

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Larissa Sgaria Pacheco

**Um estudo piloto, prospectivo,  
aberto, em único centro para  
investigar o efeito da conversão  
para Everolimo na viremia do  
vírus da hepatite C em  
receptores de rim adultos.**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre

2016

**Larissa Sgaria Pacheco**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, comorequisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Keitel

**Porto Alegre**

**2016**

## **Agradecimentos**

Inicialmente à orientadora Dra. Elizete Keitel, pela orientação, dedicação e auxílio no desenvolvimento deste projeto. Agradeço também pela convivência agregadora onde a Dra Elizete sempre foi e é um exemplo de pessoa e de profissional.

À minha família, especialmente à minha mãe Jussara Sgaria Pacheco e ao meu pai Flávio Pacheco por sempre me incentivarem na busca pelo conhecimento e priorizarem em suas vidas a minha educação e de minha irmã.

Agradeço aos meus colegas Ronivan Dal Prá, Bruna Doleys, Mariana Ferraz, Natalia Gomes, Diego Gnatta, Helen Zanetti, Natiana Vizioli, pois eles que ajudaram na viabilização deste projeto além de serem amigos queridos.

Aos médicos do Serviço de Nefrologia, em especial ao Dr. Valter Duro Garcia pelas conversas, orientações e sempre nos guiando pelo caminho da ciência.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e a todos que de alguma forma contribuíram para este projeto.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Doença Renal Crônica .....	1
1.2 Transplante Renal .....	2
1.3 Hepatite C .....	4
1.3.1 Aspectos biológicos do Vírus C .....	4
1.3.2 Genótipos virais do VHC.....	6
1.3.3 Distribuição geográfica dos genótipos virais do VHC .....	6
1.3.4 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHC .....	7
1.4 Hepatite C e Transplante Renal.....	11
1.5 Manejo da Hepatite C antes do Transplante Renal.....	12
1.6 O Papel da Imunossupressão na progressão da doença por VHC após o Transplante .....	13
1.7 Imunossupressão no Transplante Renal .....	15
1.8 Referências Bibliográficas .....	20
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
2.1 Objetivos Secundários.....	25
<b>3. Artigo científico redigido em inglês</b> .....	<b>26</b>
<b>4. Considerações Finais</b> .....	<b>44</b>
<b>5. Anexos</b> .....	<b>45</b>

**Lista de abreviaturas utilizadas**

ABTO: Associação Brasileira de Transplantes

ALT: AlaninoAminotransferase

AST: AspartatoAminotransferase

CHC: Carcinoma Hepatocelular

CsA: Ciclosporina

CYP: Citocromo

DNAc: DNA complementar

DSA: *Donor-Specific Antibody*

DRC: Doença Renal Crônica

DRT: Doença Renal Terminal

ELISA: *Enzyme LinkedImmuno Sorbent Assay*

FDA: Food and Drug Administration

FNT- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

GGT: Gama-glutamilttransferase

HLA: *Human Leukocyte Antigens*

HD: Hemodiálise

IFN: Interferon

IFN- $\gamma$ : Interferon-Gamma

IMPDH: *Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*

IRC: Insuficiência Renal Crônica

IL: Interleucina

IL2: Interleucina 2

IL4: Interleucina 4

NFAT: Fator Nuclear de Células T Ativado

OPTN: *Organ Procurement and Transplantation Network*

RNA: Ácido Ribonucleico

RVS: Resposta Viroológica Sustentada

RT-PCR: *Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction*

SPSS: *“Statistical Software Package”*

SRTR: *Scientific Registry of Transplant Recipients*

TFG: Taxa de Filtração Glomerular

TRS: Terapia Renal Substitutiva

USRDS: *United States Renal Data System*

VHC: Vírus Hepatite C

## Resumo da Dissertação

**Introdução:** Este é um protocolo específico de imunossupressão para receptores de transplante renal com sorologia positiva para Hepatite C. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da conversão para Everolimo (EVL) na viremia da hepatite C em receptores renais adultos. **Metodologia:** Estudo piloto em único centro, prospectivo, randomizado, aberto, controlado, com receptores de transplante renal com sorologia positiva para hepatite C (VHC). Foram incluídos pacientes usando Inibidor de Calcineurina (ICN), antiproliferativo e Prednisona (Pred). Os pacientes foram randomizados para converter para EVL ou manter terapia com ICN. Não houve mudanças no antiproliferativo nem na Pred. Os critérios de exclusão foram Taxa de Filtração Glomerular (TFG) menor que 30ml/min e razão proteína/creatinina >0,5. **Resultados:** Trinta pacientes foram randomizados, destes 28 realizaram acompanhamento por 12 meses (15 no grupo conversão e 13 no grupo controle). Foram comparadas entre os grupos e entre os pacientes do mesmo grupo, a carga viral através dos logs dos níveis de HCV realizados pela técnica de PCR em Tempo Real. A análise estatística mostrou que não houve efeito de interação do tempo com o grupo ( $p$ -valor  $G^*M= 0,852$ ), nem intra-grupos ( $p$ -valor $_M=0,889$ ) e também não houve efeito de interação entre o grupo controle e grupo conversão ( $p$ -valor $_G=0,286$ ). A média em Log da carga viral no início do estudo, 3, 6, 9 e 12 meses foi  $5,8 \pm 0,74$ ,  $5,7 \pm 0,89$ ,  $5,8 \pm 0,60$ ,  $5,7 \pm 0,85$ ,  $5,8 \pm 0,93$  no grupo controle e  $6,1 \pm 0,83$ ,  $6,3 \pm 0,95$ ,  $6,2 \pm 0,87$ ,  $5,6 \pm 1,8$ ,  $6,1 \pm 0,62$  no grupo de tratamento. Conforme esperado, o grupo conversão mostrou um aumento da incidência de dislipidemia ( $p=0,03$ ) e proteinúria ( $p=0,01$ )

comparado com o grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação a incidência de anemia ( $p=0,17$ ), novos casos de diabetes mellitus pós transplante ( $p= 1,00$ ) e infecção no trato urinário ( $p=0,60$ ). A média da TFG no início o estudo, 1, 3, 6, 9 e 12 meses após a randomização foi similar entre os grupos. Durante o acompanhamento do estudo não ocorreram episódios de rejeição aguda, malignidades, perda do enxerto ou morte. Conclusão: O presente estudo piloto não mostrou diminuição da carga viral do HCV após a conversão para Everolimo, associado a manutenção do antiproliferativo.

**Palavras-chave: transplante renal, hepatite C, everolimo, carga viral**

## **1. Introdução**

### **1.1 Doença Renal Crônica**

A doença renal crônica (DRC) é um processo fisiopatológico de múltiplas etiologias, resultando em inexorável perda do número e da função dos néfrons e, com freqüência, levando à doença renal terminal (DRT). Por sua vez, a DRT representa um estágio de perda irreversível da função renal endógena, num grau suficiente para tornar o paciente permanentemente dependente de uma terapia de substituição renal (diálise ou transplante) para evitar o desenvolvimento de uremia potencialmente fatal (Winearls e Mason, 2001; Skorecki e cols., 2002).

A DRC é classificada de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG), uma estimativa da redução da capacidade de depuração dos produtos do metabolismo pelos rins. A apresentação clínica é variável, e está relacionada à causa, gravidade e velocidade de progressão da doença (KDIGO, 2013).

Quando a TFG diminui abaixo de 15ml/min/1.73m<sup>2</sup> traz complicações endócrinas, metabólicas, nutricionais e cardiovasculares, além de toxicidade de drogas que não são adequadamente excretadas, suscetibilidade a infecções e alterações cognitivas (KDIGO, 2012).

A diálise crônica reduz a incidência e a gravidade de algumas alterações da insuficiência renal crônica, porém, não substitui a função renal por completo,

permitindo a progressão de algumas complicações (Winearls e Mason, 2001; Skorecki e cols., 2002). As principais manifestações clínicas e laboratoriais da DRT são: distúrbios hidroeletrólíticos e do equilíbrio ácido-básico (homeostase do sódio e da água, homeostase do potássio, acidose metabólica), anormalidades ósseas, do fosfato e do cálcio, cardiovasculares (hipertensão e hipertrofia ventricular esquerda, coronariopatia aterosclerótica e doença vascular periférica, pericardite), pulmonares, hematológicas (anemia, hemostasia anormal, susceptibilidade aumentada às infecções), distúrbios endócrino-metabólicos, gastrintestinais e dermatológicos (Skorecki e cols., 2002).

## **1.2 Transplante Renal**

O primeiro transplante renal bem sucedido ocorreu em Boston, nos Estados Unidos, em 1954, entre gêmeos idênticos. Desde então, o desenvolvimento do transplante de órgãos tornou-se um dos maiores êxitos da história da medicina. Os avanços nas técnicas cirúrgicas (aprimoramento das técnicas de anastomoses vasculares), o melhor conhecimento do sistema imunológico (descrição da prova cruzada, *crossmatch*, a descoberta do sistema dos antígenos leucocitários humanos (sigla em inglês *HLA*), e a detecção de anticorpos pré-formados contra o doador (*DSA*) e os novos regimes imunossupressores vêm contribuindo para o sucesso dessa forma de tratamento. Esses avanços tornaram o transplante renal a terapia de escolha para o paciente com doença renal crônica terminal (Sallenave e cols., 2014).

As razões para os melhores resultados podem estar associadas a restauração de uma função renal mais completa pelo transplante, com diminuição da resposta inflamatória, do estresse oxidativo e a diminuição da hipertrofia ventricular esquerda levando a redução de cardiopatia isquêmica (Lopez-Gomez e cols.,1998; McGregor e cols.,1998; Simmons e cols.,2005).

O transplante renal é uma alternativa de Terapia Renal Substitutiva (TRS) que, apesar do elevado custo no primeiro ano, parece oferecer melhor custo-benefício em relação à diálise nos anos subsequentes (Blotière e cols., 2010).

Dados do registro Norte Americano (United States Renal Data System -USRDS) do final dos anos 90 mostraram que dos 230000 que entraram em diálise, 46000 foram colocados em lista de espera para transplante e desses 23000 foram submetidos a um primeiro transplante renal. A taxa de mortalidade anual dos que ficaram em lista foi 6,3/100 pacientes/ano e dos que transplantaram foi 3,8/100 pacientes/ano. O transplante aumentou a sobrevida também nos pacientes de maior risco, como diabéticos e americanos afrodescendentes em todas as idades incluindo o grupo etário de 60 a 74 anos (Wolfe e cols., 1999).

Houve uma melhora significativa na sobrevida do paciente e do enxerto, relacionada ao transplante renal no curto e médio prazo. Para transplantes realizados no final da década de 90 a sobrevida em 5 anos do paciente era em torno de 84% do enxerto de 60%. Para os transplantes realizados de 2005 a 2009 a sobrevida do paciente aumentou para 95% e do enxerto 82% (Collaborative Transplant Study, 2014).

No último relato americano do OPTN/ SRTR haviam 164200 adultos com enxerto renal funcionante em junho de 2011. Foi observada uma expectativa de aumento de 1 ano na meia vida dos enxertos renais tanto de doador vivo quanto de falecido por diminuição na taxa de perda de enxerto, enquanto que a taxa de óbito com enxerto funcionante não modificou (OPTN/ SRTR 2011).

O Brasil é o segundo país em número absoluto de transplantes renais em 2013, foram 5.433 transplantes, enquanto o EUA realizaram 18.005. No entanto, quando se considera o número relativo a população, o Brasil fica em 35º lugar, com 28,5 transplantes por milhão de população (pmp). São 129 Centros em 21 estados brasileiros (RBT, 2014).

O registro dos resultados de transplantes no país foi iniciado em janeiro de 2010 pela Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), sendo obtidos dados completos de 78% deles para análise. Desde o início deste registro, foram 5590 (28%) transplantes com doador vivo e 14.235 (72%) com doador falecido, com respectiva sobrevida atuarial do paciente de 94% vs. 87% e do enxerto de 88% vs. 75%, em 5 anos (RBT, 2014).

## **1.3 Hepatite C**

### **1.3.1 Aspectos Biológicos do Vírus C**

A Hepatite C, inicialmente denominada de hepatite não A não B foi durante várias décadas uma constante interrogação aos pesquisadores e estudiosos da história natural das hepatites pós-transfusionais. Nos primeiros

anos da década de 80, estudos experimentais em primatas, desenvolvidos no Centro de Controle de Doenças de Atlanta (EUA), revelaram a presença de um agente infectante com 60nm de diâmetro, revestido de um invólucro lipoproteico, com o genoma constituído de ácido ribonucleico (RNA) e transmissível mediante sangue e hemoderivados (Bradley e cols., 1985).

Em 1989, mediante os sucessivos estudos de biologia molecular, Michael Houghton e colaboradores identificaram finalmente o genoma do agente viral responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não A e não B. Após a clonagem do vírus da Hepatite C (VHC) e uma seqüência de descobertas, tais como: a expressão da proteína viral recombinante; o desenvolvimento de testes imunológicos específicos; a análise de sua seqüência nucleotídica e o conhecimento de sua elevada taxa de mutação, permitiram-nos conhecer, em um breve espaço de tempo, informações importantíssimas sobre os principais aspectos biológicos do VHC, o perfil epidemiológico da infecção e a história natural da doença (Choo e cols., 1989).

O vírus da hepatite C é um membro do gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae* (Lindebach e Rice, 2005). O genoma viral é constituído por uma fita simples e de sentido positivo de RNA com aproximadamente 9,6 kilobases, organizado em uma região 5' não-codificada (5'NCR); uma região que possui uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma grande poliproteína; e uma região 3' não-codificadora (3'NCR) (Tan e Katze, 2001).

A replicação ocorre via síntese de uma fita de RNA complementar de polaridade negativa usando o genoma viral como molde, seguido de subsequente síntese da fita positiva e RNA genômico a partir desta fita negativa intermediária (Brass e col., 2006).

Análises filogenéticas de seqüência completas ou parciais de cepas isoladas do VHC de várias regiões do mundo levaram à identificação de diferentes genótipos desse vírus (Pawlotsky, 2004).

### **1.3.2 Genótipos Virais do VHC**

A classificação do VHC, definida e simplificada em 1998, é baseada na topologia de árvores obtidas através de análises filogenéticas entre diferentes variantes virais. As variantes do VHC podem ser classificadas dentro de seis clados ou genótipos. Os genótipos podem diferir entre si, de 31% a 33% nas seqüências dos nucleotídeos e são denominadas através de algarismos arábicos de 1 a 6 (Simmonds e cols., 1993). Os subtipos podem diferir de 20% a 25% e são denominados por letra em ordem alfabética correspondendo às seqüências correlatas dentro de um clado. A nova reclassificação agrupou os genótipos 7, 8, 9 e 11 como genótipo 6 e o genótipo 10 como genótipo 3 (Robertson e cols., 1998).

Essa variabilidade tem implicações clínica e terapêutica, podendo também contribuir com o conhecimento sobre as possíveis rotas de transmissão viral (Thompson e col., 2009).

### **1.3.3 Distribuição Geográfica dos Genótipos Virais do VHC**

Messina e colaboradores propuseram um estudo sobre a distribuição global e a prevalência dos genótipos do vírus da hepatite C. Realizaram uma análise de 1217 estudos publicados de 1989 até 2013 que reportavam os

genótipos do VHC, o que representa 117 países e 90% da população mundial. Calcularam que o genótipo tipo 1 do VHC é o de maior prevalência no mundo, compreendendo 83,4 milhões de casos (46,2% de todos os casos de VHC), aproximadamente um terço dos quais na Ásia Oriental. O genótipo tipo 3 é o segundo mais prevalente globalmente (54,3 milhões; 30,1%). Os genótipos tipo 2, 4 e 6 são responsáveis por um total de 22,8% de todos os casos. O genótipo tipo 5 compreende o restante <1%. Enquanto o genótipo tipo 1 e 3 dominam na maioria dos países independentemente da situação econômica, as maiores proporções dos genótipos tipo 4 e 5 estão em países de baixa renda (Messina e cols., 2015).

No Brasil, estudos apontam a circulação dos genótipos 1, 2,3,4 e 5. O genótipo 1 é o mais frequente em todas regiões (64,9%) com taxas mais elevadas no Norte. O genótipo 2 foi mais prevalente na região Centro-Oeste (4,6%) especialmente no estado de Mato Grosso, enquanto o genótipo 3 foi mais comum nas regiões Sul (30,2%). Genótipos 4 (0,2%) e 5 (0,1%) foram raramente detectados e só no Sudeste, no estado de São Paulo (Campilotto e col., 2005).

#### **1.3.4 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHC**

##### **Diagnóstico sorológico**

O diagnóstico da hepatite C, rotineiramente utilizado desde o início dos anos 90, é realizado pela pesquisa de anticorpos anti-VHC e consiste de teste imunoenzimático (ELISA) que emprega antígenos recombinantes do VHC.

Atualmente, este teste se encontra na terceira geração, utiliza proteínas recombinantes derivadas do *core*, NS3, NS4 e NS5 do VHC e apresenta alta sensibilidade e especificidade (Strauss, 2001).

A presença de anti-HCV não define isoladamente a presença da infecção ativa e deve ser interpretada como contato prévio com o HCV. O resultado reagente desse marcador deverá ser confirmado por testes moleculares para detecção de ácido nucleico do HCV (Desmet e cols., 1994).

### **Testes moleculares**

#### **- Testes de detecção de ácidos nucleicos**

São testes de amplificação de ácidos nucleicos, denominados HCV-RNA, que permitem detectar o RNA viral de todos os genótipos e subtipos descritos do VHC. Esses testes podem ser qualitativos, quando apenas detectam a presença do RNA viral, ou quantitativos, quando quantificam o RNA viral (Nainan e col., 2006).

Os testes qualitativos informam a presença ou não do RNA viral (resultado positivo ou negativo). Um teste sensível para a identificação do RNA do VHC é a reação em cadeia de polimerase com a enzima transcriptase reversa (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), que catalisa a síntese do DNA complementar (DNAC) a partir da região 5'RNC do RNA viral. A seguir, a PCR é utilizada para amplificar o DNAC, produzindo quantidades suficientes para serem detectadas em gel de agarose (de Medina e Schiff, 1995).

Testes quantitativos detectam o nível de RNA do VHC (ou a carga viral) no soro ou no plasma refletindo as taxas de replicação viral e de eliminação do vírus pelo hospedeiro. Foram desenvolvidos basicamente duas técnicas de biologia molecular para a quantificação do VHC: uma utiliza a tecnologia da PCR e a outra, a do DNA ramificado (*branched DNA*). Esta última se baseia na amplificação de um sinal, e não do DNA alvo, como ocorre na PCR. O ácido nucleico do agente infeccioso, se presente na amostra, é capturado por sondas, hibridizado com fitas do DNA que possuem inúmeras ramificações e revelado pelo sistema indicador. Esse sistema é composto de oligonucleotídeos complementares conjugados a enzimas com atuação sobre um substrato quimioluminescente. Assim, o “sinal de amplificação” é obtido sem amplificação do ácido nucleico do vírus (Greth e col.,1995).

Já o PCR permite a obtenção de informações genéticas através da amplificação de seqüências específicas de ácidos nucléicos a partir de um número inicial muito reduzido de seqüências-alvo. A reação prossegue com a amplificação em escala logarítmica do número de cópias das seqüências genéticas, por ciclo de reação, até alcançar uma quantidade de cópias idênticas que possam ser facilmente analisadas (Kubista e cols., 2006; Jung e cols., 2000). A técnica de PCR pode ser totalmente manual ou utilizar extração manual, seguida por transcrição reversa, amplificação e leitura automatizada.( Forms e Costa , 2006; Pawlotsky, 2003).

A técnica de PCR em tempo real (Real Time PCR) é uma evolução da técnica de PCR que permite realizar a quantificação do material genético presente no início dos ciclos de amplificação. A quantidade de produto genético formado a cada ciclo é monitorada por meio da fluorescência gerada, e o

número de ciclos utilizados para alcançar uma quantidade predeterminada de moléculas, permite a quantificação. O PCR em tempo real também pode ser usado de maneira qualitativa, simplesmente visando à detecção do HCV-RNA, seguido pela genotipagem, quando necessário (Kubista e cols., 2006).

- Teste de genotipagem

O exame de genotipagem do HCV utiliza testes moleculares baseados em amplificação do RNA viral, capazes de identificar os diversos genótipos, subtipos e populações mistas do HCV. A caracterização genotípica complementa a avaliação clínico-laboratorial na definição da estratégia de tratamento da hepatite crônica (Germer e col., 1999).

### **Outros exames complementares**

Aminotransferases (transaminases) – a aspartatoaminotransferase (AST/TGO) e a alaninoaminotransferase (ALT/TGP) são marcadores de agressão hepatocelular. Na forma aguda, principalmente a ALT/TGP pode atingir valores até 25 a 100 vezes acima do normal, embora alguns pacientes apresentem níveis bem mais baixos. Na forma crônica, na maioria das vezes, elas não ultrapassam quinze vezes o valor normal; em indivíduos assintomáticos, pode ser o único exame laboratorial sugestivo de dano hepático.

Bilirrubinas – pode haver aumento tanto da fração não conjugada (indireta) quanto da conjugada (direta), sendo predominante esta última. Pode ser detectada precocemente na urina e antes mesmo do surgimento da icterícia. Em associação com alguns outros fatores clínicos e laboratoriais -

encefalopatia, ascite, aumento do tempo de protrombina, queda da albumina - compõe a classificação de Child-Pugh.

Proteínas séricas – normalmente, não se alteram nas formas agudas. Nas hepatites crônicas e cirrose, a albumina apresenta diminuição acentuada e progressiva.

Fosfatase alcalina – pouco se altera, exceto nas formas colestáticas, quando se apresenta em níveis elevados.

Gama-glutamilttransferase (GGT) – é a enzima mais relacionada aos fenômenos colestáticos. Ocorre elevação discreta, exceto nas formas colestáticas.

Atividade de protrombina – essa prova sofre pouca alteração na forma aguda. Na forma crônica, o aumento do tempo de protrombina indica deterioração da função hepática.

Alfafetoproteína – de forma geral, sua presença em valores elevados ou progressivamente crescentes em pacientes portadores de hepatite crônica indica o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC), sendo por isso utilizada para rastreamento do mesmo.

Hemograma – a leucopenia é habitual na forma aguda; entretanto, muitos casos cursam sem alteração no leucograma. A plaquetopenia pode ocorrer na infecção crônica (Ministério da Saúde, 2011).

#### **1.4 Hepatite C e Transplante Renal**

A prevalência de infecção pelo HCV é estimada em cerca de 2,4% a nível mundial, com alta variabilidade geográfica, de < 0,5% no Norte da Europa

até 15% no Egito (Negro e Alberti, 2011). A transmissão ocorre principalmente através do contato com sangue. Assim, a prevalência da infecção pelo HCV é significativamente mais elevada em pacientes submetidos à hemodiálise e, conseqüentemente, em receptores de transplante de rim, do que na população em geral, positivamente correlacionada com história de múltiplas transfusões de sangue e tempo de hemodiálise (Razavi e cols.,2013).

O transplante renal é considerado o tratamento de escolha para pacientes com insuficiência renal terminal infectados com VHC com função hepática preservada e sem cirrose. No entanto, os resultados dos transplantes renais em receptores VHC positivos em comparação com VHC negativos permanecem conflitantes, sendo que a maioria dos estudos mostra pior sobrevida do enxerto e do paciente naqueles VHC positivos (Meier-Krieche e cols., 2001; Fabrizi e cols.,2005).

Uma meta-análise contendo 8 estudos observacionais com 6365 receptores de transplante renal mostrou que pacientes com VHC positivos tiveram uma maior taxa de mortalidade e perda do enxerto (risco relativo 1.79 e 1.56 respectivamente) (Fabrizi e Cols., 2005). O estudo de uma coorte de transplantados renais da Austrália e da Nova Zelândia mostrou que 140 de 7572 pacientes (1,8%) eram VHC positivos e tiveram menor sobrevida do paciente comparado aos VHC negativos: 77% *versus* 90% e 50% *versus* 79% em 5 e 10 anos, respectivamente (Scott e cols., 2010).

### **1.5 Manejo da Hepatite C antes do Transplante Renal**

Atualmente, há maior conhecimento sobre o tratamento do VHC em doentes renais crônicos. O tratamento de VHC em pacientes com doença renal crônica é semelhante ao dos pacientes em geral, com a decisão de iniciar a terapia é amplamente baseada no estágio da doença hepática, na expectativa de uma resposta virológica sustentada (RVS) e na presença de comorbidades. Pacientes VHC em Hemodiálise (HD), que são candidatos a transplante renal, devem ser tratados de forma mais agressiva. A erradicação viral antes do transplante renal promove uma diminuição de complicações hepáticas e renais (Valadez e cols, 2015).

Recomenda-se que os pacientes VHC positivos que são candidatos a transplante renal devem ser tratados com terapias antivirais. Modalidades terapêuticas para este grupo de pacientes incluem Interferon (IFN) sozinho ou em combinação com Ribavirina. Infecções causadas por VHC genótipos 1 e 4 são menos sensíveis à terapia baseada em IFN e requerem tratamento por 48 semanas (Valadez e cols, 2015). No entanto, a taxa de resposta ao tratamento em pacientes urêmicos é muito baixa, em torno de 40% (Kamar e cols, 2006).

### **1.6 O papel da imunossupressão na progressão da doença por VHC após o transplante.**

O impacto da imunossupressão sobre a progressão da lesão de fígado no VHC em receptores de transplante renal ainda é incerta. Estudos anteriores mostraram um agravamento da doença hepática em receptores de transplante

renal VHC positivos, mas estudos mais recentes tem mostrado a progressão relativamente lenta da fibrose hepática nesse grupo de pacientes. A imunossupressão em pacientes transplantados renais aumenta a replicação do VHC com o potencial de causar mais doença relacionada ao fígado (Luan e col., 2008).

Em pacientes HCV positivos submetidos a transplante renal têm se demonstrado que existe um aumento de quatro a sete vezes na viremia do HCV após o transplante em relação ao pré-transplante (Mas, 2001).

A interação entre o HCV e o sistema imunológico ainda precisa ser elucidada. Mas e cols. (2001) sugerem que o espectro da resposta imune ao vírus em pacientes imunossuprimidos é tão variável quanto o observado em indivíduos imunocompetentes. Protocolos menos agressivos de imunossupressão deveriam ser testados em pacientes HCV, uma vez que eles já são imunomodulados pela ação do vírus.

Em estudos com transplante de fígado é muito difícil medir o grau de gravidade e de re-infecção pelo HCV após o transplante. Na fase inicial pós-transplante, o aumento gradual dos níveis de RNA-HCV, assemelha-se a recorrência aguda do HCV. No curto prazo, os níveis de RNA-HCV correlacionam-se com a gravidade histológica da doença uma ou duas semanas após o transplante, mas esta correlação é ausente para o resto do primeiro ano após o transplante hepático. No longo prazo, os níveis de RNA-HCV estão relacionados com o grau de imunossupressão e com a gravidade da lesão hepática. Após um ano de transplante, os níveis de viremia, geralmente altos, representam o grau de lesão hepática (Wagner e cols., 2010).

Clinicamente, a recorrência aguda é caracterizada por uma elevação das transaminases séricas do fígado. Estas podem permanecer elevadas ou diminuir, assemelhando-se a uma infecção crônica. A imunossupressão aumenta o nível sérico de RNA-HCV, especialmente em pacientes que receberam anticorpos monoclonais ou corticóides (Wagner e cols., 2010). Para evitar a replicação viral, a imunossupressão deve ser adaptada, envolvendo um balanço entre o controle da replicação viral e rejeição.

### **1.7 Imunossupressão no Transplante Renal**

Considera-se que existem duas fases de imunossupressão: a da indução, que vai do pós-operatório imediato até os primeiros três meses após o transplante, e de manutenção, após o terceiro mês de transplante. Na fase de indução, a incidência de rejeição aguda está aumentada, por isso a imunossupressão deve ser mais intensa para preveni-la. Nesta fase, os protocolos de imunossupressão combinam até quatro fármacos, com variação nas suas dosagens. Durante a fase de manutenção, objetiva-se prevenir a rejeição crônica e evitar os efeitos secundários a longo-prazo dos diversos imunossupressores (Garcia e cols., 2006).

De acordo com as Diretrizes Terapêuticas e Protocolos Clínicos aprovados pelo Ministério da Saúde (2002) e com a Consulta Pública nº7 de 24 de julho de 2008, a terapia de imunossupressão pós-transplante deve combinar três classes terapêuticas: um corticosteroide, um inibidor de calcineurina, e um agente antiproliferativo.

Os corticosteróides, eficazes na prevenção e no tratamento da rejeição aguda, são utilizados como imunossupressores desde o início dos transplantes e ainda são empregados na maioria dos protocolos de imunossupressão no transplante renal. A prednisona é classicamente utilizada por via oral. Quando é necessária a via parenteral usa-se, preferentemente, a metilprednisolona (MP). Os corticóides ligam-se a receptores citosólicos e proteínas do choque térmico, bloqueando a transcrição de interleucinas (IL) 1, 2, 3, 6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )(Garcia e cols., 2006).

Os inibidores de calcineurina são, ainda, as drogas mais importantes dos protocolos imunossupressores empregados. A ciclosporina (CsA) não é uma droga citotóxica, exerce seu efeito numa população restrita de células linfóides e poupa as outras células de linhagem mielóide, conferindo-lhes certa seletividade. A ação supressora depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina. A ciclofilina é uma peptil-propil-isomerase que se liga e inibe a atividade da fosfatase da calcineurina, resultando na inibição da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e formação do linfócito T citotóxico. Uma dessas proteínas, o fator nuclear de células T ativado (NFAT), desloca-se para o núcleo, onde se liga à região promotora de genes interleucina 2 (IL2), interleucina 4 (IL4) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), causando a transcrição dos mesmos e a secreção das referidas citocinas. O bloqueio do NFAT é considerado, portanto, o principal efeito da CsA (Garcia e col., 2004).

O tacrolimo foi desenvolvido em 1984 a partir de uma bactéria do solo, e foi usado inicialmente como terapia de resgate após episódios de rejeição com

a terapia usual, sendo posteriormente aprovado como droga inicial, com menor incidência e menor gravidade de episódios de rejeição. O mecanismo de ação dos inibidores de calcineurina envolve a redução da produção de IL-2 e da expressão de seu receptor, levando a menor ativação de linfócitos T. Ambos formam um complexo protéico que inibe a atividade da calcineurina e previne a defosforilação e transcrição de IL-2, finalmente inibindo a ativação de linfócitos T. O tacrolimo liga-se à proteína ligadora de FK (FKBP-12), e a ciclosporina liga-se à ciclofilina. A potência imunossupressora do tacrolimo é dez a cem vezes maior que a da ciclosporina. O metabolismo de ambos é controlado pela família do citocromo (CYP) P450, acarretando um grande número de interações medicamentosas. Existe grande variabilidade farmacocinética entre e intraindivíduos, e a monitorização de nível sérico é necessária. Entre os efeitos colaterais, destaca-se a nefrotoxicidade, a redução de fluxo sanguíneo renal, tremores de extremidades, neuropatia periférica, hipercalemia, acidose hiperclorêmica, diabetes, hipertensão, distúrbios gastrintestinais, crises convulsivas (Watson e Dark, 2012).

Entre os antiproliferativos, a Azatioprina foi a primeira ser utilizada, é um derivado imidazólico da 6-mercaptopurina, com perfil menos tóxico, e seu uso em transplantes renais em humanos iniciou na década de 1960, associado a corticóides, um dos avanços que permitiu que o transplante renal fosse realizado em diversos lugares do mundo. Seu mecanismo de ação envolve a síntese de purinas, interferindo na replicação de DNA e RNA. In vitro, bloqueia a proliferação linfocitária e a produção de IL-2. Seu principal efeito indesejado é supressão medular (Morris e Knechtle, 2013).

O ácido micofenólico (outro antiproliferativo) é um produto da fermentação do *Penicillium brevicompactum* isolado em 1896, com atividade antimicrobiana discreta. Na década de 1960, foi descoberto seu potencial antimitótico, e somente na década de 1990 foram iniciados os ensaios clínicos no transplante, em combinação com ciclosporina, sendo aprovado em 1995 pela agência reguladora americana (FDA). Age como inibidor não-competitivo e reversível da inosina 5' monofosfatodesidrogenase (IMPDH), interfere na síntese de guanina e interrompe o ciclo celular na interfase G1/S, impedindo a proliferação de linfócitos T e B em resposta a estímulo (Morris e Knechtle, 2013).

Os inibidores de mTOR são representados pelo sirolimo e o everolimo, imunossuppressores potentes que inibem o alvo da rapamicina de mamíferos (mammalian target of rapamycin), um complexo enzimático multiprotéico que regula o crescimento, proliferação e sobrevivência dos linfócitos. São metabolizados pelo citocromo P450, principalmente pela subfamília CYP3A4. Seu uso pode ser aditivo aos inibidores de calcineurina ou como seu substituto. A grande vantagem em relação a estas drogas seria quanto a nefrotoxicidade, e um potencial efeito antitumorígeno. Os efeitos colaterais incluem dislipidemia, pneumonite, síndrome hemolítico-urêmica, proteinúria, edema periférico, dificuldade de cicatrização, linfocele, mucosite, anemia e distúrbios gastrintestinais (Watson e Dark, 2012).

O sirolimo, imunossupressor inibidor da via mTOR/p70S6K, reduziu *in vivo* a fosforilação do fosfopeptídeo NS5A que, também está envolvida na replicação viral. Além disso, em um estudo observacional não randomizado,

aberto, foi comprovado *in vitro* que as proteínas mTOR tem um papel protetor contra a apoptose de células infectadas pelo HCV (Wagner e cols., 2010).

Wagner e cols. (2010) mostraram um efeito benéfico sobre a reincidência viral do HCV monitorada pelas transaminases e carga viral, bem como pelos dados histológicos. Eles também relataram melhora da sobrevida após o transplante de fígado em pacientes que receberam sirolimo ao invés de regimes com inibidores de calcineurina.

Assim como o Sirolimo, o Everolimo tem se mostrado um potente inibidor da mTOR e vem sendo bastante utilizado como agente imunossupressor em pacientes transplantados renais. Considerando que não havia, até o início do presente projeto, tratamento específico disponível para a hepatite C em receptores de transplante renal e grande parte dos estudos clínicos excluem pacientes portadores do HCV, existiu a necessidade de protocolos de imunossupressão direcionados a esses pacientes. Não encontramos na literatura revisada estudo referente ao efeito do inibidor da mTOR na redução da carga viral de HCV em transplante renal, justificando a realização deste trabalho que visa avaliar os efeitos da conversão para Everolimo na viremia da hepatite C em receptores de rim adultos.

## 1.8 Referências Bibliográficas

Blotière PO, Tuppin P, Weill A, Ricordeau P, Allemand H. The cost of dialysis and kidney transplantation in France in 2007, impact of an increase of peritoneal dialysis and transplantation. *Nephrology Journals*. 2010; 6(4): 240-7.

Bradley DW, Mc Caustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Post-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: psychochemical evidence that the tubule forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology*, 1985; 88: 773-779.

Brasil. Portaria SAS/MS 221 de 01 de abril de 2002 da Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Medicamentos Excepcionais e de Alto Custo no SUS. Diário Oficial da União, Brasília, Abril 2002.

Brass V, Moradpour D, Bleum HE. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV); 2006 update. *International Journal of Medical Sciences*. 2006;3(2):2-34.

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005. 38: 41-9.

Choo Q-L, Kuo G, Weiner Aj et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-362. *Science* 1989; 244:359-362.

Collaborative Transplant Study (CTS) [acessado em maio de 2014]. Disponível em: <http://www.ctstransplant.org/>

de Medina M, Schiff ER. Hepatitis C: diagnostic assays. *Seminars in Liver Disease*. 1995; 15(1):33-40.

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. *et al*. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*, [S.l.], v. 19, p. 1513-1520, 1994.

Fabrizi F, Martin P, Dixit v. et AL. Hepatitis C virus antibody status and survival after renal transplantation: Meta-analysis of observational studies. *American Journal of Transplantation*. 2005;5:1452.

Forns X, Costa J. HCV virological assessment. *Journal of Hepatology*. 2006; 44: S35-S39.

Garcia SC, Lopes LS, Schott KL, Beck ST, Pomblum VJ. Cyclosporine A and tacrolimus: a review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2004. v. 40 n. 6 p. 393-401

Garcia VD, Filho MA, Pestana JOM. Protocolos de Imunossupressão. In: Garcia, V.D.; Filho, M.A.; Neumann, J.; Pestana, J.O.M. *Transplante de órgãos e tecidos*. 2 ed. São Paulo: Segmento Farma, 2006. p.268-292.

Germer JJ, et al. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *Journal of Clinical Microbiology*., [S.I.], v. 37, p. 2625-2630, 1999.

Gretch DR, Corazon dela Rosa MT, Carithers Jr RL, Wilson RS, Williams B, Corey L, Assessment of hepatitis C viral using molecular amplification technologies: Correlations and clinical implications. *Annals of Internal Medicine: Journal*.1995; 123(5):321-329.

Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine*; 351(26):2715-2729.

Jung R, Soondrum K, Neumaier M. Quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2000;38: 833-6.

Kamar N1, Ribes D, Izopet J, Rostaing L. Treatment of hepatitis C virus infection (HCV) after renal transplantation: implications for HCV-positive dialysis patients awaiting a kidney transplant. *Transplantation*. 2006 Oct 15;82(7):853-6.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Inter, Suppl*. 2013; 3: 1–150.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, *et al*. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*; 27:95-125.

Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 2005.436:933–938.

Lopez-Gomez JM, Verde E, Perez-Garcia R. Bloodpressure, left ventricular hypertrophy and long-term prognosis in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl*. 1998 Dec; 68:S92.

Luan FL, Schaubel DE, Zhang H, Jia X, Pelletier SJ, Port FK, Magee JC, Sung RS. Impact of Immunosuppressive Regimen on Survival of Kidney Transplant Recipients With Hepatitis C. *Transplantation*. 2008;85: 1601–1606.

Mas V, Alvarellos T, Chiurciu C, Camps D, Massari P, Boccardo G. Hepatitis C Virus Infection After Renal Transplantation: Viral Load and Outcome. *Transplantation Proceedings*. 2001.33, 1791–1793.

McGregor E, Jardine AG, Murray LS, Dargie HJ, Rodger RSC, Junor BJR, *et al.* Pre-operative echocardiographic abnormalities and adverse outcome following renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1998; 13:1499.

Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JÁ, *et al.* Hepatitis C antibody status and outcomes in renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72:241.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015; 61(1)11-87.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Protocolo Clínico e Diretrizes. Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF. Julho de 2011.

Morris PJ, Knechtle S. Azathioprine in Kidney Transplantation: Principles and Practice, 7th edition. Eds. P J Morris and Stuart J Knechtle, Elsevier Saunders.2013. Philadelphia. p216-220.

Morris PJ, Knechtle S. Mycophenolate in Kidney Transplantation: Principles and Practice, 7th edition. Eds. P J Morris and Stuart J Knechtle, Elsevier Saunders.2013. Philadelphia. p250-660.

Nainan OV, Kruszon-Moran D, *et al.* Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology*, [S.I.], v. 131, p. 478-484, 2006.

Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver International*. 2011; 31: 1-3.

OPTN/ SRTR 2011 Annual Data Report: Kidney. [acessado em maio de 2014]  
Disponível em:  
[http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual\\_reports/2011/pdf/01\\_kidney\\_12.pdf](http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2011/pdf/01_kidney_12.pdf)

Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiology*. 2004; 12(2): 96-102.

Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clinics In Liver Disease*. 2003; 7: 127– 137.

Razavi H, Elkhoury AC, Elbasha E, *et al.* Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United State. *Hepatology* 2013;57:2164-2170.

RBT – Registro Brasileiro de Transplantes 2013. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2006-2013). Ano XIX num 4.

Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2014/rbt2014-lib.pdf>

Robertson B, Myers G, Howard C, Bretin T, Bukh J, Gaschen B, *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C vírus (VHC) and related viroses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. Archives of Virology. 1998; 143(12):2493-503.

Sallenave MP, Françoso MM, Gusukuma LW; Pestana JO. Transplantar ou não transplantar. In: Pestana, JOM; Freitas, TVS; Tedesco, H. (Org.) *Transplante Renal – Manual Prático*. São Paulo: Livraria Balieiro, 2014. p.3.

Scott DR, Wong JKW, Spicer TS. “Adverse impact of hepatitis C vírus infection on renal replacement therapy and renal transplant patients in Australia and Nova Zeland” Transplantation. 2010. vol 90, 11:1165-1171.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, *et al.* Classification of hepatitis C vírus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. Journal of General Virology. 1993;74 (11):2391-9.

Simmons EM, Langone A, Sezer MT, Vella JP, Recupero P, Morrow JD, *et al.* Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. Transplantation. 2005; 79:914.

Skorecki K, Grenn, J, Brenner, BM. Insuficiência Renal Crônica. In: Braunwald, E. *et al* (ed). Harisson – Medicina interna. 15. ed. Rio de Janeiro: MacGraw Hill, 2002. p. 1640-1652.

Strauss E. Hepatite C. Revistada Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2001;34(1):69-82

Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. Journal of Clinical Virology. 2001; 284:1-12;

Thompson ND, Hellinger WC, Kay RS, Cohen L, Ragan P, Voss RA, *et al.* Healthcare associated hepatitis C vírus transmission among patients in na abdominal organ transplant center. Transplant Infectious Disease. 2009;11(4):324-9.

Valadez JA, Juárez IG, Pedrero RR, Torre A, Management of chronic hepatitis C virus infection in patients with end-stage renal disease: a review. Therapeutics and Clinical Risk Management. 2015;11 329–338.

Wagner D, Kniepeiss D, Schaffellner S, Jakoby E, Mueller H, Fahrleitner-Pammer A, Stiegler P, Tscheliessnigg K, Iberer F. Sirolimus has a potential to

influent viral recurrence in HCV positive liver transplant candidates. *International Immunopharmacology*. 2010. 10, 990–993.

Watson CJE, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 2012;108(S1):i29-i42

Winearls CG, Mason PD. Chronic Renal Failure: Renal Replacement Therapy. In: Morris P.J. (ed). *Kidney Transplantation Principles and Practice*. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p.32-44.

Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, *et al*. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 341(23):1725.

## **2. Objetivos:**

Comparar a carga viral do vírus da hepatite C em pacientes transplantados renais convertidos para Everolimo *versus* pacientes mantidos em um regime contínuo de Inibidores de Calcineurina

### **2.1. Objetivos Secundários:**

Avaliar a segurança dos regimes de tratamento quanto a:

- Incidência de rejeição aguda;
- Incidência de infecções significativas;
- Desenvolvimento de proteinúria;
- Desenvolvimento de malignidade;
- Desenvolvimento de dislipidemia;
- Desenvolvimento de dano hepático;
- Desenvolvimento de diabetes melito pós-transplante Renal (DMPT);
- Sobrevida do enxerto;
- Sobrevida do paciente.

**3. Artigo científico redigido em inglês**

**EFFECT OF EVEROLIMUS CONVERSION IN HEPATITIS  
C VIREMIA IN ADULT KIDNEY RECIPIENTS.**

**Effects of Everolimus in HCV viremia**

L.S. Pacheco<sup>1,2</sup>, V.D. Garcia<sup>1</sup>, R.L. Dal Prá<sup>1</sup>, B.D. Cardoso<sup>1,2</sup>, M.F. Rodrigues<sup>1</sup>, H.K. Zanetti<sup>1,2</sup>, G. Meinerz<sup>1,2</sup>, J. Neumann<sup>1</sup>, E. Keitel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Nephrology and Kidney Transplantation, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Post Graduation Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

A ser submetido à Transplant Infectious Disease

## Abstract

*Introduction:* There is no special immunosuppressive protocol for HCV positive renal transplants recipients. The aim of this study was to evaluate the conversion effect to everolimus on hepatitis C viremia in adult kidney recipients.

*Methods:* This is a pilot single-center, prospective, randomized, open label controlled trial with renal allograft recipients with positive serology for hepatitis C. Patients included were under immunosuppression including calcineurin inhibitors, antiproliferative and prednisone. They were randomized for conversion to Everolimus or maintenance of calcineurin inhibitor. Prednisone and antiproliferative were not changed. The exclusion criteria were eGFR below 30ml/min and proteinuria/creatinine index >0.5. *Results:* Thirty patients were randomized and 28 followed by 12 months (Conversion group=15 and control group=13). Real time PCR HCV levels expressed in log values were comparable in both groups and among patients in the same group. The statistical analysis showed no interaction effect between time and group ( $p\text{-value}_{G*M}= 0.852$ ), overtime intra-groups ( $p\text{-value}_M=0.889$ ) and between treatment and control group ( $p\text{-value}_G=0.286$ ). The mean viral load at baseline, 3, 6, 9 and 12 months was  $5.8 \pm 0.74$ ,  $5.7 \pm 0.89$ ,  $5.8 \pm 0.60$ ,  $5.7 \pm 0.85$ ,  $5.8 \pm 0.93$  in the control group and  $6.1 \pm 0.83$ ,  $6.3 \pm 0.95$ ,  $6.2 \pm 0.87$ ,  $5.6 \pm 1.8$ ,  $6.1 \pm 0.62$  UI/ml in the treatment group. The group conversion showed a higher incidence of dyslipidemia ( $p=0.03$ ) and proteinuria events ( $p=0.01$ ). No differences were observed in the incidence of anemia ( $p=0.17$ ), new onset of posttransplant diabetes mellitus ( $p= 1.00$ ), urinary tract infection ( $p=0.60$ ). The mean eGFR at the baseline, 1, 3, 6, 9 and 12 month after randomization was similar in both groups. During the follow-up there was no acute rejection

episode, malignancies, graft loss or death. *Conclusion:* Our pilot study did not show viral load decrease after conversion to everolimus with antiproliferative maintenance therapy.

## **Introduction**

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection has been recognized as an important health problem worldwide (1). The prevalence of HCV infection is significantly higher in hemodialysis and kidney transplant recipients than in the general population. It is associated with a history of multiple blood transfusions and long-term hemodialysis treatment (2).

Kidney transplantation alone is considered the treatment of choice for HCV-infected patients with end-stage renal disease (ESRD), with preserved liver function and no liver cirrhosis. However, the data on the outcomes of HCV-positive kidney transplant recipients compared with HCV-negative remain contradictory. Some studies showed a lower patient survival, whereas others reported it can be similar to that of HCV-negative patients (3,4).

There is a four to seven fold increase in HCV viremia after transplantation compared to the pretransplant period. It has been suggested that the spectrum of immune response to the virus in immunosuppressed patients is as variable as seen in immunocompetent patients. Less aggressive immunosuppressive protocols should be tested in HCV positive recipients (5).

Studies in liver transplantation found a beneficial effect of sirolimus (SRL) on viral recurrence monitored by transaminases and viral load as well as by histological data. They also reported improved survival after liver transplantation due to hepatitis C for patients receiving SRL rather than calcineurin inhibitor-based regimens (CNI) (6). Other studies also reported good viral control of HCV among liver transplant recipients after conversion to SRL and the reduction of hepatitis C virus recurrence (7,8).

As Sirolimus, the Everolimus (EVR) is a potent mTOR inhibitor and has been used as one of immunosuppressive agent in kidney transplant. As there was no specific treatment for hepatitis C in kidney transplant recipients due to the risk of rejection with gamma-interferon, and most clinical studies exclude patients with HCV, we considered to test an immunosuppressive protocol more appropriate for these patients. We found only one *non*-randomized study in the literature concerning the use of mTOR inhibitor as a potential factor in reducing the viral load of HCV in renal transplantation (14), justifying this study.

## **Patients and Methods**

### ***Study design***

This is a pilot single-center, prospective, randomized, open label controlled trial aiming to compare the viral load of hepatitis C virus in kidney transplant recipients converted to Everolimus versus patients maintained on calcineurin inhibitor. The protocol was approved by an independent ethics committee and registered in the ClinicalTrials.gov database, number NCT01469884. All subjects signed a written informed consent before enrollment and the study was conducted according a good clinical practices and the Declaration of Helsinki. Novartis partially funded this study.

### ***Population***

Renal transplant adult recipients with positive serology for hepatitis C on CNI therapy, with at least three months of follow-up were considered for enrolment. We excluded recipients of multiple organ transplants, calculated GFR < 30ml/min or with urinary protein/creatinine ratio of more than 0.5 (g/g), severe

dyslipidemia, human immunodeficiency virus or hepatitis B positive serology and hepatic cirrhosis. We also excluded patients with acute rejection episodes in the three months before enrolment.

### ***Data collection***

Patients were monitored on an outpatient basis and clinical and laboratory data were evaluated every 3 months. Laboratory evolutions included routine laboratory values, HCV RNA and blood levels of each immunosuppressive medication. Clinical adverse events including drug related side effects, rejection, infection and laboratory abnormalities were documented at each visit.

### ***Quantification of serum HCV RNA***

Serum samples were collected prospectively at study site every 3 months until 12 months after inclusion. Serum HCV RNA was quantified by Real Time Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) analysis (Abbott RealTime HCV, Abbott Molecular Ind. Des Plaines, IL 60018 USA). The viral load is expressed in log values.

### ***Randomization***

Eligible patients were randomized (1:1). A random number sequence was generated by a computer program and placed in sequentially numbered opaque envelopes.

### ***Treatment Arms***

Group 1: EVR + Antiproliferative and/or Prednisone. The conversion was performed abruptly for all patients. CNI was discontinued one day before the day of conversion (Day 1). EVR was introduced on day 1, dose of 1.5mg twice daily adjusted to maintain EVR whole blood trough concentrations between 6 and 10ng/mL. The antiproliferative (Mycophenolic acid or Azathioprine) was maintained and could not be permanently withdrawn during the study and during the conversion. The prednisone dose was not changed until adequate levels of EVR were reached and withdrawal was not allowed at any time after conversion.

Group 2: CNI + Antiproliferative and/or Prednisone. The patients were maintained with CNI [tacrolimus (TAC), adjusted to maintain whole blood trough concentrations between 5 and 10ng/mL or cyclosporine (CyA), adjusted to maintain whole blood trough concentrations between 100 and 200ng/mL]. The antiproliferative (Mycophenolic acid or Azathioprine) and prednisone were maintained and could not be permanently withdrawn during the study.

### ***Definitions***

Biopsy confirmed acute rejection episodes were graded according to Banff 2007 classification. C0 was considered to blood trough concentrations to cyclosporine and tacrolimus. Severe dyslipidemia was fasting triglycerides  $\geq$  400 mg/dL or fasting total cholesterol  $\geq$  350 mg/dL or LDL-cholesterol  $\geq$  160mg/dL despite the use of optimal lipid-lowering therapy.

**Primary end-point**

The primary end-point was to evaluate the effect of conversion to everolimus on hepatitis C viremia in adult kidney recipients.

**Secondary end-point**

Secondary outcomes included treatment failure, graft loss and death. We also evaluated the renal function (eGFR by MDRD formula), and spot urine protein/creatinine ratio (g/g). Safety analysis included incidence of adverse events as dyslipidemia, new onset of diabetes mellitus after transplantation, anemia, urinary tract infection, acute rejection and malignancies.

**Statistical analysis**

Primary and secondary end-points were analyzed in the intention-to-treat population. Qualitative variables are presented as numbers and percentages and treatment groups were compared with  $\chi^2$  or Fisher's exact test. Quantitative variables with normal distribution (verified through the Shapiro-Wilk test) are presented as means and standard deviation and compared using T-test; time after transplantation was *non-normal* and presented as median and interquartile range and compared by Mann Whitney test. For the primary end-point were analyzed using repeated measures ANOVA. All statistical tests were two sided and were performed using the 0.05 level of significance. The program used was SPSS version 20.

## Results

### *Population*

Thirty patients were enrolled in this pilot trial between Jan 26, 2012 and Dec 16, 2014. They were followed up to one year after randomization. Twenty six patients completed one year of study. Two patients were considered screening failure due to no confirmation of the positive serology for hepatitis C. One patient was removed from the study due to proteinuria/creatinuria ratio above 1. One patient withdrew consent. All patients who were randomized and received assigned treatment were included in the intention-to-treat population.

The clinical and demographic characteristics are demonstrated in Table 1.

### *Primary end-points*

HCV levels expressed in log values were comparable in both groups and among patients in the same group. The statistical analysis showed no interaction effect between time and group (  $p\text{-value}_{G*M} = 0.852$ ), overtime intra-groups (  $p\text{-value}_M = 0.889$ ) and between treatment and control group (  $p\text{-value}_G = 0.286$ ). The mean viral load at baseline, 3, 6, 9 and 12 months was  $5.8 \pm 0.74$ ,  $5.7 \pm 0.89$ ,  $5.8 \pm 0.60$ ,  $5.7 \pm 0.85$ ,  $5.8 \pm 0.93$  in the control group and  $6.1 \pm 0.83$ ,  $6.3 \pm 0.95$ ,  $6.2 \pm 0.87$ ,  $5.6 \pm 1.8$ ,  $6.1 \pm 0.62$  in the treatment group (Graphic 1).

### *Secondary end-points*

Patients in Group 1 (conversion) showed a higher incidence of dyslipidemia (66.7 vs. 23.1%,  $p = 0.03$ ) and proteinuria events (53.3 vs. 7.7%,

p=0.01) (two patients had p/c ratio >1.0) compared to Group 2. No differences were observed in the incidence of anemia (33.3 vs. 7.7%, p=0.17), new onset of post-transplant diabetes mellitus (7.7 vs. 6.7%, p= 1.00) and urinary tract infection (20.0 vs. 7.7%, p=0.60) (Table 2).

The mean eGFR at baseline, 1, 3, 6, 9 and 12 month after randomization were  $50.37 \pm 8.63$ ,  $47.91 \pm 7.79$ ,  $52.56 \pm 11.45$ ,  $52.36 \pm 10.66$ ,  $53.74 \pm 15.97$ ,  $51.71 \pm 9.71$  ml/min in the control group and  $47.91 \pm 12.26$ ,  $54.12 \pm 15.33$ ,  $51.08 \pm 15.66$ ,  $53.13 \pm 17.09$ ,  $53.74 \pm 15.97$ ,  $52.99 \pm 15.64$  ml/min in the conversion group. There was no statistical difference between groups (Graphic 2).

During follow-up there was no acute rejection episode, malignancies, graft loss or death.

## Discussion

Studies and meta-analyses have shown that the use of mTOR inhibitors was associated with lower rates of CMV infection (9,10) and reduction of Epstein-Barr virus (EBV) (11,12,13). This can be attributed to possible antiviral properties of mTOR inhibitors at immunosuppressive doses.

We measured the effect of everolimus conversion in hepatitis C viremia in adult kidney recipients. However, opposite to the results in liver transplantation, there was no difference in viral load reduction comparing the two groups. A decrease of two logs of viral load was not seen even in the same group over time.

We can not be sure about lack of antiviral activity of everolimus in HCV because we only analyzed the viral load but not histological hepatic damage

changes. Also, the possibility of anti-proliferative maintenance therapy may contribute for no viral load change.

Studies conducted with liver transplantation reported beneficial effect of mTOR inhibitors on viral load after liver transplantation in hepatitis C patients compared to calcineurin inhibitor-based regimens (6,7,8). A non-randomized study recruited patients after liver transplantation and introduced mTOR inhibitor as immunosuppressive therapy, comparing with a control group on calcineurin inhibitors. All patients received prednisolone and mofetil mycophenolate. Patients in the mTOR inhibitor group showed a decrease of two or more log values in the viral load among baseline values and months 9 and 12 of follow-up (6).

Soliman et al., 2013 have performed a prospective non-randomized study that suggested that mTOR inhibitor has the potential to suppress viral replication in hepatitis C virus-positive renal transplant candidates. Sirolimus was introduced in 10 patients due to allograft dysfunction caused by cyclosporine nephrotoxicity. They were compared with 15 patients under cyclosporine (control group). The study showed a significant decrease in the HCV PCR levels, although analyzing the absolute values of viral load instead of log values as recommended by literature (15). The evaluation by absolute value is not considered an ideal method for monitoring due to high variability of viral load detected by real time PCR.

As showed by previous studies (10) the most prevalent adverse events (AEs) with mTOR inhibitors were dyslipidemia and proteinuria. In this study two patients had proteinuria/creatinuria ratio above 1. One of them responded to

ACE inhibitor therapy. The other did not respond to ACE inhibitor treatment but proteinuria decreased after conversion to tacrolimus.

The main limitation of our study is its single-center nature, but it is a pilot study because there was no available data on renal transplants at the conception of the trial. The follow-up period was only one year. Maybe there need for a longer observation time, although the study with liver patients was able to detect two log difference at 9 month after conversion.

Antiviral therapy using interferon and ribavirin is the main approach to prevent disease progression but is not indicated for renal transplant patients due to risk of rejection. Of note, a new generation of direct antiviral agents (DAAs) was recently approved and can turn out to be a viable option for kidney transplant recipients, since this is an interferon-free treatment. However, there are no clinical trials in kidney transplant patients with this new therapy, only a series of cases published (16).The introduction of these new drugs should not end the adequacy of immunosuppression studies of renal transplant recipients with hepatitis C, since this may provide an optimal immunosuppression directed to this population.

In conclusion, our pilot study did not show viral load decrease after conversion to everolimus associated with antiproliferative maintenance therapy.

## Reference

1. Nature outlook: Hepatitis C. *Nature* 2011; 474; S1-S21.
2. Razavi H, Elkhoury AC, Elbasha E, et al. Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. *Hepatology* 2013; 57:2164-2170.
3. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, et al. Hepatitis C antibody status and outcomes in renal transplant recipients. *Transplantation* 2001;72:241
4. Fabrizi F, Martin P, Dixit v. et AL. Hepatitis C virus antibody status and survival after renal transplantation: Meta-analysis of observational studies. *American Journal of Transplantation*. 2005;5:1452.
5. Mas V, Alvarellos T, Chiurciu C, Camps D, Massari P, Boccardo G. Hepatitis C Virus Infection After Renal Transplantation: Viral Load and Outcome. *Transplantation Proceedings*. 2001;33, 1791–1793.
6. Wagner D, Kniepeiss D, Schaffellner S, Jakoby E, Mueller H, Fahrleitner-Pammer A, Stiegler P, Tscheliessnigg K, Iberer F. Sirolimus has a potential to influence viral recurrence in HCV positive liver transplant candidates. *International Immunopharmacology*. 2010;10, 990–993.
7. Gallego, R., Henriquez, F.; Oliva, E.; Camacho, R.; Hernández, R.; Hortal, L.; Sablón, N.; Quintana, B.; Santana, R.; Gonzalez, F.; Palop, L.; Veja, N. Switching to Sirolimus in Renal Transplant Recipients With Hepatitis C Virus: A Safe Option. *Transplantation Proceedings*. 2009;41, 2334–2336.
8. Benedetto, F. D.; Sandro, S. D.; Ballarin, R.; Guaraldi, G.; Gerunda, G. E. Rapamycin and HIV Replication in Liver Transplant Recipients. *Transplantation*, 2010;9, 1040.
9. Andrassy J, Hoffmann VS, Rentsch M, et al. Is cytomegalovirus prophylaxis dispensable in patients receiving an mTOR inhibitor based immunosuppression? A systematic review and metaanalysis. *Transplantation* 2012; 94: 1208–1217.
10. Lim WH, Eris J, Kanellis J, et al. A systematic review of conversion from calcineurin inhibitor to mammalian target of rapamycin inhibitors for maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2014;14: 2106–2119
11. Wowro SJ, Schmitt KR, Tong G, Berger F, Schubert S. Effects of mTOR and calcineurin inhibitor combined therapy in Epstein-Barr virus positive and negative Burkitt lymphoma cells. *Int Immunopharmacol* 2016; 30: 9-17.

12. Kawada J, Ito Y, Iwata S, Suzuki M, Kawano Y, Kanazawa T, Siddiquey MN, Kimura H. mTOR inhibitors induce cell-cycle arrest and inhibit tubor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res* 2014; 21: 5412-22.
13. Sindhi R, Webber S, Venkataramanan R, et al. Sirolimus for rescue and primary immunosuppression in transplanted children receiving tacrolimus. *Transplantation* 2001; 72(5): 851-5.
14. Soliman A, Fathy Ahmed, Hhashab S, Shaheen N, Soliman M. Sirolimus Conversion may suppress viral replication in hepatitis c virus-positive renal transplant candidates. *Exp Clin Transplant*. 2013;11(5):408-11.
15. Alan Franciscus. HCV Viral Load Tests. *Hepatitis C Support Project* 2014; 5.
16. Kamar N, Marion O, Rostain L, et al. Efficacy and Safety of Sofosbuvir-Based Antiviral Therapy to Treat Hepatitis C Virus Infection After Kidney Transplantation. *Am J Transplant* 2015;20:1-6.

**Table 1. Clinical and demographic characteristics of adult kidney transplant recipients at enrollment of study.**

	All Patients N = 30	Control (CNI) N=15	Conversion (EVL) N=15	P
Recipient age, years (mean ± SD)	39.80 ± 11.3	39.67 ± 1.9	40.00 ± 11.1	0.93
Recipient gender, male, N (%)	21 (70.0)	11(73.3)	10 (66.7)	1.00
Recipient ethnicity, Caucasian, N (%)	25 (83.3)	11 (73.3)	14 (93.3)	0.33
Baseline Condition				
Hypertension (%)	6 (20.0)	4 (26.7)	2 (13.3)	
APKD (%)	2 (6.7)	1 (6.7)	1 (6.7)	
CGN (%)	3 (10.0)	1 (6.7)	2 (13.3)	
Undetermined (%)	11 (36.7)	5 (33.3)	6 (40.0)	
Other (%)	8 (26.7)	4 (26.7)	4 (26.7)	
Panel reactive antibody above zero N (%) *	16/25 (64)	8 (66.7)	8 (61.5)	1.00
HLA mismatches (mean ± SD)	3.31 ± 1.43	3.20 ± 1.56	3.45 ± 1.29	0.66
Time after transplantation until enrolment (med IR) Months	84.59(23.75;129.0)	84.00(26.00;123.0)	85.00(19.00;154.0)	0.78
New onset of Diabetes after transplantation, N (%)	3 (10.0)	1 (6.7)	2 (13.3)	0.10
Donor age, years (mean ± SD)	39.80 ± 13.9	42.3 ± 12.1	37.20 ± 15.4	0.32
Expanded criteria donors, N (%)	2 (6.7)	1 (6.7)	1 (6.7)	1.00
Donor gender, male, N (%)	15 (50.0)	6 (40.0)	9 (60.0)	0.46
Donor type, deceased, N (%)	23 (76.7)	11 (73.3)	12 (80.0)	1.00
Baseline immunosuppression				
TAC + MPA + PRED (%)	18 (60.0)	9 (60.0)	9 (60.0)	
CYA + AZA + PRED (%)	4 (13.3)	0 (0)	4 (13.3)	
CYA + MPA + PRED (%)	7 (23.3)	5 (33.3)	2 (13.3)	
TAC + AZA + PRED (%)	1 (3.3)	1 (6.7)	0 (0)	
Recipient HCV genotype				
Genotype 3	13 (56.5)	10 (71.4)	3 (33.3)	
Genotype 1	10 (43.5)	4 (28.6)	6 (66.7)	
Subgenotype 1a	7 (70.0)	6 (85.7)	1 (14.3)	
Subgetotype 1b	3 (30.0)	2 (66.7)	1 (33.3)	

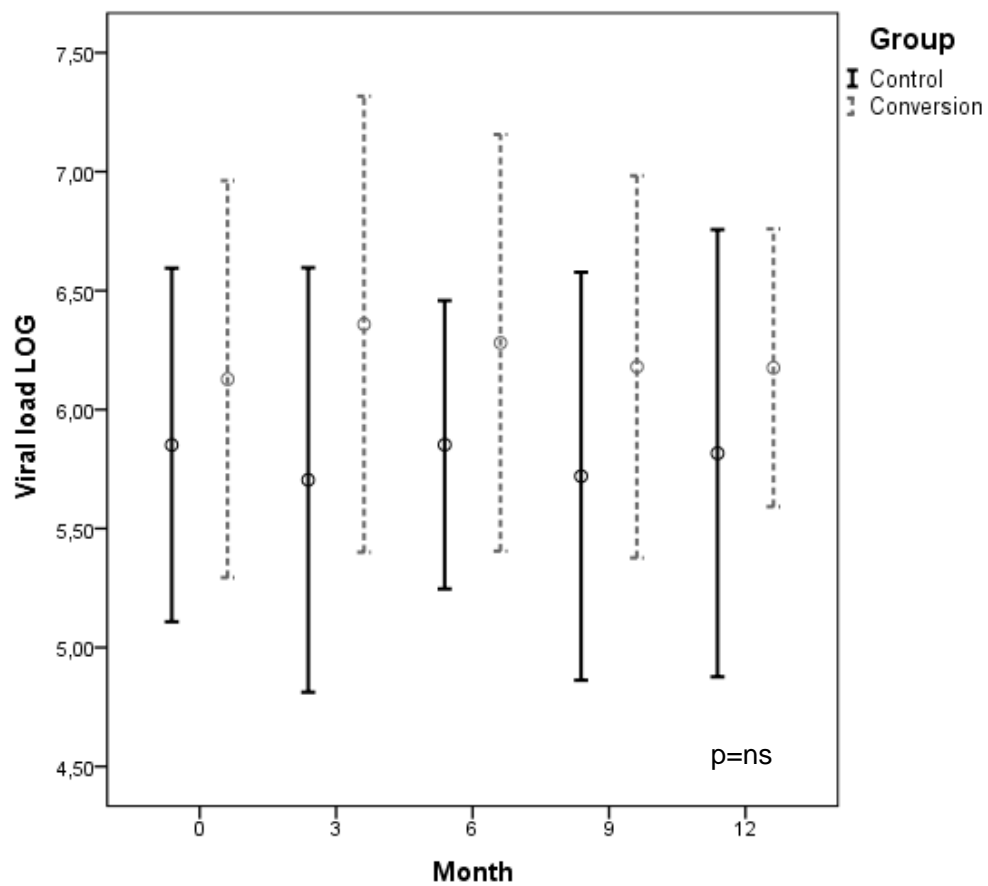
APKD = adulta polycystic kidney disease, CGN = chronic glomerulonephritis, TAC = Tacrolimus, MPA = Mycophenolic acid, CYA = Cyclosporin, AZA = Azathioprine, PRED = Prednisone, EVL = Everolimus, CNI = Calcineurin inhibitor, HCV = hepatitis C virus, HLA = , human leukocyte antigens, IR = interquartile range, N = number, Med = Median, \* Were located panel reactive antibody in only 25 patients.

**Table 2. Adverse events of special interest in both groups during the follow-up.**

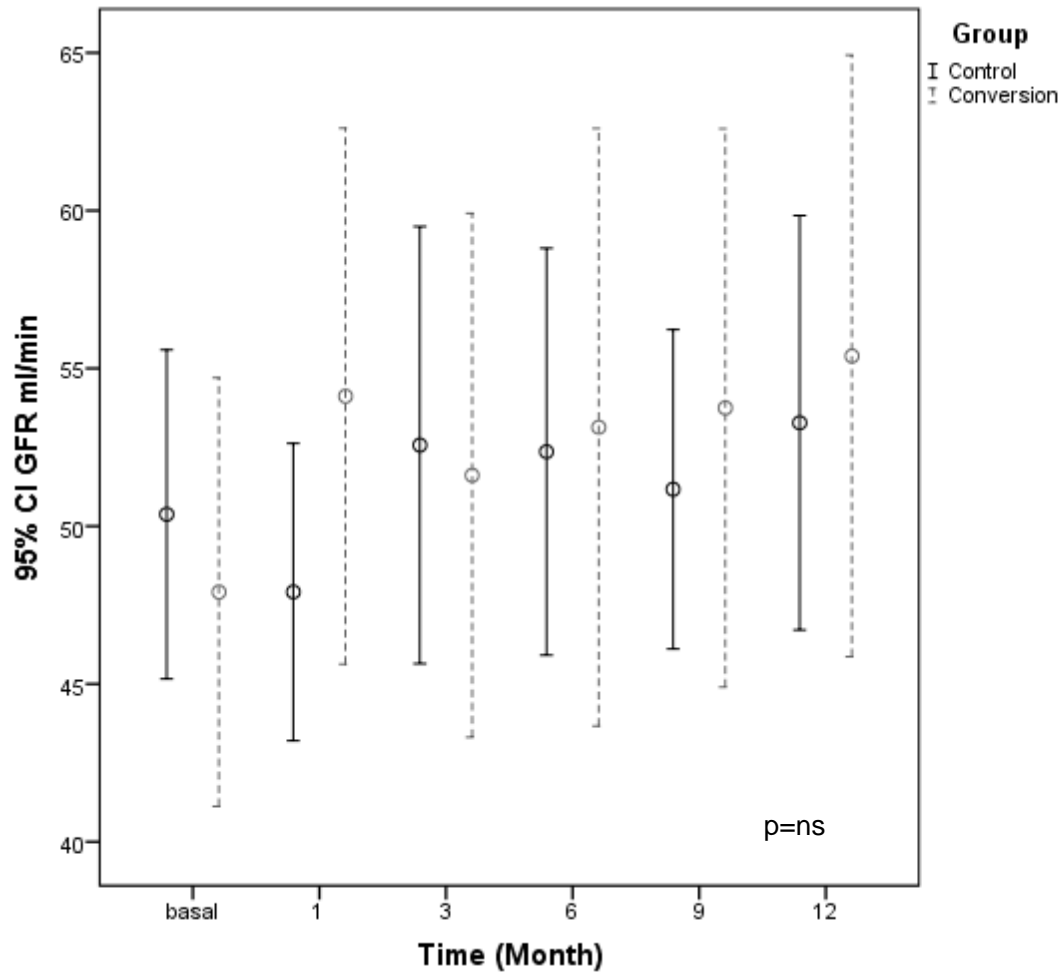
	All Patients N = 28	Control (CNI) N=13	Conversion (EVL) N=15	P
Anemia, N (%)	6 (20.0)	1 (7.7)	5 (33.3)	0,17
Dyslipidemia, N (%)	13 (43.3)	3 (23.1)	10 (66.7)	0.03
New onset of posttransplant diabetes mellitus, N (%)	2 (6.7)	1(7.7)	1 (6.7)	1.00
Proteinuria ( >0,5 upr) N (%)	9 (30.0)	1 (7.7)	8 (53.3)	0.01
Urinary tract infection, N (%)	4 (13,3)	1 (7,7)	3 (20,0)	0,60

EVL = Everolimus, CNI = Calcineurin inhibitor , upr = urine protein/creatinine ratio, N = number

Graphic 1. HCV levels viral load, expressed in log values, comparable in between groups and among patients in the same group at baseline, 3, 6, 9 and 12 months.



Graphic 2. Mean eGFR (ml/min) in the control group versus conversion group during the follow-up.



### **3. Considerações Finais:**

Este estudo teve uma bolsa parcial da Novartis, porém a mesma não participou da análise dos resultados. Os pesquisadores tiveram autonomia no desenvolvimento do estudo.