



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

André Roberto Bussmann

Efeitos da L-arginina na proteção renal por meio da dosagem plasmática e urinária de biomarcadores e histologia: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos sob anestesia inalatória

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu

2016

André Roberto Bussmann

Efeitos da L-arginina na proteção renal por meio da dosagem plasmática e urinária de biomarcadores e histologia: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos sob anestesia inalatória

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SECÃO TEC. AQUIS. TRATAMENTO DE INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE- BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Bussmann, André Roberto.

Efeitos da L-arginina na proteção renal por meio da dosagem plasmática e urinária de biomarcadores e histologia: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos sob anestesia inalatória / André Roberto Bussmann. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Norma Sueli Pinheiro Módolo

Capes: 40102130

1. Rins - Histologia. 2. Isquemia. 3. Lesão renal aguda. 4. Arginina. 5. Marcadores bioquímicos

Palavras-chave: Isquemia; KIM-1; IL-18; L-arginina; lesão renal aguda; NGAL

Dedicatória

À minha esposa, Regina, pela paciência, carinho, amor e dedicação demonstrados ao longo dos anos.

Aos meus filhos, Eduardo e Gustavo, pela alegria de suas presenças e pelo companheirismo.

Aos meus pais, José Jair e Delma, por construírem o meu caráter e me ensinarem o caminho.

Agradecimento Especial

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina".

Cora Coralina

À Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo, amiga, orientadora e mestre, que demonstrou ao longo desses anos de convivência acadêmica muito carinho e sabedoria.

Meu muito obrigado e amizade.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, por ser instituição de excelência acadêmica.

À FAPESP, pelo apoio na forma de Auxílio à Pesquisa - Regular, Processo número 12/13603-2.

Aos professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todo o aprendizado e ensino ofertado com qualidade.

À professora Maria Aparecida Domingues, pela colaboração na avaliação histopatológica.

À Rosângela Martins, pela avaliação estatística do trabalho.

À Neli Aparecida Pavan, Joana Jacirene Costa Teixeira, André Renato Passaroni, Sônia Maria Martins e Silva, Tatiana Pineiz, funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, que sempre se mostraram acessíveis e inspirados a auxiliar na evolução desse projeto.

A Marcos Antônio Marton Filho, Patrícia Amado e Renata Pinheiro Módolo, alunos de iniciação científica, pelo auxílio na realização da pesquisa.

"O maior inimigo do conhecimento não é a
ignorância,
é a ilusão
do conhecimento"

Stephen Hawking

Bussmann AR. Efeitos da L-arginina na proteção renal por meio da dosagem plasmática e urinária de biomarcadores e histologia: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos sob anestesia inalatória. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2016. 83p.

Resumo

Justificativa: Durante lesão de isquemia e reperfusão renal ocorre a inativação de óxido nítrico (NO), essa inativação diminui o relaxamento arterial endotélio-dependente e independente. O aumento nos níveis de NO poderia melhorar a disfunção endotelial e o relaxamento arterial diminuindo a lesão renal. O NO, sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), parece exercer um efeito protetor sobre os rins durante a lesão de isquemia/reperfusão (I/R). O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da L-arginina nos níveis dos biomarcadores de lesão (NGALp, NGALu, KIM-1 e IL-18) na função e na histopatologia renal em ratos submetidos a lesão de I/R.

Métodos: 32 ratos Wistar foram randomizados em 4 grupos: Sham (S): Laparotomia e nefrectomia direita. Controle (C): Laparotomia e nefrectomia direita, I/R em rim esquerdo. Controle L-arginina (CLA): Laparotomia e nefrectomia direita, L-arginina na dose de $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dose}^{-1}$, 24 e 1 hora antes. L-arginina (LA): Laparotomia e nefrectomia direita, I/R em rim esquerdo, L-arginina na dose de $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dose}^{-1}$, 24 e 1 hora antes. Foram analisados os níveis de NGALp, NGALu, KIM-1 e IL-18, creatinina e histopatologia renal. Nível de significância: $p<0,05$.

Resultados: Creatinina aumenta em todos os grupos com $\text{LA}\approx\text{C}>\text{S}\approx\text{CLA}$. A NGALp, aumenta em todos os grupos com evolução semelhante. A NGALu foi maior no grupo C e CLA em relação ao grupo LA e apresentou valores intermediários no grupo S. Os níveis de KIM-1 aumentam nos grupos S, CLA e LA, porém na análise de contrastes não há diferença na evolução dos grupos. A IL-18 apresentou valores maiores no grupo LA comparado aos demais grupos (C, S e CLA). Os grupos C e LA apresentaram grau de lesão no lado esquerdo maior que os grupos S e CLA. Não existe diferença histopatológica entre C e LA e nem entre S e CLA.

Conclusão: A L-arginina não exerce efeito protetor ou danoso aos rins submetidos a lesão de I/R na avaliação da função, da histopatologia renal e dos níveis de NGALp, KIM-1.

Palavras-chave: isquemia; lesão renal aguda; L-arginina; NGAL; KIM-1; IL-18

Bussmann AR. The effects of L-arginine in renal protection using urinary and serum biomarkers levels and histopathologic features: experimental model study of ischemia/reperfusion injury in rats under inhalatory anesthesia. [Ph.D. thesis]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2016. 83p.

Abstract

Background: Nitric oxide (NO) inactivation occurs during renal ischaemia/reperfusion injury. This inactivation decreases endothelium-dependent and -independent arterial relaxation. Higher NO levels can improve endothelial dysfunction and arterial relaxation, thereby reducing the level of kidney injury. NO, synthesized from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS), seems to exert a protective effect on the kidneys during tissue ischemia-reperfusion injury. The objective of this study was to evaluate the effect of L-arginine on the levels of injury biomarkers (pNGAL, uNGAL, KIM-1 e IL-18) for kidney function and histology in rats subjected ischaemia-reperfusion injury.

Methods: Thirty-two Wistar rats were randomised into the following 4 groups: Sham (S), laparotomy and right nephrectomy; Control (C), laparotomy and right nephrectomy and left kidney I/R; L-arginine control (LAC), laparotomy and right nephrectomy and L-arginine at a dose of $800 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dose}^{-1}$, 24 hours and 1 hour before surgery; and L-arginine (LA), laparotomy and right nephrectomy, left kidney I/R, and L-arginine at a dose of $800 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dose}^{-1}$, 24 hours and 1 hour before surgery. The pNGAL, uNGAL, KIM-1 e IL-18 and creatinine levels and kidney histopathology were analysed. The significance level was $p < 0.05$.

Results: Creatinine was increased in all groups, with $LA \approx C > S \approx LAC$. pNGAL was increased in all groups and showed a similar trend. uNGAL levels were higher in groups C and LAC than LA and had intermediate values in group S. The KIM-1 levels were increased in the S, LAC and LA groups, but the contrast analysis revealed no differences between the groups in terms of their trends. IL-18 levels were higher in LA than in the other groups (C, S and LAC). The C and LA groups, compared with the S and LAC groups, had higher damage on the left side. There was no histopathological difference between C and LA or between S and LAC.

Conclusion: L-arginine does not exert a damaging or protective effect on kidneys undergoing I/R injury based on the evaluation of kidney functions, histopathology and pNGAL and KIM-1 levels.

Keywords: ischemia; reperfusion; acute kidney injury, L-arginine; NGAL; IL-18; KIM-1;

Lista de Tabelas

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1 | Estadiamento da LRA..... | 16 |
| Tabela 2 | Grau de lesão renal segundo Park..... | 35 |
| Tabela 3 | Peso..... | 37 |
| Tabela 4 | Análise longitudinal da temperatura..... | 38 |
| Tabela 5 | ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a variável de monitorização temperatura..... | 39 |
| Tabela 6 | Análise longitudinal da PAM..... | 40 |
| Tabela 7 | ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a variável de monitorização PAM..... | 41 |
| Tabela 8 | Análise longitudinal do biomarcador NGALp..... | 42 |
| Tabela 9 | Análise longitudinal do biomarcador NGALu..... | 43 |
| Tabela 10 | ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para os biomarcadores NGALp e NGALu..... | 44 |
| Tabela 11 | Análise longitudinal do biomarcador KIM-1..... | 45 |
| Tabela 12 | ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador KIM-1..... | 46 |
| Tabela 13 | Análise longitudinal do biomarcador IL-18..... | 47 |
| Tabela 14 | ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador IL-18..... | 48 |
| Tabela 15 | Análise longitudinal da creatinina..... | 49 |
| Tabela 16 | ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a creatinina..... | 50 |
| Tabela 17 | Análise longitudinal da ureia..... | 51 |
| Tabela 18 | ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a ureia..... | 52 |
| Tabela 19 | Classificação de RIFLE/AKIN..... | 53 |
| Tabela 20 | Grau de lesão histológica em rim direito..... | 54 |
| Tabela 21 | Grau de lesão histológica em rim esquerdo..... | 55 |
| Tabela 22 | Correlação entre o grau de lesão do rim esquerdo com os biomarcadores..... | 57 |

Lista de Figuras

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Comparação entre os critérios de RIFLE e AKIN | 15 |
| Figura 2 | Alterações na estrutura celular após LRA isquêmica | 18 |
| Figura 3 | Alterações no metabolismo celular após lesão isquêmica renal | 20 |
| Figura 4 | Natureza e fonte de NGAL no plasma e na urina durante LRA | 23 |
| Figura 5 | Esquema da sequência experimental..... | 32 |
| Figura 6 | Temperatura ao longo do experimento. | 38 |
| Figura 7 | PAM ao longo do experimento. | 40 |
| Figura 8 | Boxplot - NGALp ao longo do experimento..... | 42 |
| Figura 9 | Boxplot - NGALu ao longo do experimento..... | 43 |
| Figura 10 | KIM-1 ao longo do experimento..... | 45 |
| Figura 11 | IL-18 ao longo do experimento..... | 47 |
| Figura 12 | Creatinina ao longo do experimento. | 49 |
| Figura 13 | Ureia ao longo do experimento. | 51 |
| Figura 14 | Grau de lesão histológica em rim direito. | 54 |
| Figura 15 | Grau de lesão histológica em rim esquerdo. | 55 |
| Figura 16 | Microscopia óptica dos rins esquerdos | 56 |
| Figura 17 | Novo espectro de LRA: combinação de marcadores funcionais e de dano. | 67 |
| Figura 18 | Novos critérios para o diagnóstico de LRA. | 68 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|-------------------|--|
| ADP | Adenosina difosfato |
| ADQI | Acute Dialysis Quality Initiative |
| AIQ | Amplitude interquartil |
| AKIN | Acute Kidney Injury Network |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| ANOVA | Analisis of variance |
| APACHE II | Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AURoC | Area under receiver operating characteristic curve |
| C | Controle |
| CLA | Controle L-arginina |
| DEH | Dose equivalente em humanos |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DP | Desvio padrão |
| DR | Dose em ratos |
| DU | Débito urinário |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FC | Frequência cardíaca |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FPR | Fluxo plasmático renal |
| IL-18 | Interleucina-18 |
| I/R | Isquemia/Reperusão |
| IRA | Insuficiência renal aguda |
| KDIGO | Kidney Disease: Improving Global Outcome |
| KIM-1 | Kidney injury molecule |
| LA | L-arginina |
| L-FABP | Liver Fatty Acid-binding protein |
| L-NAME | Nitro-L-arginine methyl ester |
| LRA | Lesão renal aguda |
| MDA | Malondialdeído |
| NADH ⁺ | Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina |

| | |
|-------|---|
| NGAL | Neutrophil gelatinase-associated lipocalin |
| NGALp | Neutrophil gelatinase-associated lipocalin plasmática |
| NGALu | Neutrophil gelatinase-associated lipocalin urinária |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintetase |
| eNOS | Óxido nítrico sintetase endotelial |
| iNOS | Óxido nítrico sintetase induzível |
| nNOS | Óxido nítrico sintetase neuronal |
| PAM | Pressão arterial média |
| QL | Quimioluminescencia hidroperoxido-iniciada |
| RIFLE | Risk/Injury/Failure/Loss/ End stage kidney disease |
| RFG | Ritmo de filtração glomerular |
| S | Sham |
| TRR | Trapia de reposição renal |
| UNESP | Universidade do Estado de São Paulo |
| VPP | Valor preditivo positivo |
| VPN | Valor preditivo negativo |
| XO | Xantina oxidase |

Sumário

| | |
|--------------------------------|--|
| Lista de Tabelas | |
| Lista de Figuras | |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | |
| 1 | Introdução..... 14 |
| 1.1 | Lesão Renal Aguda..... 14 |
| 1.2 | Lesão de Isquemia/Reperusão..... 16 |
| 1.3 | Biomarcadores..... 20 |
| 1.3.1 | NGAL..... 22 |
| 1.3.2 | KIM-1..... 25 |
| 1.3.3 | IL-18..... 26 |
| 1.4 | L-arginina..... 27 |
| 2 | Objetivos..... 29 |
| 3 | Materiais e Métodos..... 30 |
| 3.1 | Grupos Experimentais..... 30 |
| 3.2 | Dose..... 31 |
| 3.3 | Anestesia..... 31 |
| 3.4 | Manobras de Isquemia-Reperusão..... 31 |
| 3.5 | Sequência Experimental..... 32 |
| 3.6 | Momentos..... 34 |
| 3.7 | Critérios de RIFLE e AKIN..... 34 |
| 3.8 | Histopatologia..... 35 |
| 3.9 | Variáveis..... 35 |
| 3.10 | Metodologia Laboratorial..... 36 |
| 3.11 | Análise Estatística..... 36 |
| 4 | Resultados..... 37 |
| 4.1 | Peso..... 37 |
| 4.2 | Frequência Cardíaca..... 37 |
| 4.3 | Temperatura..... 38 |
| 4.4 | Pressão Arterial Média..... 40 |
| 4.5 | NGALp e NGALu..... 42 |
| 4.6 | KIM-1..... 45 |
| 4.7 | IL-18..... 47 |
| 4.8 | Creatinina..... 49 |
| 4.9 | Ureia..... 51 |
| 4.10 | Critérios de RIFLE e AKIN..... 53 |
| 4.11 | Histopatologia..... 54 |
| 4.12 | Correlação: Histopatologia x Biomarcadores..... 57 |
| 5 | Discussão..... 58 |
| 5.1 | Modelo Animal..... 58 |
| 5.2 | Isquemia/Reperusão..... 60 |

| | | |
|---|----------------------------|----|
| 6 | Considerações Finais | 71 |
| 7 | Conclusão | 72 |
| 8 | Referências | 73 |
| 9 | Anexos | 81 |

1 Introdução

1.1 Lesão Renal Aguda

Durante muitos anos uma diminuição aguda e potencialmente reversível no ritmo de filtração glomerular foi chamada de insuficiência renal aguda (IRA). O termo IRA foi usado inicialmente em 1951 por Homer W. Smith referindo-se a IRA relacionada com lesão traumática. A IRA é uma síndrome que se caracteriza por rápida diminuição do ritmo de filtração glomerular (RFG)⁽¹⁾, associada ao acúmulo de resíduos como ureia e creatinina⁽²⁾. As mudanças na função renal são manifestações comuns em doenças graves e sua importância é refletida nos cuidados com a monitorização fisiológica e bioquímica. A incidência de lesão renal aguda alcançou proporções epidêmicas, afetando entre 5% e 6% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva, nos quais é um preditor independente de morbidade e mortalidade. Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos, as taxas de morbidade e de mortalidade da lesão renal permanecem altas, podendo chegar a mais de 60%⁽³⁾.

Infelizmente o progresso nessa área durante muito tempo foi prejudicado pelas definições imprecisas de disfunção renal, cuja classificação e definição não eram universalmente aceitas, existindo mais de 35 definições diferentes na literatura⁽⁴⁾. O grupo de estudos *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) propôs, em 2004, algumas mudanças na descrição e terminologia de IRA.

A primeira modificação sugerida foi o uso do termo lesão renal aguda (LRA), que inclui o espectro inteiro da doença, englobando lesão renal direta, pequena diminuição aguda e potencialmente reversível na taxa de filtração glomerular até a necessidade de terapia de reposição renal. A troca do termo utilizado foi baseada em dados que sugerem fortemente que apenas alterações discretas na creatinina sérica estão relacionadas com morbidade e mortalidade clinicamente significantes.

A segunda alteração foi na definição de IRA. Com o intuito de desenvolver uma diretriz para o manejo de LRA o mesmo grupo (ADQI) também sugeriu a classificação de RIFLE (Risk/Injury/Failure/Loss/End-stage kidney disease)^(5, 6). Nessa classificação proposta os três primeiros estágios representam o grau de gravidade da

lesão e os últimos dois estágios representam critérios de prognóstico. O uso desses critérios para diagnóstico de LRA também tem demonstrado ser um bom preditor do prognóstico, uma vez que a mortalidade aumenta com a piora da classe RIFLE^(7, 8).

Após a publicação da classificação de RIFLE, muitos grupos vêm estudando e validando os seus critérios, porém, de acordo com dados mais atuais, notou-se que mudanças nos níveis séricos de creatinina menores que os descritos no sistema RIFLE podem estar associadas com desfechos adversos. Levando em consideração esses estudos, o grupo Acute Kidney Injury Network (AKIN) propôs algumas modificações na classificação de RIFLE⁽⁹⁾. As alterações incluem: a) os critérios de prognóstico foram removidos e os critérios de gravidade são designados como estágio 1, 2 e 3; b) a categoria “*Risk*” do RIFLE foi ampliada para incluir um aumento na creatinina sérica de no mínimo 0,3mg.dL⁻¹; c) uma janela de 48 horas é determinada para documentação de qualquer estágio. As duas classificações estão descritas na figura 1.

| RIFLE | | Acute Kidney Injury Network | | | |
|----------------|--|--|---|--|--|
| | Creatinina/RFG | Débito Urinário (DU) | Creatinina | Débito Urinário (DU) | |
| Risk | Aumento Cr 1,5x ou RFG diminui > 25% | DU <0,5mL/kg/h em 6hs | Estágio 1 | Aumento Cr >50% ou ≥0,3mg/dL | DU <0,5mL/kg/h em 6hs |
| Injury | Aumento Cr 2x ou RFG diminui >50% | DU <0,5mL/kg/h em 12hs | Estágio 2 | Aumento Cr >100% | DU <0,5mL/kg/h em 12hs |
| Failure | Aumento Cr 3x ou RFG diminui >75% ou Cr ≥4mg/dL com aumento agudo ≥ 0,5mg/dL) | DU <0,3mL/kg/h em 24hs ou anúria em 12hs | Estágio 3 | Aumento Cr >200% ou Cr ≥4mg/dL (com aumento agudo ≥ 0,5mg/dL) | DU <0,3mL/kg/h em 24hs ou anúria em 12hs |
| Loss | Lesão renal aguda persistente=perda completa de função renal > 4 semanas | | Pacientes que recebem terapia de reposição renal (TRR) apresentam critérios para estágio 3, independente do estágio que se encontravam no início da TRR | | |
| ESKD | Doença renal terminal | | | | |

Figura 1 - Comparação entre os critérios de RIFLE e AKIN. Adaptada de Bellomo 2004⁽⁶⁾ e Mehta 2007⁽⁹⁾

Risk - Risco; Injury - Dano; Failure - Falência; Loss - Perda; ESKD - Doença renal terminal; Cr - Creatinina

Posteriormente o grupo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) sugeriu a unificação da definição de LRA, uma vez que ambas definições são baseadas na creatinina sérica e no débito urinário e ambas foram validadas em estudos posteriores. Além disso existe a necessidade de uso de uma única definição nas

pesquisas e na prática clínica⁽¹⁰⁾.

Os critérios usados pelo grupo KDIGO são os seguintes:

- 1) LRA é definida como qualquer dos critérios:
 - Aumento na creatinina sérica em 0,3mg/dL em 48 horas
 - Aumento na creatinina sérica para 1,5 vezes a basal conhecida ou presumida, ocorrida nos 7 dias prévios
 - Débito urinário <0,5 mL/kg/h durante 6 horas.
- 2) LRA é estadiada para gravidade conforme os critérios da tabela 1. Para atingir o estágio 3 ($Cr > 4\text{mg.dL}^{-1}$) ao invés de considerarmos um aumento na creatinina de $\geq 0,5\text{mg.dL}^{-1}$ em um período não especificado, é necessário que o paciente primeiro atinja os critérios para estágio 1.

Tabela 1 - Estadiamento da LRA. Adaptada de KDIGO, 2012⁽¹⁰⁾.

| Estágio | Creatinina Sérica | Débito Urinário |
|---------|---|---|
| 1 | 1,5-1,9 vezes basal OU $\geq 0,3\text{mg/dL}$ | <0,5mL/kg/h por 6-12hs |
| 2 | 2,0-2,9 vezes basal | <0,5mL/kg/h por $\geq 12\text{hs}$ |
| 3 | 3 vezes basal OU $\geq 4,0\text{mg/dL}$ OU Início de TRR OU (em menores de 18 anos) diminuição na RFG para $<35\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ | <0,3mL/kg/h por $\geq 24\text{hs}$ OU anúria por $\geq 12\text{hs}$ |

1.2 Lesão de Isquemia/Reperusão

As causas de LRA são tradicionalmente divididas em três categorias: pré-renal, renal intrínseca e pós-renal. Na forma pré-renal ocorre elevação da ureia e creatinina séricas como uma resposta fisiológica a hipoperfusão renal, nessa forma a integridade do tecido renal está preservada⁽¹¹⁾. A forma pós-renal ocorre por obstrução intrínseca ou extrínseca das vias urinárias. Na forma renal a necrose tubular aguda é a responsável por 75% das causas de LRA. Em pacientes graves o choque séptico (47,5%) é a principal etiologia, seguido por LRA pós-cirúrgica (34%), choque cardiogênico (27%), hipovolemia (26%) e drogas nefrotóxicas (19%), com mais de um fator envolvido em muitos casos⁽³⁾. No período perioperatório, lesão por isquemia e reperusão (I/R)

permanece como a principal causa de LRA⁽¹²⁾.

A isquemia renal ocorre quando há um fornecimento de oxigênio menor que a demanda causando um acúmulo de resíduos do metabolismo. Como resultado as células tubulares epiteliais sofrem dano e, conforme a intensidade, podem apresentar morte por apoptose e necrose, desencadeando disfunção renal.

As características morfológicas da LRA incluem perda da borda em escova nos túbulos proximais, *blebbing* da membrana apical, edema celular e mitocondrial, picnose do núcleo e apoptose⁽¹³⁾. A fase inicial, desencadeada por um dano subletal, cursa com desaparecimento da borda em escova, perda da polaridade celular e alteração do citoesqueleto. Com o agravamento da lesão as células epiteliais tubulares descolam da membrana basal e contribuem para a agregação intraluminal de células e proteínas, resultando em obstrução dos túbulos distais⁽¹⁴⁾ e dilatação dos túbulos proximais⁽¹⁵⁾. A recuperação pode ser completa se o fator causal for retirado na fase inicial, caso contrário o dano progride para a fase de extensão com morte celular, descamação, obstrução luminal e resposta inflamatória. Inibição da apoptose e da inflamação nesse estágio pode representar uma abordagem terapêutica importante. A fase de manutenção é caracterizada pelo balanço entre morte de células tubulares e regeneração (Figura 2). A fase de regeneração é caracterizada funcionalmente pela melhora do RFG e estruturalmente pelo reestabelecimento da integridade tubular⁽¹⁵⁾.

A LRA cursa com ativação do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema de feedback tubuloglomerular⁽¹⁶⁾. Durante a LRA o nível sérico de vasoconstritores bem como o tônus simpático estão aumentados⁽¹⁷⁾. Nessa situação ocorre um desequilíbrio entre as substâncias vasoativas com aumento de endotelina e diminuição de óxido nítrico (NO)⁽¹⁵⁾. O desequilíbrio entre as substâncias vasoativas leva a vasoconstrição nas artérias aferentes e eferentes e aumento da resistência vascular com consequente diminuição do fluxo plasmático renal (FPR) e do RFG⁽¹⁸⁾.

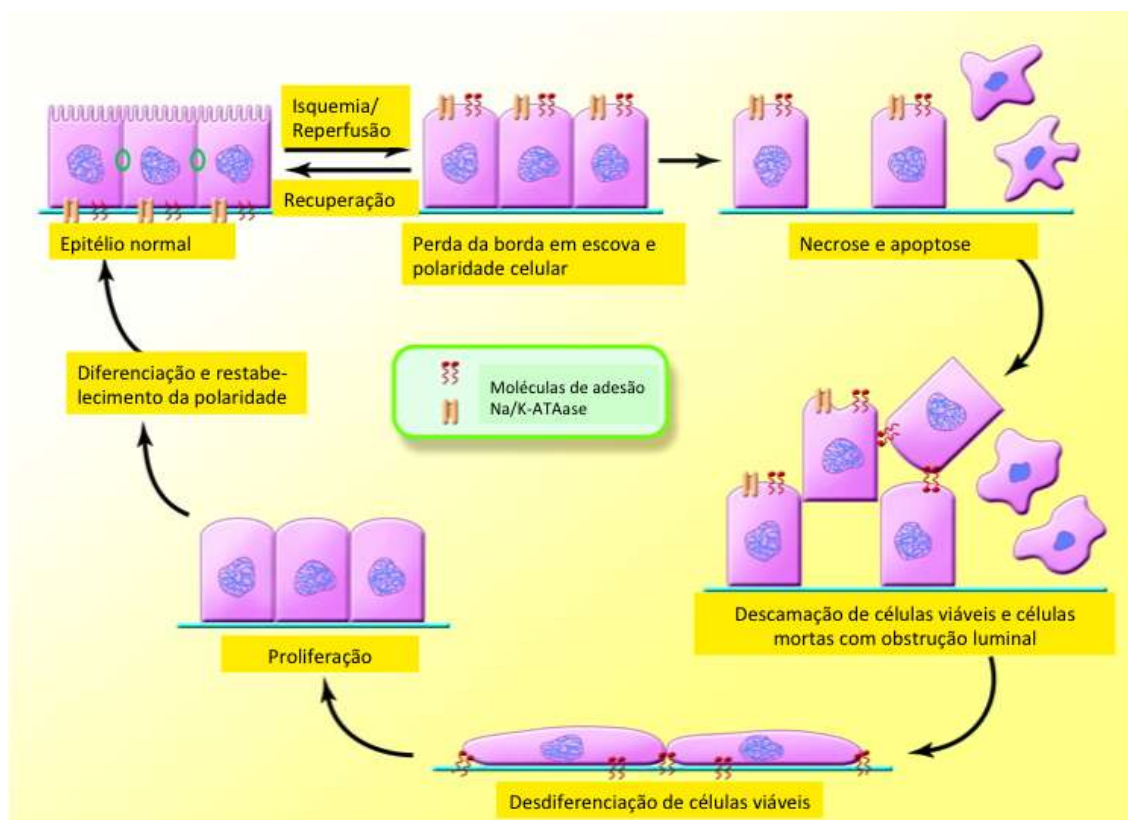


Figura 2 - Alterações na estrutura celular após LRA isquêmica. Devarajan, 2006⁽¹⁵⁾.

Devido à heterogeneidade do fluxo sanguíneo renal, as alterações transcorridas durante a isquemia causam maior dano à medula externa, por ser a região mais suscetível a dano isquêmico por apresentar uma pressão parcial de oxigênio menor⁽¹⁹⁾. A hipoperfusão e congestão na medula externa persistem mesmo após a melhora do fluxo cortical durante a reperfusão. A congestão pós-isquêmica característica piora a hipóxia relativa, levando a continuidade da agressão e causando morte celular nesses segmentos tubulares predispostos⁽¹⁵⁾. O endotélio vascular também sofre alterações como alvo e fonte de processos inflamatórios. Existe um aumento da expressão de moléculas de adesão que promovem a interação do endotélio com leucócitos, entre elas estão a ICAM-1, P-selectin e a E-selectina⁽²⁰⁾.

No mecanismo de dano celular por isquemia inicialmente ocorre a degradação de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP). Com a persistência da isquemia o AMP é metabolizado posteriormente a nucleotídeos de adenosina e a hipoxantina, causando acúmulo dos mesmos. Como consequência, ocorre aumento do cálcio intracelular por disfunção do retículo endoplasmático com posterior ativação de proteases e fosfolipases. A depleção de ATP

seguida do aumento do cálcio intracelular, ativação de múltiplas enzimas, alteração no metabolismo do NO e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem levar a necrose e apoptose celular⁽²⁾. Esses efeitos causam perda definitiva da função mitocondrial e impedem a regeneração de ATP após a reperfusão⁽¹⁵⁾.

Durante a reperfusão, a conversão da hipoxantina acumulada a xantina, catalizada pela enzima xantina oxidase (XO), gera peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de Fe^{++} , forma o radical superóxido que é altamente reativo. A conversão de hipoxantina em xantina via XO é a maior fonte potencial de EROs, que parecem exercer uma importante função na gênese da lesão de I/R. Concomitantemente, a isquemia aumenta a quantidade da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) nas células tubulares, aumentando a formação de NO. O NO formado reage com superóxido e forma o peroxinitrito, outro radical livre. Coletivamente as EROs causam dano as células dos túbulos renais mediado por oxidação de proteínas, rompimento do citoesqueleto, peroxidação de lipídeos, dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e indução de apoptose conforme esquema na figura 3. A mitocôndria também colabora para a formação de superóxido através da oxidação de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH). Durante a isquemia a ativação de leucócitos também é uma fonte potencial de EROs⁽²⁾.

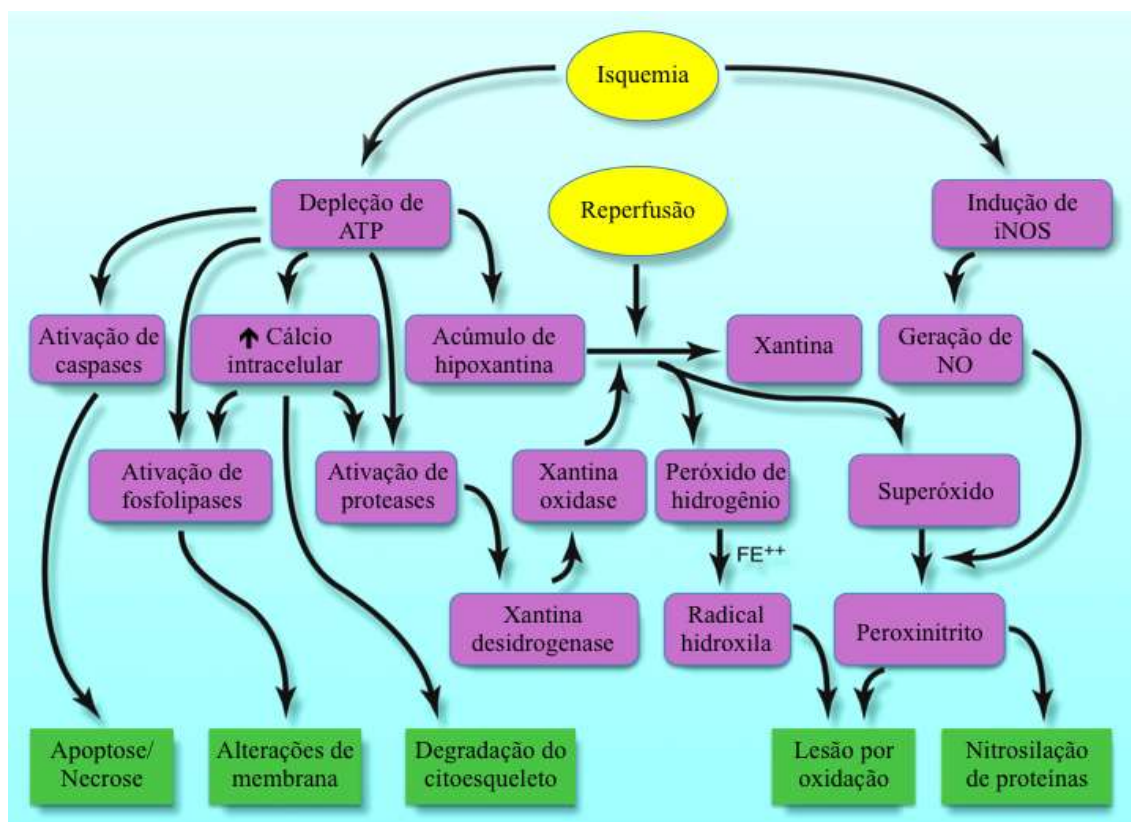


Figura 3 - Alterações no metabolismo celular após lesão isquêmica renal. Adaptado de Devarajan 2006⁽¹⁵⁾.

1.3 Biomarcadores

A creatinina sérica e o DU são comumente usados para avaliação da função renal, apesar das limitações conhecidas. A creatinina é uma substância endógena e a dosagem da sua concentração plasmática é utilizada como uma forma indireta de aferir a adequação da filtração glomerular. Ela é produto do metabolismo da creatinina e fosfocreatina no músculo esquelético, porém seus níveis são influenciados por uma série de fatores não relacionados ao rim (idade, gênero, massa muscular, metabolismo muscular, medicações em uso, estado de hidratação, qualidade de ingesta alimentar) apresentando uma produção e liberação no sangue variáveis⁽²¹⁾. Em pacientes com função renal estável, os níveis plasmáticos da creatinina são quase constantes, com variação de cerca de 8%⁽²²⁾.

O aumento dos níveis séricos de creatinina é observado quando ocorre lesão dos néfrons funcionantes, entretanto, para ocorrer esse aumento, o tempo necessário pode variar entre 24 e 72 horas. Em situações quando o diagnóstico e tratamento precoces de isquemia renal são determinantes de morbimortalidade e prognóstico, esse

período é muito longo e a creatinina sérica tem sido sistematicamente questionada como marcador ideal da função renal.

A creatinina e o DU têm sensibilidade e especificidade limitados e o nível de creatinina tem uma velocidade de alteração muito baixa, restringindo o seu uso no diagnóstico de LRA⁽²³⁾. A creatinina é útil nos casos em que o organismo alcançou estado de equilíbrio, o que pode levar dias para ocorrer⁽²⁴⁾. Além disso, a alteração na creatinina sérica não consegue discriminar entre modificações na função renal devido a depleção de volume, mudanças hemodinâmicas na perfusão renal, obstrução urinária ou lesão renal intrínseca⁽²⁵⁾.

Sabemos que as modificações moleculares induzidas pela lesão ocorrem antes do dano celular e do desenvolvimento da síndrome clínica, por isso a detecção de biomarcadores pode nos fornecer um diagnóstico precoce e preciso de LRA⁽²⁶⁾.

O biomarcador ideal deveria⁽²⁷⁾:

- diagnosticar disfunção renal rapidamente;
- distinguir LRA pré-renal de dano apoptótico e necrótico;
- ter capacidade de localizar o dano;
- ser específico para lesão renal na presença de lesão concomitante de outros órgãos;
- ter capacidade de distinguir LRA de doença renal crônica;
- classificar de acordo com o grau de gravidade;
- prever o prognóstico;
- permitir a modificação da doença;
- ser de baixo custo e de fácil execução;
- ser capaz de medir o desfecho.

Entre os biomarcadores em fase de estudos podemos citar a Lipocalina Associada à Gelatinase do Neutrófilo (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin/NGAL*) urinária (NGALu) e plasmática (NGALp), Molécula de Lesão Renal-1 (*Kidney Injury Molecule-1/KIM-1*) urinária, cistatina-C urinária e plasmática, Interleucina-18 urinária (IL-18) e Liver Fatty Acid-Binding Protein (L-FABP) urinária e plasmática. Esses marcadores tem contribuído para diagnóstico precoce da LRA⁽²⁶⁾.

1.3.1 NGAL

As lipocalinas constituem uma família de mais de 20 pequenas proteínas que são definidas levando-se em consideração as suas estruturas tridimensionais, caracterizadas por 8 cadeias β que formam um β barril com um cálice anexado. A NGAL é uma dessas proteínas pertencentes a família das lipocalinas, é constituída de uma cadeia única de polipeptídeos com 178 aminoácidos e possui uma massa molecular de 25kDa⁽²⁸⁾. Ocorre na forma monomérica (25kDa), na forma de dímeros ligadas por pontes dissulfíto (45kDa) e na forma de heterodímeros (135kDa) covalentemente ligados à gelatinase (matrix metalloproteinase-9)⁽²⁹⁾.

Resultados de experimentos *in vitro* indicam que neutrófilos ativados liberam a forma homodimérica de NGAL e em grau inferior a forma monomérica. Em contraste, células epiteliais renais lesadas liberam a forma monomérica e, aparentemente, são incapazes de formar dímeros. Essas conclusões são sustentadas pela observação do aumento dos níveis urinários da forma homodimérica em pacientes com infecção do trato urinário e uma abundância relativa da forma monomérica de NGAL em pacientes com LRA (Figura 4)⁽²⁹⁾.

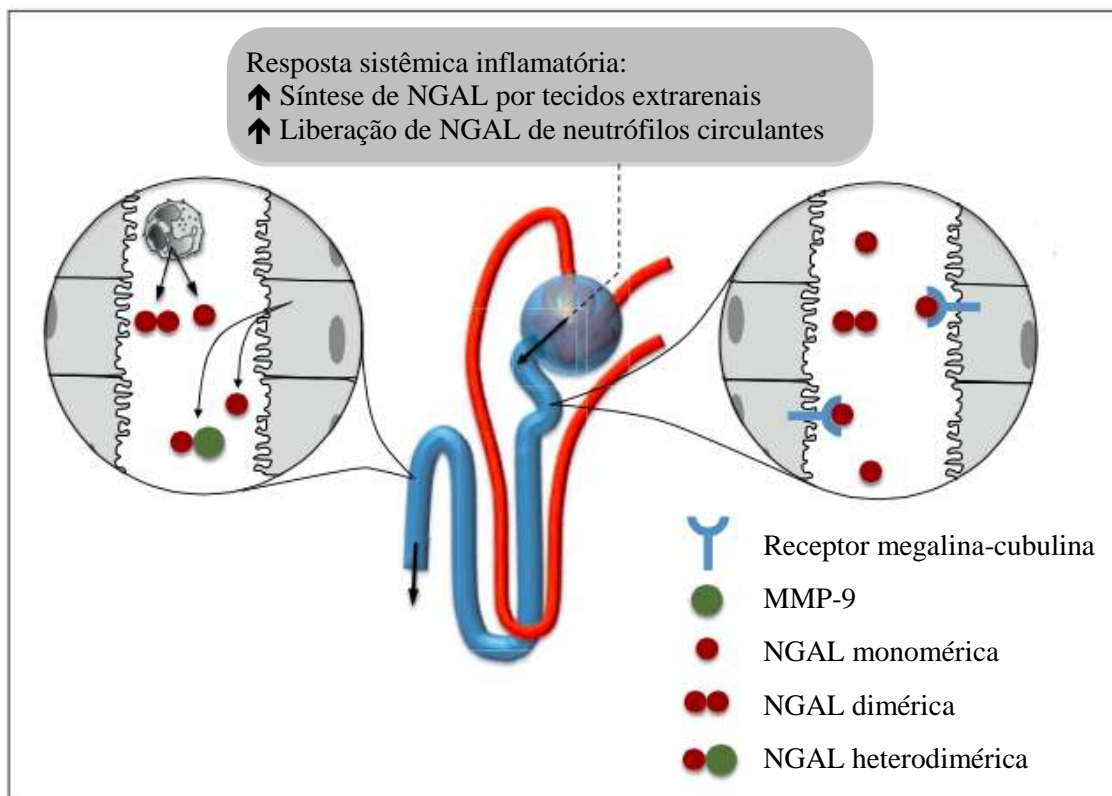


Figura 4 - Natureza e fonte de NGAL no plasma e na urina durante LRA. Martensson, 2014
Inflamação sistêmica induz a síntese de NGAL por tecidos extra-renais e a liberação de NGAL por neutrófilos. A NGAL urinária aumenta pela reabsorção inadequada da carga filtrada (*downregulation* de receptores de megalina-cubulina no túbulo proximal), aumento da síntese de células tubulares estressadas no néfron distal e liberação por neutrófilos infiltrados. Os neutrófilos liberam principalmente a forma homodimérica, enquanto que as células tubulares produzem principalmente a forma monomérica e a forma conjugada com MMP-9 (NGAL heterodimérico)⁽²⁹⁾.

Em condições fisiológicas o mRNA da NGAL é expresso em vários tecidos humanos incluindo rim, medula óssea, próstata, útero, glândula salivar, estômago, cólon, pulmões e fígado^(24, 28). Ela é hiperproduzida por esses tecidos em resposta a diversas condições inflamatórias com aumento significativo nos níveis de expressão local e sistêmico. Ela é secretada em baixas concentrações pela alça ascendente do túbulo renal e, devido ao seu baixo peso molecular, a NGAL circulante é filtrada pelo glomérulo e quase totalmente reabsorvida nos túbulos proximais⁽³⁰⁾ tendo como consequência níveis urinários normais muito baixos.

Acredita-se que a NGAL seja bacteriostática em estados patológicos por formar complexos com sideróforos ligantes do ferro. A função fisiológica da NGAL na

isquemia renal parece ser diminuir a lesão por reduzir a apoptose e aumentar a proliferação de células tubulares renais normais⁽³⁰⁾.

Uma diminuição no RFG induz ao aumento nos níveis de NGALp. NGALu aumenta devido a reabsorção inadequada nos túbulos proximais, ao aumento na síntese de células tubulares estressadas e a liberação por neutrófilos infiltrados⁽³⁰⁾. Os níveis de NGALp e NGALu podem ser de grande importância diagnóstica uma vez que essa proteína representa um biomarcador precoce de lesão renal⁽²⁸⁾, porém devemos lembrar que os níveis de NGALp são menos específicos para doença renal pois níveis altos também são encontrados na inflamação, sepse ou câncer. Níveis urinários são muito menos afetados por essas situações já que a NGAL que aparece na urina é secretada pelos túbulos⁽³⁰⁾.

Tem sido demonstrado a NGALu como um novo biomarcador de lesão isquêmica renal, apresentando um aumento de aproximadamente 4 vezes apenas 3 horas após o início da reperfusão, ocorrência de pico transcorridas 24 horas e declínio a valores normais após 72 horas⁽³¹⁾. As pesquisas têm indicado que os valores de corte entre 100-270ng.mL⁻¹ são os níveis que têm apresentado maior sensibilidade e especificidade para prever LRA, com maiores valores aceitos em adultos (170ng.mL⁻¹), comparados com crianças (100-135ng.mL⁻¹). Sendo de maior aceitação valores >150ng.mL⁻¹ para ambas as populações⁽³²⁾.

Estudos denotam a NGAL como uma poderosa ferramenta que se mostrou ser preditor independente de LRA, com uma surpreendente AUROC (Area Under Receiver Operating Characteristic Curve) de 0,998 para a NGALu e 0,91 para a NGALp em medidas realizadas 2 horas após *bypass* cardiopulmonar em crianças⁽³³⁾ e, mais recentemente, apresentou valores de 0,95⁽³⁴⁾. Já em adultos que se submeteram a cirurgia cardíaca a AUROC constatada é de 0,74 para NGALu coletada 3 horas após e 0,8 para NGALu coletada 18 horas o término da cirurgia⁽³⁵⁾, outro trabalho encontrou resultados mais promissores com valores da AUROC de 0,87⁽³⁶⁾.

Estudos recentes têm tentado estabelecer o intervalo aceito como valores de referência levando em consideração a idade, sexo, etnia e horário do dia. Bennett *et al.*, estabeleceram valores de referência em população pediátrica saudável para NGALu, KIM-1, IL-18 e L-FABP levando em consideração o gênero e a idade. Foi descrito que existe uma variabilidade nas concentrações influenciada pela idade, sendo encontrado

maiores valores com o aumento da idade. Níveis significativamente diferentes também foram influenciados pelo gênero, mesmo após ajuste pela idade, sendo encontrado níveis maiores nos indivíduos de sexo feminino⁽³⁷⁾. Outros autores chegaram a conclusão semelhante usando valores normalizados para creatinina urinária⁽³⁸⁾. Valores considerados normais e valores normalizados pela creatinina urinária são encontrados no Anexo I e Anexo II respectivamente. As razões biológicas de encontrarmos níveis maiores de biomarcadores no sexo feminino atualmente são desconhecidas, mas representam um assunto interessante para estudos posteriores.

Em uma revisão sistemática os autores concluíram que a NGAL parece ser uma ferramenta prognóstica útil em relação ao início da terapia de reposição renal, porém com algumas limitações em relação a morte intra-hospitalar⁽³²⁾.

Devemos ter conhecimento das limitações do uso do NGAL⁽²¹⁾:

- valores de NGALu podem ser confundidos pelo grau de hidratação e débito urinário;
- valores de NGALp podem ser confundidos por infecções sistêmicas;
- o tipo de ensaio influencia uma vez que a forma monomérica de NGAL é a secretada por rins agudamente lesados, enquanto os dímeros são predominantemente secretados pelos neutrófilos.

1.3.2 KIM-1

O KIM-1 é uma glicoproteína de membrana que contém, na sua porção extracelular, um domínio *Ig-like* e um domínio de proteína *mucin-like*. Inicialmente, pensou-se que a KIM-1 apresentava propriedades de moléculas de adesão devido a sua estrutura semelhante a outra molécula de adesão celular, a *mucosal adressin*⁽³⁹⁾. O gene KIM-1 ou a expressão da proteína é indetectável em rins normais ou na urina e, após sofrer dano isquêmico ou tóxico, o mRNA de KIM-1 é rapidamente sintetizado e a proteína gerada é localizada em níveis altos na membrana apical das células desdiferenciadas do túbulo proximal⁽⁴⁰⁾.

Muitas transmembranas sofrem clivagem proteolítica, liberando o seu domínio extracelular, podendo apresentar uma função de sinalização autócrina ou parácrina, sendo o ectodomínio da KIM-1 uma delas. Ela é clivada de um modo dependente de metaloproteinases e seu domínio solúvel é liberado na urina. A clivagem da molécula

transmembrana KIM-1 é regulada pela região justamembrana e por MAP quinases⁽⁴¹⁾.

KIM-1 proporciona às células epiteliais a habilidade de reconhecer e fagocitar células mortas presentes no rim pós-isquêmico que contribuem para a obstrução do lúmen do túbulo. Além de facilitar o *clearance* de debris apoptóticos do lúmen tubular, KIM-1 também ajuda a limitar a resposta autoimune a lesão, uma vez que a fagocitose de corpos apoptóticos é um mecanismo que limita a resposta pró-inflamatória⁽⁴²⁾.

A forma solúvel de KIM-1, que é a porção externa da proteína, é encontrada na urina de pacientes com necrose tubular aguda e pode servir como um biomarcador útil. De fato, níveis urinários altos de KIM-1 estão associados com desfecho clínico adverso (morte e necessidade de diálise) em pacientes com LRA⁽⁴⁰⁾, além disso a extensão do dano túbulo-glomerular e fibrose também tem sido associadas às concentrações urinárias altas de KIM-1⁽⁴³⁾. Os níveis ótimos que devem ser usados como ponto de corte para o diagnóstico de LRA ainda precisam ser estabelecidos.

1.3.3 IL-18

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória de 18kDa produzida no túbulo proximal. É detectada na urina após vários processos patológicos renais, incluindo I/R, rejeição de transplante, infecção, malignidade e condições autoimunes⁽²⁶⁾. Ela é sintetizada como um precursor biologicamente inativo (pró-IL-18) que sofre clivagem e é convertida na forma ativa pela enzima intracelular caspase-1^(44, 45). Após ser clivada no túbulo proximal, a forma ativa de IL-18 é secretada pela célula e vai para a urina⁽⁴⁵⁾.

Os valores urinários de IL-18 (pg.mL^{-1}) mostraram-se significativamente maiores em paciente com LRA 24 e 48 horas antes do evento diagnosticado por creatinina sérica. O nível urinário de IL-18 apresenta pico 6 horas após o dano isquêmico e a AUROC do teste, em pacientes com síndrome do desconforto respiratório do adulto, encontrado foi de 0,73, demonstrando uma boa eficácia para o diagnóstico de LRA dentro das próximas 24 horas. A performance para diagnóstico precoce, antes de 48 horas foi de 65% e também tem se mostrado útil como preditor independente de mortalidade⁽⁴⁶⁾. Recentemente foi demonstrado que a IL-18 parece ser um bom biomarcador urinário no pós-operatório imediato, fornecendo informação prognóstica adicional sobre o risco de morte em 3 anos em pacientes com e sem LRA clínica⁽⁴⁷⁾. Os níveis ótimos que devem ser usados como ponto de corte para o diagnóstico de LRA também ainda não foram definidos.

1.4 L-arginina

NO é um radical livre de meia vida curta que é produzido em todas as células incluindo as células endoteliais. NO é gerado a partir do aminoácido L-arginina e do oxigênio molecular pelas isoformas óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS)⁽⁴⁸⁾. O NO sintetizado causa relaxamento das artérias pré-glomerulares aumentando o fluxo sanguíneo renal e está envolvido na regulação de muitas funções fisiológicas como por exemplo: vasodilatação endotélio dependente, neurotransmissão, inflamação e resposta imunológica celular. É conhecido por ser um regulador chave da expressão de genes, capaz de exercer funções positivas ou negativas⁽⁴⁹⁾.

In vivo, NO é rapidamente oxidado a nitrato e nitrito e seus subprodutos são excretados na urina. Sob certas condições o nitrito e nitrato circulantes bem como o nitrato excretado são indicadores apropriados da quantidade síntese de NO, sendo a concentração do nitrato na urina considerada como uma medida útil de NO total sintetizado enquanto a concentração do nitrito circulante melhor reflete a síntese de NO endotélio dependente⁽⁴⁸⁾.

Estudos experimentais executados em modelos animais de I/R tem indicado que a presença de disfunção endotelial ocorre pela diminuição na liberação do NO. É sugerido que os mecanismos responsáveis são: a degradação acelerada do NO pelas EROs e a deficiência de L-arginina como resultado da redução da reciclagem de L-citrulina a L-arginina. Na deficiência de L-arginina, NOS ainda é capaz de realizar a transferência de elétron, porém usa o oxigênio molecular como substrato ao invés de L-arginina, levando a geração de outras EROs como ânions superóxido⁽⁵⁰⁾. A superprodução de EROs na I/R leva a inativação do NO que, por sua vez diminui o relaxamento arterial endotélio-dependente e independente, sugerindo que o aumento na bioavaliabilidade de NO poderia melhorar a disfunção endotelial e o relaxamento arterial.

NO exerce uma função importante na regulação da hemodinâmica renal e no transporte tubular de sódio, participando ativamente da fisiopatologia da LRA⁽⁴⁹⁾. Além disso NO parece exercer uma função ambígua na patogênese da LRA por I/R⁽⁵¹⁾. NO reduziu a lesão induzida por leucócitos agindo como bloqueador da ativação e sequestro

de leucócitos. Entretanto, a I/R aumenta os níveis de iNOS, o que pode potencializar o dano, uma vez que o NO produzido reage com O_2^- , gerado pelo sistema da xantina oxidase, formando peroxinitrito ($ONOO^-$)^(49, 52). Por outro lado, inibidores não seletivos da NOS, como *Nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME), pioram a função renal pós isquemia, enquanto inibidores seletivos da iNOS podem melhorar a lesão de I/R e reverter a deterioração da função renal⁽⁵³⁾. Assim, o NO parece exercer efeitos bidirecionais na patogênese da LRA induzida por I/R.

Em condições fisiológicas a produção de $ONOO^-$ é baixa e o dano oxidativo é minimizado por defesas antioxidantes endógenas. Pequenos aumentos na produção de NO aumentam muito a produção de $ONOO^-$, conseqüentemente, condições patológicas podem estimular bastante a formação de $ONOO^-$. Mesmo a geração de pouca quantidade de $ONOO^-$ ao longo do tempo resulta em oxidação e destruição de proteínas, lipídeos e constituintes celulares, levando a disfunção de processos celular críticos, rompimento de vias de sinalização da célula e a indução da morte celular por necrose e apoptose⁽⁵²⁾.

Em vista destas controvérsias, este estudo foi desenvolvido para avaliar se o uso de L-arginina em situação experimental de I/R exerce função protetora ou lesiva na função e estrutura renal.

2 Objetivos

Geral: avaliar se a L-arginina exerce efeito protetor sobre as células renais, usando um modelo experimental de I/R em ratos.

Específicos: quantificar o efeito da L-arginina na proteção de células renais em situação de estresse de I/R por meio de análise histopatológica, dosagem plasmática de NGAL, ureia e creatinina, e dosagem urinária de KIM-1, IL-18 e NGAL; verificar a classificação de AKIN e de RIFLE no momento M2 do experimento.

3 Materiais e Métodos

Após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Protocolo Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) 922/2012, foram incluídos no estudo 32 ratos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, machos, com peso entre 300g e 500g. Os animais foram mantidos em ambiente controlado (iluminação entre 7:00 e 19:00 horas e temperatura $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e foi oferecido ração e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). O experimento foi realizado no Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

3.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos e alocados aleatoriamente, por sorteio em envelopes lacrados, em quatro grupos experimentais:

Grupo S (Sham - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5 a 2%. Foi realizado nefrectomia direita.

Grupo C (Controle - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5% a 2%. Foi realizado nefrectomia direita. Foram realizadas manobras de I/R renal esquerda conforme itens 16 a 19 da sequência experimental. Os animais desse grupo foram tratados com placebo.

Grupo CLA (Controle L-arginina - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5% a 2%. Foi realizado nefrectomia direita. Os animais desse grupo foram tratados com L-arginina na dose de $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dose}^{-1}$.

Grupo LA (L-arginina - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5 a 2%. Foi realizado nefrectomia direita. Os animais desse grupo foram tratados com L-arginina na dose de $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dose}^{-1}$. Foram realizadas manobras de I/R renal esquerda conforme itens 16 a 19 da sequência experimental.

3.2 Dose

A L-arginina foi administrada na dose de $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dose}^{-1}$, por via oral, utilizando-se o método de gavagem, em duas doses iguais administradas 24 horas e 1 hora antes da indução anestésica. Essa forma de administração já foi utilizada em trabalhos anteriores⁽⁵⁴⁾ e está de acordo com a dose preconizada pela *Food and Drug Administration (FDA) – Guidance for Industry – Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*⁽⁵⁵⁾. Esse guia apresenta uma fórmula que converte a dose em ratos (DR) em dose equivalente em humanos (DEH) e leva em consideração as diferenças de superfície corpórea.

$$\text{Fórmula: DR}=0,16\text{DEH}$$

3.3 Anestesia

Após pesados, os animais foram colocados sob uma campânula, onde foi iniciada a indução anestésica. Foi administrado, no interior deste recipiente, isoflurano na concentração de 3% (vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda) em uma mistura contendo 40% de oxigênio. Havia um sistema de eliminação de gases no recipiente que não permitia o acúmulo de dióxido de carbono. O tempo de indução foi de 5 minutos.

Após o animal estar adormecido e em plano anestésico, o mesmo foi colocado em uma plataforma, em seguida foi adaptada a máscara ao focinho do animal e realizou-se a manutenção da anestesia com isoflurano na concentração de 1,5% a 2% e oxigênio na concentração de 40%.

Foi instalado um sensor para a medida da temperatura retal. Os animais foram mantidos sobre e cobertos com bolsas térmicas (Bolsa térmica Gel - Body Care - Mercur[®]) pré-aquecidas para a manutenção da temperatura entre 36°C e 38°C.

3.4 Manobras de Isquemia-Reperfusão

As manobras de I/R foram executadas como segue:

Após um intervalo inicial de 10 minutos, foi realizada a nefrectomia direita.

A artéria renal esquerda foi clampeada completamente durante um período de 30 minutos. Após esse período a artéria renal esquerda foi liberada e foi aguardado um período de 30 minutos para a reperfusão. Durante esse período a parede abdominal e o

acesso cirúrgico cervical foram fechados e o animal preparado para despertar.

| M0 _{urinário} | T0 | | T1 | T2 | M2 |
|------------------------|----------------------|---------------------|---|------------------------------|----------------------------------|
| Indução inalatória | Intervalo | Nefrectomia direita | Clampeamento da artéria renal esquerda ou intervalo | Reperusão renal ou intervalo | Despertar e sacrifício 24hs após |
| 5 min | 10 min | | 30 min | 30 min | |
| | M0 _{plasma} | | | M1 | M2 |

Figura 5 - Esquema da sequência experimental.

3.5 Sequência Experimental

A sequência experimental foi realizada na seguinte ordem cronológica:

- 1) Os animais receberam uma dieta padrão e água *ad libitum* em gaiola metabólica.
- 2) Realizada a coleta de urina, esse foi o Momento 0 (M0) para as variáveis urinárias (NGALu, KIM-1 e IL-18).
- 3) Foram pesados imediatamente antes do início do experimento.
- 4) Todos os cálculos relativos às infusões e doses foram feitos e preparadas.
- 5) Administração de L-arginina ou placebo por via oral.
- 6) Anestesia em uma campânula com isoflurano a 3% e oxigênio a 40%.
- 7) Colocação de bolsas aquecidas para manutenção da temperatura retal entre 36°C e 38°C.
- 8) Manutenção da anestesia com a administração de isoflurano por via inalatória sob máscara em concentração variando entre 1,5% e 2%.
- 9) Posicionamento do termômetro retal.
- 10) Dissecção e cateterismo da veia jugular externa direita para infusão da solução hidratação em bomba de infusão contínua.
- 11) Início da infusão venosa de Ringer lactato, 3mL.kg⁻¹.h⁻¹, para reposição das perdas de fluidos, utilizando a bomba de infusão ANNE® (ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda).
- 12) Dissecção e cateterismo da artéria carótida esquerda para monitorização da pressão arterial e coleta de amostras de sangue.
- 13) Intervalo de 10 minutos para estabilização e avaliação da estabilidade hemodinâmica.
- 14) Coleta dos dados de monitorização (T0): Frequência Cardíaca (FC), Pressão Arterial Média (PAM) e Temperatura Retal.

- 15) Coleta de 1,5mL de sangue da artéria carótida esquerda para dosagem das variáveis plasmáticas (NGALp, creatinina, ureia). Este foi o Momento 0 (M0) para amostras plasmáticas. A retirada dessa amostra foi acompanhada de infusão de 4,5mL de Ringer Lactato ao longo de 1 minuto.
- 16) Realização de nefrectomia direita. O rim direito foi guardado em solução de Duboscq-Brasil para análise posterior.
- 17) Clampeamento da artéria renal esquerda por um período de 30 minutos ou foi aguardado intervalo de tempo de 30 minutos nos grupos que não foram submetidos à I/R.
- 18) Abertura do clampeamento da artéria renal esquerda.
- 19) Um minuto após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda foram coletados os dados de monitorização (T1): FC, PAM e Temperatura Retal.
- 20) Após o período de 30 minutos de reperfusão, 1,5 mL de sangue foi coletado da carótida esquerda para dosagem das variáveis plasmáticas. Esse foi o Momento 1 (M1). A retirada desse sangue foi acompanhada de infusão de 4,5mL de Ringer Lactato ao longo de 1 minuto.
- 21) Avaliação da estabilidade hemodinâmica
- 22) Coleta dos dados de monitorização (T2): FC, PAM e Temperatura Retal.
- 23) Realização do fechamento da parede abdominal.
- 24) A analgesia pós-operatória foi realizada com infiltração subcutânea de 1 mL de bupivacaína 0,15% nas incisões.
- 25) Retirada dos cateteres venoso e arterial.
- 26) Fechamento da incisão cervical.
- 27) Interrupção do anestésico inalatório.
- 28) Foi aguardada a recuperação do animal.
- 29) Manutenção do animal em gaiola metabólica com alimentação e água *ad libitum*, em ambiente controlado.
- 30) Coleta da urina das gaiolas metabólicas 24 horas após o início do experimento, esse foi o Momento 2 (M2) para as variáveis urinárias (NGALu, KIM-1 e IL-18).
- 31) Quantificação do volume urinário, centrifugação e armazenamento.
- 32) Vinte e quatro horas após o início de experimento, os animais foram novamente anestesiados em recipiente específico, com isoflurano 3% e oxigênio a 40%.

- 33) Verificada a adequação da ventilação.
- 34) Realizada a nefrectomia esquerda. O rim esquerdo foi armazenado em solução de Duboscq-Brasil para análise posterior.
- 35) Coleta de 2,5mL de sangue intracardíaco para a dosagem de NGALp, ureia e creatinina. Este foi o Momento 2 (M2) para as variáveis sanguíneas.
- 36) O animal foi sacrificado com injeção intraventricular de 125mg de tiopental sódico. Descarte do animal após a confirmação da sua morte.

3.6 Momentos

Os atributos PAM, FC e Temperatura Retal foram estudados nos tempos: T0 - 10 minutos após a cateterização da artéria carótida direita; T1 - 1 minuto após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (LA e C) e após ter passado intervalo de tempo semelhante nos grupos sem isquemia (S e CLA) e; T2 - 30 minutos após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (LA e C) ou após transcorrido intervalo de tempo semelhante nos grupos sem isquemia (S e CLA).

A concentração plasmática de NGAL, ureia e creatinina foi estudada nos momentos: M0 - 10 minutos após a cateterização da artéria carótida direita; M1 - 30 minutos após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (LA e C) ou após transcorrido intervalo de tempo semelhante nos grupos sem isquemia (S e CLA) e; M2 - 24 horas após o início do experimento.

As dosagens urinárias de NGAL, KIM-1 e IL-18 foram estudadas nos momentos: M0 - imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico e; M2 - 24 horas após o início do experimento.

3.7 Critérios de RIFLE e AKIN

Os critérios de RIFLE e AKIN foram utilizados para estadiamento do grau da lesão entre os momentos M0 e M2. Levando em consideração apenas a creatinina sérica, a diferença entre as duas classificações encontra-se apenas no estágio 1 de AKIN e *Risk* de RIFLE. Uma vez que, na classificação de AKIN a categoria “*Risk*” da classificação de RIFLE foi ampliada para incluir um aumento na creatinina sérica de no

mínimo 0,3 mg.dL⁻¹.

3.8 Histopatologia

A análise histopatológica foi realizada em todos os rins retirados. O tecido fresco foi fixado em solução de Duboscq-Brasil durante as primeiras 48 horas e a seguir acondicionado em solução de álcool 70% para avaliação histopatológica posterior. A solução de Duboscq-Brasil foi preparada com 6 mL de formol a 40%, 12 mL de álcool absoluto, 1,5 mL de ácido acético e 8 mL de ácido pícrico.

As lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina e examinadas sob diversos aumentos de microscopia óptica. Os rins foram identificados por números e o patologista que fez análise histopatológica não tinha conhecimento a qual grupo experimental pertencia a peça do anatomopatológico. O grau de lesão renal foi classificada segundo os critérios de Park⁽⁵⁶⁾ apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Grau de lesão renal segundo Park *et al.*⁽⁵⁶⁾

| Grau | Tipo | % de Lesão (área de necrose) |
|------|------------------|------------------------------|
| 0 | Sem lesão | - |
| 1 | Lesão leve | <10% |
| 2 | Moderada | 10 a 25% |
| 3 | Moderada a Grave | 25 a 50% |
| 4 | Grave | 50 a 75% |
| 5 | Muito Grave | >75% |

3.9 Variáveis

Foram estudados, em cada um dos animais dos quatro grupos de estudo os seguintes atributos:

- Peso
- FC
- PAM
- Temperatura retal
- Dosagem plasmática de NGAL, ureia e creatinina
- Dosagem urinária de KIM-1 , IL-18, NGAL
- Critérios de RIFLE e AKIN

- Exame histopatológico dos rins direito e esquerdo

3.10 Metodologia Laboratorial

Para as dosagens de ureia e creatinina foram utilizados reagentes da marca EBRAM e o equipamento para análise foi o COBAS MIRA PLUS. Para a dosagem de NGALp, NGALu, KIM-1 e IL-18 foi utilizada a metodologia ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), teste imunoenzimático que permite a detecção quantitativa e os kits utilizados foram kits padrão da BioPorto Diagnostics A/S (Dinamarca).

3.11 Análise Estatística

A análise inferencial foi composta pelos seguintes métodos:

- *Analysis of variance* (ANOVA) para medidas repetidas e testes de contrastes foram usadas para avaliar o comportamento das variáveis de monitorização e biomarcadores ao longo de três momentos no interior de cada grupo experimental;
- ANOVA para medidas repetidas com um fator e testes de contrastes foram realizadas para verificar se a evolução das variáveis foi diferenciada entre os grupos (efeito da interação);
- ANOVA de Kruskal-Wallis (não paramétrica) e o teste de comparações múltiplas de Dunn foram aplicados para comparação do peso e grau de lesão histopatológica.

Foi aplicada a transformação logarítmica (log natural) nos dados para análise longitudinal (ANOVA para medidas repetidas), devido à falta de normalidade na distribuição das variáveis nos grupos estudados. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%. A análise estatística foi processada pelo software SAS 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

4 Resultados

4.1 Peso

Tabela 3 - Peso (gramas)

| Grupo | n | média | DP | <i>p valor</i> |
|-------|----|-------|------|----------------|
| C | 8 | 451,3 | 43,9 | 0,12 |
| S | 8 | 400,0 | 45,0 | |
| CLA | 8 | 402,5 | 43,7 | |
| LA | 8 | 390,0 | 58,3 | |
| Total | 32 | 416,5 | 54,3 | |

ANOVA de Kruskal-Wallis
DP: Desvio padrão

Comentários: não existe diferença significativa no peso entre os grupos experimentais ($p = 0,12$) demonstrando homogeneidade da distribuição da amostra.

4.2 Frequência Cardíaca (FC)

Uma vez que a frequência cardíaca normal de um rato é superior a 300 batimentos por minuto, a frequência cardíaca apresentada pelo monitor em todos os ratos durante todos os momentos foi maior que 250 batimentos por minuto por limitações do próprio monitor. Devido a esse fato não possível realizar análise estatística dessa variável.

4.3 Temperatura

Tabela 4 - Análise longitudinal da temperatura (°C)

| Grupo | T0 | T1 | T2 | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-------|------------|------------|------------|---------------------------|--------------------------|
| | média ± DP | média ± DP | média ± DP | | |
| C | 36,8 ± 0,7 | 37,8 ± 0,8 | 37,7 ± 0,7 | 0,002 | T0 < (T1 ≈ T2) |
| S | 36,6 ± 0,8 | 36,9 ± 1,1 | 38,0 ± 1,4 | 0,003 | T2 > (T0 ≈ T1) |
| CLA | 37,0 ± 1,8 | 37,7 ± 1,2 | 38,4 ± 0,5 | 0,053 | |
| LA | 37,7 ± 0,6 | 38,2 ± 1,6 | 38,0 ± 1,1 | 0,52 | |

DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

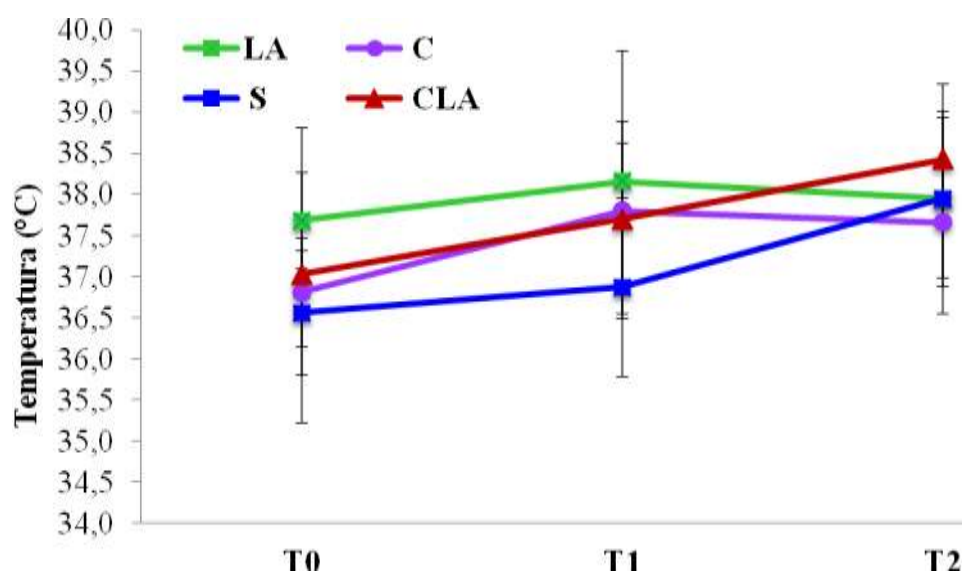


Figura 6 - Temperatura ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na temperatura dos grupos C ($p=0,002$), S ($p=0,003$) ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se aumento na temperatura, conforme ilustram a figura 6 e a tabela 4.

Tabela 5 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a variável de monitorização temperatura

| Variável | Efeito Principal | | Interação | Análise de Contraste entre grupos | | |
|------------------|------------------|---------------|-----------|-----------------------------------|----------------|---------------------------------|
| | Grupo | Tempo | | Par de momento | <i>p</i> valor | Comentários |
| Tempe- ratura | 0,32 | 0,0001 | 0,12 | T0 x T1 | 0,67 | C ≈ LA ≈ S ≈ CLA |
| | | | | T0 x T2 | 0,15 | C ≈ LA ≈ S ≈ CLA |
| | | | | T1 x T2 | 0,028 | S > (C ≈ LA), CLA intermediário |

Inicialmente, não foi observado efeito significativo, ao nível de 5%, na interação da temperatura ($p=0,12$), porém identificou-se diferença significativa na variação do momento T1 para T2 ($p=0,028$) entre alguns grupos, sem grande relevância clínica.

Não existe diferença significativa na variação da temperatura do T0 para T1 ($p=0,67$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

Não existe diferença significativa na variação da temperatura do T0 para T2 ($p=0,15$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante;

Existe diferença significativa na variação da temperatura do T1 para T2 entre os grupos experimentais ($p=0,028$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo S apresentou aumento significativamente maior que os grupos LA e C (se mantiveram). Não existem diferenças significativas entre S e CLA, e nem entre LA, C e CLA (CLA grupo intermediário).

4.4 Pressão Arterial Média

Tabela 6 - Análise longitudinal da PAM (mmHg)

| Grupo | T0 | | T1 | | T2 | | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|---------------------------|--------------------------|
| | média | ± DP | média | ± DP | média | ± DP | | |
| C | 118,1 | ± 10,6 | 77,3 | ± 10,6 | 80,5 | ± 16,4 | 0,0001 | T0 > (T1 ≈ T2) |
| S | 101,6 | ± 17,1 | 91,3 | ± 7,7 | 91,1 | ± 17,7 | 0,21 | |
| CLA | 106,0 | ± 15,1 | 96,0 | ± 16,1 | 88,9 | ± 12,2 | 0,081 | |
| LA | 101,3 | ± 17,5 | 78,3 | ± 28,6 | 73,9 | ± 27,0 | 0,007 | T0 > (T1 ≈ T2) |

DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

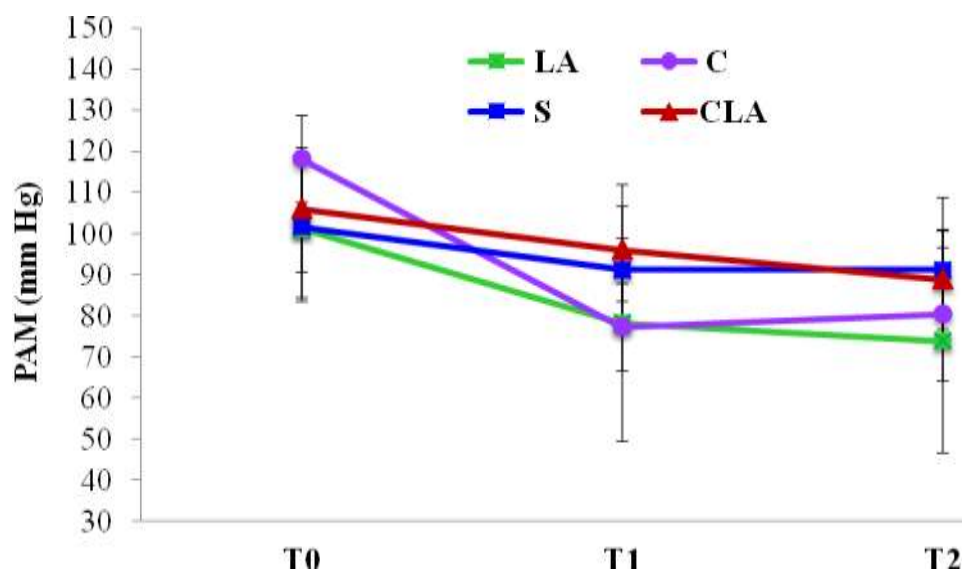


Figura 7 - PAM ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na PAM dos grupos C ($p=0,0001$) e LA ($p=0,007$) ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se diminuição na PAM conforme ilustram a figura 7 e a tabela 6.

Após a análise longitudinal no interior de cada grupo, foi aplicada a ANOVA para medidas repetidas com um fator visando estudar principalmente o efeito da interação (grupo*tempo), com ênfase na influência do grupo nos pares de momentos das variáveis de monitorização e biomarcadores, ou seja, verificar se existe diferença significativa na evolução das variáveis entre os grupos.

Tabela 7 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a variável de monitorização PAM

| Variável | Efeito Principal | | Interação | Análise de Contraste entre grupos | | |
|----------|------------------|---------------|--------------|-----------------------------------|----------------|---------------------------------|
| | Grupo | Tempo | | par de momento | <i>p valor</i> | Comentários |
| PAM | 0,15 | 0,0001 | 0,031 | T0 x T1 | 0,007 | (S ≈ CLA) > C, LA intermediário |
| | | | | T0 x T2 | 0,096 | C ≈ LA ≈ S ≈ CLA |
| | | | | T1 x T2 | 0,72 | C ≈ LA ≈ S ≈ CLA |

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação na PAM ($p=0,031$).

A análise de contrastes para a variável PAM mostrou que existe diferença significativa na variação da PAM do T0 para T1 entre os grupos experimentais ($p=0,007$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo C apresentou diminuição significativamente maior que os grupos S e CLA. Não existem diferenças significativas entre C e LA, e nem entre S, CLA e LA (LA grupo intermediário).

Não existe diferença significativa na variação da PAM do T0 para T2 ($p=0,096$), entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

Não existe diferença significativa na variação da PAM do T1 para T2 ($p=0,72$), entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

4.5 NGALp e NGALu

Tabela 8 - Análise longitudinal do biomarcador NGALp (ng.mL⁻¹)

| Grupo | M0 med [AIQ] | M1 med [AIQ] | M2 med [AIQ] | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------------------|------------------------|
| C | 29,5[9,0;93,6] | 52,1[20,5;65,1] | 368,3[357,6;385,4] | 0,0001 | (M0 ≈ M1) < M2 |
| S | 14[9,8;54,8] | 12[10,5;91] | 343[239,8;364] | 0,001 | (M0 ≈ M1) < M2 |
| CLA | 10[7;14,5] | 17[11,3;19] | 364[91,8;388,8] | 0,0001 | M0 < M1 < M2 |
| LA | 17,5[9,5;20,3] | 47[25,5;113,8] | 335,5[304,0;395,0] | 0,0001 | M0 < M1 < M2 |

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

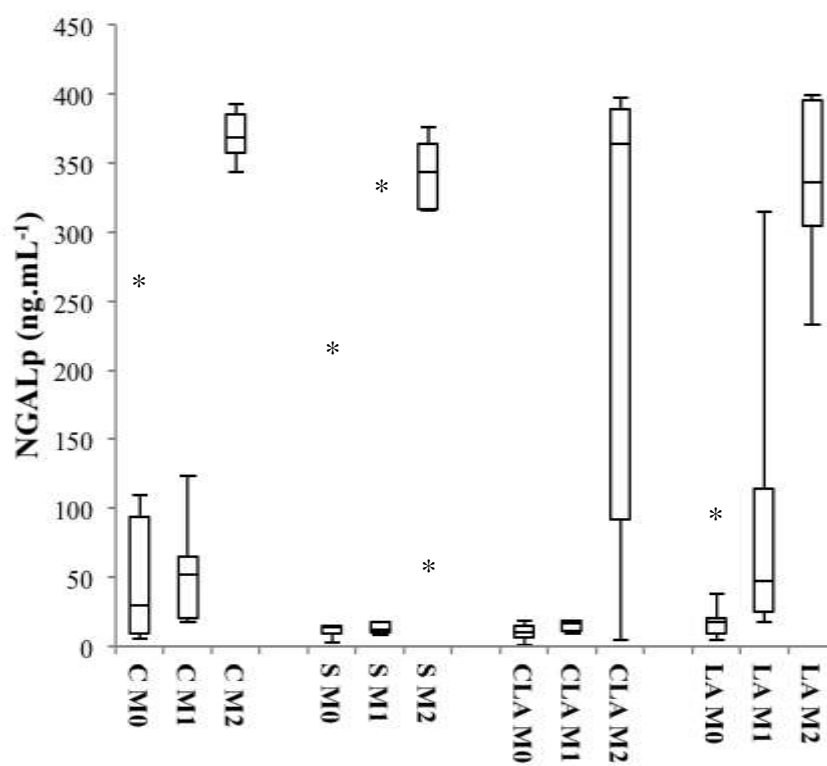


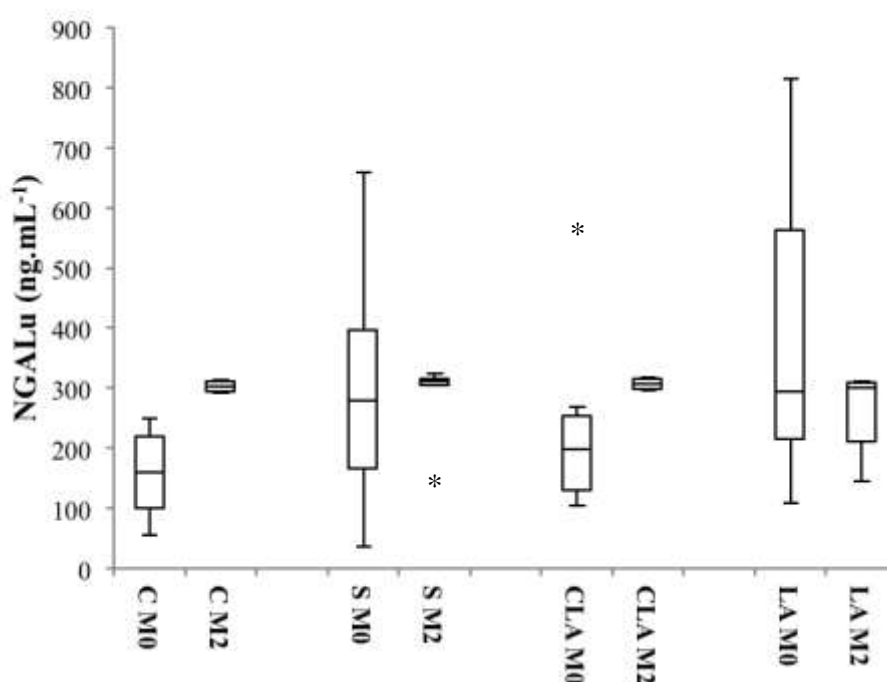
Figura 8 - Boxplot - NGALp ao longo do experimento.

Tabela 9 - Análise longitudinal do biomarcador NGALu ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

| Grupo | M0 | M2 | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | med [AIQ] | med [AIQ] | | |
| C | 159 [101;218,6] | 303 [295;311] | 0,046 | M0 < M2 |
| S | 278,6 [166,4;396,3] | 311 [304,3;315] | 0,98 | |
| CLA | 198,2 [130,4;254,4] | 306,5 [298;316,5] | 0,042 | M0 < M2 |
| LA | 293,6 [215;563,1] | 300,5 [210,3;309,8] | 0,31 | |

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

**Figura 9** - Boxplot - NGALu ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa nas medidas de NGALp em todos os grupos ao longo do experimento e nas medidas de NGALu existe variação apenas nos grupos C e CLA. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se aumento nos biomarcadores no momento M2. Conforme ilustram a figura 8 e a figura 9.

Tabela 10 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para os biomarcadores NGALp e NGALu

| Variável | Efeito Principal | | | Análise de Contraste entre grupos | | |
|----------|------------------|---------------|--------------|-----------------------------------|----------------|-------------------------------|
| | Grupo | Tempo | Interação | par de momento | <i>p</i> valor | Comentários |
| NGALp | 0,54 | 0,0001 | 0,66 | M0 x M1 | 0,20 | C ≈ LA ≈ S ≈ CLA |
| | | | | M0 x M2 | 0,71 | C ≈ LA ≈ S ≈ CLA |
| | | | | M1 x M2 | 0,88 | C ≈ LA ≈ S ≈ CLA |
| NGALu | 0,63 | 0,096 | 0,015 | M0 x M2 | 0,015 | C ≈ CLA > LA, S intermediário |

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação nos níveis medidos do biomarcador NGALu ($p = 0,015$).

Análise de contrastes para variável NGALp mostrou que não existe diferença significativa na variação dos níveis de NGALp do M0 para M1 ($p=0,20$), do M0 para M2 ($p=0,71$) e nem do M1 para M2 ($p=0,88$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

Análise de contrastes para variável NGALu mostrou que existe diferença significativa na variação do NGALu do M0 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,015$). Identificou-se que os grupos C e CLA apresentaram aumento significativamente maior que o grupo LA. Não existem diferenças significativas entre C, CLA e S, e nem entre LA e S (S grupo intermediário).

4.6 KIM-1

Tabela 11 - Análise longitudinal do biomarcador KIM-1 (pg.mL^{-1})

| Grupo | M0 | | M2 | | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-------|-------|---------------|-------|----------------|---------------------------|---------------------|
| | med | [AIQ] | med | [AIQ] | | |
| C | 327 | [289,8;607] | 270 | [223,5;929] | 0,94 | |
| S | 270,1 | [196,8;353,5] | 423,5 | [340,8;542,8] | 0,029 | M0 < M2 |
| CLA | 423,9 | [296,4;470,4] | 543,0 | [322,0;1014,0] | 0,045 | M0 < M2 |
| LA | 316,3 | [268,7;356,0] | 713,5 | [299,0;1184,8] | 0,044 | M0 < M2 |

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

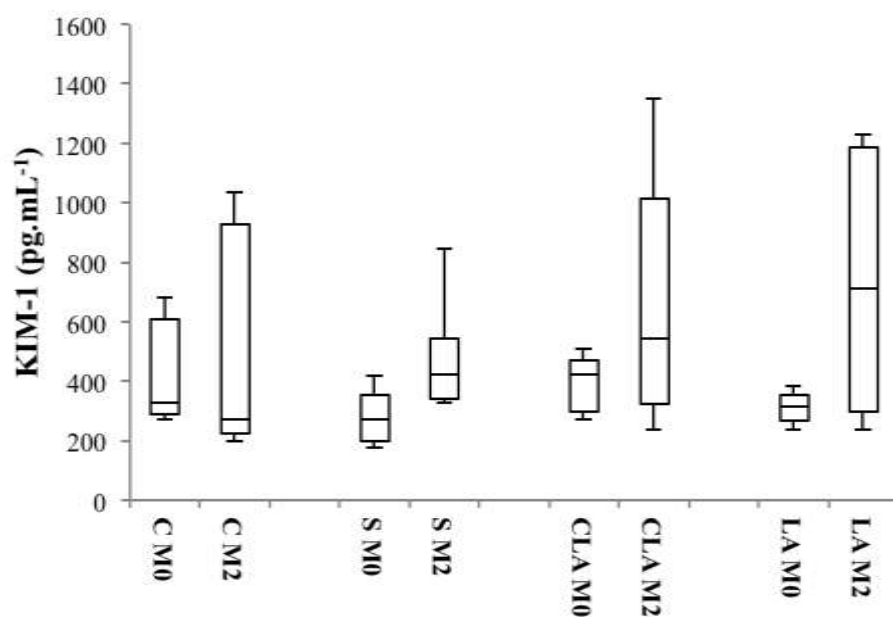


Figura 10 – KIM-1 ao longo do experimento.

A ANOVA para medidas repetidas mostrou que houve variação significativa no KIM-1 nos grupos S ($p=0,029$), CLA ($p=0,045$) e LA ($p=0,044$) ao longo do experimento. Pelos testes de contrastes, identificou-se, ao nível de 5%, que o momento M2 foi significativamente maior que o momento M0 nos grupos S, CLA e LA, conforme ilustram a figura 10 e a tabela 11.

Tabela 12 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador KIM-1

| Variável | Efeito Principal | | | Análise de Contraste entre grupos | | |
|--------------|------------------|--------------|-----------|-----------------------------------|----------------|--|
| | Grupo | Tempo | Interação | par de momento | <i>p valor</i> | Comentários |
| KIM-1 | 0,39 | 0,003 | 0,39 | M0 x M2 | 0,39 | C \approx LA \approx S \approx CLA |

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, não foi observado efeito significativo da interação da variável KIM-1 ($p=0,39$). Análise de contrastes para variável KIM-1 mostrou que não existe diferença significativa na variação do KIM-1 do M0 para M2 ($p=0,39$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

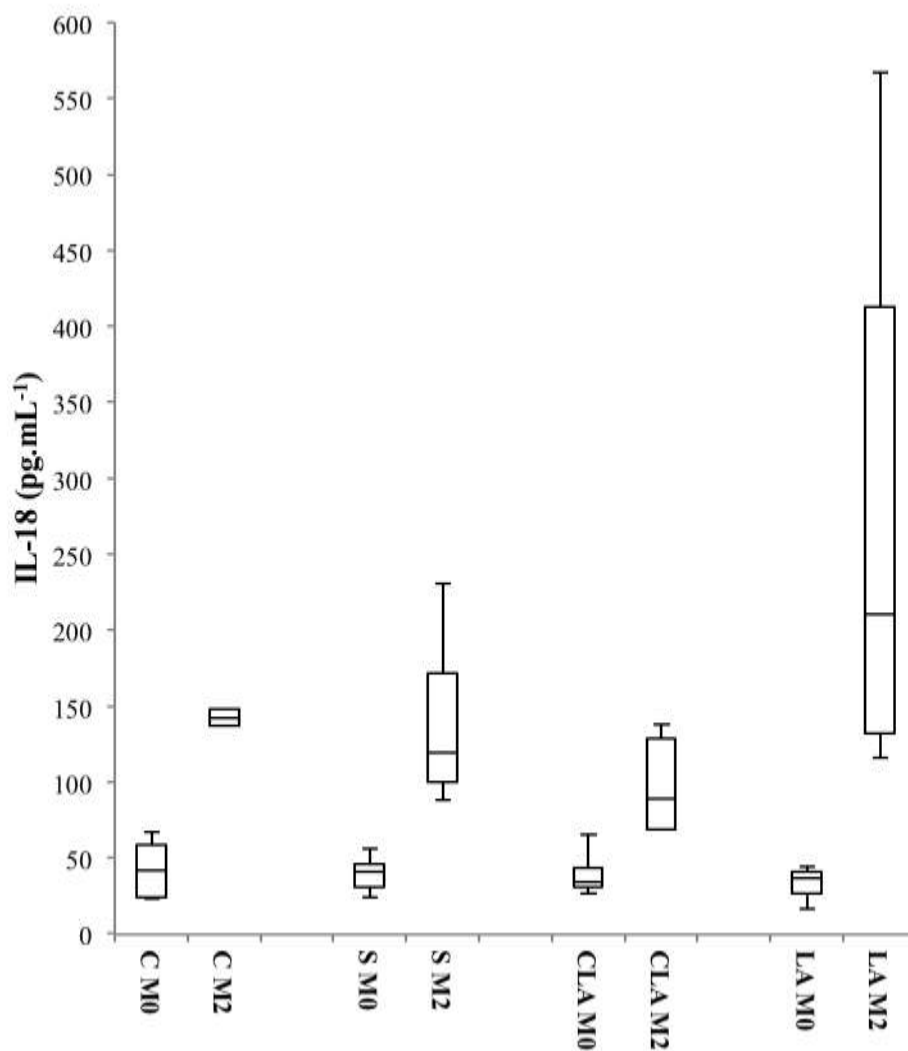
4.7 IL-18

Tabela 13 - Análise longitudinal do biomarcador IL-18 (pg.mL⁻¹)

| | M0 | M2 | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-----|------------------|-----------------|---------------------------|---------------------|
| | med[AIQ] | med[AIQ] | | |
| C | 41,5 [23,7;58,7] | 138 [95;142,5] | 0,005 | M0 < M2 |
| S | 41,1 [30,9;46,1] | 119 [100;171,5] | 0,0001 | M0 < M2 |
| CLA | 34,4 [31,1;43,7] | 89 [69;138] | 0,009 | M0 < M2 |
| LA | 36,3 [26,3;41,3] | 210 [131,8;413] | 0,0001 | M0 < M2 |

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

**Figura 11** - IL-18 ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na medida de IL-18 em todos os grupos ao longo do experimento. Segundo os testes de contrastes, observou-se aumento na IL-18 no momento M2, conforme ilustra a figura 11.

A ANOVA para medidas repetidas mostrou que houve variação significativa na IL-18 nos grupos C ($p=0,005$), S ($p=0,0001$), CLA ($p=0,009$) e LA ($p=0,0001$) ao longo do experimento. Pelos testes de contrastes, identificou-se, ao nível de 5%, que o momento M2 foi significativamente maior que o momento M0 em todos os grupos.

Tabela 14 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador IL-18

| Variável | Efeito Principal | | | Análise de Contraste entre grupos | | |
|--------------|------------------|---------------|--------------|-----------------------------------|----------------|------------------|
| | Grupo | Tempo | Interação | par de momento | <i>p valor</i> | Comentários |
| IL-18 | 0,31 | 0,0001 | 0,019 | M0 x M2 | 0,019 | LA > C ≈ S ≈ CLA |

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação no níveis urinários de IL-18 ($p=0,019$).

Análise de contrastes para variável IL-18 mostrou que existe diferença significativa na variação do IL-18 do M0 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,019$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo LA apresentou aumento significativamente maior que os grupos C, S e CLA. Não existem diferenças significativas entre C, S e CLA.

4.8 Creatinina

Tabela 15 - Análise longitudinal da creatinina ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)

| Grupo | M0 | M1 | M2 | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|------------------------|
| | med \pm DP | med \pm DP | med \pm DP | | |
| C | 0,46 \pm 0,07 | 0,79 \pm 0,2 | 3,36 \pm 2,2 | 0,0001 | M0 < M1 < M2 |
| S | 0,43 \pm 0,10 | 0,45 \pm 0,08 | 0,58 \pm 0,07 | 0,0008 | (M0 \approx M1) < M2 |
| CLA | 0,41 \pm 0,04 | 0,51 \pm 0,10 | 0,55 \pm 0,05 | 0,0004 | M0 < (M1 \approx M2) |
| LA | 0,50 \pm 0,23 | 0,66 \pm 0,21 | 3,04 \pm 1,57 | 0,0001 | (M0 \approx M1) < M2 |

med: média DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

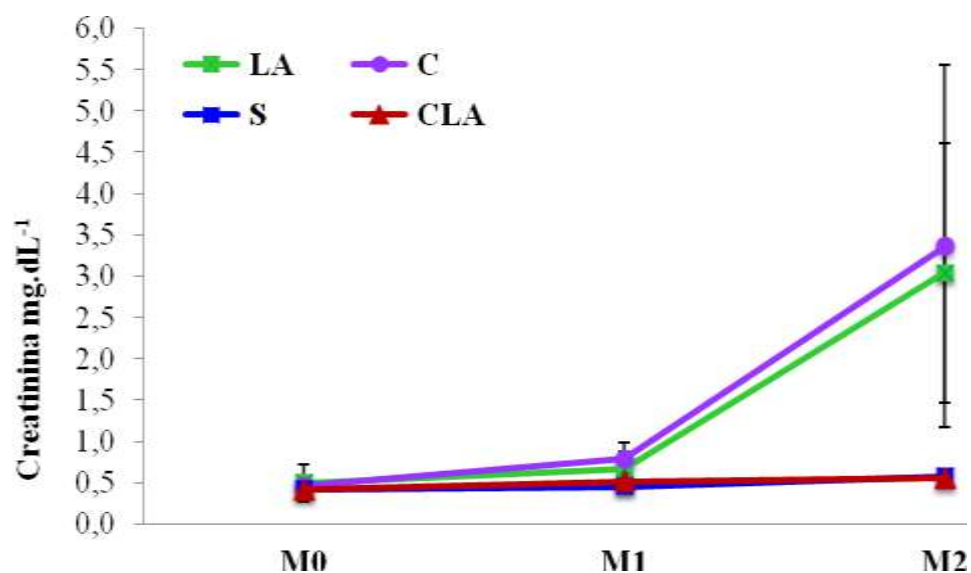


Figura 12 - Creatinina ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa nas medidas de creatinina nos grupos ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se aumento na creatinina, principalmente no momento M2, conforme ilustra a figura 12.

Tabela 16 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a creatinina

| Variável | Efeito Principal | | | Análise de Contraste entre grupos | | |
|------------|------------------|--------|-----------|-----------------------------------|----------------|---------------------------------|
| | Grupo | Tempo | Interação | par de momento | <i>p valor</i> | Comentários |
| Creatinina | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | M0 x M1 | 0,015 | C > (S ≈ CLA), LA intermediário |
| | | | | M0 x M2 | 0,0001 | (LA ≈ C) > (S ≈ CLA) |
| | | | | M1 x M2 | 0,0001 | (LA ≈ C) > S > CLA) |

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação na creatinina ($p=0,0001$).

Análise de contrastes para variável Creatinina mostrou que existe diferença significativa na variação dos níveis séricos de creatinina do M0 para M1 entre os grupos experimentais ($p=0,015$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo C apresentou aumento significativamente maior que os grupos S e CLA. Não existem diferenças significativas entre C e LA, e nem entre S, CLA e LA (LA grupo intermediário);

Existe diferença significativa na variação dos níveis séricos de creatinina do M0 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos LA e C apresentaram aumento significativamente maior que os grupos S e CLA. Não existem diferenças significativas entre LA e C e nem entre S e CLA;

Existe diferença significativa na variação dos níveis séricos de creatinina do M1 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos LA e C apresentaram aumento significativamente maior que os grupos S e CLA, e o grupo S apresentou aumento significativamente maior que o grupo CLA (se manteve). Não existem diferenças significativas entre LA e C.

4.9 Ureia

Tabela 17 - Análise longitudinal da ureia ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)

| Grupo | M0 | M1 | M2 | Efeito Tempo ^a | Teste de contrastes |
|-------|----------------|-----------------|------------------|---------------------------|------------------------|
| | med \pm DP | med \pm DP | med \pm DP | | |
| C | 37,8 \pm 6,1 | 44,6 \pm 6,6 | 147,1 \pm 58,4 | 0,0001 | M0 < M1 < M2 |
| S | 39,9 \pm 5,5 | 40,8 \pm 5,2 | 50,4 \pm 4,7 | 0,002 | (M0 \approx M1) < M2 |
| CLA | 47,3 \pm 6,9 | 54,5 \pm 5,2 | 49,3 \pm 5,1 | 0,001 | (M0 \approx M1) < M2 |
| LA | 54,9 \pm 9,3 | 51,2 \pm 22,9 | 209,8 \pm 70,3 | 0,012 | (M0 \approx M1) < M2 |

med: média DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

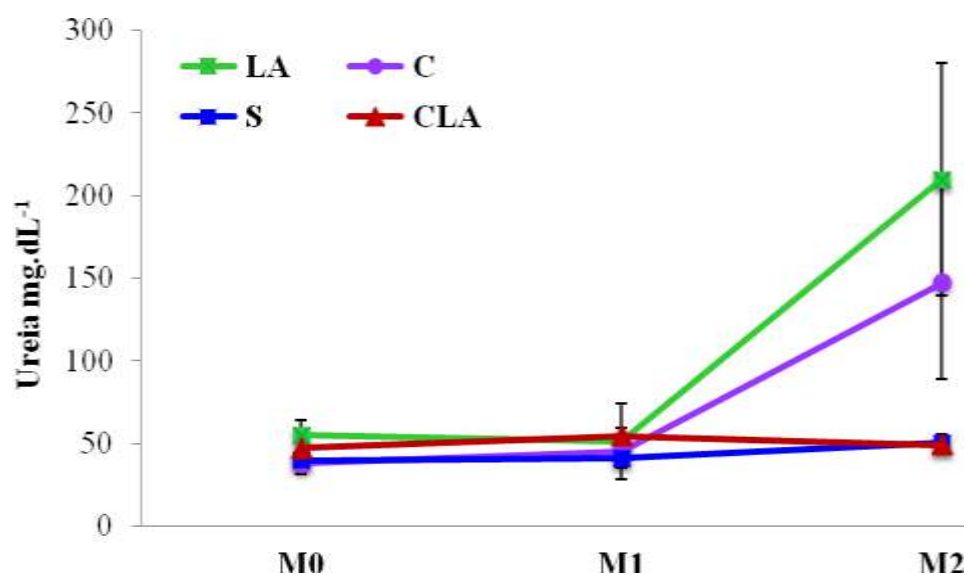


Figura 13 - Ureia ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na medida de ureia em todos os grupos ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se aumento nos níveis de ureia, principalmente no momento M2, conforme ilustra a figura 13.

Tabela 18 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a ureia

| Variável | Efeito Principal | | Interação | Análise de Contraste entre grupos | | |
|----------|------------------|--------|-----------|-----------------------------------|----------------|---------------------------------|
| | Grupo | Tempo | | par de momento | <i>p</i> valor | Comentários |
| Ureia | 0,022 | 0,0001 | 0,0001 | M0 x M1 | 0,036 | (C ≈ CLA) > S, LA intermediário |
| | | | | M0 x M2 | 0,0001 | (C ≈ LA) > S > CLA |
| | | | | M1 x M2 | 0,002 | (C ≈ LA) > S > CLA |

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação na ureia ($p=0,0001$). Análise de contrastes para variável Ureia mostrou que existe diferença significativa na variação da Ureia do M0 para M1 entre os grupos experimentais ($p=0,036$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos C e CLA apresentaram aumento significativamente maior que o grupo S (se manteve). Não existem diferenças significativas entre C, CLA e LA, e nem entre S e LA.

Existe diferença significativa na variação da Ureia do M0 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos LA e C apresentaram aumento significativamente maior que os grupos S e CLA, e o grupo S apresentou aumento significativamente maior que o grupo CLA. Não existem diferenças significativas entre LA e C;

Existe diferença significativa na variação da Ureia do M1 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,002$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos LA e C apresentaram aumento significativamente maior que os grupos S e CLA, e o grupo S apresentou aumento significativamente maior que o grupo CLA. Não existem diferenças significativas entre LA e C.

4.10 Critérios de RIFLE e AKIN

Mesmo levando em consideração as diferenças existentes entre as classificações de RIFLE e AKIN, em nosso trabalho encontramos valores iguais para as duas classificações em todos os animais estudados.

A tabela 19 fornece a frequência e o percentual da classificação RIFLE/AKIN no momento M2 segundo o grupo experimental. Devido o tamanho muito reduzido da amostra em cada grupo experimental o teste estatístico não processa. Observa-se que existe piora expressiva dos níveis de creatinina e na classificação de RIFLE/AKIN em todos os grupos experimentais, principalmente nos grupos C e LA.

Tabela 19 - Classificação de RIFLE/AKIN

| RIFLE/ AKIN | Grupo C M2 | | Grupo LA M2 | | Grupo CLA M2 | | Grupo S M2 | |
|----------------|---------------|------|----------------|------|-----------------|-----|---------------|----|
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Normal/0 | 1 | 12,5 | - | - | 8 | 100 | 4 | 50 |
| Risk/1 | - | - | - | - | - | - | 4 | 50 |
| Injury/2 | 1 | 12,5 | 1 | 12,5 | - | - | - | - |
| Failure/3 | 6 | 75 | 7 | 87,5 | - | - | - | - |

4.11 Histopatologia

A classificação do grau de lesão segundo a histopatologia foi obtida por uma avaliação semiquantitativa variando de 0 a 5, onde zero corresponde a ausência de lesão e cinco uma lesão de alta gravidade. Sendo assim, para maior abrangência analítica, foi proposto analisar os dados sob o ponto de vista discreto (numérico).

Tabela 20 - Grau de lesão histopatológica em rim direito

| Grupo | mediana | [AIQ] | |
|-------|---------|-------|------------------|
| C | 0 | [0;0] | C ≈ S ≈ CLA ≈ LA |
| S | 0 | [0;0] | |
| CLA | 0 | [0;0] | |
| LA | 0 | [0;0] | |

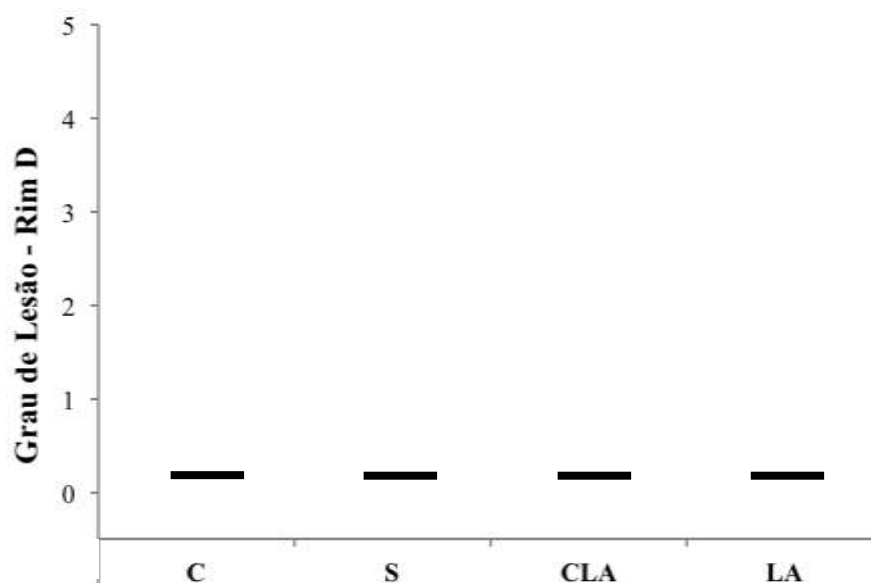


Figura 14 - Grau de lesão histopatológica em rim direito.

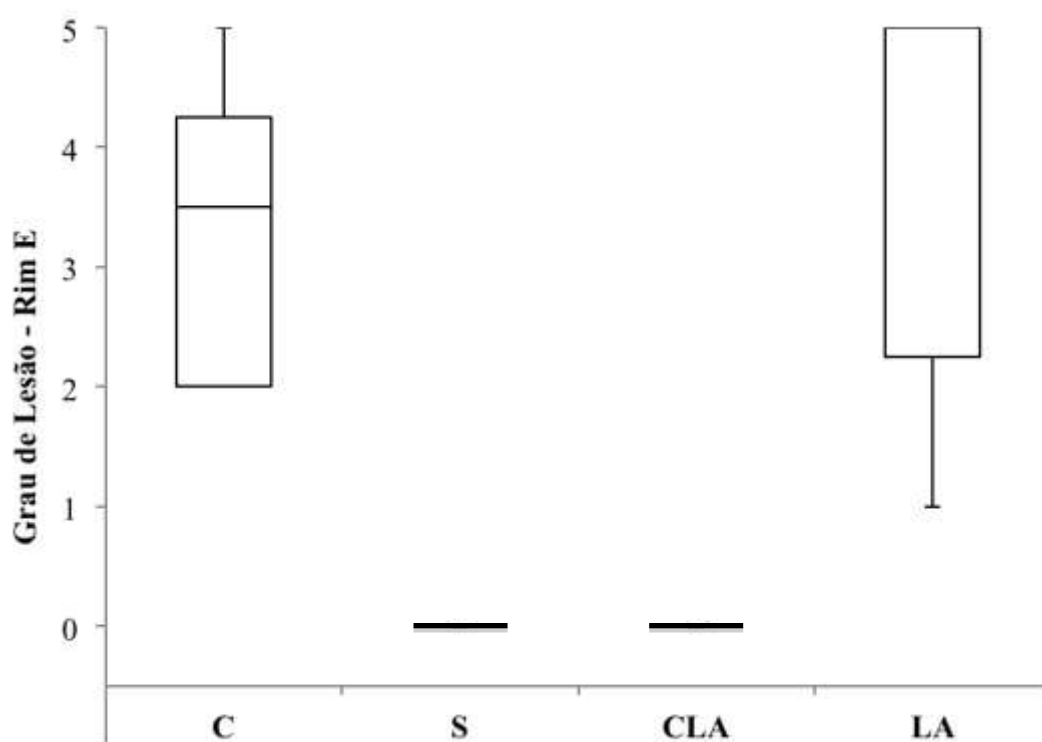
Não houve diferença na análise estatística dos rins direitos, sendo todos os grupos idênticos com ausência de lesão.

Tabela 21 - Grau de lesão histopatológica em rim esquerdo

| Grupo | mediana | interquartil | <i>p</i> valor ^a | diferenças significativas ^b |
|-------|---------|--------------|-----------------------------|--|
| C | 3,5 | [2;4,25] | 0,0001 | (C ≈ LA) > (S ≈ CLA) |
| S | 0 | [0;0] | | |
| CLA | 0 | [0;0] | | |
| LA | 5 | [2,25;5] | | |

^a ANOVA de Kruskal-Wallis.

^b teste de comparações múltiplas de Dunn, ao nível de 5%.

**Figura 15** - Grau de lesão histológica em rim esquerdo.

Observou-se que existe diferença significativa no grau de lesão pela histopatologia entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Os grupos C e LA apresentaram grau de lesão do lado esquerdo significativamente maior que os grupos S e CLA. Não existe diferença significativa, ao nível de 5%, entre C e LA e nem entre S e CLA.

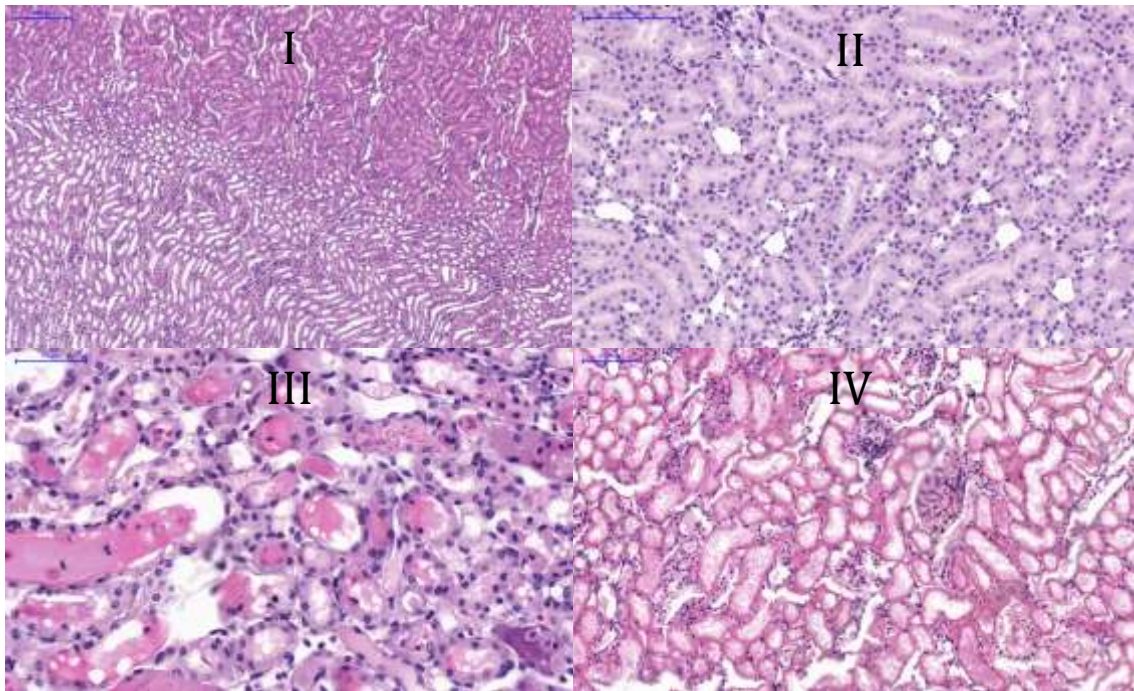


Figura 16 - Microscopia óptica dos rins esquerdos. Coloração: hematoxilina e eosina.

- I) Rim esquerdo grupo S, aumento 40x: Grau 0 - Sem lesão;
- II) Rim esquerdo grupo CLA, aumento 100x: Grau 0 - Sem lesão;
- III) Rim esquerdo grupo C, aumento 200x: Grau 4 - Grave;
- IV) Rim esquerdo grupo LA, aumento 100x: Grau 5 - Muito grave;

4.12 Correlação: Histopatologia x Biomarcadores

O coeficiente de correlação de Spearman (r_s) mede o grau de associação entre duas variáveis numéricas. Este coeficiente varia de -1 a 1, quanto mais próximo estiver de -1 ou 1, mais forte é a associação, enquanto que quanto mais próximo estiver de zero, mais fraca é a relação entre as duas variáveis. Um coeficiente negativo expressa uma relação inversa, ou seja, quanto maior o valor de uma das variáveis menor o valor esperado da outra.

A tabela 22 fornece o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e seu respectivo nível descritivo (p) para cada correlação avaliada entre o grau de lesão do lado esquerdo com os biomarcadores por grupo experimental.

Tabela 22 - Correlação entre o grau de lesão do rim esquerdo com os biomarcadores

| Biomarcador | | Grupo | |
|-------------|-------|--------------|--------|
| | | C | LA |
| NGALp | r_s | 0,265 | -0,467 |
| | p | 0,61 | 0,24 |
| NGALu | r_s | 0,5 | 0,191 |
| | p | 0,67 | 0,65 |
| KIM-1 | r_s | 0,5 | -0,136 |
| | p | 0,67 | 0,75 |
| IL-18 | r_s | 0,99 | -0,136 |
| | p | 0,001 | 0,75 |

r_s : coeficiente de correlação de Spearman.

Não foi possível observar nenhuma correlação direta significativa entre o grau de lesão do rim esquerdo com os biomarcador estudados. Esta análise deve ser interpretada com muito cuidado, pois a amostra é pequena e de baixa confiabilidade diante da complexidade do estudo.

5 Discussão

5.1 Modelo Animal

Esse experimento utilizou o modelo de I/R em ratos, desenvolvido pelo Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. É um modelo consolidado, tendo sido utilizado em estudos de I/R renal em mais de 1000 ratos *Wistar*. Os animais provenientes do Biotério Central da UNESP - Botucatu foram gerados e criados em cativeiro, foram submetidos sob as mesmas condições de ambientação e alimentação, receberam controle interno de zoonoses e apresentavam maturidade semelhante.

Os animais da amostra eram todos do sexo masculino e foram selecionados de maneira aleatória. A amostra apresentou uma distribuição homogênea, não havendo diferença significativa para a variável peso ($p=0,12$). Para este experimento foram escolhidos ratos machos por serem mais suscetíveis à lesão por I/R, mediada por ativação diferencial do sistema nervoso simpático renal⁽⁵⁷⁾.

O tempo de isquemia influencia diretamente os níveis de creatinina plasmática e o grau de lesão. Vinte e cinco minutos de isquemia arterial dobram os valores basais e 45 minutos resultam em um aumento de 7 a 8 vezes nos níveis plasmáticos de creatinina, com grau de necrose significativa ($>75\%$)⁽⁵⁶⁾. O tempo de 30 minutos foi utilizado por causar lesões renais isquêmicas moderadas, uma vez que necrose muito extensa teria impedido exame histopatológico relevante e por ter sido usado anteriormente em outros modelos animais⁽⁵⁸⁾, além disso, modelo prévio observou mortalidade de aproximadamente 74% em 48 horas com tempo de isquemia de 45 minutos e sobrevivência de 100% em animais que foram submetidos a isquemia durante o período de 30 minutos⁽⁵⁹⁾. Em trabalho recente, os níveis de NGALu demonstraram que o período de 30 minutos de isquemia é o ideal para atingir nível de pico de dano renal⁽⁶⁰⁾.

A isquemia renal temporária foi executada com *clamp* microvascular atraumático, garantindo assim a integridade vascular e subsequente reperfusão adequada após a retirada do *clamp* e liberação do fluxo arterial. Nos animais que foram submetidos à I/R, após o clampeamento da artéria renal esquerda, foi observada a

mudança da coloração do rim para vermelho escuro (cianose) com aspecto de mosaico. Após a liberação do clampeamento ocorreu o retorno progressivo para a coloração e aspecto iniciais, possibilitando uma avaliação macroscópica adequada da interrupção do fluxo sanguíneo e do seu retorno durante a fase de reperfusão.

Foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse compensação pelo rim contralateral. Em trabalhos anteriores já foi demonstrado que a nefrectomia unilateral determina recuperação mais rápida da falência renal, menor lesão isquêmica e maior produção de fatores humorais que estimulam a recuperação renal compensatória⁽⁵⁸⁾.

É importante a manutenção da temperatura em modelos de I/R renal porque a hipotermia protege o órgão e a hipertermia pode aumentar a extensão da lesão. Sabe-se que o grau de lesão funcional, medida pela creatinina, apresenta uma correlação positiva com temperatura corporal, e que o dano estrutural, observado na histopatologia, apresenta piora com aumento da temperatura corporal durante o período de isquemia. Ambos efeitos já foram demonstrados em modelo experimental prévio⁽⁶¹⁾. O efeito da variação da temperatura na gravidade da lesão renal após período isquêmico também já foi descrito por Delbridge *et al.* que observaram que a temperatura do animal durante a fase isquêmica também afeta significativamente a gravidade da lesão⁽⁶²⁾.

Durante o experimento vários fatores podem alterar a temperatura: as soluções administradas são frias; perda de calor pela abertura da cavidade abdominal; respiração sem reinalação, sem umidificação e sem aquecimento do ar também são fatores que promovem perda rápida de calor. A manutenção da temperatura foi realizada com a colocação de bolsas térmicas sob e sobre o animal e o controle da temperatura foi contínuo através de termômetro retal, com o objetivo de manter normotermia. Apesar disso, notamos que houve aumento na temperatura ao longo do tempo nos grupos C e S. No grupo C poderíamos encontrar uma piora no grau de lesão devido ao aumento da temperatura e isso seria considerado um viés. Porém, acreditamos que não houve essa interferência negativa pois na análise de contrastes podemos perceber que os grupos submetidos a isquemia (C e LA) apresentam comportamento semelhante nas medidas de temperatura em todos os momentos. Encontramos uma diferença estatística demonstrando que o Grupo S, entre T1 e T2, apresentou uma maior variação na temperatura do que os outros grupos. Porém, esse achado não influenciou os resultados porque a suscetibilidade renal à lesão é influenciada pela temperatura em situações que

ocorrem isquemia, em situações que não há isquemia renal, a temperatura não apresenta efeito adverso sobre a função e morfologia renais⁽⁶¹⁾. De fato, a isquemia ocorreu entre T0 e T1 e na análise estatística esse período não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,67$). A ausência de alterações histopatológicas no grupo S, demonstra que esse achado não interferiu nos demais resultados encontrados.

Em nosso experimento todos os ratos foram anestesiados com isoflurano. Já foi demonstrado que ratos que recebem anestésicos voláteis durante o período de I/R apresentam níveis menores de creatinina sérica e menores graus de necrose renal. Mecanismo atribuído a diminuição da expressão da proteína ICAM-1 e da diminuição da atividade da mieloperoxidase no córtex renal⁽⁶³⁾. O isoflurano também diminuiu a lesão de I/R em ratos reduzindo a inflamação pela modulação do influxo de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e NK1.1+) e do influxo precoce de linfócitos-T⁽⁶⁴⁾.

Estudos de I/R em ratos que apresentam valores de saturação de oxigênio, medida pela oximetria de pulso, são incomuns. Esse parâmetro não foi estudado, apesar de ser uma monitorização importante para evidenciar oxigenação adequada. Os animais foram mantidos em ventilação espontânea e sob monitorização visual constantes, tanto de amplitude quanto frequência respiratória. Em nenhum momento durante o experimento foram observadas dificuldades ventilatórias, constatando uma ventilação adequada durante a anestesia.

5.2 Isquemia/Reperfusão

Os valores encontrados de PAM revelaram diferença estatística na análise longitudinal dos grupos LA e C, com níveis menores em T1 e T2. O instante T1 ocorreu 1 minuto após liberação do *clamp* da artéria renal esquerda e a partir desse momento há a diminuição dos níveis pressóricos. Atribuímos a liberação de fatores humorais na síndrome pós-isquêmica como fator causal desse achado.

Na análise de contrastes encontramos diferença entre T0 e T1 com maiores valores pressóricos nos grupos S e CLA comparados com C (LA apresentou valores intermediários). A diminuição na PAM ativa mecanismos compensatórios na tentativa de manter a perfusão renal. Os mecanismos compensatórios ativados durante e após a síndrome isquêmica podem contribuir para a piora do quadro de LRA. Já foi descrito que o aumento na liberação de noradrenalina nos terminais nervosos induzido pelo

excesso de ativação dos nervos simpáticos renais é um possível fator causal no desenvolvimento e piora da LRA⁽⁶⁵⁾. Além disso, supressão de níveis elevados de noradrenalina na veia renal após a reperfusão atenua a lesão renal de I/R, uma vez que quando é realizada a denervação renal ou bloqueio gangliônico a disfunção renal ocorre em menor intensidade. Este mecanismo é mediado por receptores α -1 adrenérgicos⁽⁶⁶⁾, enquanto que o bloqueio dos receptores β -1 adrenérgicos parecem não exercer influência sobre a gravidade da lesão⁽⁵⁸⁾. Embora a vasoconstrição seja relacionada com a diminuição do RFG e cause repercussão sobre os túbulos renais, não explica todo o tipo de dano ocasionado, pois os eventos iniciados pelo componente vascular podem ser continuados pelos mediadores inflamatórios glomerulares e tubulares.

A evolução das variáveis funcionais foi semelhante nos grupos submetidos a I/R (LA \approx C), com progressivo aumento dos níveis séricos de creatinina e ureia em ambos os grupos e lesão histopatológica confirmando tal evidência. Por outro lado, os biomarcadores evidenciaram achados ambíguos. A NGALp e o KIM-1 não apresentaram efeito de interação ($p>0,05$) sendo que todos os grupos apresentaram uma evolução semelhante ao longo do experimento. O grupo LA, quando avaliado pelo biomarcador IL-18, foi o que apresentou maior dano renal. Já a NGALu evidenciou o grupo LA como sendo o que menos apresentou lesão renal. Baseados nesses achados não podemos afirmar a função que a L-arginina exerce na lesão renal após I/R.

Os grupos S e CLA, que somente foram submetidos à nefrectomia direita sem isquemia renal esquerda, apresentaram alterações nos valores da creatinina plasmática na análise longitudinal, porém, na análise de contrastes entre os momentos M0 e M2, a elevação foi menor do que a encontrada nos grupos que sofreram I/R, evidenciando (C \approx LA) $>$ (S \approx CLA). Achado semelhante ocorreu na análise de contrastes entre os momentos M0 e M2 com a ureia, onde encontramos (C \approx LA) $>$ S $>$ CLA. Apesar de os níveis de ureia terem apresentado aumento significativamente maior no grupo S que no grupo CLA podemos perceber que níveis continuaram em valores normais em M2 (S:50,4 \pm 4,7; CLA: 49,3 \pm 5,1). Já nos biomarcadores não foi encontrado efeito de interação sendo todos os grupos S e CLA semelhantes para as variáveis NGALp, NGALu, KIM-1 e IL-18. Achados que sugerem que a L-arginina *per se* não causa lesão renal.

A nefrectomia realizada a direita juntamente com a isquemia renal esquerda,

aos quais os animais foram submetidos, são consideradas como cirurgias de grande porte. Esse tipo de cirurgia submete as cobaias a um grande estresse cirúrgico com consequente ativação intensa do sistema nervoso simpático e ativação de grande resposta inflamatória sistêmica. Estudos recentes tem demonstrado que os níveis plasmáticos e urinários de NGAL sofrem influência da gravidade da doença e da intensidade da inflamação de uma maneira independente de LRA⁽⁶⁷⁾.

Os níveis de NGALp aumentam em muitas outras condições além de LRA, sendo considerada uma proteína de fase aguda na inflamação^(29, 68). Vanmassenhove *et al.* demonstraram que ocorre aumento nos níveis de NGALp e NGALu conforme aumenta os níveis de proteína C reativa, do escore *Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II* (APACHE II) e com a gravidade da doença em pacientes sépticos. Uma vez que NGALp é filtrado nos glomérulos, os níveis de NGALu também podem ser influenciados pela intensidade da inflamação. Já foi evidenciado que há uma forte correlação entre os níveis NGALp e NGALu em pacientes com sepse, indicando que níveis aumentados de NGALu podem ocorrer devido ao excesso dos níveis de NGALp na circulação sistêmica, como consequência do aumento da produção induzida pela inflamação⁽⁶⁷⁾. De fato, em estudo recente em pacientes sépticos sem LRA, os níveis de NGALp estavam acima dos valores de corte aceitos (150ng.mL^{-1})⁽⁶⁷⁾. Somado a esse achado, os níveis de NGALu em todos os pacientes com choque séptico estavam acima de 150ng.mL^{-1} , mesmo nos que não apresentaram LRA⁽⁶⁷⁾. Achados que nos permitem dizer que NGALu e NGALp aumentam em pacientes com LRA intrínseca e transitória bem como em pacientes sem LRA, com uma substancial sobreposição de valores, limitando a habilidade discriminatória dos testes. Sem essa habilidade a NGAL não é um biomarcador confiável para discriminar entre pacientes com LRA e sem LRA em casos individuais.

A ativação do sistema nervoso simpático, com indução de aumento na atividade nervosa simpática renal, a perda de fluidos no transoperatório juntamente com a resposta inflamatória sistêmica podem ter contribuído na elevação dos biomarcadores sem dano estrutural ou alteração da função renal no presente estudo.

Cai *et al.*, demonstraram em seu trabalho que a forma monomérica e a forma heterodimérica são predominantemente produzidas pelas células tubulares epiteliais, enquanto que a forma homodimérica parece ser exclusiva dos neutrófilos⁽⁶⁹⁾. Esse novo

teste seria mais sensível e específico para a detectar LRA e de maior benefício para os nossos pacientes em risco de desenvolver disfunção renal. A NGAL está presente na urina em diferentes formas e o teste a ser desenvolvido necessita levar em consideração essa diversidade. Os resultados de Cai *et al.*, sugerem que é possível construir um ensaio que identifique preferencialmente a NGAL originada pelo epitélio tubular renal, uma vez que a estrutura molecular parece ser ligeiramente diferente nessas duas fontes⁽⁶⁹⁾.

Em 2013, Glassford *et al.* afirmaram que ainda não existem kits de imunoensaio com a capacidade de realizar uma discriminação clara entre os monômeros, liberados principalmente pelas células epiteliais tubulares, e os homodímeros, originados de neutrófilos ativados⁽⁷⁰⁾.

Inicialmente postulou-se que o efeito protetor da L-arginina em tecido isquêmico seria mediado pela formação de NO produzido pela iNOS, o aumento na expressão de iNOS provavelmente ocorre pela ativação de células tubulares renais. O NO formado pode reduzir a lesão induzida por leucócitos agindo como bloqueador da ativação e sequestro de leucócitos. Somado a isso, postula-se que a L-arginina exerce parte do seu efeito benéfico na função renal devido a uma melhor preservação de eNOS exercendo uma função fundamental na melhora da regulação da hemodinâmica renal⁽⁷¹⁾. Uma das hipóteses sugeridas de como a L-arginina exerce seu efeito protetor em tecido isquêmico seria mediado pela diminuição da formação de EROs gerados durante estresse oxidativo. Uma forma de quantificar o estresse oxidativo *in vivo* de maneira indireta é através da medida dos níveis malondialdeído (MDA), que apresentam correlação com os produtos da peroxidação de lipídeos.

Senbel *et al.*, descreveram um estudo de I/R em modelo animal no qual os animais foram pré-tratados com L-arginina na dose de 125mg.kg^{-1} , 30 minutos antes de serem submetidos a isquemia renal com duração de 45 minutos. Nesse estudo foi observado níveis menores de ureia e creatinina 24 e 48 horas após a isquemia em grupos tratados com L-arginina. Níveis menores de MDA também foram encontrados. Os achados do estudo sugerem efeito protetor da L-arginina em lesão de I/R mediados pela redução do estresse oxidativo medidos pela diminuição de MDA, aumento da atividade da superóxido dismutase, aumento nos níveis de glutathione reduzida, bem como elevando os níveis de NO⁽⁵³⁾.

Rhoden *et al.*, realizaram estudo de I/R em modelo animal testando a influência da L-arginina e do L-NAME, um inibidor da NOS, na função e histopatologia renal. Nesse estudo os ratos foram nefrectomizados a direita 7 dias antes dos procedimentos de isquemia. Entre os grupos que sofreram isquemia de 50 minutos, um recebeu L-arginina intraperitoneal na dose de $200\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, outro recebeu L-NAME na dose de $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intraperitoneal, ambos 20 minutos antes da isquemia, e o outro grupo serviu como controle. No grupo pré-tratado com L-arginina o aumento na creatinina sérica foi atenuado 24 e 96 horas após reperfusão, porém 192 horas após a reperfusão a L-arginina não apresentou proteção. No grupo pré-tratado com L-NAME houve uma piora significativa nos níveis de creatinina em todos os tempos após a isquemia (24, 96 e 192 horas)⁽⁴⁹⁾.

Nesse mesmo estudo foi medida de maneira indireta o índice de peroxidação de lipídeos com os resultados expressos pelos níveis de MDA e quimioluminescência hidroperóxido-iniciada (QL). O pré-tratamento com L-arginina aumentou significativamente os níveis de MDA, porém atenuou os níveis de QL comparado com o grupo não tratado, enquanto que o L-NAME aumentou tanto os níveis de MDA quanto os de QL⁽⁴⁹⁾. Os achados desse estudo sugerem que a L-arginina exerce efeito benéfico sobre a lesão renal causada por I/R de forma independente dos efeitos nas EROs e peroxidação de lipídeos.

Em outro modelo de I/R, Mohamed *et al.*, encontraram efeito protetor com o uso de L-arginina evidenciado pelo menor aumento da creatinina sérica em grupos pré-tratados com L-arginina, além de menor lesão renal observada na histopatologia. Os níveis de MDA, de catalase renal e superóxido dismutase não foram estatisticamente diferentes entre os grupos I/R e pré-tratado com L-arginina⁽⁵¹⁾. Esses autores sugerem que o NO exerce diversas funções nos rins, dependendo da sua concentração, lugar onde foi liberado e duração de ação. Por exemplo, o NO gerado pela iNOS apresenta efeito citotóxico sobre as células epiteliais tubulares renais. Em contraste, um aumento na expressão de eNOS, por aumentar a produção do NO endotélio-derivado, pode melhorar a lesão tóxica e isquêmica da lesão renal por mediar vasodilatação, inibir adesão leucocitária e reduzir a agregação plaquetária⁽⁵¹⁾.

A L-arginina administrada por via oral não apresenta diminuição na sua eficácia já que apresenta uma ótima biodisponibilidade com picos séricos entre 60 e 120

minutos e causa aumento considerável nos níveis de NO em menos de 60 minutos. Em nosso modelo experimental a L-arginina foi administrada 60 minutos antes do animal receber anestesia, um momento adequado para aumento da oferta de L-arginina à célula.

A análise histológica demonstrou ausência de lesão nos rins direitos de todos os grupos. A avaliação histopatológica serviu como controle do rim contralateral, aumentando a confiabilidade da análise.

Nos grupos S e CLA os corpúsculos renais eram compostos pelo tufo de capilares convolutos (glomérulo) encapsulados pela invaginação em forma de copo do túbulo contorcido proximal (cápsula de Bowman) coberta por epitélio escamoso. Os túbulos contorcidos proximais apresentaram lúmen estreito e eram cobertos por célula cuboidais apresentando núcleo esférico e citoplasma eosinofílico. Os túbulos contorcidos distais apresentaram cobertura por epitélio cuboidal e o lúmen mais amplo. Os túbulos apresentavam-se lado a lado com quantidade mínima de interstício entre eles. A medula estava ocupada na sua maior parte por tubos coletores recobertos por epitélio colunar.

As lâminas dos grupos C e LA mostraram muitas mudanças histopatológicas. A estrutura do glomérulo sofreu muitas alterações, apresentando muitas formas assimétricas e tamanhos diferentes. Outras características encontradas foram encolhimento glomerular, baixa celularidade, espessamento parietal da cápsula de Bowman, espaço de Bowman aumentado. Nos túbulos o epitélio de revestimento demonstrou sinais de degeneração como perda da borda em escova, vacuolização, edema, citoplasma esbranquiçado com núcleos degenerados e descolamento da membrana basal. Outros túbulos mostraram alterações necróticas do epitélio com dilatação intensa, presença de células necróticas no interior e completa destruição do mesmo. Ampliação do interstício foi bastante evidente e exibiu número excessivo de células inflamatórias infiltradas e vasos sanguíneos dilatados. As artérias intrarrenais mostraram congestão sanguínea intensa. O lúmen dos túbulos estava aumentado e alguns apresentaram depósitos hialinos.

A análise histopatológica das lâminas dos rins esquerdos, utilizando o escore de lesão proposto por Park *et al.* para a avaliação da necrose tubular, demonstrou que os animais pertencentes aos grupos S e CLA não apresentaram lesão, e estão de acordo com outros trabalhos na literatura⁽⁴⁹⁾. Já nos grupos C e LA, 100% dos animais

apresentaram lesões de graus variados com medianas de 3,5 e 5 respectivamente, maiores em relação aos grupos S e CLA, porém semelhantes entre si. Evidenciado que, semelhante aos achados funcionais, do ponto de vista histopatológico, a L-arginina não exerceu efeito protetor nem efeito danoso para os rins submetidos a I/R.

No trabalho de Rhoden *et al.* citado anteriormente, os autores encontraram lesão renal em todos os animais que sofreram isquemia. O grau de lesão 24 horas após a reperfusão foi similar nos dois grupos. No entanto, o uso de L-arginina foi capaz de diminuir o infiltrado inflamatório 24hs após o procedimento. A análise histopatológica realizada 8 dias após a reperfusão mostrou que a L-arginina e o L-NAME diminuíram significativamente o grau de atrofia tubular, porém, sem alterar o grau de fibrose intersticial. Este estudo sugere que o efeito protetor da L-arginina, medido pelo grau de atrofia tubular, só seria evidenciado após transcorridos 8 dias.

Raff *et al.* realizaram análise da histopatologia renal em ratos submetidos a I/R, e não encontraram diferenças morfológicas 1, 3, 7 e 14 dias após clampeamento bilateral de artéria renal por 45 minutos entre os grupos tratados com salina ou com L-arginina (500mg.kg^{-1} 15 minutos após a isquemia). Nesse experimento ambos os grupos apresentaram lesões intensas 24 horas após evento isquêmico com posterior reestabelecimento progressivo da estrutura renal. A infiltração de macrófagos no córtex e medula também foi avaliada, porém, não apresentou diferença entre os grupos. L-arginina não altera a sobrevivência das células nem a morfologia renal em lesão de I/R apesar de já ter sido demonstrado que apresenta melhora no RFG e FPR⁽⁷¹⁾.

Na presente pesquisa, foram avaliados a função, a histopatologia renal e os biomarcadores em ratos submetidos a lesão de I/R renal anestesiados com isoflurano e o objetivo foi avaliar se a L-arginina exerce efeito protetor sobre os rins submetidas a esse estímulo. Segundo os dados encontrados em nosso experimento, não houve benefício na utilização de L-arginina na dose de $800\text{mg.kg}^{-1}.\text{dose}^{-1}$ sobre os efeitos da lesão de I/R. Conclusão divergente dos outros trabalhos citados que sugerem que o uso de L-arginina pode diminuir a formação de EROs, aumentar a síntese de NO e diminuir o grau de lesão renal.

Utilizando os critérios de RIFLE e AKIN percebeu-se uma piora em todos os grupos, porém foi muito mais intensa nos grupos LA e C com 87,5% e 75% dos animais respectivamente encontrando-se na classe R/3 em M2 e discreta nos grupos S e CLA

com 100% dos animais encontrando-se nas classes R/1 e normal nesse mesmo momento. Para que pudéssemos testar estatisticamente se existe correlação dos níveis de biomarcadores com o grau de gravidade nos critérios de RIFLE/AKIN necessariamente deveríamos ter uma amostra de tamanho maior. Contudo os resultados podem ser valorizados do ponto de vista clínico.

No presente estudo não foi encontrada correlação dos níveis de biomarcadores com o grau de lesão histopatológica como seria esperado.

O diagnóstico de LRA utilizando os critérios de AKIN e RIFLE são limitados, uma vez que creatinina e DU refletem indiretamente que o dano renal já ocorreu. Tentando caracterizar os vários aspectos da doença, identificar indivíduos em risco e introduzir terapêuticas pré-clínicas o décimo consenso do ADQI sugeriu o uso dos biomarcadores no diagnóstico e estratificação de risco dos pacientes em 4 subgrupos (Figura 17)⁽⁷²⁾ e recomendam a complementação da habilidade de diagnóstico dos critérios de AKIN/RIFLE com o uso de biomarcadores de lesão renal (Figura 18)⁽⁷²⁾.

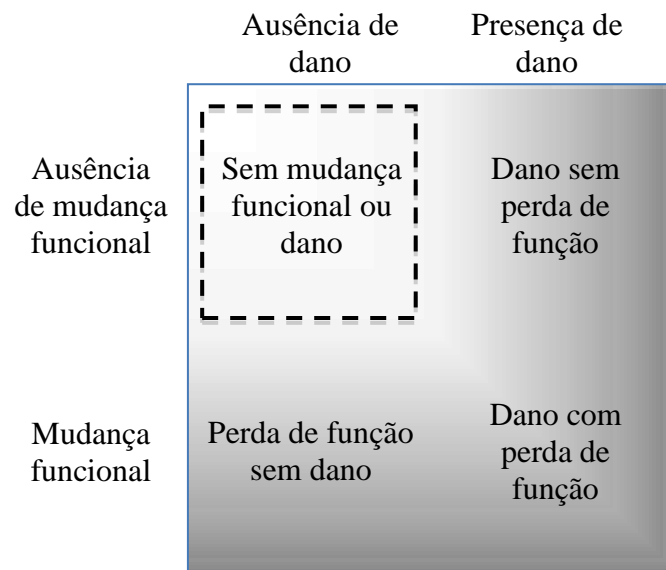


Figura 17 - Novo espectro de LRA: combinação de marcadores funcionais e de dano. Adaptado de McCullough⁽⁷²⁾

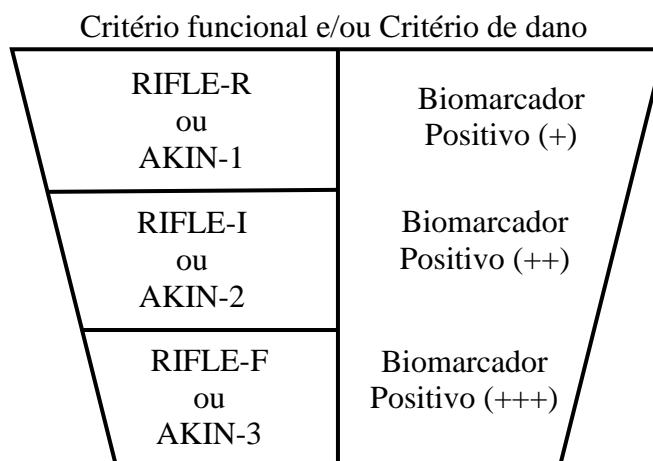


Figura 18 - Novos critérios para o diagnóstico de LRA. Adaptado de McCullough⁽⁷²⁾.

O novo critério proposto (Figura 18) necessita de refinamento para determinar qual biomarcador e quais os valores limiares devem ser utilizados para estadiamento inicial. Baseados em nosso conhecimento atual o estadiamento de LRA utilizando apenas os biomarcadores ainda não pode ser justificado, uma vez que valores discriminatórios de referência para separar lesão leve de moderada ou grave não podem ser encontrados na literatura. Poderemos utilizá-los com essa finalidade quando tivermos uma melhor compreensão do padrão de elevação e desfechos clínicos associados com o nível de biomarcadores. Apesar da recomendação de uso dos biomarcadores como critério diagnóstico o consenso reconhece que atualmente a creatinina e o DU continuam sendo os melhores marcadores biológicos para o diagnóstico e estadiamento de LRA e não devem ser descartados.

Em revisão da literatura recente, o diagnóstico de LRA utilizando os biomarcadores em população pediátrica, apresentou uma AUROC variando entre 0,44 a 1,00, com o valor preditivo positivo (VPP) variando entre 27% e 100% enquanto o valor preditivo negativo (VPN) variou entre 10% e 100%. Em pós-operatório de cirurgia cardíaca em adultos, a AUROC variou entre 0,27 e 0,98, com o VPP e o VPN variando entre 4% a 100% e 61% a 100%, respectivamente. Os biomarcadores avaliados no contexto de pacientes atendidos na emergência apresentou AUROC variando entre 0,59 e 0,95. Nesse mesmo contexto o VPP e o VPN variaram entre 4% a 90% e 84% a 99,5%, respectivamente. Em paciente internado em unidade de tratamento intensivo a AUROC variou entre 0,35 e 0,99 e o VPP e o VPN variaram entre 1% a 100% e 50% a 100%, respectivamente⁽⁷³⁾.

Em relação à utilidade diagnóstica dos biomarcadores, percebe-se que existe uma grande diversidade de resultados, abrangendo desde estudos notoriamente negativos a estudos extremamente otimistas. Os primeiros estudos clínicos dos biomarcadores mostraram resultados promissores com altos valores preditivos em populações homogêneas nas quais a agressão ao rim era aguda, única e facilmente identificável como circulação extracorpórea ou uso de contraste intravenoso. A maioria dos biomarcadores não está associada apenas com dano renal, mas também com outras condições que podem levar à LRA. Por isso, em populações mais heterogêneas, com causas multifatoriais de LRA, a performance para diagnosticar o dano renal de maneira precoce tem sido equivalente a avaliação clínica e exames de laboratório padrão. De fato, pacientes pediátricos sépticos apresentam níveis maiores de NGALu e de IL-18 do que pacientes não sépticos, indicando que a associação entre NGALu/IL-18 e LRA em pacientes sépticos pode significar mais a associação entre a gravidade da doença do que simplesmente dano renal real⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾

Não existe dúvida que existe uma zona de intersecção onde LRA funcional e histopatológica coexistem em diversos graus. Foi demonstrado em trabalho recente que mesmo em casos de LRA transitória, como na depleção de volume, os marcadores de dano tubular podem estar presentes, demonstrando que LRA funcional e intrínseca são graduações de um espectro evolutivo de LRA⁽⁷⁷⁾. De fato, em estudo prospectivo realizado por Singer *et al.* foi empregado NGALu na tentativa de distinguir entre LRA pré-renal e renal baseado na responsividade à reposição de fluidos, com sucesso no diagnóstico diferencial em apenas 25% dos pacientes⁽⁷⁸⁾.

Deve-se avaliar com cautela a recomendação do décimo ADQI, pois a maioria dos estudos relata valores alterados dos biomarcadores em pacientes com LRA, porém existe uma sobreposição substancial de valores entre pacientes com lesão e sem lesão, dificultando a discriminação em um paciente individualizado. Para diagnóstico de LRA subclínica já foi demonstrado que a habilidade discriminatória da NGALu é menor conforme diminui a classe do RIFLE⁽⁷⁹⁾. Além disso, estudos partem da premissa que um aumento nos níveis dos biomarcadores sem aumento na creatinina sérica indica LRA, dessa forma aumentam a sensibilidade a custas de especificidade e VPP.

Em condições de pesquisa o uso de biomarcadores altamente sensíveis é ideal para diagnosticar dano renal. Porém, em situações nas quais o momento da agressão

renal é desconhecido, são necessárias múltiplas amostras, as quais todas apresentam o potencial de ser falso-positivas e podem levar a decisões clínicas equivocadas. Na prática clínica, precisamos definir qual o grau de dano subclínico, detectado pelo aumento somente nos níveis dos biomarcadores que serão utilizados. Para definir esse ponto de corte, estudos demonstrando a relação entre o aumento dos biomarcadores e o desfecho a longo prazo são necessários.

Existe consenso de que a maioria dos biomarcadores de lesão renal que estão surgindo são capazes de detectar a LRA de maneira precoce em relação à creatinina, porém o padrão de elevação em relação ao dano renal não é completamente compreendido. A utilização de biomarcadores deve ser diferenciada para situações clínicas distintas, já que a performance é dependente da situação clínica do paciente. Uma vez que todos os parâmetros utilizados para prever e diagnosticar LRA têm suas limitações e que os biomarcadores apresentam performance variável, as informações de microscopia urinária, bioquímica e biomarcadores utilizados em conjunto são a melhor alternativa para nos ajudar a prever a LRA e sua intensidade.

6 Considerações Finais

Em relação ao modelo animal, a nefrectomia direita poderia ter sido feita uma semana antes do experimento, de maneira semelhante ao estudo de Rhoden *et al.*⁽⁴⁵⁾. Esse cuidado evitaria o fator de confusão do estresse cirúrgico. A avaliação histopatológica precoce parece não ser suficiente para diferenciar os grupos e também poderia ser feita uma semana após o experimento.

Para podermos analisar estatisticamente os resultados utilizando os critérios de RIFLE e AKIN a amostra obrigatoriamente deveria ser maior. Da mesma forma, a amostra deveria ser maior para podermos realizar a análise de correlação entre ao grau de lesão histopatológica e o nível dos biomarcadores.

A creatinina sérica e o DU continuam sendo os melhores marcadores biológicos para LRA.

Estudos clínicos futuros devem ter como objetivo avaliar se as decisões clínicas baseadas no diagnóstico precoce de LRA com os biomarcadores se traduz em tratamento efetivo e benefícios clínicos.

7 Conclusão

A L-arginina na dose de $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dose}^{-1}$ administrada por via oral nas condições metodológicas deste experimento, não exerceu efeito protetor ou danoso ao rim submetidos a lesão de I/R.

Houve lesão funcional comprovada por aumento da ureia, creatinina em todos os grupos, porém nos grupos C e LA o aumento foi mais intenso.

Os biomarcadores NGALu, NGALp, KIM-1 e IL-18 não foram específicos o suficiente para discriminar os grupos de maneira adequada.

Não houve diferença no grau de lesão histopatológica entre os grupos C e LA.

8 Referências

1. Venkataraman R. Can we prevent acute kidney injury? *Crit Care Med.* 2008 Apr;36(4 Suppl):S166-71.
2. Lameire NH, Vanholder R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004 Mar;18(1):21-36.
3. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA.* 2005 Aug 17;294(7):813-8.
4. Kellum JA, Mehta RL, Angus DC, Palevsky P, Ronco C. The first international consensus conference on continuous renal replacement therapy. *Kidney Int.* 2002 Nov;62(5):1855-63.
5. Bellomo R, Kellum JA, Mehta R, Palevsky PM, Ronco C. Acute Dialysis Quality Initiative II: the Vicenza conference. *Curr Opin Crit Care.* 2002 Dec;8(6):505-8.
6. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care.* 2004 Aug;8(4):R204-12.
7. Mosier MJ, Pham TN, Klein MB, Gibran NS, Arnolde BD, Gamelli RL, et al. Early acute kidney injury predicts progressive renal dysfunction and higher mortality in severely burned adults. *J Burn Care Res.* 2010 Jan-Feb;31(1):83-92.
8. Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care.* 2006;10(3):R73.
9. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007;11(2):R31.
10. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, Barsoum RS, Burdmann EA, Goldstein SL, et al. Section 2: AKI Definition. *Kidney Int Suppl* (2011). 2012 Mar;2(1):19-36.

11. Blantz RC. Pathophysiology of pre-renal azotemia. *Kidney Int.* 1998 Feb;53(2):512-23.
12. Mahon P, Shorten G. Perioperative acute renal failure. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2006 Jun;19(3):332-8.
13. Rascusen LC. The Morphologic basis of acute renal failure. In: WF MBF, editor. *Acute Renal Failure - A Companion to Brenner and Rector's The Kidney.* Philadelphia: Saunders; 2001. p. 1-12.
14. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med.* 1996 May 30;334(22):1448-60.
15. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jun;17(6):1503-20.
16. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet.* 2012 Aug 25;380(9843):756-66.
17. Lieberthal W. Biology of acute renal failure: therapeutic implication. *Kidney International.* 1997 (52):1102-15.
18. Daugharty TM, Brenner BM. Reversible hemodynamic defect in glomerular filtration rate after ischemic injury. *Am J Physiol.* 1975 May;228(5):1436-9.
19. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla-its implications for disease. *N Engl J Med.* 1995 Mar 9;332(10):647-55.
20. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):486-91.
21. Devarajan P. NGAL for the detection of acute kidney injury in the emergency room. *Biomark Med.* 2014;8(2):217-9.
22. Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. *BMJ.* 2006 Oct 7;333(7571):733-7.
23. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* 2004 Sep;66(3):1115-22.
24. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2008 Dec;23(12):2151-7.
25. Schrier RW. Need to intervene in established acute renal failure. *J Am Soc*

Nephrol. 2004 Oct;15(10):2756-8.

26. Soni SS, Ronco C, Katz N, Cruz DN. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif.* 2009;28(3):165-74.
27. Tsigou E, Psallida V, Demponeras C, Boutzouka E, Baltopoulos G. Role of new biomarkers: functional and structural damage. *Crit Care Res Pract.* 2013;2013:361078.
28. Makris K, Kafkas N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury. *Adv Clin Chem.* 2012;58:141-91.
29. Martensson J, Bellomo R. The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif.* 2014;37(4):304-10.
30. Bouquegneau A, Krzesinski JM, Delanaye P, Cavalier E. Biomarkers and physiopathology in the cardiorenal syndrome. *Clin Chim Acta.* 2014 Oct 31.
31. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Oct;14(10):2534-43.
32. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009 Dec;54(6):1012-24.
33. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet.* 2005 Apr 2-8;365(9466):1231-8.
34. Fadel FI, Abdel Rahman AM, Mohamed MF, Habib SA, Ibrahim MH, Sleem ZS, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker for prediction of acute kidney injury after cardio-pulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Arch Med Sci.* 2012 May 9;8(2):250-5.
35. Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology.* 2006 Sep;105(3):485-91.
36. Liu S, Che M, Xue S, Xie B, Zhu M, Lu R, et al. Urinary L-FABP and its combination with urinary NGAL in early diagnosis of acute kidney injury after cardiac surgery in adult patients. *Biomarkers.* 2013 Feb;18(1):95-101.

37. Bennett MR, Nehus E, Haffner C, Ma Q, Devarajan P. Pediatric reference ranges for acute kidney injury biomarkers. *Pediatr Nephrol*. 2015 Apr;30(4):677-85.
38. McWilliam SJ, Antoine DJ, Sabbisetti V, Pearce RE, Jorgensen AL, Lin Y, et al. Reference intervals for urinary renal injury biomarkers KIM-1 and NGAL in healthy children. *Biomark Med*. 2014;8(10):1189-97.
39. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13;273(7):4135-42.
40. Obermuller N, Geiger H, Weipert C, Urbschat A. Current developments in early diagnosis of acute kidney injury. *Int Urol Nephrol*. 2013 May 15.
41. Zhang Z, Humphreys BD, Bonventre JV. Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Oct;18(10):2704-14.
42. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Nov;24(11):3265-8.
43. Maisel AS, Katz N, Hillege HL, Shaw A, Zanco P, Bellomo R, et al. Biomarkers in kidney and heart disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jan;26(1):62-74.
44. Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*. 2004 Mar;43(3):405-14.
45. Leslie JA, Meldrum KK. The role of interleukin-18 in renal injury. *J Surg Res*. 2008 Mar;145(1):170-5.
46. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Oct;16(10):3046-52.
47. Coca SG, Garg AX, Thiessen-Philbrook H, Koyner JL, Patel UD, Krumholz HM, et al. Urinary biomarkers of AKI and mortality 3 years after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol*. 2014 May;25(5):1063-71.
48. Kanzelmeyer NK, Pape L, Chobanyan-Jurgens K, Tsikas D, Hartmann H, Fuchs AJ, et al. L-arginine/NO pathway is altered in children with haemolytic-uraemic

syndrome (HUS). *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:203512.

49. Rhoden EL, Rhoden CR, Lucas ML, Pereira-Lima L, Zettler C, Bello-Klein A. The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Immunol*. 2002 Nov;10(4):277-84.

50. Goumas G, Tentolouris C, Tousoulis D, Stefanadis C, Toutouzas P. Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*. 2001 Feb 1;154(2):255-67.

51. Mohamed Abd E, Lasheen NN. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusion in adult rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014;6(3):153-65.

52. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315-424.

53. Senbel AM, Omar AG, Abdel-Moneim LM, Mohamed HF, Daabees TT. Evaluation of l-arginine on kidney function and vascular reactivity following ischemic injury in rats: protective effects and potential interactions. *Pharmacol Rep*. 2014 Dec;66(6):976-83.

54. Margaritis EV, Yanni AE, Agrogiannis G, Liarakos N, Pantopoulou A, Vlachos I, et al. Effects of oral administration of (L)-arginine, (L)-NAME and allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci*. 2011 Jun 6;88(23-24):1070-6.

55. Guidance for Industry – Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers Silver Spring 2005 [updated 18/10/2013; cited 2011 20/08/2011]. Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/02d-0492-gdl0002.pdf>.

56. Park Y, Hirose R, Dang K, Xu F, Behrends M, Tan V, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery*. 2008 Feb;143(2):243-51.

57. Tanaka R, Tsutsui H, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. Sex differences in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury are dependent on the renal sympathetic nervous system. *Eur J Pharmacol*. 2013 Aug 15;714(1-3):397-404.

58. Modolo NS, Castiglia YM, Ganem EM, Braz JR, Vianna PT, Vane LA. Acute renal ischemia model in dogs: effects of metoprolol. *Ren Fail*. 2001 Jan;23(1):1-10.

59. Heemann U, Szabo A, Hamar P, Muller V, Witzke O, Lutz J, et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury : possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):287-93.
60. Woodson B, Wang L, Mandava S, Lee BR. Urinary Cystatin C and NGAL as Early Biomarkers for Assessment of Renal Ischemia-Reperfusion Injury: A Serum Marker to Replace Creatinine? *J Endourol.* 2013 Sep 25.
61. Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol.* 1986 Jul;251(1 Pt 2):F87-93.
62. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007 Dec;39(10):2983-5.
63. Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology.* 2004 Dec;101(6):1313-24.
64. Lee HT, Kim M, Kim M, Kim N, Billings FTt, D'Agati VD, et al. Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Sep;293(3):F713-22.
65. Fujii T, Kurata H, Takaoka M, Muraoka T, Fujisawa Y, Shokoji T, et al. The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur J Pharmacol.* 2003 Nov 28;481(2-3):241-8.
66. Fujii T, Sugiura T, Ohkita M, Kobuchi S, Takaoka M, Matsumura Y. Selective antagonism of the postsynaptic alpha(1)-adrenoceptor is protective against ischemic acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007 Nov 28;574(2-3):185-91.
67. Vanmassenhove J, Glorieux G, Lameire N, Hoste E, Dhondt A, Vanholder R, et al. Influence of severity of illness on neutrophil gelatinase-associated lipocalin performance as a marker of acute kidney injury: a prospective cohort study of patients with sepsis. *BMC Nephrol.* 2015;16:18.
68. Giasson J, Li GH, Chen Y. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a new biomarker for non--acute kidney injury (AKI) diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011 Aug;10(4):272-82.

69. Cai L, Rubin J, Han W, Venge P, Xu S. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Dec;5(12):2229-35.
70. Glassford NJ, Schneider AG, Xu S, Eastwood GM, Young H, Peck L, et al. The nature and discriminatory value of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in critically ill patients at risk of acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2013 Oct;39(10):1714-24.
71. Raff U, Schneider R, Gambaryan S, Seibold S, Reber M, Vornberger N, et al. L-Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron Physiol*. 2005;101(3):p39-50.
72. McCullough PA, Shaw AD, Haase M, Bouchard J, Waikar SS, Siew ED, et al. Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Contrib Nephrol*. 2013;182:13-29.
73. Vanmassenhove J, Vanholder R, Nagler E, Van Biesen W. Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Feb;28(2):254-73.
74. Washburn KK, Zappitelli M, Arikian AA, Loftis L, Yalavarthy R, Parikh CR, et al. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Feb;23(2):566-72.
75. Wheeler DS, Devarajan P, Ma Q, Harmon K, Monaco M, Cvijanovich N, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med*. 2008 Apr;36(4):1297-303.
76. Zappitelli M, Washburn KK, Arikian AA, Loftis L, Ma Q, Devarajan P, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2007;11(4):R84.
77. Nejat M, Pickering JW, Devarajan P, Bonventre JV, Edelstein CL, Walker RJ, et al. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. *Kidney Int*. 2012 Jun;81(12):1254-62.
78. Singer E, Elger A, Elitok S, Kettritz R, Nickolas TL, Barasch J, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal

failure and predicts outcomes. *Kidney Int.* 2011 Aug;80(4):405-14.

79. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, Bennett M, Story D, Matalanis G, et al. The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Nov;24(11):3349-54.

Anexo I

Valores de percentil para cada biomarcador por idade e sexo.

| Percentil 95 | NGAL (ng/ml) | KIM-1 (pg/ml) | IL-18 (pg/ml) | LFABP (ng/ml) |
|---------------------------|--------------------|----------------------------|---------------------|-------------------|
| | Combinado (M, F) | Combinado (M, F) | Combinado (M, F) | Combinado (M, F) |
| Coorte completa (n = 368) | 57.6 (28.3, 73.1) | 1,302.0 (1,298.4, 1,444.7) | 87.9 (56.1, 104.5) | 17.0 (15.5, 18.6) |
| 3-<5 Anos (n = 94) | 39.1 (26.1, 52.2) | 1,128.2 (983.7, 1,291.7) | 89.5 (78.3, 100.5) | 39.5 (49.4, 41.4) |
| 5-<10 Anos (n = 89) | 58.5 (10.9, 139.5) | 1,239.5 (1,276.6, 1,212.9) | 54.3 (41.7, 79.0) | 13.1 (15.5, 13.5) |
| 10-<15 Anos (n = 93) | 66.8 (25.5, 72.3) | 1,141.1 (1,156.6, 1,103.5) | 88.8 (58.5, 111.1) | 13.2 (13.7, 13.3) |
| 15-<18 Anos (n = 91) | 74.7 (50.0, 138.6) | 1,876.2 (1,877.3, 1,934.5) | 138.9 (71.2, 273.1) | 8.2 (10.5, 6.7) |

O primeiro número é o percentil 95 para toda a amostra por idade, e os valores para o sexo masculino e feminino são mostrados entre parênteses.

NGAL neutrophil gelatinase associated lipocalin, KIM-1 kidney injury molecule 1, IL-18 interleucina 18, LFABP liver fatty acid binding protein, M masculino, F feminino

McWilliam SJ, Antoine DJ, Sabbisetti V, Pearce RE, Jorgensen AL, Lin Y, et al. Reference intervals for urinary renal injury biomarkers KIM-1 and NGAL in healthy children. *Biomark Med.* 2014;8(10):1189-97.

Anexo II

| Coorte e biomarcador | 2.5 ^o percentil (90% IC), ng/mg Cr | 50 ^o percentil (90% IC), ng/mg Cr | 97.5 ^o percentil (90% IC), ng/mg Cr |
|--|--|---|---|
| UK KIM-1 (MSD) Caucasianos, masculino e feminino (n = 107) | | | |
| Idade 1–4 anos | 0.08 (0.03–0.12) | 0.46 (0.38–0.57) | 2.39 (1.96–2.91) |
| Idade 5–8 anos | 0.08 (0.03–0.12) | 0.46 (0.38–0.57) | 1.84 (1.62–2.10) |
| Idade 9–12 anos | 0.08 (0.03–0.12) | 0.46 (0.38–0.57) | 1.42 (1.22–1.65) |
| Idade 13–16 anos | 0.08 (0.03–0.12) | 0.46 (0.38–0.57) | 1.10 (0.87–1.39) |
| UK NGAL (MSD) Caucasianos, femininos (n = 48) | | | |
| Idade 1–4 anos | 8.34 (3.14–22.15) | 10.49 (8.02–13.72) | 128.84 (54.03–307.25) |
| Idade 5–8 anos | 3.84 (2.64–5.60) | 15.30 (12.78–18.32) | 143.95 (81.17–255.29) |
| Idade 9–12 anos | 1.77 (0.95–3.31) | 22.31 (16.79–29.66) | 160.83 (104.23–248.19) |
| Idade 13–16 anos | 0.82 (0.22–3.01) | 32.55 (20.41–51.90) | 179.70 (100.73–320.58) |
| UK NGAL (MSD) Caucasianos, masculinos (n = 58) | | | |
| Idade 1–16 anos | 1.33 (0–1.89) | 5.21 (4.66–6.49) | 64.59 (29.14–Inf) [‡] |
| UK KIM-1 (Luminex) Caucasianos, masculino e feminino (n = 108) | | | |
| Idade 1–16 anos | 0.03 (0.002–0.04) | 0.17 (0.15–0.18) | 0.63 (0.49–Inf) [‡] |
| UK NGAL (Luminex) Caucasianos, femininos (n = 50) | | | |
| Idade 1–4 anos | 1.25 (0.11–14.06) | 63.43 (38.09–83.93) | 706.72 (247.84–2015.28) |
| Idade 5–8 anos | 2.72 (0.92–8.06) | 63.43 (38.09–83.93) | 581.69 (297.53–1137.25) |
| Idade 9–12 anos | 5.95 (2.41–14.70) | 63.43 (38.09–83.93) | 478.78 (327.30–700.38) |
| Idade 13–16 anos | 13.00 (1.46–116.09) | 63.43 (38.09–83.93) | 394.08 (256.72–604.94) |
| UK NGAL (Luminex) Caucasianos, masculinos (n = 58) | | | |
| Idade 1–4 anos | 0.36 (0–0.58) | 6.30 (4.53–10.18) | 229.90 (118.14–447.38) |
| Idade 5–8 anos | 0.36 (0–0.58) | 6.30 (4.53–10.18) | 180.51 (114.13–285.51) |
| Idade 9–12 anos | 0.36 (0–0.58) | 6.30 (4.53–10.18) | 141.73 (103.94–193.27) |
| Idade 13–16 anos | 0.36 (0–0.58) | 6.30 (4.53–10.18) | 111.28 (80.96–152.95) |
| US KIM-1 (MSD) Caucasianos, masculino e feminino (n = 73) | | | |
| Idade 7–8 anos | 0.014 (0.007–0.032) | 0.23 (0.19–0.29) | 0.79 (0.62–Inf) [‡] |
| Idade 9–12 anos | 0.031 (0.022–0.044) | 0.23 (0.19–0.29) | 0.79 (0.62–Inf) [‡] |
| Idade 13–16 anos | 0.088 (0.051–0.151) | 0.23 (0.19–0.29) | 0.79 (0.62–Inf) [‡] |
| US KIM-1 (MSD) Africano–Americano, masculino e feminino (n = 65) | | | |
| Idade 7–8 anos | 0.038 (0.018–0.077) | 0.17 (0.13–0.19) | 0.42 (0.34–Inf) [‡] |
| Idade 9–12 anos | 0.048 (0.035–0.066) | 0.17 (0.13–0.19) | 0.42 (0.34–Inf) [‡] |
| Idade 13–16 anos | 0.067 (0.043–0.106) | 0.17 (0.13–0.19) | 0.42 (0.34–Inf) [‡] |
| US NGAL (MSD), femininos (n = 55) | | | |
| Idade 7–8 anos | 1.30 (0–4.07) | 19.30 (12.36–30.14) | 58.26 (42.06–80.70) |
| Idade 9–12 anos | 1.30 (0–4.07) | 35.38 (28.40–44.09) | 96.95 (82.72–113.64) |
| Idade 13–16 anos | 1.30 (0–4.07) | 79.40 (49.91–126.32) | 191.21 (137.58–265.74) |
| US NGAL (MSD), masculinos (n = 90) | | | |
| Idade 7–8 anos | 1.34 (0–1.50) | 3.10 (2.55–3.77) | 8.28 (6.34–10.81) |
| Idade 9–12 anos | 1.34 (0–1.50) | 4.23 (3.63–4.95) | 10.38 (8.83–12.20) |
| Idade 13–16 anos | 1.34 (0–1.50) | 6.42 (4.56–9.03) | 14.02 (10.67–18.42) |

Intervalo de referência por regressão quartil

IR 95% (2.5^o e 97.5^o percentis) juntamente com valores de mediana (50^o) e seus IC de 90% foram estimados usando o método de regressão de percentil. IR são relatados por coorte (UK ou USA), biomarcador (KIM-1 ou NGAL) e método analítico (MSD ou Luminex). Quando em concentrações dos biomarcadores foram associadas significativamente com sexo e etnia ($p < 0.05$), VR foram apresentados estratificados.

†Nos IR que não apresentaram associação significativa com a idade, não foi possível calcular os limites superiores do IC devido a amostra pequena e percentil extremo.

IC: Intervalo de confiança; Cr: Creatinina; Inf: Infinito; MSD: *Meso Scale Discovery*; IR: Intervalo de referência.

Bennett MR, Nehus E, Haffner C, Ma Q, Devarajan P. Pediatric reference ranges for acute kidney injury biomarkers. *Pediatr Nephrol*. 2015 Apr;30(4):677-85.