sup>. No presente estudo utilizamos a dose de fixa de 2mg/dia objetivando níveis séricos de 4-8ng/ml em conjunto com tacrolimo também em doses reduzidas.

## Desfecho Primário (Perfil Cardiovascular)

Foram feitas medidas da espessura médio intimal da carótida (cIMT) no início e aos 6 meses e 12 meses em todos os pacientes. Todas as medições de ultrassom foram realizadas na artéria carótida comum e foram realizadas usando um dispositivo GE Vivid I com transdutor linear de 7 MHz. As imagens obtidas foram avaliadas segundo o Consenso de espessura médio intimal da carótida - Mannheim (2004-2006)<sup>41</sup>. A cIMT foi medida a partir de múltiplos segmentos da parede posterior de ambos os lados da

artéria carótida comum a 1 cm antes da bifurcação em abordagem longitudinal. Com o uso de software de computador, o valor médio, máximo e o desvio padrão da cIMT foram calculados. Para a análise, a variável dependente considerada a média da cIMT em ambos os lados. Todas as medidas foram avaliadas por um único pesquisador que desconhecia os grupos.

Foram realizados exames de ecocardiograma no início com 6 e 12 meses após o transplante para avaliações da massa ventricular esquerda indexada. O ecocardiograma foi realizado com o Equipamento Vivid S6 da General Electric (GE), com transdutor cardiológico com frequência de 3 MHz. O paciente permaneceu em decúbito lateral esquerdo, utilizando-se a janela acústica para-esternal esquerda, obtendo-se o plano transversal (eixo menor) em nível do músculo papilar com determinação dos diâmetros diastólico (DdVE) e sistólico (DsVE) do VE e espessura diastólica do septo interventricular (S) e parede posterior (PP), através do modo M, com posterior determinação da massa ventricular (MV) pela fórmula de Devereux:  $MV = 0,8 \times (1,04 \times ((DdVE + S + PP)^3 - DdVE^3)) + 0,6$ . A massa ventricular foi posteriormente corrigida pela superfície corporal para obter a massa ventricular esquerda indexada (LVMI). A superfície corporal foi estimada pela fórmula de DuBois. A espessura relativa do ventrículo (ERP) foi calculada pela fórmula  $= (S + PP) / DdVE$ . O valor considerado para aumento de ERP foi de 0,42. Foi considerado Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo (HVE) a massa ventricular indexada maior que  $115\text{g/m}^2$  em homens e  $95\text{g/m}^2$  em mulheres segundo recomendações da sociedade americana de ecocardiografia. Os padrões de remodelamento cardíaco foram definidos: Normal (ausência de HVE e ERP menor que 0,42); Remodelamento Concêntrico (ausência de HVE e ERP maior que 0,42); Hipertrofia concêntrica (presença de HVE e ERP maior que

0,42) e Hipertrofia Excêntrica (presença de HVE e ERP menor que 0,42). Os exames de ecocardiograma foram realizados pelo mesmo cardiologista experiente, cego para o tratamento do paciente.

## **Desfechos secundários**

### **Análise da Função Renal**

Foram feitas avaliações da função renal através da creatinina sérica e pela estimativa da taxa de filtração glomerular (eGFR) utilizando a fórmula 4 do MDRD. Conjuntamente nas avaliações foram feitas dosagens dos eletrólitos, índice albuminúria/creatininúria em todas as avaliações segundo a sequência: Avaliações semanais do primeiro ao segundo mês, quinzenais do terceiro ao sexto mês e mensais até o término do estudo. Dosagens de colesterol total e frações foram feitas a cada 3 meses.

### **Avaliação de Infecção por CMV**

Foram feitas antígenemias para citomegalovírus (CMV) semanalmente do primeiro ao terceiro mês e após mensalmente até o término do estudo. A técnica utilizada foi a antígenemia pp65 por imunofluorescência e pesquisa em sangue periférico coletado no mesmo dia da análise. Foi considerada positividade qualquer valor diferente de zero. Para os casos positivos foi feito tratamento com ganciclovir 5mg/kg/dia de 12/12hs ajustado para função renal pelo período mínimo de 14 dias ou até uma semana após a negatificação da antígenemia.



### **Outros desfechos secundários**

Também foram avaliados a sobrevida do paciente e sobrevida do enxerto óbito censurado. Foram analisados o número de episódios de rejeição aguda comprovados por biópsia e a incidência de retardo de função do enxerto.

Foram analisados a incidência dos principais efeitos colaterais tais como: dislipidemia através do colesterol total e frações e triglicérides, a incidência de diabetes após o transplante e a taxa de infecção de ferida operatória.

### **Variáveis Clínicas**

No início da randomização, semanalmente após a alta hospitalar por 2 meses e após mensalmente até 1 ano após a conversão todos os pacientes foram submetidos a: avaliação clínica com exame físico completo, antropometria, aferição de pressão arterial e frequência cardíaca. Também foram feitas análises bioquímicas com dosagem de creatinina, clearance de creatinina estimado, lipidograma, hemograma completo, dosagem de sirolimo e/ou tacrolimo, urinálise e índice albuminúria/creatininúria.

## **No momento da randomização**

### **Dados dos Doadores**

Idade, sexo, raça, comorbidades (hipertensão, diabetes, doenças infecciosas virais ou bacterianas), função renal (creatinina no momento da captação), causa morte, uso de drogas vasopressoras e biópsia do enxerto quando disponível.

### **Dados dos Receptores**

Idade, sexo, raça, causa da doença renal, comorbidades (hipertensão, diabetes, presença de doenças vasculares), tempo de diálise, modalidade de terapia substitutiva, história de transplante prévio, sorologias para Hepatite B e C, HIV, CMV, painel de reatividade; número de incompatibilidades do sistema HLA (“mismatches”) e drogas usadas para a indução.

## **Após o Transplante**

Ocorrência de retardo da função do enxerto, ocorrência de rejeição comprovada por biópsia, creatinina sérica, níveis glicemia, colesterol total e frações e índice albuminúria/creatininúria. Ocorrências de eventos cardiovasculares e infecção por citomegalovírus (detectada por antigenemia para CMV).

## **Análises Estatísticas**

### **Tamanho da amostra**

O cálculo do número amostral foi obtido considerando-se o desfecho cardiovascular de redução de massa do ventrículo esquerdo com base nos dados de Paoletti et al<sup>21</sup> para uma média de redução da massa ventricular esquerda indexada de  $8,5\text{mg}/\text{m}^2$  e o desvio padrão de  $7\text{mg}/\text{m}^2$  (alfa de 0,05 e poder de 0,955). Considerou-se também uma taxa de perda de seguimento de 20%. Definiu-se a inclusão de um total de 48 pacientes.

### **Análise exploratória dos Dados**

Dentre as variáveis contínuas foi utilizado o teste t para as paramétricas (comparando os dois grupos) e o teste de Mann-Whitney para as não paramétricas (comparando os dois grupos). Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriados. A análise de sobrevida foi feita pela curva de Kaplan-Meier utilizando-se como comparador o log-rank test. Para a sobrevida do enxerto considerou-se a sobrevida censurada o óbito. Para as análises de medidas repetidas (creatinina, eGFR, proteinúria e perfil lipídico) no decorrer dos meses foi utilizada a análise de modelos lineares mistos. Foram consideradas as medidas repetidas no decorrer de 3 avaliações (basal, 6 e 12 meses) utilizando-se como variável dependente a medida de estudo e como fator fixo o tempo e o grupo (micofenolato ou sirolimo).

### **Análise estatística do desfecho primário**

Primeiro, para a análise cIMT, consideramos a diferença média entre a última e a primeira observações (12 meses e linha de base) e as comparações foram feitas entre os grupos com o teste de Mann-Whitney. Segundo, para avaliar a variação da cIMT e da massa ventricular esquerda indexada (LVMI) ao longo do tempo, usamos o modelo misto generalizado. Esta análise considera as medidas repetidas e a estrutura de covariância. Como a cIMT e a LVMI tem distribuição não normal, o modelo foi ajustado com a distribuição gama com ligação logarítmica. Para as medidas repetidas, foi utilizada a estrutura de covariância diagonal. Como efeitos fixos utilizamos o grupo (micofenolato ou sirolimo) e o tempo de avaliação (basal, 6 meses e 12 meses). Em uma análise adicional de cIMT para ajustar as variáveis de confusão, adicionamos como efeitos fixos idade, sexo, presença de diabetes, tabagismo, uso de estatinas, uso de IECA ou BRA, eGFR e pressão arterial média. O modelo misto foi escolhido porque permite a análise de todos os dados, incluindo aqueles de pacientes com valores ausentes. As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS, versão 20 (IBM, Armonk, NY). O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

Foram alocados de forma consecutiva todos os pacientes maiores de 60 anos que consentiram em participar do estudo. Foram randomizados 46 pacientes sendo excluídos: 2 pacientes que não transplantaram por presença de infecção (um caso de infecção do trato urinário e um caso de herpes-zoster) e um caso com menos de um mês de seguimento assim analisados um total de 44 casos.

Quanto as características basais dos dois grupos não houve diferenças quanto a idade sendo a média de  $65 \pm 4$  anos para o grupo micofenolato e  $66 \pm 4$  anos no grupo sirolimo. A maior parte dos casos em ambos os grupos eram do sexo masculino e da raça branca. Houve predominância de Hipertensão arterial e diabetes como causa da doença de base correspondendo a aproximadamente 60% dos casos em ambos os grupos (Tabela 01). O painel de reatividade classe I foi baixo com a mediana 0 [0-0] {0-88} no grupo micofenolato e 0 [0-0] {0 -57} no grupo sirolimo.

A indução predominante foi feita com basiliximabe e todos os casos foram transplantados com doador falecido. Quanto as características do doador também não houve diferenças estatísticas com relação a média de idade (41 anos em ambos os grupos) e predominância de causa morte por traumatismo crâneo encefálico (TCE) em ambos os grupos (Tabela 01).

**Tabela 01. Características Basais da População e dados do doador em transplantados renais idosos em relação aos grupos micofenolato e sirolimo.**

Características do Receptor		Micofenolato (n=23)	Sirolimo (n=21)	p
Idade (anos)		65±4	66±4	0,35
Sexo Masculino		78,3%	76,2%	0,87
Raça Branca		78,3%	85,7%	0,52
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		25,25±2,6	25,49±8,3	0,82
Tempo Dialise (meses)		27,8 [20,4-47,8]	30,6 [21,4-58,9]	0,69
Doença de Base	Hipertensão	30,4%	57,1%	0,38
	Diabetes	39,1%	19,0%	
	Glomerulonefrite	8,7%	9,5%	
	Indeterminada	13,0%	4,8%	
	Outras	8,7%	9,5%	
Retransplante (%)		0	4,8%	0,29
Painel (%)		0 [0-0] {0-88}	0 [0-0] {0-57}	0,12
Mismatches (n)		3 [2-3]	3 [2-3]	0,18
Indução	Basiliximabe	91,3%	81,0%	0,31
	Timoglobulina	8,7%	19,0%	
Doador Falecido		100,0%	100,0%	1,0
<b>Características do Doador</b>				
Idade Doador (anos)		41±12	41±11	0,85
Causa de Morte Doador	TCE	47,8%	38,1%	0,48
	CerebroVascular	47,8%	47,6%	
	Outros	4,3%	14,3%	
Creatinina Doador (mg/dl)		1,58±0,8	1,61±1,1	0,98

Dados expressos em média ± desvio padrão; mediana [percentil 25% e percentil 75%] e mediana [percentil 25% e percentil 75%] {valor mínimo e valor máximo}.

### Desfecho Primário

A diferença média entre a cIMT aos 12 meses e da avaliação basal foi de  $-0,03 \pm 0,19$  mm no grupo micofenolato e de  $-0,11 \pm 0,08$  mm no grupo do sirolimo ( $p = 0,05$ ) (Figura 2). A média da cIMT diminuiu ao longo do tempo aos 6 e 12 meses em ambos os grupos, mas apenas no grupo do sirolimo esta diferença foi estatisticamente

significativa ( $p = 0,012$ ) (Tabela 2 e Figura 3). Na análise ajustada para idade, sexo, presença de diabetes, uso de estatina, IECA, tabagismo, pressão arterial média e eGFR, observou-se redução da cIMT apenas no grupo sirolimo ( $p = 0,016$ ) (Tabela 3). Outra maneira de visualizar os dados é através de um mapa de calor, que mostrou uma queda mais intensa de cIMT no grupo sirolimo ao longo do tempo (Figura 4).

A massa ventricular esquerda indexada (LVMI) mostrou redução ao longo do tempo em ambos os grupos,  $p=0,005$  (momento basal x 12 meses) sem diferenças entre os grupos micofenolato e sirolimo (Tabela 2, figura 5). Não houve diferenças na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (formula de Teicholz ou Simpson) ou na espessura relativa da parede (ERP) ao longo do tempo ou entre grupos. A prevalência de hipertrofia do ventrículo esquerdo no início do estudo foi de 64,4% e aos 12 meses de 53,33% sem diferenças entre os grupos. Quando a geometria do ventrículo esquerdo a predominância foi de hipertrofia concêntrica no início do estudo com 37,8% e o padrão normal esteve presente em apenas 15,5%. Ao fim de 12 meses a hipertrofia concêntrica continuou sendo o padrão predominante em 42,2% e houve um aumento do padrão de geometria normal (31,1%) sem diferenças entre os grupos (Figura 6).



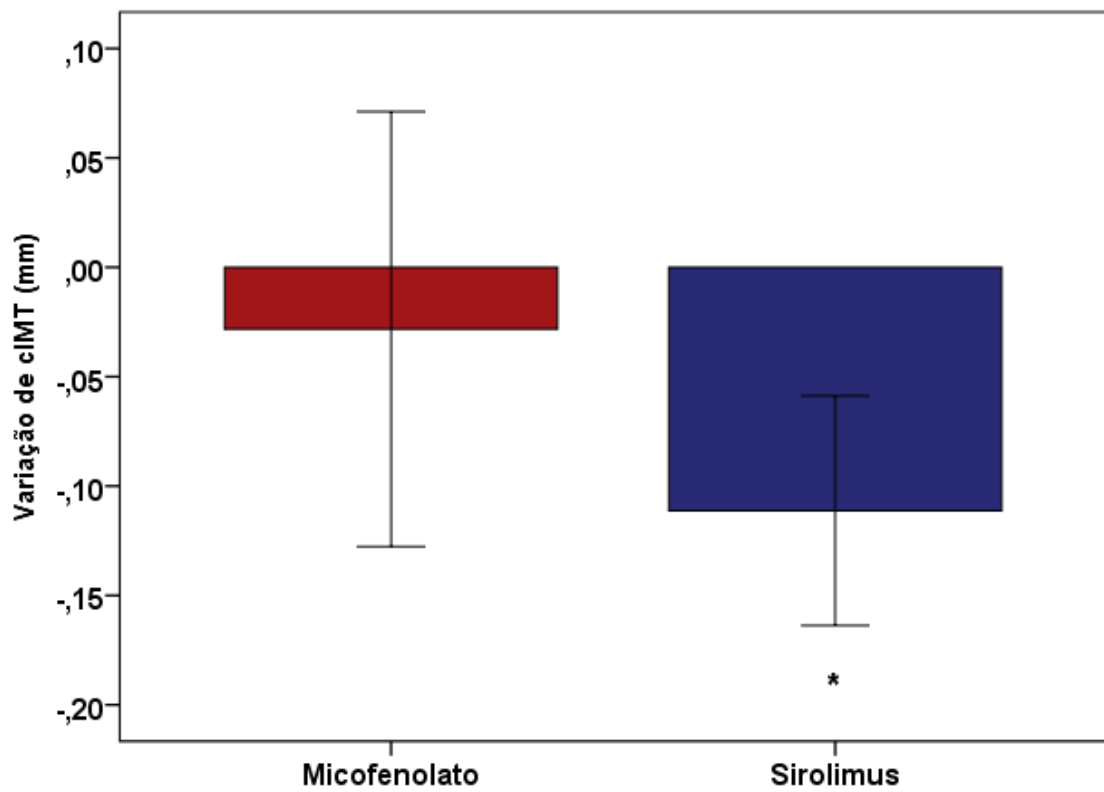


Figura 2. Alteração média da espessura médio-intimal da carótida (cIMT) entre 12 meses e no início do estudo nos grupos micofenolato e sirolimo. \*  $p = 0,05$  x grupo micofenolato.

**Tabela 2. Medidas sequenciais, medicações concomitantes e dados ecocardiográficos no grupo do tacrolimo associado a micofenolato (grupo micofenolato) e no grupo tacrolimo associado a sirolimo (grupo sirolimo).**

		Micofenolato (n=23)	Sirolimo (n=21)	p
<b>Medicações Concomitantes</b>				
Estatina (uso no início do estudo)		52.2%	59.1%	0.420
Estatina (uso no fim do estudo)		69.6%	72.7%	0.815
iECA/BRA		60.9%	45.5%	0.300
Número de anti hipertensivos		1.8±1	1.4±0.7	0.190
<b>Medidas sequenciais</b>				
Índice Proteína/creatinina urinária (mg/mg)	3 Meses	0.42±0.369	1.1±1.9	0.125
	6 Meses	0.13±0.15	0.19±0.22	entre
	12 Meses	0.22±0.77	0.20±0.37	grupos
eGFR (ml/min)	3 Meses	52±26	46±19	0.182
	6 Meses	64±23	54±14	entre
	12 Meses	60±15	60±17	grupos
Pressão arterial média (mmHg)	3 Meses	102±5.8	102±6.9	0.121
	6 Meses	98±4.8 <sup>+</sup>	91±18 <sup>+</sup>	entre
	12 Meses	91±3.4 <sup>+</sup>	90±3.3 <sup>+</sup>	grupos
Colesterol Total (mg/dl)	Basal	179±62	206±34	*0.023
	6 Meses	170±45	189±34*	entre
	12 Meses	149±38	176±32*	grupos
HDL colesterol (mg/dl)	Basal	52±16	69±18	*0.01
	6 Meses	46±11	62±24*	Entre
	12 Meses	45±25	59±28*	grupos
LDL Colesterol (mg/dl)	Basal	83±53	104±20	0.185
	6 Meses	89±37	94±26	entre
	12 Meses	69±30	75±28	grupos
TG (mg/dl)	Basal	234±159	158±59	0.245 entre
	6 Meses	173±52	161±44	grupos
	12 Meses	167±40	181±77	

**Dados Ecocardiográficos**

<b>FE Teicholz (%)</b>	<b>Basal</b>	64±10.4	64±12	0.965 entre grupos
	<b>6 Meses</b>	60±12	62±6.8	
	<b>12 Meses</b>	66±13	63±10	
<b>FE Simpson (%)</b>	<b>Basal</b>	63±10	67±11	0.179 entre grupos
	<b>6 Meses</b>	62±7	66±8	
	<b>12 Meses</b>	65±11	65±9.7	
<b>LVM</b>	<b>Basal</b>	255±92	231±64	0.81 entre grupos
	<b>6 Meses</b>	200±61	220±88	
	<b>12 Meses</b>	213±64	227±69	
<b>LVMi</b>	<b>Basal</b>	140±57	126±43	0.404 entre grupos
	<b>6 Meses</b>	104±44#	104±58#	
	<b>12 Meses</b>	104±51#	95±60#	
<b>ERP</b>	<b>Basal</b>	0,53±0,12	0,47±0,12	0.891 entre grupos
	<b>6 Meses</b>	0,49±0,10	0,50±0,10	
	<b>12 Meses</b>	0,50±0,07	0,53±0,11	

**Ultrassom de Carótida**

<b>cIMT (mm)</b>	<b>Basal</b>	0.82±0.27	0.77±0.14	*0.012 entre grupos
	<b>6 Meses</b>	0.81±0.16	0.72±0.12*	
	<b>12 Meses</b>	0.78±0.15	0.69±0.13*	

Análise repetida do colesterol total, eGFR, proteína / creatinina e espessura médio intimal da carótida no início do estudo, 6 e aos 12 meses. cIMT: espessura íntima-média carotídea; eGFR (taxa de filtração glomerular estimada); HLA, antígeno leucocitário humano; IECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA: antagonistas do receptor da angiotensina II; LVM: massa do ventrículo esquerdo; LVMi: massa do ventrículo esquerda indexada; ERP: espessura relativa da parede do ventrículo; FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo +: p <0,001 ao longo do tempo; #: p=0,005

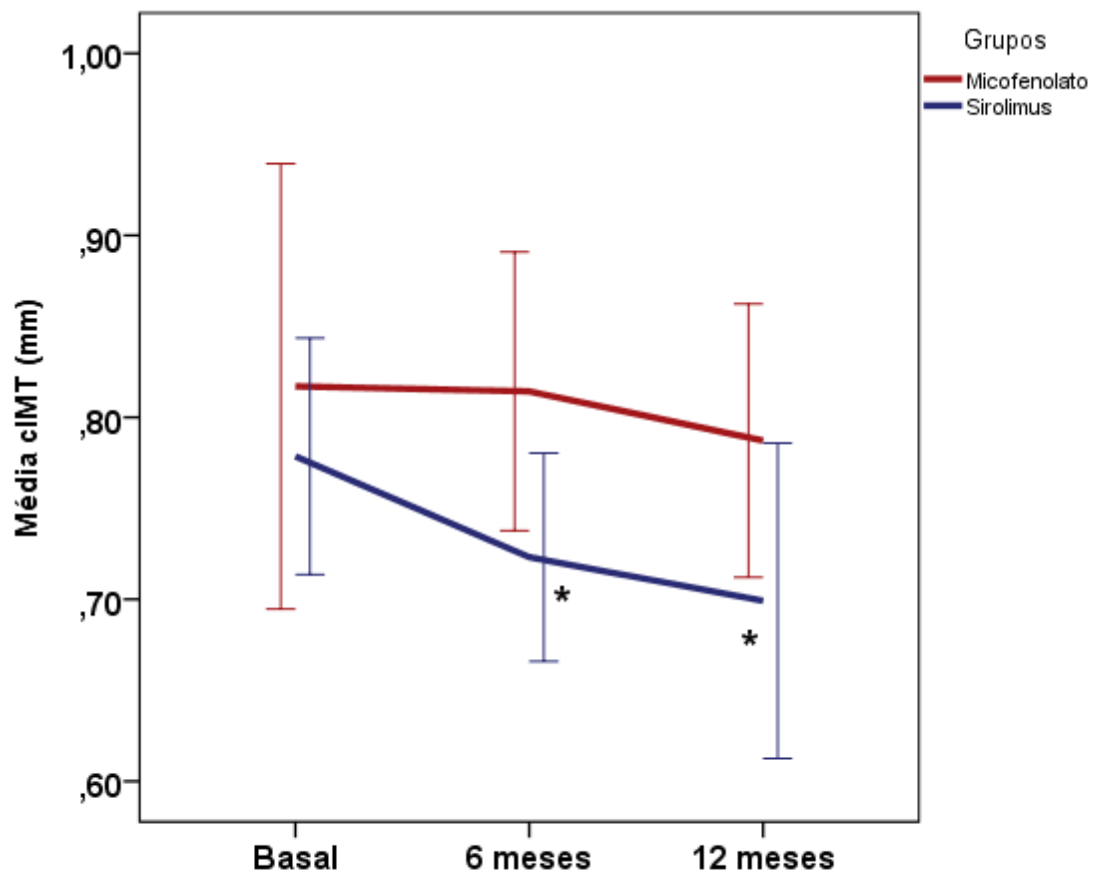


Figura 3. Evolução da espessura média intimal da carótida (cIMT) em relação aos três momentos e entre os grupos (vermelho: micofenolato; azul: sirolimo). Análise de modelos generalizados mistos. \*  $p = 0,012$  x grupo micofenolato.

**Tabela 3. Análise da espessura médio-intimal da carótida como medidas repetidas considerando as covariáveis usando modelo misto generalizado com distribuição gama e função log-link.**

Efeitos fixos	F	df1	df2	Valor p
Corrected model	1.888	11	86	0.052
Tempo (basal, 6 e 12 meses)	0.508	2	86	0.604
Grupo Sirolimo	6.023	1	86	0.016
Tabagismo	1.985	1	86	0.162
Diabetes	1.549	1	86	0.217
Uso de Estatina	0.086	1	86	0.769
Idade	0.244	1	86	0.623
Sexo	1.117	1	86	0.293
IECA/BRA	0.946	1	86	0.334
Pressão arterial média	3.645	1	86	0.060
eGFR	0.495	1	86	0.484

Distribuição de probabilidade: gama

Função de Link: log

eGFR (taxa de filtração glomerular estimada); IECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA: antagonistas dos receptores da angiotensina II

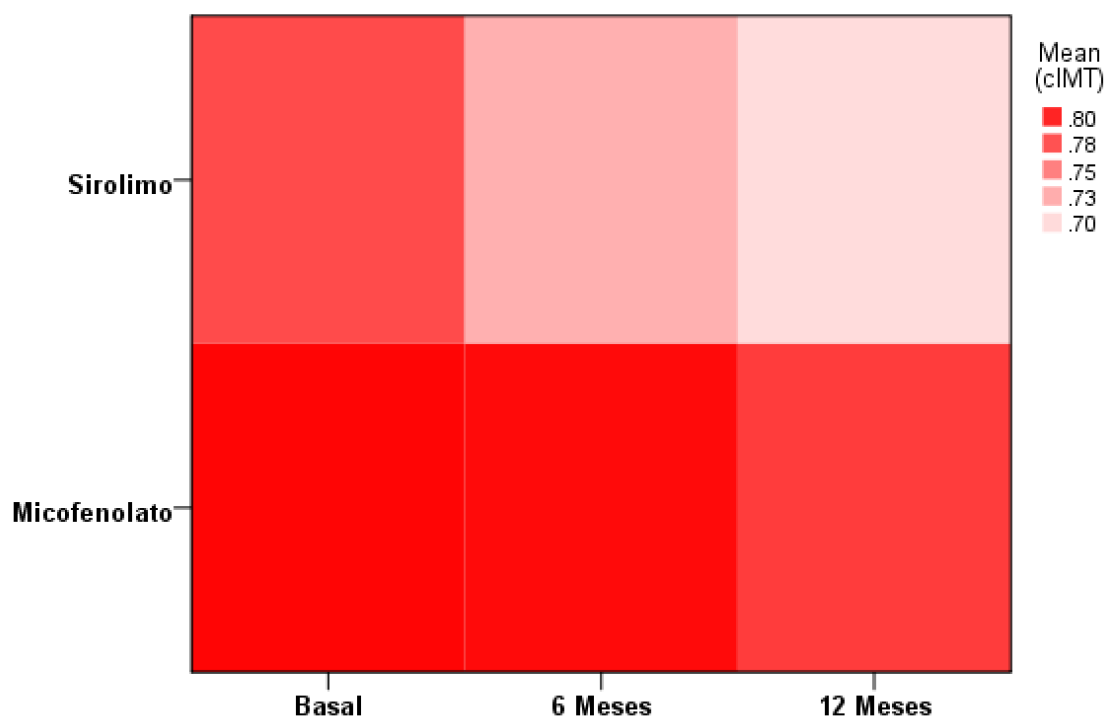


Figura 4. Mapa de calor (HeatMap) mostrando o valor médio da espessura íntima-média da carótida (cIMT) nos grupos sirolimo e micofenolato ao longo do tempo (basal, 6 meses e 12 meses). Valores mais altos de cIMT são representados em vermelho mais escuro. Observamos diminuição da cIMT em ambos os grupos; a mudança foi mais significativa no grupo do sirolimo ( $p=0,012$ ).

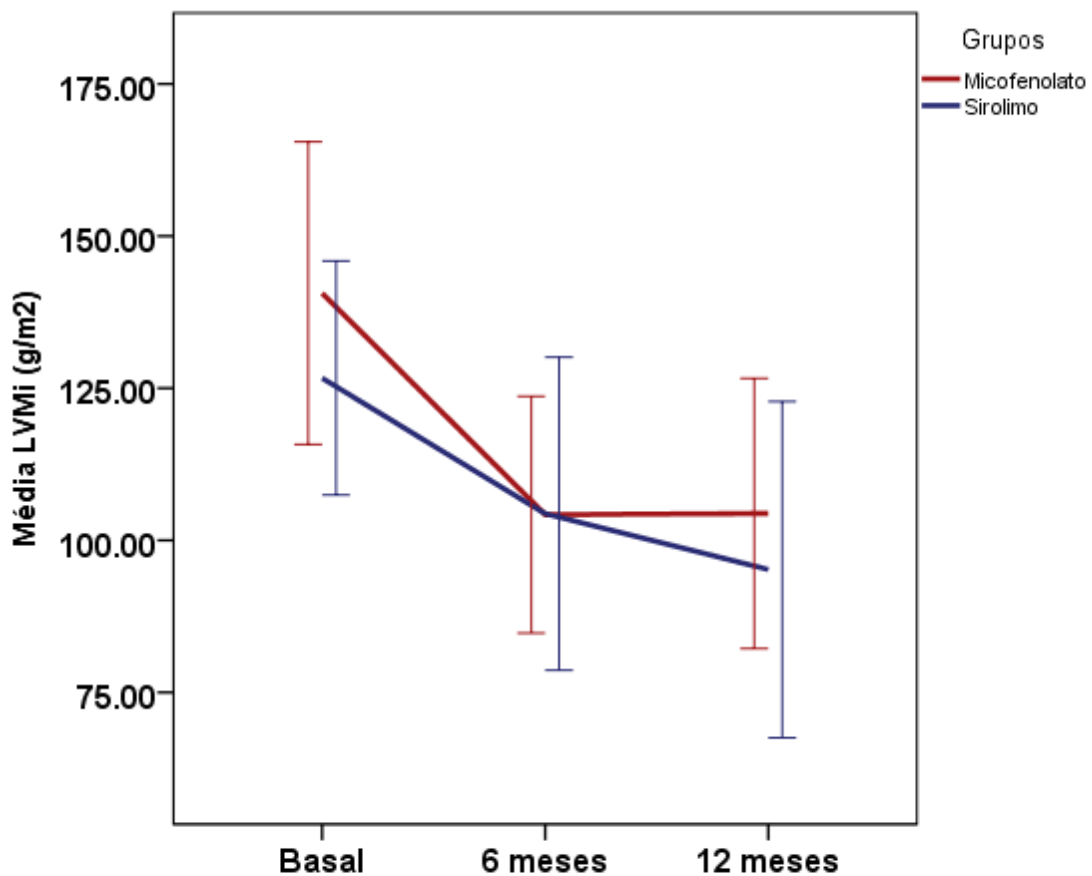
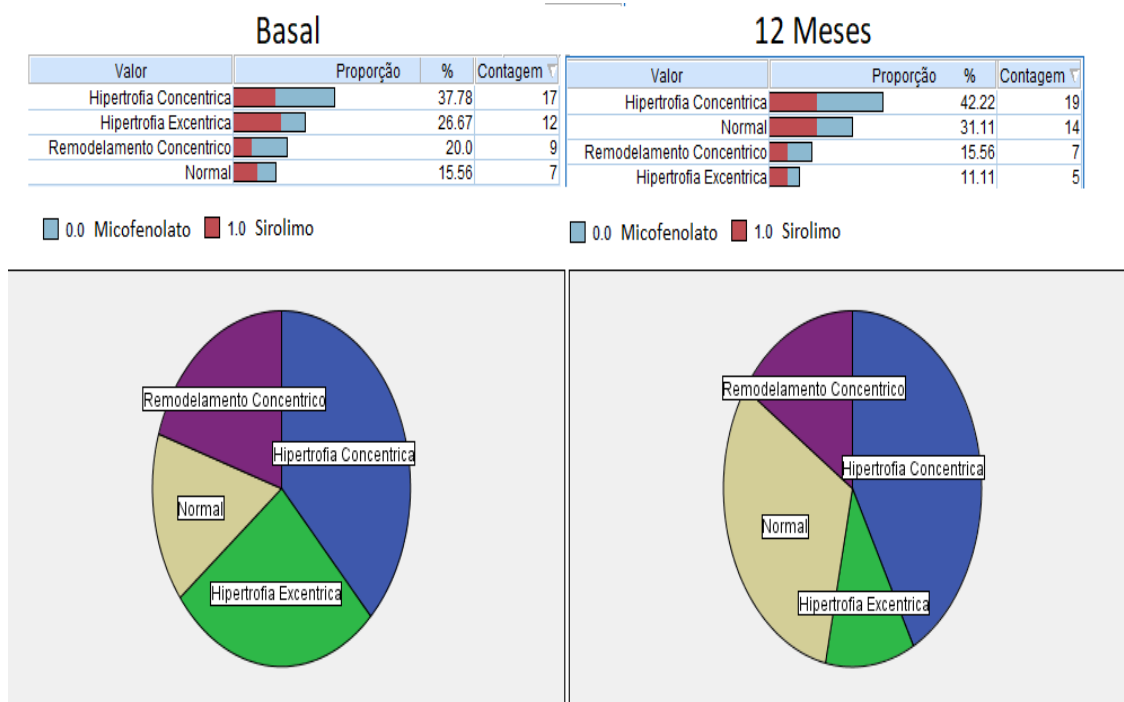


Figura 5. Evolução da massa ventricular esquerda indexada (LVMi) em relação aos três momentos e entre os grupos (vermelho: micofenolato; azul: sirolimo). Análise de modelos generalizados mistos.  $p = 0,005$  ao longo do tempo em ambos os grupos (basal x 6 e 12 meses).



**Figura 6. Padrão da Geometria do ventrículo esquerdo no momento basal e após 12 meses. No canto superior observamos as percentagens de Hipertrofia Concêntrica, Hipertrofia Excêntrica, Remodelamento Concêntrico e Geometria Normal nos momentos basal e 12 meses. Em azul os pacientes do grupo micofenolato e vermelho do grupo sirolimo. No canto inferior a mesma representação em formato de gráfico de pizza com as percentagens do remodelamento nos momentos basal e 12 meses sem divisão por grupos.**

### Desfechos secundários

Quanto aos desfechos secundários observamos uma taxa de retardo de função do enxerto de 60,9% no grupo micofenolato e 57,1% no grupo sirolimo sem diferenças estatísticas. O tempo de alta foi semelhante entre os grupos. As taxas de rejeição comprovadas por biópsia foram baixas e não diferentes entres os grupos. A creatinina, a eGFR e o índice proteinúria/creatininúria com 30 dias após o transplante foram

semelhantes entre os grupos (Tabela 02). O óbito ocorreu em 4,3% no grupo micofenolato (n=1) e em 19% (n=4) no grupo sirolimo. O paciente do grupo micofenolato faleceu de causa indeterminada com 2 meses de transplante com o enxerto funcionante. No grupo sirolimo dos 4 óbitos, dois foram de causas hemorrágicas no pós-operatório (sangramento após cirurgia por distúrbio de coagulação e por hemorragia digestiva alta evoluindo com choque hemorrágico). Os outros dois casos deste grupo ocorreram: com um mês após transplante de causa indeterminada (possível cardiovascular); e outro com 6 meses devido choque séptico após hérnia encarcerada. Excluindo as causas relacionadas a cirurgia (óbitos intra-hospitalares com n=2) as taxas de mortalidade foram 4,35% no grupo micofenolato de 10,5% no grupo sirolimo  $p=0,49$ . As taxas de infecção de ferida operatória e diabetes após o transplante também não foram diferentes entre os grupos (tabela 4). Já analisando as taxas de infecção por citomegalovírus (CMV) houve maior incidência de infecção por CMV no grupo micofenolato (60,9% no grupo micofenolato e 16,7% no grupo sirolimo,  $p=0,004$ ). Pertencer ao grupo micofenolato conferiu um risco relativo de 3,54 [1,2 – 10,3] vezes maior para desenvolver infecção por CMV.



**Tabela 4. Desfechos clínicos em transplantados renais idosos em relação aos grupos micofenolato e sirolimo.**

	<b>Micofenolato (n=23)</b>	<b>Sirolimo (n=21)</b>	<b>p</b>
Rejeição Aguda+	0	4,8%	0,29
Retardo de Função do Enxerto	60,9%	57,1%	0,82
Tempo de Internação (dias)	15±7	18±11	0,26
Creatinina com 30 dias (mg/dl)	1,7±1,1	1,7±0,9	0,55
eGFR com 30 dias (ml/min)	52±26	46±19	0,44
Proteinúria com 30 dias	0,37 [0,11-0,59]	0,36[0,22-1,25]	0,48
Óbito até 1 ano	4,3%	19%	0,12
Óbito (excluindo causas transoperatório)	4,3%	10,5%	0,49
Infecção por Citomegalovírus	60,9%	16,7%	0,004*
Infecção de Ferida Operatória	28,6%	7,1%	0,14
Diabetes após Transplante	13%	23,8%	0,35

eGFR: taxa de filtração glomerular estimada

+ Comprovada por biópsia; \* qui-quadrado

Dados expressos em média ± desvio padrão; mediana [percentil 25% e percentil 75%]

A sobrevida do paciente em 12 meses não foi diferente entre os grupos com 95,7% no grupo micofenolato e 79,6% no grupo sirolimo,  $p=0,13$ . A sobrevida do enxerto óbito censurado em 12 meses foi de 100% no grupo micofenolato e 90,5% no grupo sirolimo,  $p=0,13$ .

Pela análise de modelos mistos, avaliando a função renal no decorrer de um ano de seguimento, não observamos efeitos alterações da creatinina entre os grupos ( $p=0,17$ ) e também no decorrer do tempo ( $p=0,58$ ). A média da creatinina ao fim de 12 meses foi de  $1,2\pm 0,29$ mg/dl no grupo micofenolato e  $1,2\pm 0,37$ mg/dl no grupo sirolimo,  $p=NS$ . Quando avaliamos a função renal pelo Clcreatinina ao fim de 12 meses a média foi de  $60,8\pm 15,37$ ml/min no grupo micofenolato e  $60,8\pm 17$ ml/min no grupo sirolimo,

$p=NS$ . Não houve diferença da função renal em relação ao tempo ( $p=0,1$ ) e em relação aos grupos ( $p=0,18$ ) (Tabela 2).

Quando avaliamos a proteinúria ao fim de 12 meses a média foi de  $0,22\pm 0,7$ mg/mg no grupo micofenolato e  $0,20\pm 0,37$ mg/mg no grupo sirolimo,  $p=NS$ . Houve melhora da proteinúria em relação ao tempo em ambos os grupos com melhora do primeiro mês em relação aos demais ( $p=0,04$ ) sem diferenças entre os grupos ( $p=0,32$ ) (Tabela 2).

Para o colesterol total a média ao fim de 12 meses foi de  $149\pm 36$ mg/dl no grupo micofenolato e  $175,18\pm 31,2$  no grupo sirolimo. O efeito do tempo não foi diferente ( $p=0,13$ ) porém o colesterol total foi maior no grupo sirolimo ao longo do tempo em relação ao grupo micofenolato ( $p=0,02$ ) (Tabela 2). O colesterol total foi na média  $27,5\pm 8,4$  mg/dl menor no grupo micofenolato pela análise de modelos lineares mistos,  $p=0,002$

Para o HDL colesterol a média ao fim de 12 meses foi de  $45\pm 10,6$ mg/dl no grupo micofenolato e  $58,5\pm 27,3$  no grupo sirolimo. Houve redução do HDL com o passar do tempo ( $p=0,048$ ). O HDL colesterol foi maior no grupo sirolimo ao longo do tempo em relação ao grupo micofenolato ( $p<0,0001$ ) (Tabela 2). O HDL colesterol foi na média  $13,1\pm 83,7$ mg/dl menor no grupo micofenolato,  $p<0,0001$ .

Para o Triglicérides a média ao fim de 12 meses foi de  $167,2\pm 40,9$ mg/dl no grupo micofenolato e  $173,2\pm 78,2$  no grupo sirolimo. Não houve alteração do triglicérides com o passar do tempo ( $p=0,25$ ) (Tabela 2) Também não houve diferenças do triglicérides entre os grupos no decorrer do tempo,  $p=0,7$ .

## 6. DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos as medidas de espessura médio intimal da carótida e da massa ventricular esquerda indexada no início e aos 6 e 12 meses após o transplante em 44 pacientes. Observamos uma redução nas medidas da cIMT ao longo do tempo no grupo em uso do sirolimo. Apesar dos níveis de colesterol total mais elevados neste grupo, a cIMT diminuiu. Houve redução da massa ventricular esquerda indexada em ambos os grupos porém não devido ao efeito de classe pelo uso de sirolimo.

Vários estudos experimentais em animais mostraram uma redução da aterosclerose com o uso de mTORI<sup>22,23</sup>. A aterogênese reduzida com o mTORI tem uma base teórica na redução da quimiotaxia de monócitos e na redução do mecanismo inflamatório<sup>24</sup>. A tradução clínica desse fato ainda é incerta, pois poucos ensaios clínicos avaliaram esse desfecho. O estudo de transplante cardíaco A2310 foi um dos poucos ensaios clínicos que avaliaram a aterogênese no transplante<sup>42</sup>. Este estudo avaliou 189 pacientes utilizando ultrassonografia endovascular no início do estudo e após 12 meses. No mês 12, o aumento da espessura intimal das artérias coronárias foi significativamente menor no grupo em uso de everolimus do que no grupo em uso de micofenolato. Por outro lado, Szymczak e cols<sup>43</sup> não encontraram redução da cIMT após o transplante renal com uso de sirolimo. No entanto, este estudo foi realizado entre 3 e 24 anos após o transplante, e a falta de um desenho prospectivo pode dificultar as comparações e a tomada de conclusões deste estudo.

A espessura médio intimal (IMT) fornece um desfecho alternativo aos eventos cardiovasculares em ensaios clínicos, pois este pode detectar sinais precoces de aterosclerose. Vários ensaios clínicos utilizaram o IMT para avaliar o risco cardiovascular<sup>44,45</sup> e apoiam o conceito de que as medidas IMT podem ser usadas como um marcador substituto da aterosclerose.<sup>46</sup>

No presente estudo, houve redução da cIMT em todos os pacientes (ambos os grupos) devido ao efeito do transplante, o que já foi observado em estudos anteriores que compararam a cIMT antes e após o transplante<sup>47</sup>. Assim postula-se que a redução da cIMT pode ser um dos fatores responsáveis pela redução do risco cardiovascular após o transplante renal. No presente estudo, também observamos um efeito de classe em que o grupo sirolimo teve uma redução maior na cIMT e este efeito se manteve no modelo ajustado para os principais fatores associados à variabilidade da cIMT<sup>48</sup> tais como tabagismo, pressão arterial, diabetes, idade, função renal e dislipidemia. Os mTORI (sirolimus e everolimus) tem sido amplamente utilizado em stents coronarianos revestidos em procedimentos de revascularização para reduzir a reestenose do lúmen.<sup>49,50</sup> Nestes ensaios, o mTORI preveniu a proliferação neointimal e a restenose. A administração oral de rapamicina por 14 dias após o implante de stents metálicos coronários reduziu significativamente os parâmetros angiográficos e clínicos da reestenose.<sup>51</sup> Além disso, essa classe de medicamentos previne a hiperplasia intimal e reduz a aterosclerose em modelos animais<sup>22,23,52</sup> e clínicos<sup>42</sup>. Esses possíveis efeitos podem explicar nossas observações. Portanto, a dislipidemia causada pelo mTORI pode não se traduzir em aterogênese porque a droga aumenta a estabilidade das placas ateroscleróticas, reduz o risco de ruptura e promove a

depuração de macrófagos além de limitar a resposta inflamatória nas células musculares lisas das paredes arteriais<sup>52,53</sup>.

Outro ponto a considerar na fisiopatologia da aterogênese relacionada ao uso do mTORI é o tempo de exposição e a dose desses medicamentos. O mTORI inibe preferencialmente a via mTORC1, que é responsável pelos principais efeitos benéficos, incluindo as respostas anti-ateroscleróticas. A inibição de mTORC2, que é insensível a via da rapamicina, está relacionada ao aumento da resistência à insulina e pode ser responsável por alguns efeitos indesejáveis. O tratamento em longo prazo com mTORI pode inibir o mTORC2 e pode ser responsável pelo desenvolvimento da resistência ao mTORC1, revertendo assim seu papel benéfico na aterosclerose<sup>54</sup>. Isto pode explicar a ausência de efeito sobre a aterosclerose em ensaios clínicos com um longo tempo de exposição ao mTORI<sup>43</sup>. Também explica os efeitos benéficos na redução da aterosclerose quando o mTORI foi utilizado em dosagens controladas por um período mais curto, como no estudo A2310<sup>42</sup> e no presente trabalho.

A despeito do resultado positivo deste estudo sobre a cIMT, alguns estudos recentes não demonstraram benefício do mTORI relacionado aos outros desfechos cardiovasculares. O estudo ELEVATE mostrou ausência de redução do índice de massa ventricular esquerda e da rigidez arterial medida pela velocidade da onda de pulso entre os grupos (tacrolimus e everolimus)<sup>55</sup>. Em estudo semelhante Cruzado e cols. com um desenho de estudo aberto em 24 meses não demonstraram redução do índice de massa ventricular esquerda em um grupo de conversão de tacrolimus para everolimus<sup>56</sup>. Semelhante a estes estudos não encontramos no presente trabalho redução da massa ventricular esquerda por efeito de classe devido ao uso de sirolimo.

Porém com relação a redução da HVE em ambos os grupos, estudos anteriores<sup>57, 58</sup> já mostraram redução da hipertrofia do ventrículo esquerdo por efeito do transplante renal. Adicionalmente Vaidya et al<sup>58</sup> demonstrou que o único preditor de redução da HVE foi o nível de hipertrofia pre-transplante. No presente estudo houve melhora do padrão da geometria ventricular embora sem diferenças entre os grupos. A geometria normal do ventrículo esquerdo aumentou de 15 para 30% aproximadamente aos 12 meses as custas da redução do remodelamento concêntrico e da hipertrofia excêntrica. Cruzado et al<sup>56</sup> também havia encontrado após 24 meses uma melhora da geometria do ventrículo devido ao aumento da morfologia normal por efeito do transplante.

### **Segurança e Eficácia**

Neste estudo a combinação de tacrolimo e sirolimo em doses reduzida (níveis séricos 3-7ng/ml e 4-8ng/ml respectivamente) se mostrou seguro em comparação a combinação de tacrolimo com micofenolato na população de transplantados renais idosos. Esta segurança foi avaliada por taxas semelhantes de rejeição comprovada por biópsia, sobrevida do paciente, sobrevida do enxerto e função renal ao longo de 12 meses de estudo. Estudos prévios comparando a combinação de tacrolimo com everolimo apontavam para semelhantes resultados de segurança<sup>13, 14</sup>. Outros estudos, no entanto comparando a associação de tacrolimo com sirolimo mostram resultados inferiores com relação as taxas de rejeição e maiores taxas de eventos adversos e descontinuidade<sup>15, 16, 17</sup>. No estudo de Gallon e colaboradores a combinação de tacrolimo e sirolimo mostrou-se inferior a combinação de tacrolimo com micofenolato

em relação a sobrevida do enxerto e função renal ao fim de 36 meses que foi cerca de 10ml/min inferior no grupo tacrolimo em associação ao sirolimo. Neste estudo os níveis séricos de tacrolimo foram em torno de 8-10ng/ml nos primeiros 3 meses e concentrações de sirolimo de 7-10ng/ml<sup>16</sup> o que poderia, em teoria, potencializar a nefrotoxicidade do inibidor de calcineurina. De forma diferente no estudo de Sampaio e colaboradores a sobrevida do enxerto e rejeição aguda foram semelhantes nos grupos tacrolimo e micofenolato e nos grupos tacrolimo e sirolimo, entanto, a combinação de tacrolimo com sirolimo resultou em maior creatinina sérica, maior proteinúria e dislipidemia<sup>17</sup>. Outro estudo multicêntrico randomizado que avaliou a eficácia e segurança do sirolimo em combinação a dose reduzida de tacrolimo e dose padrão de tacrolimo com sirolimo mostrou que a sobrevida do paciente, do enxerto e as taxas de rejeição foram semelhantes entre os grupos. A redução de 50% da exposição ao tacrolimo resultou em melhor função renal com a mesma eficácia da dose padrão de tacrolimo<sup>59</sup>. Outro estudo com longo tempo de seguimento comparando tacrolimo com micofenolato contra tacrolimo com sirolimo sem prednisona mostrou melhor sobrevida do enxerto e função renal superior no grupo tacrolimo com micofenolato. As concentrações de tacrolimo neste estudo foram de 8-10ng/ml nos primeiros três meses<sup>60</sup>. Em recente metanálise de estudos com inibidores da calcineurina associados a mTORI comparados com associação com micofenolato apontam para maior perda do enxerto e taxas de função renal inferior no grupo sirolimo bem como maior incidência de efeitos colaterais como dislipidemia e proteinúria. Nesta mesma metanálise a maior parte dos estudos incluídos contavam com maiores níveis de tacrolimo na ordem de 6-10ng/ml<sup>61</sup>. Assim a combinação de tacrolimo e sirolimo apresenta na literatura diferentes perfis de segurança sendo



possivelmente inferior na população de transplantados com alto risco imunológico e segura na população de risco moderado a baixo. Para uma população de moderado risco associado a terapia de indução com basiliximabe a manutenção de doses baixas de inibidores de calcineurina parece segura<sup>62</sup>. Assim os estudos com baixa dosagem de tacrolimo (3-7ng/ml) junto com baixas dosagens de sirolimo apontam para resultados melhores com taxas semelhantes de função renal<sup>59, 63</sup>. Já estudos com níveis mais elevado de tacrolimo e sirolimo apontam para resultados inferiores de função renal e sobrevida do enxerto<sup>16, 60</sup>. Não vimos diferenças na função renal, sobrevida do enxerto e paciente com níveis de tacrolimo entre 4-8ng/ml e sirolimo nesta mesma faixa. Sugere-se que esta faixa seja uma combinação ideal para evitar rejeição e impedir a nefrotoxicidade<sup>64</sup>. As análises de concentrações séricas efetivas do presente estudo mostram que a dose prescrita foi próxima da dose efetivamente utilizada.

### **Avaliação de Eventos Adversos**

Quanto aos principais eventos adversos relacionados aos inibidores da mTOR<sup>12</sup> não foram observadas diferenças neste estudo em relação a infecção de ferida operatória, incidência de retardo de função do enxerto, diabetes após o transplante, proteinúria, creatinina sérica e função renal ao longo de 12 meses. A proteinúria numericamente maior no grupo sirolimo no primeiro mês não apresentou diferenças em relação ao tempo bem como a função renal que mostrou níveis semelhantes entre os grupos.

Achado significativo no presente estudo foi a redução na incidência de infecção por citomegalovírus no grupo sirolimo da ordem de 40%. Vários estudos prévios já observaram uma redução do risco para o desenvolvimento de infecção por CMV nos

esquemas utilizando inibidores da mTOR<sup>27-29</sup>. Em recente metanálise a autor considera dispensável a monitorização para CMV no grupo de pacientes em uso de inibidores da mTOR seja em associação ou sem inibidores da via da calcineurina<sup>65</sup>. Outra metanálise de estudos utilizando mTORI comparado com micofenolato junto com inibidores da calcineurina apontou que o uso de mTORI reduziu o risco de infecção por CMV com OR=0,43<sup>61</sup>.

Uma possível explicação para este fato é que o uso de inibidores da mTORI associa-se a maior contagem de células CD4+ e CD8+ específicas contra o CMV justificando um possível mecanismo de ação dos inibidores da mTORI na prevenção de infecções por CMV<sup>66</sup>.

### **Limitações**

A principal limitação deste estudo é que foi um estudo unicêntrico com um pequeno número de pacientes. Nós também avaliamos apenas as medidas de cIMT e alguns autores relatam que as placas carotídeas são mais correlacionadas à doença coronariana em idosos<sup>67</sup>. Também outras métricas de placas derivadas de ultrassonografia, como a espessura íntima-média máxima, que são preditores de doença cardiovascular, não foram avaliadas neste estudo<sup>68</sup>. Entretanto, foi um estudo prospectivo randomizado em uma população idosa de transplante renal com alto risco cardiovascular. As medidas repetidas de cIMT foram tomadas em três vezes para cada paciente, e usamos um método estatístico robusto para analisar as diferenças ao longo do tempo. Este é um dos poucos estudos que avaliaram a aterosclerose relacionada ao mTORI com um desenho prospectivo controlado.

## 7. CONCLUSÃO

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o uso de sirolimus/tacrolimo de novo no transplante renal está associado com uma redução na cIMT após 12 meses com uma diferença mais significativa do que a observada na combinação de micofenolato e tacrolimo. Isto sugere um efeito de classe do mTORI na prevenção da aterosclerose. Houve redução da massa ventricular em ambos os grupos ao fim do estudo e aumento da morfologia normal do ventrículo. Não houve efeito de classe do sirolimo sobre a redução da massa ventricular. Os resultados deste estudo devem ser confirmados com outros estudos com foco em desfechos clínicos e em pacientes de alto risco cardiovascular.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sesso, R. C., Lopes, A. A., Saldanha, F. & Lugon, J. R. 2010 report of Brazilian dialysis census. *J Bras Nefrol* **33**, 442–447 (2011).
2. GA, K. Kidney Transplantation in the Older Adult. *Am J Kidney Dis* (2012).
3. Tonelli, M. *et al.* Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am. J. Transplant* **11**, 2093–109 (2011).
4. Wolfe, R., Ashby, V. & Milford, E. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. ... *Engl. J. ...* **341**, 1725–1730 (1999).
5. Rao, P. S. *et al.* Renal transplantation in elderly patients older than 70 years of age: results from the Scientific Registry of Transplant Recipients. *Transplantation* **83**, 1069–74 (2007).
6. Meier-Kriesche, H. U. & Kaplan, B. Immunosuppression in elderly renal transplant recipients: are current regimens too aggressive? *Drugs Aging* **18**, 751–9 (2001).
7. Danovitch, G. M., Gill, J. & Bunnapradist, S. Immunosuppression of the elderly kidney transplant recipient. *Transplantation* **84**, 285–91 (2007).
8. Morales, J. M., Campistol, J. M., Andrés, a & Herrero, J. C. Immunosuppression in older renal transplant patients. *Drugs Aging* **16**, 279–87 (2000).
9. Meier-Kriesche, H.-U. *et al.* Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am. J. Transplant* **6**, 1111–31 (2006).
10. Meier-Kriesche, H.-U. *et al.* Mycophenolate mofetil vs azathioprine in a large population of elderly renal transplant patients. *Nephrol. Dial. Transplant* **19**,

- 2864–9 (2004).
11. Saxena, R. *et al.* Renal transplantation in the elderly. *Int. Urol. Nephrol.* **41**, 195–210 (2009).
  12. Hernández, D. *et al.* Clinical evidence on the use of anti-mTOR drugs in renal transplantation. *Nefrologia* **31**, 27–34 (2011).
  13. Lorber MI, Mulgaonkar S, Butt KM, Elkhammas E, Mendez R, Rajagopalan PR, Kahan B, Sollinger H, Li Y, Cretin N, T. H. Everolimus versus mycophenolate mofetil in the prevention of rejection in de novo renal transplant recipients: a 3-year randomized, multicenter, phase III study. *Transplantation* **80**, 244–52 (2005).
  14. Vítko, S. *et al.* Three-year efficacy and safety results from a study of everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am. J. Transplant* **5**, 2521–30 (2005).
  15. Guerra, G. *et al.* Randomized trial of immunosuppressive regimens in renal transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1758–68 (2011).
  16. Gallon, L. *et al.* Long-term renal allograft function on a tacrolimus-based, pred-free maintenance immunosuppression comparing sirolimus vs. MMF. *Am. J. Transplant* **6**, 1617–23 (2006).
  17. Sampaio EL, Pinheiro-Machado PG, Garcia R, Felipe CR, Park SI, Casarini DE, Moreira S, Franco MF, Tedesco-Silva H Jr, M.-P. J. Mycophenolate mofetil vs. sirolimus in kidney transplant recipients receiving tacrolimus-based immunosuppressive regimen. *Clin Transpl.* **22**, 141–9 (2008).
  18. McMullen, J. R. *et al.* Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* **109**,

- 3050–5 (2004).
19. Paoletti, E. *et al.* Effect of sirolimus on left ventricular hypertrophy in kidney transplant recipients: a 1-year nonrandomized controlled trial. *Am. J. Kidney Dis.* **52**, 324–30 (2008).
  20. Svensson, M., Jardine, A., Fellström, B. & Holdaas, H. Prevention of cardiovascular disease after renal transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **17**, 393–400 (2012).
  21. Paoletti, E. & Cannella, G. Regression of left ventricular hypertrophy in kidney transplant recipients: the potential role for inhibition of mammalian target of rapamycin. *Transplant. Proc.* **42**, S41-3 (2010).
  22. Elloso, M. M. *et al.* Protective effect of the immunosuppressant sirolimus against aortic atherosclerosis in apo E-deficient mice. *Am. J. Transplant* **3**, 562–9 (2003).
  23. Mueller MA, Beutner F, Teupser D, Ceglarek U, T. J. Prevention of atherosclerosis by the mTOR inhibitor everolimus in LDLR<sup>-/-</sup> mice despite severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **198**, 39–48 (2008).
  24. Andrés, V., Castro, C. & Campistol, J. M. Potential role of proliferation signal inhibitors on atherosclerosis in renal transplant patients. *Nephrol. Dial. Transplant* **21 Suppl 3**, iii14-7 (2006).
  25. Meier-Kriesche, H. U., Ojo, a O., Hanson, J. a & Kaplan, B. Exponentially increased risk of infectious death in older renal transplant recipients. *Kidney Int.* **59**, 1539–43 (2001).
  26. De Keyzer, K., Van Laecke, S., Peeters, P. & Vanholder, R. Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician’s update. *Am. J. Kidney*

- Dis.* **58**, 118–26 (2011).
27. Webster AC, Lee VW, Chapman JR, C. J. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* **81**, 1234–48 (2006).
  28. Fortun J, Martin-Davila P, Pascual J, Cervera C, Moreno A, Gavalda J, Aguado JM, Pereira P, Gurgu  M, Carratala J, Fogueda M, Montejo M, Blasco F, Bou G, T.-C. J. Immunosuppressive therapy and infection after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis* **12**, 397–405 (2010).
  29. Ozaki, K. S., C mara, N. O. S., Galante, N. Z., Camargo, L. F. a & Pacheco-Silva, A. Decreased Cytomegalovirus infection after antilymphocyte therapy in sirolimus-treated renal transplant patients. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 103–6 (2005).
  30. Berg D, O. C. Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol.* **47**, 18–20 (2002).
  31. Lieberthal, W. & Levine, J. S. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 2493–502 (2009).
  32. Guba, M. *et al.* Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* **8**, 128–35 (2002).
  33. Cullis, B. *et al.* Sirolimus-induced remission of posttransplantation lymphoproliferative disorder. *Am. J. Kidney Dis.* **47**, e67-72 (2006).
  34. Campistol, J. M., Gutierrez-Dalmau, A. & Torregrosa, J. V. Conversion to sirolimus: a successful treatment for posttransplantation Kaposi's sarcoma. *Transplantation* **77**, 760–762 (2004).



35. Kauffman, H. M., Cherikh, W. S., Cheng, Y., Hanto, D. W. & Kahan, B. D. Maintenance Immunosuppression with Target-of-Rapamycin Inhibitors is Associated with a Reduced Incidence of De Novo Malignancies. *Transplantation* **80**, 883–889 (2005).
36. Mathew, T., Kreis, H. & Friend, P. Two-year incidence of malignancy in sirolimus-treated renal transplant recipients: results from five multicenter studies. *Clin. Transplant.* **18**, 446–9 (2004).
37. Salgo, R. *et al.* Switch to a sirolimus-based immunosuppression in long-term renal transplant recipients: reduced rate of (pre-)malignancies and nonmelanoma skin cancer in a prospective, randomized, assessor-blinded, controlled clinical trial. *Am. J. Transplant* **10**, 1385–93 (2010).
38. van den Hoogen, M. & Hilbrands, L. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2519; author reply 2519–20 (2008).
39. McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, M. A. A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit* **24**, 346–50 (2002).
40. Vitko, S. *et al.* Tacrolimus combined with two different dosages of sirolimus in kidney transplantation: results of a multicenter study. *Am. J. Transplant* **6**, 531–8 (2006).
41. Touboul, P.-J. *et al.* Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, B. *Cerebrovasc. Dis.*

- 34**, 290–6 (2012).
42. Eisen HJ<sup>1</sup>, Kobashigawa J, Starling RC, Pauly DF, Kfoury A, Ross H, Wang SS, Cantin B, Van Bakel A, Ewald G, Hirt S, Lehmkühl H, Keogh A, Rinaldi M, Potena L, Zuckermann A, Dong G, Cornu-Artis C, L. P. Everolimus versus mycophenolate mofetil in heart transplantation: a randomized, multicenter trial. *Am J Transplant.* **13**, 1203–16 (2013).
43. Szymczak M<sup>1</sup>, Kluz J<sup>2</sup>, Małeckie R<sup>2</sup>, Wątoerek E<sup>3</sup>, Obremaska M<sup>4</sup>, Głuszek M<sup>3</sup>, Klinger M<sup>3</sup>, B. M. Effect of Immunosuppressive Treatment on Carotid Atherosclerosis in Renal Transplant Recipients. *Transpl. Proc* **48**, 1629–6 (2016).
44. Lorenz MW<sup>1</sup>, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, S. M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* **115**, 459–67 (2007).
45. Ren, L., Cai, J., Liang, J., Li, W. & Sun, H. Impact of cardiovascular risk factors on carotid intima-media thickness and degree of severity: A cross-sectional study. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
46. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, Najjar SS, Rembold CM, P. W. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr* **21**, 189–90 (2008).
47. Yilmaz, M. I. *et al.* A longitudinal study of inflammation, CKD-mineral bone disorder, and carotid atherosclerosis after renal transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 471–479 (2015).

48. Hernández, D. *et al.* Artery wall assessment helps predict kidney transplant outcome. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
49. Morice MC<sup>1</sup>, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnàr F, F. R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* **346**, 1773–80 (2002).
50. Costa RA<sup>1</sup>, Lansky AJ, Mintz GS, Mehran R, Tsuchiya Y, Negoita M, Gilutz Y, Nikolsky E, Fahy M, Pop R, Cristea E, Carlier S, Dangas G, Stone GW, Leon MB, Müller R, Techen G, G. E. Angiographic results of the first human experience with everolimus-eluting stents for the treatment of coronary lesions (the FUTURE I trial). *Am J Cardiol* **95**, 113–6 (2005).
51. Rodriguez, A. E. *et al.* Oral Rapamycin After Coronary Bare-Metal Stent Implantation to Prevent Restenosis. The Prospective, Randomized Oral Rapamycin in Argentina (ORAR II) Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**, 1522–1529 (2006).
52. Chen WQ<sup>1</sup>, Zhong L, Zhang L, Ji XP, Zhang M, Zhao YX, Zhang C, Z. Y. Oral rapamycin attenuates inflammation and enhances stability of atherosclerotic plaques in rabbits independent of serum lipid levels. *Br J Pharmacol* **156**, 941–51 (2009).
53. Verheye S<sup>1</sup>, Martinet W, Kockx MM, Knaapen MW, Salu K, Timmermans JP, Ellis JT, Kilpatrick DL, D. M. G. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *J Am Coll Cardiol* **49**, 706–15 (2007).
54. Kurdi, A., De Meyer, G. R. Y. & Martinet, W. Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **82**, 1267–1279 (2016).

55. Holdaas H1, de Fijter JW, Cruzado JM, Massari P, Nashan B, Kanellis J, Witzke O, Gutierrez-Dalmau A, Turkmen A, Wang Z, Lopez P, Bernhardt P, Kochuparampil J, van der Giet M, M. K. E. S. G. Cardiovascular Parameters to 2 years After Kidney Transplantation Following Early Switch to Everolimus Without Calcineurin Inhibitor Therapy: An Analysis of the Randomized ELEVATE Study. *Transplantation* **101**, 2612–2620 (2017).
56. Cruzado JM1, Pascual J2, Sánchez-Fructuoso A3, Serón D4, Díaz JM5, Rengel M6, Oppenheimer F7, Hernández D8, Paravisini A9, Saval N9, M. J. E. S. G. Controlled randomized study comparing the cardiovascular profile of everolimus with tacrolimus in renal transplantation. *Transpl Int* **29**, 1317–1328 (2016).
57. An, J. N. *et al.* The reciprocal interaction between LV remodelling and allograft outcomes in kidney transplant recipients. *Heart* **101**, 1826–1833 (2015).
58. Vaidya, O. U. *et al.* Effect of Renal Transplantation for Chronic Renal Disease on Left Ventricular Mass. *Am. J. Cardiol.* **110**, 254–257 (2012).
59. Russ, G. . *et al.* Reduced and standard target concentration tacrolimus with sirolimus in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* **35**, S115–S117 (2003).
60. Chhabra, D. *et al.* Long-Term Kidney Allograft Function and Survival in Prednisone-Free Regimens: Tacrolimus/Mycophenolate Mofetil versus Tacrolimus/Sirolimus. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 504–512 (2012).
61. Xie, X. *et al.* mTOR inhibitor versus mycophenolic acid as the primary immunosuppression regime combined with calcineurin inhibitor for kidney transplant recipients: a meta-analysis. *BMC Nephrol.* **16**, 91 (2015).
62. B, N. Induction therapy and mTOR inhibition: minimizing calcineurin inhibitor exposure in de novo renal transplant patients. *Clin. Transplant.* **27**, 16–29

- (2013).
63. Peddi VR, Wiseman A, Chavin K, S. D. Review of combination therapy with mTOR inhibitors and tacrolimus minimization after transplantation. *Transpl. Rev* **27**, 97–107 (2013).
  64. Shihab, F., Christians, U., Smith, L., Wellen, J. R. & Kaplan, B. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: Pharmacokinetics, exposure–response relationships, and clinical outcomes. *Transpl. Immunol.* **31**, 22–32 (2014).
  65. Andrassy J, Hoffmann VS, Rentsch M, Stangl M, Habicht A, Meiser B, Fischereeder M, Jauch KW, G. M. Is cytomegalovirus prophylaxis dispensable in patients receiving an mTOR inhibitor-based immunosuppression? a systematic review and meta-analysis. *Transplantation* **94**, 1208–17 (2012).
  66. Havenith SH, Yong SL, van Donselaar-van der Pant KA, van Lier RA, ten Berge IJ, B. F. Everolimus-treated renal transplant recipients have a more robust CMV-specific CD8+ T-cell response compared with cyclosporine- or mycophenolate-treated patients. *Transplantation* **95**, 184–91 (2013).
  67. Plichart M1, Celermajer DS, Zureik M, Helmer C, Jouven X, Ritchie K, Tzourio C, Ducimetière P, E. J. Carotid intima-media thickness in plaque-free site, carotid plaques and coronary heart disease risk prediction in older adults. The Three-City Study. *Atherosclerosis* **219**, 917–24 (2011).
  68. Polak JF1, Szklo M, Kronmal RA, Burke GL, Shea S, Zavodni AE, O. D. The value of carotid artery plaque and intima-media thickness for incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Am Hear. Assoc* **8**, (2013).



## 9. ANEXOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você realizará uma cirurgia de transplante de rim. Após essa cirurgia você receberá medicamentos chamados imunossupressores para evitar que rejeite o rim transplantado. Geralmente utilizamos a combinação de 3 medicamentos imunossupressores, sendo o tratamento padrão realizado com Tacrolimo (Tacrolimo®), Micofenolato Sódico (Myfortic®) e Prednisona (Meticorten®). Porém há novas medicações disponíveis no mercado como é o caso do Sirolimo (Rapamune®), que pode ser utilizado em substituição ao Micofenolato Sódico (Myfortic®) e que parece ter efeitos benéficos no coração do paciente, redução das infecções virais e diminuição da chance de desenvolver câncer de pele principalmente em pacientes com idade igual ou superior a 60 anos.

Você está sendo convidado a participar de um estudo em que estaremos avaliando os benefícios que o Sirolimo (Rapamune®) traz em comparação ao Micofenolato Sódico (Myfortic®) no paciente transplantado renal quanto à diminuição do tamanho do coração, das placas de gordura do organismo, da incidência de câncer de pele e de infecção pelo citomegalovírus.

Para avaliar o real benefício desta medicação nos quesitos citados acima, será realizado um estudo no Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP. No momento do transplante você será convidado a participar deste estudo e se concordar em participar será imediatamente sorteado para integrar um dos seguintes grupos:

- GRUPO 1: Tacrolimo, Micofenolato sódico e prednisona
- GRUPO 2: Tacrolimo, Sirolimo e prednisona

O estudo durará aproximadamente 12 meses.

Não assine este termo de consentimento a não ser que você tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e de receber respostas que esclareçam todas as suas dúvidas. Se escolher assinar e participar, uma cópia deste documento será entregue a você.

Gostaríamos que antes de optar por participar ou não do estudo, você esteja ciente que:

- A participação neste estudo é inteiramente voluntária. Você pode recusar-se a participar nesta pesquisa ou poderá desistir de sua participação em qualquer momento. Sua decisão não resultará na perda dos benefícios ou tratamento médico para o qual estava designado.

- O grupo de pesquisadores pode encerrar o estudo antes do período previamente determinado (aproximadamente 12 meses) se durante o mesmo for identificado qualquer situação de risco para o paciente relacionado à droga em estudo

-Os procedimentos planejados são semelhantes aos procedimentos de rotina de todos os pacientes transplantados, com realização de avaliação clínica habitual envolvendo exame físico, revisão de sinais vitais (pressão arterial e frequência cardíaca) e exames de sangue. Serão coletados aproximadamente 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) em todas as visitas. Também será coletado exame de urina tipo I e índice proteinúria/creatininúria. As visitas clínicas e coletas de sangue ocorrerão com 1, 3, 6 após o transplante renal. Você será instruído a anotar a quantidade de medicação de estudo que toma por dia.

- Os riscos associados à coleta de sangue são: hemorragia, lesão com hematoma, inchaço ou infecção no local de onde o sangue foi colhido. Todos os cuidados serão tomados para diminuir esses riscos.

- Além da avaliação clínica habitual, você será submetido a 3 exames dermatológicos completos, realizado por dermatologista deste serviço, sendo as avaliações durante a internação para o transplante renal, 6 e 12 meses após o transplante renal. Também serão realizados 3 exames de ultrassom Doppler de carótidas e ecocardiograma, sendo o primeiro durante a internação para o transplante e os demais com 6 e 12 meses após o transplante.

-Se você optar por participar deste estudo, terá suas consultas de rotina realizadas em ambulatório específico para os pacientes integrantes do estudo, realizado às quintas-feiras na secretaria de transplante renal.

-Todos os medicamentos desse estudo são aprovados no Ministério da Saúde do Brasil para uso em transplantes renais e são amplamente utilizados pelos transplantadores brasileiros.

-Qualquer informação importante, que for obtida no decorrer deste estudo, que possa influenciar a sua vontade de continuar participando neste estudo, lhe será comunicado.

-Não existe benefício direto na sua participação nesse estudo. No entanto, acreditamos que o resultado desse estudo nos ajudará a escolher o melhor tratamento no futuro. Você não será pago por sua participação neste estudo.

-Sua identidade não será divulgada. Sua participação nesse estudo será confidencial. Somente pessoas envolvidas na pesquisa terão acesso aos seus registros.

-Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, se precisar de quaisquer informações adicionais, ou ainda achar que sofreu algum dano relacionado à pesquisa, entre em contato a qualquer momento com os médicos: Dra. Christiane, Dr Luís Gustavo, Dra. Paula, Dr Henrique



ou Dra. Mariana no telefone (14) 3811-6547 e o Comitê de Ética em Pesquisa através do telefone (14) 3880-1608/1609.

-Todos os cuidados adequados serão tomados para garantir a sua segurança no decorrer deste estudo. Se você sofrer uma lesão durante este estudo, e sua lesão *for* um resultado direto dos efeitos do medicamento de estudo, o centro médico irá proporcionar lhe cuidado médico adequado sem qualquer despesa.

-Você não terá custos adicionais como resultado de sua participação nesta pesquisa médica. Todos os exames do estudo e testes laboratoriais de acompanhamento e os exames físicos realizados para esta pesquisa serão gratuitos durante sua participação.

-Em casos de emergência, favor contatar a qualquer momento o seu médico no telefone (14) 3811-6547 durante o horário comercial, ou procure o pronto socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP em qualquer horário.

Este termo de consentimento será assinado em duas vias, ficando uma delas com o paciente que assinar o termo.

## CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, li as informações acima e entendi o objetivo do estudo, assim como os riscos e benefícios esperados com minha participação nesta pesquisa clínica. Eu tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas, e todas as minhas perguntas foram respondidas. Assinando este termo, eu forneço meu consentimento informado em participar neste estudo e não abro mão de nenhum dos meus direitos como paciente. Eu receberei uma cópia datada e assinada deste termo de consentimento antes de iniciar qualquer avaliação ou procedimento de estudo.

Nome do paciente

\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Nome da testemunha\*

Assinatura

Data

*\* Aplicável somente em casos de Pacientes analfabetos ou semianalfabetos ou pacientes com deficiências auditivas ou visuais.*

Nome do pesquisador responsável pela obtenção do termo

---

Assinatura \_\_\_\_\_

Data

Endereço:

Tel.:

e-mail:

## 10. PUBLICAÇÃO

### **Effect of Sirolimus on Carotid Atherosclerosis in Kidney Transplant Recipients: Data Derived From a Prospective Randomized Controlled Trial**

Andre L Silva<sup>1+§</sup>, Daniéliso R Fusco<sup>1&</sup>, Hong S NGA<sup>1+</sup>, Henrique M Takase<sup>1+</sup>, Ariane M Bravin<sup>1+</sup>,  
Mariana M Contti<sup>1+</sup>, Mariana F Valiatti<sup>1+</sup>, Luis Gustavo M de Andrade<sup>1+&\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine - UNESP, Univ Estadual Paulista

<sup>+</sup>Participated in the performance of the research

<sup>&</sup>Analysis and interpretation of data

<sup>§</sup>Conception and design; Final approval of the version to be published

**\* Corresponding author**

Luis Gustavo Modelli de Andrade  
Department of Internal Medicine - UNESP, Univ Estadual Paulista  
Rubião Jr, s/n – Botucatu/SP  
ZIP Code: 18.618-970  
Brazil  
Tel/Fax: 55 (14) 3811-6547  
Email: [landrade@fmb.unesp.br](mailto:landrade@fmb.unesp.br)

**The results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract form.**

## **Abbreviations**

CMV, cytomegalovirus

cIMT, carotid intima-media thickness

eGFR, estimated glomerular filtration rate

HLA, human leukocyte antigen

IMT, intima-media thickness

MDRD, modification of diet in renal disease

mTORI, mammalian target of rapamycin inhibitors

**ABSTRACT**

**Background:** In animal models the mammalian target of rapamycin inhibitors (mTORI) may prevent atherogenesis by the regulation of homeostasis of cholesterol and by a reduced inflammatory response. The aim of this study is to compare the carotid intima-media thickness (cIMT) between de novo tacrolimus/mycophenolate and tacrolimus/sirolimus at low doses. The cIMT is considered a surrogate marker of atherosclerosis. **Methods:** We evaluated cIMT at baseline and at 6 and 12 months after kidney transplantation in a database derived from a previously published trial. That trial had prospectively randomly assigned kidney transplant recipients older than 60 years of age to one of two groups: tacrolimus/sirolimus (n=21) or tacrolimus/mycophenolate (n=23). The cIMT was evaluated by using ultrasound in the common carotid artery wall in both sides. **Results:** The total and high-density lipoprotein cholesterol levels were higher in the sirolimus group at 6 and 12 months. The cIMT decreased over time at 6 and 12 months in the sirolimus group ( $p = 0.012$ ); this decrease continued to be significant in a model adjusted for age, sex, presence of diabetes, statin use and smoking. **Conclusions:** The use of sirolimus plus tacrolimus de novo in kidney transplantation is associated with a reduction in cIMT after 12 months, a decrease more significant than seen with the combination of mycophenolate plus tacrolimus. This suggests a class effect of mTORI in the prevention of atherosclerosis.

**Keywords:** kidney transplantation; mammalian target of rapamycin inhibitors; Sirolimus; Atherosclerosis; Carotid Intima-Media Thickness.

## Introduction

The mammalian target of rapamycin inhibitors (mTORI; sirolimus and everolimus) have been used in renal transplantation for the past 20 years [1]. Recently, studies of the combination of these agents with calcineurin inhibitors at low doses in de novo transplantation have shown clinical advantages, such as lower rates of cytomegalovirus infections [2-4]. However, there are still doubts about the cardiovascular safety of mTORI. Some studies are favorable to mTORI and have shown reduction of left ventricular mass compared with patients not using mTORI [5-6]. The negative effects are dyslipidemia, increased incidence of diabetes after transplantation, and anemia caused by mTORI, which could increase cardiovascular risk [7]. However, many points need to be clarified regarding the hyperlipidemia caused by mTORI, which is a major risk factor for atherosclerosis.

In experimental models of atherosclerosis in mice, the administration of mTORI resulted in the reduction of aortic atherosclerosis independent of elevations in plasma cholesterol levels [8-9]. This suggests that mTORI could prevent atherogenesis by the regulation of homeostasis of cholesterol and by a reduced inflammatory response [10]. The primary effect is reduced accumulation of cholesterol in the artery wall [11] due to decreased expression of lipoprotein receptors and reduced monocyte chemotaxis to the atherosclerotic plaque [12]. However, few clinical trials show a reduction of atherosclerosis with the use of mTORI [13]. The aim of this study was to evaluate the carotid intima-media thickness (cIMT) in a prospective trial that compared de novo tacrolimus plus mycophenolate and tacrolimus plus sirolimus at low doses.

## Patients and Methods

### Study Design

This paper evaluated the repeated measures of cIMT at baseline and at 6 and 12 months after kidney transplantation. Data from this study were derived from the database of a previously published trial [4]. Briefly, this single-center, prospective, 12-month randomized controlled trial included patients older than age 60 years and sought to compare mTORI plus tacrolimus in elderly renal transplant patients in terms of safety and incidence of cytomegalovirus (CMV) infection. The protocol was reviewed and approved by the Institutional Review Board, and written informed consent was obtained from the patients before participation. The study was registered on ClinicalTrials.gov (NCT02683291). Eligible patients were randomly assigned (1:1) before surgery to one of the two treatment regimens.

### Treatments

The sirolimus group received tacrolimus (starting with 0.1 mg/kg twice daily adjusted to target serum levels of 4-8 ng/mL at the third month and then 3-7 ng/mL from the third month to the 12th month) and sirolimus 2 mg/day (adjusted serum levels to 4-8 ng/mL throughout the study period).

The mycophenolate (control) group was given tacrolimus (starting with 0.1 mg/kg twice daily adjusted to target serum levels of 4-8 ng/mL at the third month and then 3-7 ng/mL from the third month to the 12th month) and mycophenolate sodium 720 mg twice daily. In both group the immunosuppressors was initiated in the day after the transplant.

All patients in both groups received prednisone 30 mg/day induction therapy, consisting of basiliximab or antithymocyte globulin (Thymoglobulin, Genzyme).

Antithymocyte globulin was used in patients with panel reactivity class I greater than 50 %. The flow char of study was represented in figure 1.

### **Variables and measures**

We evaluated estimated glomerular filtration ratio (eGFR) by using the Modification of Diet in Renal Disease equation, spot urine protein/creatinine ratio, new-onset diabetes after transplantation (NODAT), mean arterial pressure and lipid profiles (total cholesterol and fractions). These measures were taken at 3, 6, and 12 months after transplantation. We evaluated the use of statins at baseline and at the end of study, the use of angiotensin-converting-enzyme inhibitor (ACEi) and angiotensin II receptor antagonists (ARA-II). The NODAT was defined by glucose levels more than 200 mg/dl after 2 hours of oral glucose tolerance test.

### **Evaluated endpoint**

We evaluated the cIMT at baseline and at 6 months and 12 months in all patients. All ultrasound measurements were of the common and internal carotid artery walls and were performed by using a GE Vivid I device with 7-MHz linear array transducer. The images obtained were evaluated according to the Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus (2004-2006) [14]. The cIMT was measured from multiple segments of the posterior wall of both sides of the common carotid artery at 1 cm before the bifurcation in the longitudinal view. With use of computer software, the mean value, maximum, and standard deviation of cIMT were calculated. For the analysis, the dependent variable was the mean of cIMT on both sides. All measures were evaluated by a single researcher who was blinded to the groups.



## Statistics

Continuous variables are presented as mean and standard deviation and categorical variables are presented as frequencies and percentages. A *t* test or the Mann-Whitney test was used for the analysis of continuous variables where appropriate. For categorical variables, the chi-square test or Fisher exact test was used where appropriate.

We used a mixed linear model with normal distribution for the analysis of repeated measures of eGFR, proteinuria and cholesterol. The group and time of observation were considered as fixed factors.

First, for cIMT analysis we considered the mean difference between the last and the first observations (12 months and baseline); comparisons were made between the groups with the Mann-Whitney test. Second, to assess the variation of the cIMT over time, we used the generalized mixed model. This analysis considers the repeated measures and the covariance structure. Because cIMT has non-normal distribution, the model was adjusted with the gamma distribution with logarithmic link. For the repeated measurements, the diagonal covariance structure was used. As fixed effects we used the group (mycophenolate or sirolimus) and the time of the evaluation (baseline, 6 months, and 12 months). In an additional analysis to adjust for confounding variables, we added as fixed effects age, sex, presence of diabetes, smoking, use of statins, use of ACEi or ARA-II, eGFR and mean arterial pressure. A mixed model was chosen because it allows the analysis of all data, including those of patients with missing values. Statistical analyses were performed using SPSS software, version 20 (IBM, Armonk, NY). The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## Results

The average patient age was  $65 \pm 4$  years in the mycophenolate group (n=23) and  $66 \pm 4$  years in the sirolimus group (n=21). The predominant sex was male; smoking, biopsy-proven acute rejection and baseline cholesterol did not differ between groups (Table 1). The use of concomitant medications like statins and angiotensin converting-enzyme inhibitor did not differ between groups. The mean arterial pressure decreased over time in both groups but did not differ between the two groups (Table 1). Total cholesterol was higher in the sirolimus group at 6 and 12 months. High-density lipoprotein cholesterol decreased over time in both groups but was higher in the sirolimus group than the mycophenolate group ( $p=0.01$ ). Triglycerides and LDL cholesterol did not differ between the groups and over time. The eGFR and urinary protein/creatinine ratio also did not differ between groups and over time (Table 1).

The mean difference between cIMT at 12 months and baseline was  $-0.03 \pm 0.19$  mm in the mycophenolate group and  $-0.11 \pm 0.08$  mm in sirolimus group ( $p=0.05$ ) (Figure 2). The mean cIMT decreased over time at 6 and 12 months in both groups, but only in the sirolimus group was this difference statistically significant ( $p=0.012$ ) (Table 1 and Figure 3). In the analysis adjusted for age, sex, presence of diabetes, statin use, ACEi, smoking, mean arterial pressure and eGFR a reduction in cIMT was seen only in the sirolimus group ( $p=0.016$ ) (Table 2). Another way to visualize the data is through a heatmap, which showed a more intensive drop of cIMT in the sirolimus group over time (Figure 4).

## Discussion

In this trial we analyzed the cIMT measurements at baseline and at 6 and 12 months after transplantation in 44 patients. We observed a reduction in cIMT measures over time in the group taking sirolimus. Despite the higher total cholesterol levels in this group, cIMT decreased.

Several experimental animal studies showed a reduction of atherosclerosis with the use of mTORI [8-9]. The reduced atherogenesis with mTORI has a theoretical basis in reducing monocyte chemotaxis and reducing the inflammatory mechanism [10]. The clinical translation of this fact is still uncertain because few clinical trials have evaluated this outcome. The A2310 cardiac transplant study was one of the few clinical trials that evaluated atherogenesis in transplantation [13]. This study assessed 189 patients by using endovascular ultrasound at baseline and 12 months. By month 12, the mean increase in maximal intimal thickness of the coronary arteries was significantly smaller in the everolimus group than in the mycophenolate group. Conversely, Szymczak et al [15] did not find a reduction of cIMT after renal transplantation with use of sirolimus. However, the study was performed 3 to 24 years after transplantation, and the lack of a prospective design makes comparisons difficult.

The IMT provides an alternative endpoint of cardiovascular outcomes in clinical trials because it may detect early signs of atherosclerosis. Several clinical trials have used IMT to assess cardiovascular risk [16-17] and support the concept that IMT measurements can be used as a surrogate marker of atherosclerosis [18].

In the present study, cIMT was decreased in all patients (both groups) because of the transplant effect, which has already been observed in previous studies that

compared cIMT before and after transplantation [19]. The reduction of cIMT may be one of the factors responsible for declining cardiovascular risk after kidney transplantation. In the present study we also observed a class effect in which the sirolimus group had a greater reduction in cIMT; this was also seen in a model adjusted for principal factors associated with variability of cIMT [20]. Additionally, this drug class prevents intimal hyperplasia [21] and reduces atherosclerosis in animal models [8-9,25] and in a clinical trial [13]. These possible effects may explain our observations. Therefore, the dyslipidemia caused by mTORI is not such a major problem because the drug enhanced stability of atherosclerotic plaques, reducing the risk of rupture by promoting macrophage clearance and limiting the inflammatory response within smooth muscle cells in the artery walls [22-23].

Another point to consider in the pathophysiology of atherogenesis related to mTORI use is the time of exposure and the dose of these medications. The mTORI preferentially inhibit the mTORC1 pathway, which is responsible for the major beneficial effects, including the anti-atherosclerotic responses. The inhibition of mTORC2, which was rapalog-insensitive, is related to increased insulin resistance and may be responsible for some serious undesired effects. Long-term treatment with mTORI may inhibit mTORC2 and may be responsible for the development of mTORC1 resistance, thus reversing its beneficial role in atherosclerosis [24]. This may explain the absence of effect on atherosclerosis in clinical trials with a long time of exposure to mTORI [15]. It also explains the beneficial effects in reducing atherosclerosis when mTORI were used in dosages controlled for a shorter period, as in study A2310 [13] and in the present trial.

Conversely some recent studies have failed to demonstrated benefit of mTORI related to cardiovascular end-points. The ELEVATE study showed no reduction of left ventricular mass index and no reduction of arterial stiffness as measured by pulse wave velocity between groups (tacrolimus and everolimus) [25]. Similar Cruzado et al in a 24 moth open label study did not showed a reduction of left ventricular mass index in a conversion group from tacrolimus to everolimus [26]. Both studies, however, did not assess atherogenesis through carotid plaque evaluation or cIMT. Additionally these studies are of conversion from tacrolimus to everolimus and have not used mTORI since beginning of transplantation.

The main limitation of this trial is that it was a single-center study with a small number of patients. We also evaluated only de cIMT and some authors report that carotid plaques are more correlated to coronary heart disease in older adults [27]. Also other ultrasound-derived plaque metrics like maximum intima-media thickness that are predictors of cardiovascular disease were not evaluated in this trial [28].

However, it was a prospective randomized study in an elderly kidney transplant population with high cardiovascular risk. Repeated measures of cIMT were taken at three times for each patient, and we used a robust statistical method to analyze the differences over time. This is one of the few studies that evaluated atherosclerosis related to mTORI in a prospective controlled trial.

In conclusion, the use of sirolimus plus tacrolimus de novo in kidney transplantation is associated with a reduction in the cIMT after 12 months, a more significant difference than seen with the combination of mycophenolate and tacrolimus. This suggests a class effect of mTORI in the prevention of atherosclerosis. The results of this trial have

to be confirmed with other studies focusing on clinical outcomes and in a high cardiovascular risk patients.

### **Conflict of Interest Statement**

**The results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract format.**

**The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose**

### **Funding**

**This study has no funding**

## References

1. Ma MKM, Yung S, Chan TM1. mTOR Inhibition and Kidney Diseases. *Transplantation* 2018; 102: S32-S40
2. Tedesco-Silva H, Felipe C, Ferreira A et al. Reduced Incidence of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients Receiving Everolimus and Reduced Tacrolimus Doses. *Am J Transplant* 2015; 15: 2655-2664
3. Mallat SG, Tanios BY2, Itani HS et al. CMV and BKPyV Infections in Renal Transplant Recipients Receiving an mTOR Inhibitor-Based Regimen Versus a CNI-Based Regimen: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12: 1321-1336
4. Kojima CA, Nga HS, Takase HM et al. Sirolimus Associated with Tacrolimus at Low Doses in Elderly Kidney Transplant Patients: A Prospective Randomized Controlled Trial. *Exp Clin Transplant* 2017; doi: 10.6002/ect.2016.0335. [Epub ahead of print]
5. Paoletti E, Amidone M, Cassottana P, Gherzi M, Marsano L, Cannella G. Effect of sirolimus on left ventricular hypertrophy in kidney transplant recipients: a 1-year nonrandomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2008; 52: 324-330
6. Paoletti E, Cannella G. Regression of left ventricular hypertrophy in kidney transplant recipients: the potential role for inhibition of mammalian target of rapamycin. *Transplant Proc* 2010; 42: S41-3
7. Murakami N, Riella LV, Funakoshi T. Risk of metabolic complications in kidney transplantation after conversion to mTOR inhibitor: a systematic review and metaanalysis. *Am J Transplant* 2014; 14: 2317-2327
8. Elloso MM, Azrolan N, Sehgal SN et al. Protective effect of the immunosuppressant sirolimus against aortic atherosclerosis in apo E-deficient mice. *Am J Transplant* 2003; 3: 562-569
9. Mueller MA, Beutner F, Teupser D, Ceglarek U, Thiery J. Prevention of atherosclerosis by the mTOR inhibitor everolimus in LDLR<sup>-/-</sup> mice despite severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2008; 198: 39-48
10. Andrés V, Castro C, Campistol JM. Potential role of proliferation signal inhibitors on atherosclerosis in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21 Suppl 3:iii14-7
11. Basso MD, Nambi P, Adelman SJ. Effect of sirolimus on the cholesterol content of aortic arch in ApoE knockout mice. *Transplant Proc* 2003; 35: 3136-3138
12. Naoum JJ, Woodside KJ, Zhang S, Rychahou PG, Hunter GC. Effects of rapamycin on the arterial inflammatory response in atherosclerotic plaques in Apo-E knockout mice. *Transplant Proc* 2005; 37: 1880-1884
13. Eisen HJ, Kobashigawa J, Starling RC et al. Everolimus versus mycophenolate mofetil in heart transplantation: a randomized, multicenter trial. *Am J Transplant* 2013; 13: 1203-1216
14. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and



- Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis* 2012; 34: 290-296
15. Szymczak M, Kluz J, Małeck R et al. Effect of Immunosuppressive Treatment on Carotid Atherosclerosis in Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2016; 48: 1626-1629
  16. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007; 115: 459-467
  17. Ren L, Cai J, Liang J, Li W, Sun Z. Impact of cardiovascular risk factors on carotid intima-media thickness and degree of severity: A cross-sectional study. *PLoS One* 2015; 10: e0144182
  18. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21: 93-111
  19. Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M et al. A longitudinal study of inflammation, CKD-mineral bone disorder, and carotid atherosclerosis after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10: 471-479
  20. Hernández D, Triñanes J, Salido E et al. Artery wall assessment helps predict kidney transplant outcome. *PLoS One* 2015; 10: e0129083
  21. Joannides R, Etienne I, Iacob M et al. Comparative effects of sirolimus and cyclosporin on conduit arteries endothelial function in kidney recipients. *Transpl Int* 2010; 23: 1135-1143
  22. Chen WQ, Zhong L, Zhang L et al. Oral rapamycin attenuates inflammation and enhances stability of atherosclerotic plaques in rabbits independent of serum lipid levels. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 941-951
  23. Verheye S, Martinet W, Kockx MM et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 706-715
  24. Kurdi A, De Meyer GR, Martinet W. Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol* 2016; 82: 1267-1279
  26. Holdaas H, de Fijter JW, Cruzado JM et al. Cardiovascular Parameters to 2 years After Kidney Transplantation Following Early Switch to Everolimus Without Calcineurin Inhibitor Therapy: An Analysis of the Randomized ELEVATE Study. *Transplantation* 2017; 101: 2612-2620
  27. Cruzado JM, Pascual J, Sánchez-Fructuoso A et al. Controlled randomized study comparing the cardiovascular profile of everolimus with tacrolimus in renal transplantation. *Transpl Int* 2016; 29: 1317-1328
  27. Plichart M, Celermajer DS, Zureik M et al. Carotid intima-media thickness in plaque-free site, carotid plaques and coronary heart disease risk prediction in older adults. The Three-City Study. *Atherosclerosis* 2011; 219: 917-924
  28. Polak JF, Szklo M, Kronmal RA et al. The value of carotid artery plaque and intima-media thickness for incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2013; 2: e000087

**Table 1. Baseline characteristics of the tacrolimus plus mycophenolate group and tacrolimus plus sirolimus group.**

		<b>Mycophenolate n=23</b>	<b>Sirolimus n=21</b>	<b>p</b>
<b>Age (years)</b>		65±4	66±4	0.577
<b>Diabetes</b>		13%	22.7%	0.142
<b>Men</b>		78.3%	81.8%	0.605
<b>White</b>		78.3%	85.7%	0.218
<b>Body mass index (kg/m<sup>2</sup>)</b>		25.25±2.6	25.49±8.3	0.697
<b>Smoking</b>		39%	31.8%	0.375
<b>Time in dialysis (months)</b>		42.2±37.6	46.2±44.5	0.69
<b>Biopsy-proven acute rejection</b>		0	4.8 %	0.29
<b>Panel-reactive antibody (%)</b>		8±24	3±13	0.11
<b>HLA mismatches</b>		3±1	3±2	0.29
<b>Induction</b>	<b>Basiliximab</b>	91.3%	81.0%	0.31
<b>Therapy</b>	<b>Thymoglobulin</b>	8.7%	19.0%	
<b>Concomitant Medications</b>				
<b>Statin (baseline)</b>		52.2%	59.1%	0.420
<b>Statin (end of study)</b>		69.6%	72.7%	0.815
<b>ACEi/ARA-II</b>		60.9%	45.5%	0.300
<b>Number of anti-hypertensives</b>		1.8±1	1.4±0.7	0.190
<b>Donor Charactersitics</b>				
<b>Donor Age (years)</b>		41±12	41±11	0.85
<b>Donor creatinine (mg/dL)</b>		1.58±0.8	1.61±1.1	0.98
<b>Cause of Donor</b>	<b>Cranial trauma</b>	47.8 %	38.1 %	0.48
<b>Death</b>	<b>Cerebrovascular</b>	47.8 %	47.6 %	
	<b>Others</b>	4.3 %	14.3 %	
<b>Sequential measures</b>				
<b>Urinary protein/creatinine ratio (mg/mg)</b>	<b>3 Months</b>	0.42±0.369	1.1±1.9	0.125 between groups
	<b>6 Months</b>	0.13±0.15	0.19±0.22	
	<b>12 Months</b>	0.22±0.77	0.20±0.37	
<b>eGFR (ml/min)</b>	<b>3 Months</b>	52±26	46±19	0.182 between groups
	<b>6 Months</b>	64±23	54±14	
	<b>12 Months</b>	60±15	60±17	
<b>Mean arterial pressure (mmHg)</b>	<b>3 Months</b>	102±5.8	102±6.9	0.121 between groups
	<b>6 Months</b>	98±4.8 <sup>+</sup>	91±18 <sup>+</sup>	
	<b>12 Months</b>	91±3.4 <sup>+</sup>	90±3.3 <sup>+</sup>	
<b>Total Cholesterol (mg/dl)</b>	<b>Baseline</b>	179±62	206±34	*0.023
	<b>6 Months</b>	170±45	189±34*	between

	<b>12 Months</b>	149±38	176±32*	groups
<b>HDL cholesterol (mg/dl)</b>	<b>Baseline</b>	52±16	69±18	*0.01
	<b>6 Months</b>	46±11	62±24*	Between
	<b>12 Months</b>	45±25	59±28*	groups
<b>LDL Cholesterol (mg/dl)</b>	<b>Baseline</b>	83±53	104±20	0.185
	<b>6 Months</b>	89±37	94±26	between
	<b>12 Months</b>	69±30	75±28	groups
<b>TG (mg/dl)</b>	<b>Baseline</b>	234±159	158±59	0.245
	<b>6 Months</b>	173±52	161±44	between
	<b>12 Months</b>	167±40	181±77	groups
<b>cIMT (mm)</b>	<b>Baseline</b>	0.82±0.27	0.77±0.14	*0.012
	<b>6 Months</b>	0.81±0.16	0.72±0.12*	between
	<b>12 Months</b>	0.78±0.15	0.69±0.13*	groups

**Repeated analysis of total cholesterol, eGFR, protein/creatinine and carotid intima-media thickness at baseline, 6 and at 12 months.** cIMT: carotid intima-media thickness; eGFR (estimated glomerular filtration rate); HLA, human leukocyte antigen; ACEi: angiotensin-converting-enzyme inhibitor; ARA-II: angiotensin II receptor antagonists; +: p<0.001 over time.

**Table 2. Analysis of the carotid intima-media thickness as a repeated measures considering the covariates using generalized mixed model with gamma distribution and log link function**

<b>Fixed effects</b>	<b>F</b>	<b>df1</b>	<b>df2</b>	<b>p value</b>
<b>Corrected model</b>	1.888	11	86	0.052
<b>Time (baseline, 6 and 12 months)</b>	0.508	2	86	0.604
<b>Group</b>	6.023	1	86	0.016
<b>Smoking</b>	1.985	1	86	0.162
<b>Diabetes</b>	1.549	1	86	0.217
<b>Statin use</b>	0.086	1	86	0.769
<b>Age</b>	0.244	1	86	0.623
<b>Sex</b>	1.117	1	86	0.293
<b>ACEi/ARA-II</b>	0.946	1	86	0.334
<b>Mean arterial pressure</b>	3.645	1	86	0.060
<b>eGFR</b>	0.495	1	86	0.484

Probability distribution: Gamma

Link-Function: log

eGFR (estimated glomerular filtration rate); ACEi: angiotensin-converting-enzyme inhibitor; ARA-II: angiotensin II receptor antagonists

## Figure Legends

**Figure 1.** Flow chart diagram of study design

**Figure 2.** Mean change of carotid intima-media thickness (cIMT) between 12 months and baseline in mycophenolate and sirolimus groups. \* $p=0.05$  x mycophenolate group.

**Figure 3.** Evolution of carotid intima-media thickness (cIMT) in relation to the three time points and between groups (red: mycophenolate; blue: sirolimus). Analysis of mixed generalized models. \* $p=0.012$  x mycophenolate group.

**Figure 4.** Heatmap showing the mean value of carotid intima-media thickness (cIMT) in the sirolimus and mycophenolate groups over time (1: baseline; 2: 6 months and 3: 12 months). Higher values of cIMT is represented in darker red. We observed a decreased cIMT in both groups; the change was most significant in the sirolimus group.