



FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**MARCADORES BIOLÓGICOS PARA NECROSE TUBULAR AGUDA EM
PACIENTES COM DOENÇA GLOMERULAR**

MARIA BRANDÃO TAVARES

Salvador – Bahia

2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

T231m Tavares, Maria Brandão
Marcadores biológicos para necrose tubular aguda em pacientes com doença
glomerular / Maria Brandão Tavares. - 2017.
100 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, Laboratório
de Patologia e Intervenção.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação
Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. Necrose tubular aguda. 2. Síndrome nefrótica. 3. Lesão renal aguda. I.
Título.

CDU 616.611

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MUNIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**MARCADORES BIOLÓGICOS PARA NECROSE TUBULAR AGUDA EM
PACIENTES COM DOENÇA GLOMERULAR**

MARIA BRANDÃO TAVARES

Orientador: Washington Luis Conrado dos Santos

Tese apresentada ao Colegiado do Curso
de Pós-Graduação em Patologia Humana,
para obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2017

Título da Tese: " **MARCADORES BIOLÓGICOS PARA NECROSE TUBULAR AGUDA EM PACIENTES COM DOENÇA GLOMERULAR**"

MARIA BRANDÃO TAVARES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 07 de abril de 2017

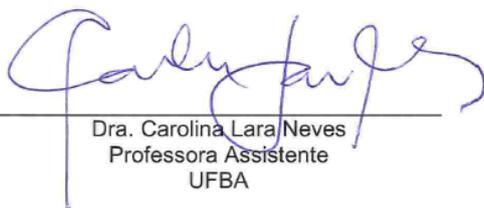
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Fabricio Kleryton Marchini
Pesquisador
Fiocruz/PR



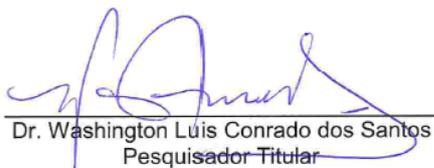
Dr. Mittermayer Barreto Santiago
Professor adjunto
FBDC



Dra. Carolina Lara Neves
Professora Assistente
UFBA



Dr. Daniel Abensur Athanázio
Professor
IGM/Fiocruz



Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
IGM/Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Dr. Washington Luis Conrado dos Santos pela oportunidade de executar este trabalho, pelos anos de convivência e todo conhecimento passado.

À minha família que me proporciona pelo apoio incondicional, quer nos momentos bons compartilhando minhas alegrias ou momentos difíceis ajudando a seguir.

Meus queridos e amados filhos, pelos seres maravilhosos que são, pela compreensão e o sorriso de cada dia.

A Tiago Rodrigues Monteiro, jamais conseguirei expressar em palavras minha gratidão pelo seu apoio e companheirismo.

À Caroline Vilas Boas de Melo, estudante que participou da execução do trabalho pela grande contribuição.

À Paula Neves Fernandes, estudante de iniciação de científica que contribuiu com a coleta dos dados e amostras; espero ter retribuído em forma de conhecimento e ter ajudado em sua jornada acadêmica.

Aos colegas de trabalho do Hospital Ana Nery, Hospital Geral Roberto Santos e Hospital Santo Antônio que colaboraram com a realização deste projeto.

Todos os colegas e pesquisadores do Laboratório de Patologia e Biointervenção – LPBI, pelo apoio, opiniões, críticas que sempre permitem a melhoria do nosso trabalho.

A todos funcionários da biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz pela preciosa ajuda na formatação deste trabalho e disposição.

Aos amigos que me acompanharam em toda esta jornada, que torceram por este momento e colaboraram em pensamento pelo sucesso deste trabalho.

Finalizo agradecendo a todos os pacientes que consentiram em participar deste trabalho. Espero poder contribuir com o crescimento do conhecimento desta complexa área que é nefrologia, e por podermos lhes fornecer dias melhores cada vez mais.

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq

CPqGM

FAPESB

FIOCRUZ

TAVARES, Maria Brandão. Marcadores biológicos para necrose tubular aguda em pacientes com doença glomerular. 100 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação frequente em pacientes com glomerulopatias, acometendo até 34% dos adultos com síndrome nefrótica (SNO) idiopática. O diagnóstico diferencial de necrose tubular aguda (NTA) de glomerulonefrite proliferativa ou crescêntica em pacientes com SNO e LRA é fundamental, visto que a NTA pode mimetizar quadro de glomerulonefrite rapidamente progressiva. Dados clínicos e laboratoriais podem ser úteis no diagnóstico diferencial da LRA na SNO, entretanto a distinção entre NTA e glomerulonefrite proliferativa ou crescêntica é feita pela biópsia renal, procedimento invasivo e que não está disponível amplamente. Novos biomarcadores para diagnóstico precoce e preditores diagnósticos na LRA têm sido identificados. **OBJETIVOS:** Neste trabalho nós avaliamos o uso de testes baseados nas concentrações urinárias de kidney injury molecule-1 (KIM-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin NGAL, interleukin-18 (IL-18) e β 2-microglobulin (β 2M) para diagnóstico diferencial de NTA em pacientes com SNO e examinamos a associação das concentrações urinárias destes marcadores com lesão histológica consistente com NTA ou lesões glomerulares proliferativas. Adicionalmente, estudamos as diferenças na expressão de proteínas na urina de pacientes com SNO, com e sem NTA estabelecida histologicamente, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que poderia ser útil na identificação de novos marcadores para NTA. **MATERIAL E MÉTODO:** Foram coletadas amostras de urina de 40 pacientes submetidos à biópsia renal para fins de diagnósticos e encaminhadas para o CPQGM-FIOCRUZ. Os pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com a presença ou ausência de NTA histologicamente definida; e presença de glomerulonefrite proliferativa: grupo CON sem necrose tubular ou lesão proliferativa glomerular (n=17), grupo GNTA com necrose tubular e sem proliferação glomerular (n=14), e grupo GNP com lesão proliferativa glomerular incluindo crescentes independente da presença de NTA (n=9). LRA foi definida utilizando os critérios KDIGO. Foi coletada amostra de urina previamente à realização da biópsia renal, centrifugada a 2000 xg a 4°C e o sobrenadante armazenado a -80°C em alíquotas de 1 ml. As mensurações das concentrações dos biomarcadores foram realizadas utilizando imunoensaio enzimático (ELISA). A extração de proteína urinária foi realizada pelo método de precipitação da acetona. As concentrações proteicas das amostras foram dosadas pelo método do ácido bicitrônico (Micro BCA) e Bradford. As amostras de proteína (50 μ g)

foram analisadas em SDS-PAGE a 15% na presença de dodecil sulfato de sódio. **RESULTADOS:** A média de idade foi de 35 ± 16 anos, 22 (55%) eram mulheres, os principais diagnósticos histológicos foram glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) (10, 25%), glomerulonefrite membranosa (GNM) (10, 25%), Lesão Mínima (LM) (7, 18%), nefrite lúpica (NL) (6, 15%) e glomerulonefrite proliferativa (3, 8%). Os pacientes com NTA tiveram maiores concentrações urinárias de KIM-1 ($P = 0,016$), NGAL ($P = 0,023$) e $\beta 2M$ ($P = 0,017$) em comparação aos pacientes sem NTA. As concentrações urinárias de KIM-1 ($P = 0,009$) e NGAL ($P = 0,002$) também foram maiores nos pacientes com LRA comparado aos paciente sem LRA. As dosagens de NGAL ($P = 0,034$) e KIM-1 ($P = 0,024$) urinários foram significamente maiores nos pacientes com NTA sem lesão glomerular proliferativa em comparação aos pacientes com glomerulonefrites proliferativas. Na análise das proteínas em SDS-PAGE, observamos a expressão de banda proteica com peso molecular 35 KDa apenas nos pools de pacientes do grupo CON e desaparecimento de fração protéica correspondente a 28 KDa nos pools de pacientes do grupo GNP. **CONCLUSÕES:** As concentrações urinárias de KIM-1 e NGAL foram capazes de distinguir pacientes com e sem LRA, mesmo na presença de síndrome nefrótica; e as dosagens de NGAL e KIM-1 urinárias podem ser úteis no diagnóstico diferencial entre NTA e glomerulonefrite proliferativa em pacientes com síndrome nefrótica. A presença de lesão proliferativa glomerular ou necrose tubular aguda resulta no desaparecimento de uma fração protéica de 35 kDa, e a lesão proliferativa, no desaparecimento de fração protéica de 28 kDa da urina de pacientes com SNO. O estudo dessas frações protéicas pode contribuir para novas estratégias no diagnóstico diferencial da NTA em pacientes com SNO.

Palavras chave: Necrose tubular aguda, Síndrome nefrótica, Lesão renal aguda

TAVARES, Maria Brandão. Acute tubular necrosis biomarkers in patients with glomerular disease. 100 f. il. Tese (Pathology PhD) –Federal University of Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Acute kidney injury (AKI) is a common complication in patients with nephrotic syndrome (NS), and it is reported in 34% of adults with idiopathic nephrotic syndrome. Emergence of AKI in the course of nephrotic syndrome requires a prompt differential diagnosis between acute tubular necrosis (ATN) and proliferative glomerular lesions leading to rapidly progressive glomerulonephritis. Although clinical and conventional laboratory clues can be decisive in many cases, sometimes such distinctions rely on renal biopsy, which is an invasive procedure and is not available in many centers. Several new biomarkers have emerged, increasing the perspective on early diagnosis and the prognostic prediction of AKI. **OBJECTIVES:** In this work, we studied the use of tests based on the urinary concentrations of kidney injury molecule-1 (KIM-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin NGAL, interleukin-18 (IL-18) and β 2-microglobulin (β 2M) for the diagnosis of ATN in patients with NS and examined the association of urinary concentration of these biomarkers with histological lesions consistent with ATN or proliferative glomerular lesions. Furthermore, we analyzed differences in urinary protein expression of patients with NS, with and without histological evidence of ATN, using sodium dodecil sulfate -polycarylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) that could be useful for the development of new biomarkers for ATN. **METHODOLOGY:** Urinary samples from 40 patients with nephrotic syndrome subjected to renal biopsy between 2012 January and 2013 December and analyzed at CPQGM-FIOCRUZ were collected. Patients were divided in 3 groups: group CON, patients without proliferative glomerulopathy or ATN (n=17); group GNTA, patients with ATN but without proliferative glomerulopathy (n=14); and group GNP, with proliferative glomerular lesion (n=9). AKI was defined using the KDIGO criteria. Urine sample was obtained before renal biopsy procedure, centrifuged at 2000 xg, 4°C; and the supernatant stored at -80°C. The urinary concentrations of the biomarkers were estimated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Urinary protein extraction was performed by acetone precipitation method. Protein concentration was measured using bicichronic acid (Micro BCA) and Bradford. The urinary protein samples (50 μ g) were analyzed in 15% SDS-PAGE. **RESULTS:** The mean age of the 40 patients was 35 \pm 16 years. The main histological diagnosis of Focal and Segmental Glomerulosclerosis (10, 25%), Membranous Glomerulopathy (10, 25%), Minimal Change Disease (7, 18%), Lupus Nephritis (6, 15%) and Proliferative Glomerulonephritis (3, 8%). The patients with ATN had higher levels of urinary KIM-1 (P = 0.016), NGAL (P =

0.023) and β 2M (P = 0.017) than patients without ATN. The urinary concentrations of KIM-1 (P= 0.009) and NGAL (P= 0.002) were higher in patients with AKI than in patients without AKI. Urinary NGAL (P=0.034) and KIM-1 (P=0.024) levels were significantly higher in patients with ATN without proliferative glomerulonephritis than in patients with proliferative glomerulonephritis. Regarding protein analyzes with SDS-PAGE, expression of a protein fraction with 35 KDa molecular weight in pool samples of patients from CON group was observed that was not present in other groups. A protein fraction with 28 KDa molecular weight that was observed in CON and GNTA groups samples was lacking in pool samples from patients of GNP group.

CONCLUSIONS: Urinary NGAL and KIM-1 estimates were able to discriminate patients with AKI even in conditions of NS. Furthermore, urinary levels of NGAL and KIM-1 may be useful in the differential diagnosis of ATN and exudative glomerulonephritis in patients with nephrotic syndrome. The presence of proliferative glomerular lesion or ATN was associated with lack of protein fraction of 35 KDa, and proliferative glomerular lesion with lack of protein fraction of 28 kDa in NS patients urine. The identification of proteins present in these SDS-PAGE fractions, can be useful for developing new strategies for AKI diagnosis in NS patients.

Key words: Acute tubular injury, Nephrotic syndrome, Acute kidney injury.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Características dos estudos sobre marcadores para necrose tubular aguda em pacientes com doenças glomerulares. _____36
- Tabela 2 Comparação dos dados demográficos e clínicos dos pacientes com síndrome nefrótica com e sem necrose tubular aguda e com lesão glomerular proliferativa. _____56
- Tabela 3 Comparação dos dados da análise do sedimento urinário dos pacientes com síndrome nefrótica com e sem necrose tubular aguda, com lesão glomerular proliferativa, e com ou sem lesão renal aguda. _____59
- Tabela 4. Biomarcadores para necrose tubular aguda (NTA) em pacientes com síndrome nefrótica: associação com necrose tubular aguda (NTA), glomerulonefrite proliferativa (GNP). _____64
- Tabela 5. Biomarcadores para necrose tubular aguda (NTA) em pacientes com síndrome nefrótica: associação com lesão renal aguda (LRA) definida pelos critérios KDIGO. _____65

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Correlação dos marcadores biológicos para lesão renal aguda com intensidade de necrose tubular aguda estimada em percentual da cortical renal com evidência de necrose tubular na biópsia renal. _____62
- FIGURA 2 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% de urina de 4 pacientes com síndrome nefrótica antes (Albumina +) e após (Albumina -) depleção de albumina. Densitograma representativo das bandas correspondentes aos pacientes GNP1 (a,b), GNP2 (c,d), GNTA1 (e,f) e GNTA2 (g,h); a,c,e,f anterior à depleção de albumina; b,d,f e h após depleção de albumina. _____67
- FIGURA 3 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% de urina de pacientes com síndrome nefrótica. GNTA: pacientes com necrose tubular sem lesão proliferativa glomerular; GNP: pacientes com lesão proliferativa glomerular; GCON: pacientes sem lesão proliferativa glomerular ou necrose tubular aguda. _____68
- FIGURA 4 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% de urina de pools (P1 a P6) de pacientes com síndrome nefrótica.. Densitograma representativo das bandas correspondentes ao P1 (a), P2 (b), P3 (c), P4 (d), P5 (e) e P6 (f). P1 e P2 pacientes GCON: pacientes sem lesão proliferativa glomerular ou necrose tubular aguda; P3 e P4 pacientes GNTA: pacientes com necrose tubular sem lesão proliferativa glomerular; P5 e P6 pacientes GNP: pacientes com lesão proliferativa glomerular. _____70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|---------------------------------------|
| DRC | Doença Renal Crônica |
| EFDR | Estágio Final de Doença Renal |
| GESF | Glomeruloesclerose Segmentar e Focal |
| GNM | Glomerulonefrite Membranosa |
| GNPD | Glomerulonefrite Proliferativa Difusa |
| LM | Lesão Mínima |
| LRA | Lesão Renal Aguda |
| NL | Nefrite Lúpica |
| NTA | Necrose Tubular Aguda |
| SNO | Síndrome Nefrótica |
| TFG | Taxa de Filtração Glomerular |
| TRS | Terapia Renal Substitutiva |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | DOENÇAS GLOMERULARES E TUBULOINTERSTICIAIS | 16 |
| 1.2 | LESÃO TUBULOINTERSTICIAL NAS DOENÇAS GLOMERULARES | 19 |
| 1.3 | MARCADORES BIOLÓGICOS PARA LESÃO RENAL AGUDA | 24 |
| 1.4 | MARCADORES DE LESÃO TUBULAR NAS DOENÇAS GLOMERULARES | 32 |
| 1.5 | ESTUDO DO PROTEOMA URINÁRIO | 40 |
| 2 | JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE | 44 |
| 3 | OBJETIVOS | 46 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 46 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 46 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 47 |
| 4.1 | PACIENTES | 47 |
| 4.2 | VARIÁVEIS ANALISADAS | 46 |
| 4.3 | ESPÉCIMES TECIDUAIS E ANÁLISE HISTOLÓGICA | 48 |
| 4.4 | BIOQUÍMICA E ANÁLISE URINÁRIA | 49 |
| 4.4.1 | Bioquímica convencional e análise do sedimento | 47 |
| 4.4.2 | Dosagem de marcadores biológicos | 49 |
| 4.4.3 | Precipitação de proteínas e depleção de albumina e imunoglobulinas | 52 |
| 4.4.4 | Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) | 52 |
| 4.5 | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 53 |
| 4.6 | EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS | 53 |
| 5 | RESULTADOS | 53 |
| 5.1 | PACIENTES | 53 |
| 5.2 | BIOQUÍMICA E ANÁLISE URINÁRIA | 57 |
| 5.2.1 | Bioquímicas convencional e análise sedimento urinário | 59 |
| 5.2.2 | Dosagens dos marcadores biológicos | 62 |
| 5.2.3 | Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) | 65 |

| | | |
|----------|--------------------|-----------|
| 6 | DISCUSSÃO | 72 |
| 7 | CONCLUSÃO | 89 |
| | REFERÊNCIAS | 90 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS GLOMERULARES E TUBULOINTERSTICIAIS

Os rins são órgãos duplos situados no espaço retroperitoneal e tem como unidade funcional o néfron, que é composto pelo corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman), túbulos proximais, alças finas, túbulos distais e túbulos coletores. Essa estrutura complexa é responsável pela filtração do sangue e formação da urina. O processo inicial de formação da urina ocorre com a filtração do plasma nos glomérulos, estrutura formada por uma rede de capilares revestida por um fino endotélio fenestrado, uma região central composta por células mesangiais que é cercada pela matriz mesangial.

A barreira de filtração entre o sangue e o espaço urinário é formada pelo endotélio glomerular, a membrana basal glomerular e os poros presentes entre os processos podais das células epiteliais viscerais glomerulares (podócitos). A filtração do plasma nos glomérulos gera cerca de 170 litros de ultrafiltrado plasmático por dia. Em condições normais, a barreira de filtração glomerular é impermeável a proteínas, porém eletrólitos, aminoácidos, glicose e moléculas com peso molecular de até 5.000 KDa são livremente filtrados. O ultrafiltrado gerado pelos glomérulos irá deixar o espaço urinário do corpúsculo renal percorrendo os túbulos renais, iniciando pelos túbulos proximais, onde há reabsorção de grande parte da água e eletrólitos filtrados, geração de bicarbonato, excreção e secreção de produtos derivados do metabolismo protéico com a formação final da urina.

Os rins são órgãos fundamentais na manutenção da homeostase hidroeletrólítica, equilíbrio acidobásico, importante via de depuração de drogas e produtos derivados do metabolismo das proteínas. Além disso, desempenha papel fundamental no controle da pressão arterial, metabolismo ósseo pela regulação da excreção de cálcio, e eritropoiese pela produção da eritropoietina que é o hormônio estimulador da diferenciação e proliferação de

precursores dos eritrócitos na medula óssea. As doenças que acometem os rins podem ter manifestações clínicas diversas a depender do segmento do néfron acometido e da gravidade da lesão. A lesão renal pode ocorrer nos glomérulos, compartimentos tubulointersticial ou vascular, sendo que pode haver acometimento simultâneo desses segmentos, e a persistência da lesão a qualquer um desses segmentos pode levar a perda definitiva de todo o néfron, mecanismo final de progressão da doença renal (BRENNER; RECTOR, 2004).

As glomerulopatias são a terceira causa de doença renal crônica (DRC) no Brasil em pacientes que se encontram em programa de terapia substitutiva renal (TRS), excluindo-se os casos notificados como insuficiência renal com apresentação suficientemente grave para requererem internamento hospitalar demonstrando que as doenças glomerulares são uma questão importante para saúde pública. (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>). Ademais, estima-se que a prevalência de pacientes em Estágio Final de Doença Renal (EFDR) terá aumento de 60% até o ano de 2020, tendo grande impacto econômico na saúde pública.

As manifestações clínicas das glomerulopatias são diversas e geralmente categorizadas em hematuria isolada e/ou proteinúria isolada, síndrome nefrítica, quando há hipertensão, insuficiência renal e hematuria, e síndrome nefrótica (SNO). A SNO é caracterizada pela perda de grande quantidade de proteína na urina (proteinúria em 24 horas > 3,5g), edema, hipoalbuminemia e dislipidemia. Esta é a principal manifestação em pacientes com glomerulopatias diagnosticadas em biópsias no Brasil (POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010). As manifestações clínicas das glomerulopatias geralmente refletem as alterações patológicas renais. Os principais achados histológicos nas doenças glomerulares são hiper celularidade ou proliferação de células endoteliais, mesangiais e epiteliais, infiltrado de leucócitos, depósitos imunes, alterações na membrana basal glomerular, cicatrizes ou fibrose. As glomerulonefrites proliferativas e crescênticas (quando há proliferação de células epiteliais parietais no espaço de Bowman geralmente

se apresentam com quadro de síndrome nefrítica, entretanto as glomerulopatias podem apresentar características de mais de uma síndrome clínica dificultando o diagnóstico não invasivo, sendo a biópsia renal fundamental para diagnóstico (JENNETE et al., 2006).

As principais glomerulopatias que cursam com a SNO são aquelas associadas a alterações na membrana basal glomerular e do epitélio parietal (podócitos), como a lesão mínima (LM), glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) e glomerulonefrite membranosa (GNM), sendo que a GESF e GNM podem ser primárias ou secundárias (KODNER, 2016). Apesar da manifestação clínica semelhante, têm evolução e resposta terapêutica diversa, sendo que pacientes com LM apresentam boa resposta à terapia com corticóides enquanto os pacientes com GESF têm índice de remissão menor e com maior risco de progressão para DRC (DU BUF-VEREIJKEN; BRANTEN; WETZELS, 2005; MOURA; FRANCO; KIRSZTAJN, 2015; RYDEL et al., 1995; WALDMAN et al., 2007). Além de ser uma importante causa de EFDR em pacientes que se encontram em TRS, a SNO está associada a diversas complicações relacionadas a doença e tratamento que aumentam morbimortalidade sendo responsáveis por até 60% das internações nesses pacientes (GIPSON et al., 2013). Pacientes com SNO apresentam risco elevado de trombose venosa profunda (TVP) em relação a pacientes hospitalizados sem SNO. A frequência da TVP em paciente com SNO foi estimada em 1,5%, sendo mais comum em adultos e na GNM; o tratamento é realizado com anticoagulação plena acarretando risco de sangramentos (KAYALI et al., 2008). Infecções bacterianas como celulite, peritonite bacteriana espontânea, sepse e pneumonia são comuns em pacientes com SNO, sendo relatada como principal complicação em crianças hospitalizadas com SNO (RHEAULT et al., 2014).

Alguns fatores prognósticos clínicos e histológicos são comuns às glomerulopatias, como esclerose glomerular, fibrose intersticial, insuficiência renal no momento do diagnóstico e proteinúria não seletiva persistente (MORITA et al., 2000; PEI; CATTRAN; GREENWOOD, 1992)(WALSH et al., 2010). A presença dessas alterações histológicas além de ser marcador

prognóstico importante pode influenciar na decisão terapêutica, visto que em pacientes com lesões agudas proliferativas há benefício com o uso de terapia citotóxica enquanto a presença de lesões crônicas e fibrose já são indicativos de resposta terapêutica ruim podendo os riscos de complicações da imunossupressão suplantarem os benefícios.

1.2 LESÃO TUBULOINTERSTICIAL NAS DOENÇAS GLOMERULARES

Enquanto nas glomerulopatias as doenças primárias predominam, as doenças que envolvem o compartimento tubulointersticial frequentemente estão associadas a doenças sistêmicas ou toxicidade por agentes externos. As principais alterações tubulares são a lesão aguda ao epitélio tubular com alterações vacuolares hidrópicas, gordurosas, ou NTA; alterações do componente luminal dos túbulos com presença de cilindros, inflamação, alterações na membrana basal tubular ou atrofia tubular. As alterações tubulares comumente são acompanhadas de alterações intersticiais com infiltrado de células inflamatórias, edema, expansão da matriz ou fibrose (JENNETE et al., 2006). As manifestações clínicas geralmente são inespecíficas, sendo encontrado alterações no sumário de urina como proteinúria, hematúria microscópica, leucocitúria, podendo estar associadas à doença renal aguda ou crônica (CLARKSON et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2008).

As lesões tubulointersticiais são comuns em pacientes com doenças glomerulares. A fibrose tubulointersticial além de indicar pior prognóstico e maior risco de progressão para DRC correlaciona-se com a função renal no momento da biópsia. Risdon e colaboradores (1968), correlacionaram achados histológicos em 50 biópsias renais de pacientes com glomerulonefrites, e houve correlação significativa da lesão tubulointersticial com o clearance de creatinina e creatinina sérica, sendo que houve correlação entre esses marcadores com lesão glomerular mas de menor grau (RISDON; SLOPER; DE WARDENER, 1968). Portanto, os mecanismos de lesão tubular nas

glomerulopatias têm sido amplamente estudados. Alguns elementos presentes na urina de pacientes com proteinúria têm sido implicados na lesão à célula tubular renal, atrofia e apoptose, entre eles albumina, transferrina, fatores de crescimento, ácidos graxos ligados à albumina e fatores do complemento (EDDY, 2004). A exposição de células tubulares proximais à grande quantidade de proteína induz a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (nuclear fator κ B) e STAT (signal transducer and activator of transcription) que irão estimular a produção de citocinas e quimiocinas levando ao recrutamento de macrófagos, linfócitos, inflamação e fibrose (HAASE et al., 2009; ZOJA et al., 1998). Ademais, a exposição a proteínas derivadas da urina de pacientes com SNO levou à produção de estresse oxidativo e consequente disfunção endotelial em células de túbulo proximal renal, mecanismo que pode estar associado à apoptose destas células. Morita e colaboradores demonstraram maior excreção de produtos da ativação do complemento na urina de pacientes com SNO, e que a excreção desses produtos correlacionava com a taxa de excreção de proteína na urina (MORITA et al., 2000). Adicionalmente, a ativação da via alternativa do complemento pode ocorrer por proteínas ligadas às células tubulares renais com a amplificação da ativação do C3, levando também à inflamação e fibrose intersticial (TANG et al., 2001; TANG et al., 1999). Portanto, independente do diagnóstico histológico da doença glomerular, a proteinúria nefrótica acarreta dano tubulointersticial que é um importante mecanismo final de progressão da DRC para estágio final.

A associação da lesão tubulointersticial crônica com pior prognóstico e insuficiência renal está bem estabelecida nas glomerulopatias. Entretanto, poucos estudos avaliaram o impacto da lesão aguda ao epitélio tubular renal no curso e apresentação clínica das glomerulopatias. A NTA é a principal causa de LRA juntamente com a LRA pré-renal que ocorre quando há redução da perfusão renal e não há dano estrutural. A LRA é definida como perda rápida e abrupta da função renal podendo ser leve e assintomática ou, a depender da gravidade da lesão, haver incapacidade dos rins em manter a homeostase do organismo levando a acúmulo de toxinas derivadas do

metabolismo protéico, acidose metabólica, hipercalemia implicando risco de vida sendo necessário a instituição da TRS (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012). A incidência de LRA tem aumentado nos últimos anos (BROWN et al., 2016). Nos EUA, houve aumento em mais de 100% dos casos de LRA com necessidade de TRS entre os anos de 2000 e 2009, com maior incidência em idosos (HSU et al., 2013). Adicionalmente, esta é uma condição que está associada a aumento da mortalidade, custo e tempo de internamento em pacientes hospitalizados. O diagnóstico de LRA está associado a maior mortalidade mesmo quando há pequeno aumento na creatinina sérica de 0,3-0,5 mg/dl mesmo após ajustar para variáveis como idade, sexo e diagnóstico de outras doenças associadas (CHERTOW et al., 2005). A mortalidade aumenta quanto maior a gravidade da lesão renal e, em pacientes críticos que necessitam TRS, atinge > 60% dos casos (BAGSHAW et al., 2009) (“Intensity of Renal Support in Critically Ill Patients with Acute Kidney Injury”, 2008). A LRA é uma complicação comum em pacientes com SNO, acometendo até 30% dos adultos com SNO idiopática (CHEN et al., 2011; WALDMAN et al., 2007) e estando presente em 59% das crianças com SNO hospitalizadas como demonstrado em estudo que envolveu 17 hospitais pediátricos nos EUA (RHEAULT et al., 2014). A associação de LRA com SNO é conhecida há décadas (CHAMBERLAIN; PRINGLE; WRONG, 1966), sendo que em alguns casos pode haver necessidade de TRS e ser irreversível (RAIJ et al., 1976). Em estudo recente, cerca de 30% dos pacientes com SNO desenvolveram LRA (CHEN et al., 2011); mesmo naqueles pacientes com lesões renais discretas que não justificariam por si só a insuficiência renal a LRA foi encontrada em 18% dos casos (WALDMAN et al., 2007). Em pacientes com SNO, a LRA pode ocorrer no contexto de infecções, por toxicidade de drogas utilizadas no tratamento das glomerulonefrites, depleção volêmica ou idiopática.

Etiologicamente a LRA pode ser definida como; (1) Pré-renal: quando não há lesão estrutural renal e a queda de taxa de filtração glomerular (TFG) é decorrente de fatores anteriores ao rim como depleção volêmica por desidratação e hemorragia, diminuição do débito cardíaco ou vasodilatação sistêmica; (2) intrínseca renal: quando há lesão aos compartimentos renais

como vasos, glomérulos e túbulos; (3) pós-renal: quando a causa da LRA é decorrente de obstrução do trato urinário posteriormente ao rim, tendo como exemplo a litíase renal e hiperplasia prostática benigna. A LRA pré-renal e a intrínseca renal decorrente da NTA por lesão isquêmica ou tóxica são responsáveis pela maioria dos casos de LRA em pacientes hospitalizados (THADHANI; PASCUAL; BONVENTRE, 1996).

O diagnóstico diferencial etiológico da LRA inicialmente está baseado em dados da anamnese, exame físico, exames laboratoriais e de imagem, no intuito de identificar condições que necessitam intervenção imediata. A LRA pré-renal é uma das principais causas de LRA juntamente com a NTA, e a história e o exame físico são úteis na detecção de sinais de depleção volêmica ou insuficiência cardíaca congestiva. A fração de excreção de sódio na urina é avaliada pelas dosagens de sódio e creatinina no soro e urina. Na LRA pré-renal há um aumento na reabsorção de sódio pelos túbulos proximais portanto uma redução na excreção urinária deste eletrólito. Quando a fração de excreção de sódio urinária é inferior a 1%, é sugestivo de LRA pré-renal, sendo que na NTA há um aumento na excreção urinária de sódio (PÉPIN et al., 2007). A ultrassonografia é um exame não invasivo e de baixo custo que afasta obstruções do trato urinário e LRA pós-renal.

Testes sorológicos e o sumário de urina poderão indicar causas de LRA intrínseca renal como vasculites, glomerulonefrites e nefrite intersticial aguda. A análise do sedimento urinário é considerada uma importante ferramenta na investigação diagnóstica das doenças renais por conter elementos que poderão dar informações sobre a localização da lesão no nefron. Dentre os elementos analisados estão células e cilindros (ex.: cilindros hemáticos, leucocitários, granulados). A presença de hemácias no sedimento urinário pode ser decorrente de lesões glomerulares, do trato urológico ou de origem externa ao sistema urinário. O achado de dismorfismo eritrocitário – hemácias com alterações irregulares nas membranas – indica que a hematúria tem origem glomerular e é um exame de grande valia no diagnóstico diferencial das hematúrias microscópicas (FAIRLEY; BIRCH, 1982; SCHRAMEK et al., 1989).

As células epiteliais presentes no sumário de urina podem ser provenientes do epitélio da uretra e trato genital (células escamosas), do trato urinário desde cálices renais à bexiga (células uroteliais) ou dos túbulos renais (células do epitélio tubular renal - CETR), devendo ser diferenciadas por apresentarem significados diagnósticos distintos (FOGAZZI; VERDESCA; GARIGALI, 2008). O achado de CETR e cilindros granuloso e de células epiteliais, que são estruturas formadas por uma matriz de proteína (uromodulina ou proteína de Tamm Horsfall) e CETRs degeneradas ou agregadas, está associado com lesão aos túbulos renais, sendo preditor de NTA em alguns estudos. Perazella e colaboradores desenvolveram escore baseado no número de CETR e cilindros granuloso em análise do sedimento urinário, e este apresentou sensibilidade de 76% e especificidade de 83% no diagnóstico diferencial de NTA e LRA pré-renal (PERAZELLA et al., 2008).

Quando não é possível determinar a etiologia da LRA ou há indícios de doenças glomerulares, vasculares ou tubulares que não a NTA, a biópsia renal é fundamental na elucidação diagnóstica. Porém, a biópsia renal é um procedimento invasivo, de alto custo, demanda tempo entre sua realização e análise além de não estar amplamente disponível na rede pública de saúde. A LRA quando ocorre no contexto da SNO representa um importante desafio em termos de diagnóstico diferencial (RODAMILANS et al., 2010), visto que lesão a diferentes compartimentos renais podem ocorrer concomitantemente e o uso de medicações para tratamento e controle sintomatológico da SNO, como diuréticos de alça, dificultam a interpretação dos exames laboratoriais citados previamente. A possibilidade de lesão proliferativa glomerular com trombose e obstrução do capilar glomerular e a formação de crescentes preenchendo o espaço urinário do glomérulo é sempre presente. Em uma coorte envolvendo 2281 biópsias renais em pacientes com LRA, a glomerulonefrite crescêntica e nefrite intersticial aguda foram os diagnósticos etiológicos mais comuns (LÓPEZ-GÓMEZ; RIVERA, 2008). De forma semelhante, em idosos submetidos à biópsia renal, glomerulonefrite crescêntica foi o achado mais comum quando o motivo da biópsia foi LRA; e a suspeita diagnóstica pré biópsia divergiu do diagnóstico final em 15% dos casos (BAGCHI et al., 2016; UEZONO et al.,

2006). As glomerulonefrites crescênticas necessitam de imunossupressão imediata sob pena de perda irreversível da função renal e evolução para EFDR. Por outro lado, o tratamento imunossupressor acarreta riscos em termos de susceptibilidade a infecções e toxicidade.

A NTA é uma lesão frequente também em pacientes com SNO. Em estudo prévio envolvendo 149 pacientes com doenças glomerulares, focos de NTA foram encontrados em 77% das biópsias renais, sendo que em 18% dos casos a NTA foi considerada severa a extensa. A intensidade de NTA correlacionou com a frequência de insuficiência renal neste estudo (TAVARES et al., 2012). O tratamento da NTA é de suporte, visto que pode haver regeneração do epitélio tubular e restauração da função renal, diferentemente das glomerulonefrites proliferativas e crescênticas. Assim, novas estratégias não invasivas para o diagnóstico diferencial entre NTA e lesão proliferativa glomerular são importantes nos pacientes com SNO, porque a abordagem terapêutica é diversa nas duas condições, e atualmente a biópsia renal é a única ferramenta disponível para diagnosticar acuradamente estas condições.

1.3 MARCADORES BIOLÓGICOS PARA LESÃO RENAL AGUDA

O diagnóstico da LRA é baseado na elevação da creatinina sérica e redução do volume urinário. Segundo as diretrizes publicadas pelo Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group, LRA é definida como aumento absoluto na creatinina sérica em 0,3 mg/dl em até 48 horas ou aumento relativo 1,5 vezes em relação ao valor basal do paciente ocorrido num período inferior a 7 dias (“Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury.”, 2012).

Entretanto, o uso da creatinina sérica como marcador diagnóstico na LRA tem diversas limitações. A creatinina é uma substância derivada do metabolismo da creatina muscular, é livremente filtrada pelos glomérulos e totalmente excretada pelos rins em condições normais. Além da filtração

glomerular, os túbulos renais secretam creatinina sendo responsáveis por cerca de 10-20% da excreção renal dessa substância. Portanto, a depuração da creatinina sérica é dependente da TFG e elevação sérica de creatinina é utilizada como indicativo de insuficiência renal há décadas (ENDRE; PICKERING; WALKER, 2011). Fatores que interferem na geração e volume de distribuição da creatinina podem limitar a acurácia da creatinina sérica no diagnóstico de insuficiência renal. Por ser derivada do metabolismo muscular, pessoas com menor massa muscular, como crianças, idosos e mulheres, terão uma taxa de geração de creatinina menor. Por outro lado, em condições onde há redução da diurese e aumento no volume extracelular corporal, volume de distribuição da creatinina será maior, acarretando diluição da creatinina. Nestas condições, poderá ocorrer redução significativa da função renal sem que haja elevação nos níveis séricos de creatinina (PICKERING; RALIB; ENDRE, 2013). A creatinina é um marcador tardio necessitando queda de mais de 30% na TFG para que a LRA seja detectada por um aumento absoluto de 0,3 mg/dl na creatinina sérica. Por ser um marcador indireto da TFG, a creatinina sérica é um marcador de função renal, não detectando casos em que há lesão renal sem que ainda tenha perda na função, e também não podendo definir etiologia ou localizar a lesão nos diversos compartimentos renais (WAIKAR; BONVENTRE, 2009; ENDRE; PICKERING; WALKER, 2011).

Diante das limitações citadas acima, os últimos anos foram marcados pela busca de novos marcadores para LRA. Idealmente, um marcador para LRA deveria ter alta sensibilidade para detectar lesão, mesmo na ausência de perda de função, especificidade para diagnóstico etiológico do sítio da lesão renal, ter correlação entre os níveis do marcador e intensidade da lesão, sofrer pouca variação entre populações diferentes e prover informações sobre prognóstico. A urina tem sido alvo de muitos estudos por permitir coleta não invasiva, de forma simples e disponível em grandes volumes para estudos seriados. A presença de uma proteína na urina pode ocorrer por aumento na filtração desta proteína pelos glomérulos, diminuição na reabsorção tubular, excreção de proteínas tubulares constitutivamente presentes ou produzidas pelas células tubulares renais em condições de lesão.

As CETR renais são responsáveis pela reabsorção de mais de 95% das proteínas filtradas pelos glomérulos. A reabsorção dessas proteínas é mediada pela megalina, receptor de endocitose presente na borda em escova das CETR (CHRISTENSEN; BIRN, 2001). A lesão histológica mais frequente na LRA isquêmica ou tóxica é a perda da borda em escova, então, a presença de proteínas de baixo peso molecular na urina (proteinúria tubular) seria um indicativo de lesão das CETR (SOLEZ; MOREL-MAROGER; SRAER, 1979).

A β 2-microglobulina (β 2M) é uma proteína de membrana que forma a porção não variante da cadeia leve do complexo de histocompatibilidade principal e está presente em todas células nucleadas. Por ser uma proteína de baixo peso molecular (11,4 KDa) ela é livremente filtrada pelos glomérulos e quase totalmente reabsorvida pelas CETR, sendo que apenas pequenas quantidades dessa proteína estão presentes na urina em condições normais. Diertele e colaboradores (2010) avaliaram lesão glomerular e tubular induzida por drogas em camundongos e sugeriram que as concentrações urinárias de β 2M correlacionam com escore de lesão glomerular, com consequente inibição da reabsorção dessa proteína pelos túbulos proximais (DIETERLE et al., 2010). A elevação da β 2M urinária foi associada com lesão tubular causada por vírus, isquemia e toxicidade por drogas. Zeng e colaboradores (2014) demonstraram que as concentrações urinárias de β 2M correlacionam com lesão histológica tubular evidenciada por expressão de Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) em pacientes com doenças glomerulares e tubulointersticiais (ZENG et al., 2014). Porém, a β 2M é também um marcador de disfunção tubular não refletindo necessariamente lesão persistente ou irreversível.

A resposta inflamatória após isquemia/reperfusão está associada com amplificação da lesão podendo ser um mediador de lesão tubular na NTA. Na NTA, há acúmulo de neutrófilos nos vasa reta, aumento na expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias (JENNETE et al., 2006). A interleucina-18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e que é convertida em sua forma ativa pela caspase-1, e é um importante mediador da resposta inflamatória na NTA.

Camundongos deficientes para caspase-1 não expressam a forma ativa da IL-18 estando associada a menor intensidade de lesão renal em modelo de NTA por isquemia. Melnikov e colaboradores mostraram a expressão de IL-18 em células de túbulo proximal renal com características de NTA (MELNIKOV et al., 2001). Em modelos experimentais de NTA, foi evidenciado produção do precursor da IL-18 pelas CETR, e a inibição de produção de caspase-1 e IL-18 teve efeito protetor contra NTA em modelo experimental de LRA, sugerindo que a IL-18 é um dos mediadores da lesão isquêmica na LRA e sua presença na urina poderia ser um marcador diagnóstico da NTA (MELNIKOV; FAUBEL, 2002). Em estudo envolvendo pacientes críticos com Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto, Parikh e colaboradores demonstraram que as concentrações urinárias de IL-18 estiveram associadas ao desenvolvimento de LRA 24 horas antes da LRA ser diagnosticada pela elevação da creatinina sérica (PARIKH et al., 2004). Desde então, estudos avaliaram o papel da IL-18 na urina em prever desenvolvimento de LRA em diversos cenários clínicos como pós-operatório de cirurgia cardíaca, sepse, queimados, pacientes críticos (PARIKH, 2005; PARIKH et al., 2006; REN et al., 2015; WASHBURN et al., 2008). Apesar desses estudos demonstrarem que as concentrações urinárias de IL-18 são um marcador que está elevado precocemente nos pacientes com LRA, o desempenho irregular ainda não justifica o uso na prática clínica (HAASE et al., 2008; LIN et al., 2014). Há aumento na produção de IL-18 em doenças inflamatórias sistêmicas, sepse e quando há lesão isquêmica em outros órgãos como coração e cérebro, essas condições são frequentes nos pacientes envolvidos nos estudos citados e a influência desses fatores no desempenho da IL-18 urinária para diagnóstico de LRA ainda não pode ser avaliado.

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) é uma proteína de 25 KDa da superfamília das lipocalinas, que foi inicialmente isolada e associada à gelatinase de neutrófilos (KJELDSEN et al., 1993). Posteriormente, foi demonstrado que havia aumento em > 10x na expressão do gene da NGAL em rins de camundongos em modelo de isquemia-reperfusão de LRA. Mishra e colaboradores (2003) avaliaram a expressão renal e presença de NGAL na urina de camundongos e ratos após isquemia. A expressão de

NGAL foi precocemente induzida em rins de camundongos e ratos após lesão isquêmica, e foi detectada precocemente na urina duas horas após a lesão, e antes que houvesse alteração na TFG e nos níveis de creatinina sérica. A NGAL é uma proteína capaz de sequestrar complexos ferro-sideróforos atuando como bacteriostático no sistema imune inato por diminuir o aporte de ferro para as bactérias. Em modelo experimental de LRA por isquemia, NGAL parece exercer efeito protetor e induz recuperação inibindo apoptose e estimulando proliferação de células tubulares proximais, e a administração de NGAL foi capaz de atenuar lesão isquêmica renal em modelo experimental (AN et al., 2013; GONG et al., 2012).

Mishra e colaboradores demonstraram que células do túbulo proximal renal de humanos têm expressão aumentada de NGAL quando cultivadas em condições de depleção de ATP e pôde ser identificada na cultura de sobrenadante dessas células (MISHRA, 2003). Em trabalho que avaliou a expressão de NGAL por imunofluorescência em biópsias de enxerto renal de doador cadáver (n=13) e doador vivo relacionado (n=12), não foi evidenciada expressão nos enxertos de doador vivo relacionado. Porém, a intensidade de fluorescência nos enxertos de doador cadáver correlacionou-se com o tempo de isquemia fria e o pico de creatinina sérica 2 a 4 dias após transplante (MISHRA et al., 2006). A indução e presença de NGAL precocemente após lesão isquêmica renal foram demonstradas em estudos envolvendo pacientes em pós-operatório de cirurgia cardíaca. As concentrações urinárias de NGAL (uNGAL) apresentam elevação precoce significativa duas horas após procedimento cirúrgico nos pacientes que desenvolveram LRA quando comparado aos pacientes que não desenvolveram (MISHRA et al., 2005). Haase e colaboradores (2009) realizaram metanálise envolvendo 19 estudos com total de 2538 pacientes em condições clínicas diversas (pós operatório cirurgia cardíaca, uso de contraste iodado, pacientes críticos). As concentrações de uNGAL apresentaram bom desempenho para diagnóstico precoce de LRA e como preditor de necessidade de TRS e mortalidade (HAASE et al., 2009).

A elevação nas concentrações séricas e urinárias de NGAL pode ocorrer em condições de inflamação sistêmica, sepse e neoplasias, visto que NGAL é produzida por neutrófilos e células epiteliais como pulmonares, sendo uma das proteínas presentes em grânulos de neutrófilos. Em pacientes com LRA associada ou não à sepse, as concentrações de uNGAL foram significativamente maiores nos pacientes com LRA e sepse (BAGSHAW et al., 2010). Uma meta-análise com 15 estudos que envolveram 1.478 pacientes, as concentrações de uNGAL foram preditores do desenvolvimento de LRA em pacientes com sepse (ZHANG et al., 2016).

Portanto, estudos que avaliaram as concentrações de uNGAL em diversas condições como pós-operatório de cirurgia cardíaca, pós transplante e pacientes críticos, demonstram que esta proteína é um preditor para desenvolvimento de LRA, elevando-se precocemente após lesão renal, precedendo elevação na creatinina sérica. Porém, poucos estudos avaliaram o desempenho das concentrações de uNGAL para diagnóstico de LRA já estabelecida. Para avaliar se uma dosagem isolada de uNGAL seria útil no diagnóstico de LRA em pacientes com diferentes tempos de lesão e com LRA já estabelecida, Nickolas e colaboradores estudaram 635 pacientes com LRA (n=30), doença renal crônica (n=106), insuficiência renal pré renal (n=88) e sem alteração da função renal (n=411), e demonstraram que as concentrações de uNGAL eram significativamente maiores nos pacientes com LRA (NICKOLAS et al., 2012b). Porém, a despeito dos estudos realizados até o momento sugerirem que uNGAL é preditor de LRA, diferentes definições de LRA foram utilizadas nesses trabalhos, os desempenhos dos ensaios disponíveis comercialmente não foram comparados e não houve uniformização dos pontos de corte nas concentrações urinárias utilizados, limitando sua utilização na prática clínica.

A NGAL se tornou um marcador promissor que está precocemente elevado em condições de lesão renal isquêmica e tóxica, mas não é um marcador específico de lesão tubular proximal renal, sítio mais comumente acometido na LRA isquêmica e tóxica.

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) é uma proteína transmembrana que contém domínios mucina e semelhante à imunoglobulina na sua porção extracelular. Ichimura e colaboradores identificaram a expressão de KIM-1 em rins de ratos que estavam em fase de regeneração do epitélio tubular após lesão de isquemia-reperfusão (ICHIMURA et al., 1998). A expressão de KIM-1 ocorria em células tubulares proximais em túbulos em regeneração, com simplificação do epitélio KIM-1 não havendo expressão em áreas com néfrons sem lesão. A expressão dessa molécula parece conferir às células tubulares proximais características fagocíticas, sendo importante na fagocitose de restos celulares e corpos apoptóticos presentes na luz tubular após lesão renal e na regeneração do epitélio tubular (ICHIMURA et al., 2008). Adicionalmente, em modelos experimentais de nefrotoxicidade por drogas, houve correlação entre os níveis de KIM-1 na urina com lesão histológica aguda do epitélio tubular proximal, sendo que KIM-1 urinário apresentou especificidade significativamente maior que a creatinina sérica e N-acetyl-beta-(d)-glucosaminidase (NAG) urinária, que é um enzima presente na borda escova de células do túbulo proximal e secretada na urina quando há lesão tubular renal (VAIDYA et al., 2010).

A expressão de KIM-1 em pacientes com NTA ocorre na membrana luminal de células epiteliais do túbulo proximal que também expressavam vimentina e aquaporina-1, evidenciando que a expressão de KIM-1 estava ocorrendo em células tubulares proximais com característica de dediferenciação. Entretanto, esta expressão foi observada em áreas de fibrose intersticial e inflamação (VAN TIMMEREN et al., 2007). Por não haver expressão de KIM-1 em rins normais, e em condições de lesão renal a expressão desta proteína ocorrer em células de túbulo proximal, KIM-1 se tornou um marcador potencialmente específico para NTA e que pode ser detectado na urina, tendo suas concentrações elevadas na LRA. A expressão dessa proteína foi demonstrada também em seis biópsias renais de pacientes com LRA por NTA, havendo expressão na membrana apical de células tubulares proximais e não foi identificada expressão em tecido renal normal de pacientes submetidos à nefrectomia por carcinoma renal. No estudo citado, foi possível detectar a presença de KIM-1 na urina dos pacientes com LRA e

necrose tubular, e as concentrações urinárias de KIM-1 foram maiores em comparação a pacientes sem LRA, com doença renal crônica e com LRA de outras etiologias (HAN et al., 2002).

A utilidade do KIM-1 para diagnóstico de LRA foi avaliada em estudos clínicos envolvendo pacientes hospitalizados, em pós-operatório de cirurgia cardíaca, pacientes críticos, função tardia de enxerto renal e LRA na descompensação de doenças cardíaca e hepática. Shao e colaboradores (2014) realizaram meta-análise para avaliar o desempenho de KIM-1 urinário para prever LRA em diferentes contextos clínicos, e KIM-1 apresentou alta especificidade e sensibilidade para prever ocorrência de LRA, sendo que houve melhor desempenho no subgrupo de pacientes após cirurgia cardíaca (SHAO et al., 2014). Estudos recentes têm demonstrado que KIM-1 tem papel na fisiopatologia da LRA, não sendo apenas um marcador. A indução de expressão de KIM-1 permite às células tubulares proximais a adquirirem características fagocíticas, podendo desempenhar papel importante na fase de extensão e recuperação da LRA, auxiliando na fagocitose e limpeza de células necróticas e debris da luz tubular (YANG et al., 2015). Por isso a excreção de KIM-1 na urina ocorre um pouco mais tardiamente e tende a permanecer elevado por mais tempo.

A despeito dos estudos demonstrarem um bom desempenho dos novos marcadores para LRA, algumas limitações ainda persistem. A maioria dos estudos realizados envolveram pacientes em pós-operatório de cirurgia cardíaca, quando o tempo de lesão pode ser definido. Portanto, em pacientes com LRA já estabelecida nos quais não podemos determinar o tempo de lesão renal, ainda não está determinado o papel desses marcadores. Nejat e colaboradores (2012) demonstraram que os marcadores para LRA estão elevados em pacientes com insuficiência renal pré-renal em relação aos pacientes sem lesão renal. Os autores questionam se a presença dos marcadores na urina desses pacientes estaria refletindo uma lesão subclínica, situação na qual haveria lesão tubular sem haver alteração da função renal estimada pela creatinina sérica (NEJAT et al., 2012).

A alteração dos marcadores para LRA na ausência de LRA definida pelos critérios clássicos com perda da função renal e elevação da creatinina sérica reflete dano renal agudo e é denominada de LRA subclínica. Esses pacientes apresentam maior risco de progressão para LRA clinicamente definida e necessidade de TRS, portanto medidas preventivas podem ser tomadas para evitar a piora da LRA (HAASE et al., 2016; NICKOLAS et al., 2012). Por outro lado, a persistência da elevação desses marcadores pode refletir pacientes em transição da LRA para DRC (KO et al., 2010).

Outro fator importante é se há correlação entre as concentrações dos marcadores com a intensidade da NTA. A NTA não constitui indicação de biópsia renal, portanto nos estudos envolvendo marcadores para diagnóstico de LRA não é possível avaliar a correlação com lesão histológica assim como o papel desses marcadores no diagnóstico diferencial etiológico da LRA. Ademais, o diagnóstico de LRA é definido com base na creatinina sérica sendo este o padrão ouro na avaliação dos novos marcadores e por ser um marcador com baixa sensibilidade e pouco específico, comparar os novos marcadores com creatinina sérica pode subestimar o desempenho destes no diagnóstico de LRA (ENDRE, PICKERING, WALKER, 2011).

Diante dessas limitações, a LRA ainda é definida e diagnosticada pela dosagem de creatinina sérica e débito urinário, porém novos estudos que buscam responder a essas questões abrem perspectivas para o uso dos novos marcadores de LRA na prática clínica, assim como definição de prognóstico, gravidade da LRA e risco de progressão para DRC.

1.4 MARCADORES DE LESÃO TUBULAR NAS DOENÇAS GLOMERULARES

O diagnóstico de LRA baseado na creatinina sérica em pacientes com SNO apresenta limitação adicional às discutidas previamente, pois a creatinina sérica é um marcador de função renal estimando a filtração glomerular, conseqüentemente inespecífico, não sendo útil no diagnóstico etiológico diferencial. Portanto, os novos marcadores para LRA que estão

associados à NTA poderiam ser úteis no diagnóstico diferencial da LRA nestes pacientes. A Tabela 1 resume os principais achados dos estudos envolvendo marcadores para NTA em pacientes com doença glomerular.

Alguns trabalhos avaliaram a expressão tecidual e excreção desses marcadores em pacientes com doença glomerular. Timmeren e colaboradores estudaram a expressão de KIM-1 em 102 biópsias renais de pacientes com doenças renais que cursam com proteinúria, e correlacionaram os achados histológicos com a excreção urinária de KIM-1 em 53 pacientes. A expressão de KIM-1 foi praticamente indetectável nos controles e pacientes com LM, ao passo que houve expressão aumentada nos outros pacientes. A expressão de KIM-1 foi heterogênea e presente em células de túbulos proximais, confirmada pela colocalização com expressão de aquaporina-1 e ausência da expressão nas células positivas para e-caderina (marcador de células de túbulo distal). Adicionalmente, a expressão de KIM-1 ocorreu em áreas com infiltrado de macrófagos e miofibroblastos. Houve correlação positiva entre expressão de KIM-1 e fibrose intersticial e TFG estimada. Diferente da expressão tecidual, as concentrações urinárias de KIM-1 não apresentaram correlação com fibrose intersticial, mas correlacionaram com a expressão tecidual de KIM-1, níveis de creatinina sérica e TFG estimada (VAN TIMMEREN et al., 2007). Esse achado foi semelhante ao descrito por Ogrizovic e colaboradores, em 60 pacientes com glomerulopatias submetidos à biópsia renal. A expressão de KIM-1 foi identificada em áreas de fibrose e inflamação intersticial, havendo correlação entre a intensidade de expressão de KIM-1 com a TFG estimada seis meses após a realização da biópsia renal.

Em pacientes com nefropatia por IgA, foi relatado aumento na excreção urinária de KIM-1 e NGAL, porém apenas o KIM-1 foi preditor independente de progressão para EFDR (OGRIZOVIC et al., 2013). Ding e colaboradores demonstraram que pacientes com nefropatia por IgA score Lee III apresentam excreção urinária de NGAL, e a presença deste marcador na urina correlacionava com a expressão tecidual de NGAL em túbulos proximais (DING et al., 2007). Assim como em estudos prévios que avaliaram a expressão desses marcadores na lesão tubular em modelos experimentais, nas

glomerulopatias a expressão de KIM-1 e NGAL e a presença desses marcadores na urina estão associadas à lesão tubulointersticial.

A proteinúria de baixo peso molecular, considerada proteinúria tubular, foi associada a pior prognóstico e progressão de doença em pacientes com glomerulonefrite membranosa, possivelmente por refletir dano tubular associado (BAZZI et al., 2001). As concentrações elevadas de β 2M na urina de pacientes com glomerulonefrite membranosa pode indicar pacientes com alto risco para progressão de doença. Já em pacientes com GESF, Allez e colaboradores evidenciaram que há elevação nas concentrações urinárias de β 2M nos pacientes corticorresistentes, mas não houve correlação desse marcador com lesão tubulointersticial evidenciada histologicamente.

A despeito dos estudos prévios citados demonstrarem a correlação dos marcadores para LRA com lesão histológica tubulointersticial em pacientes com glomerulopatias, esses trabalhos não avaliaram especificamente a associação dos marcadores com a presença de LRA clinicamente definida, e não está definido se a LRA em pacientes com glomerulopatias também está associada a maior risco de progressão da DRC.

Além do papel dos marcadores para LRA em predizer dano tecidual e progressão de doença renal nas glomerulopatias, alguns autores avaliaram a associação das concentrações urinárias de marcadores de lesão tubular com resposta terapêutica e identificação de atividade de doença. Em 29 crianças com SNO, Bennet e colaboradores associaram as concentrações urinárias de NGAL com perfil corticorresistente, revelando bom desempenho da NGAL urinária em predizer resposta à corticoterapia (BENNETT et al., 2012). A IL-18 é um importante regulador de resposta imune, e a imunidade mediada por células foi proposta como um dos mecanismos etiológicos na LM. Diante disso, Matsumoto e colaboradores investigaram se as concentrações urinárias de IL-18 estariam elevadas na SNO, avaliando 20 pacientes com LM. As concentrações urinárias de IL-18 foram significativamente maiores nos pacientes quando comparados aos controles normais, e houve queda nos níveis de IL-18 urinários quando os pacientes estavam em remissão (MATSUMOTO; KANMATSUSE, 2001). Em crianças em atividade de SNO,

também foi relatado aumento na excreção urinária de IL-18 quando comparado com crianças em remissão da doença ou controle normais (KILIŚ-PSTRUSIŃSKA et al., 2008).

Adicionalmente, as concentrações urinárias de KIM-1 e NGAL foram avaliadas em pacientes com vasculite associada a anticorpo anti-neutrófilo (ANCA), e a excreção urinária desses marcadores foram significativamente maiores durante atividade de doença renal em comparação às concentrações durante remissão. Porém, a excreção urinária de KIM-1 e NGAL também encontrava-se elevada nos pacientes com vasculite associada a ANCA sem atividade renal, não havendo diferença significativa nas concentrações desses marcadores entre os pacientes com atividade renal e extra renal da vasculite (LIEBERTHAL et al., 2013). De forma semelhante, Alharazy e colaboradores reportaram aumento nas concentrações urinárias na nefrite lúpica em atividade em relação à remissão de doença. Seo e colaboradores acompanharam pacientes com nefropatia por IgA antes e cerca de 2 anos após tratamento, e houve redução significativa das concentrações urinárias de KIM-1 após tratamento da nefropatia por IgA (SEO et al., 2013).

Os estudos que avaliaram os marcadores de LRA em pacientes com doença glomerular demonstram que a presença de NGAL e KIM-1 na urina está correlacionada ao achado de lesão histológica tubulointersticial, predominantemente em áreas que já apresentam fibrose e inflamação intersticial (KITIYAKARA et al., 2016). Dados prévios sugerem que as concentrações urinárias elevadas de KIM-1, NGAL, IL-18 e β 2M são indicativos de atividade de doença renal e em algumas glomerulopatias podem ser preditores de pior prognóstico e progressão para DRC. Entretanto, até o momento não está definido se os marcadores de lesão tubular são úteis para diagnóstico de LRA clinicamente definida em pacientes com SNO, e se a presença de desses marcadores seria capaz de definir se a perda de função renal está associada à NTA ou doença proliferativa glomerular em atividade, tendo impacto imediato na decisão terapêutica.

A patogênese da NTA nas glomerulopatias é diferente da NTA isquêmica ou associada à nefrotoxicidade por drogas, principais causas de LRA nos

estudos que avaliaram o papel dos novos biomarcadores. Portanto, a dinâmica de excreção dessas moléculas na urina pode ser diferente nos pacientes com SNO. Algumas peculiaridades envolvendo esses pacientes devem ser consideradas. O uso de medicações para tratamento das glomerulopatias pode interferir na expressão e excreção dos biomarcadores. Em pacientes submetidos a procedimento hemodinâmico, causa comum de LRA nefrotóxica pelo uso de contraste iodado, o uso de corticoide esteve associado com menor elevação nas concentrações urinárias de KIM-1 e NGAL após o procedimento (RIBICHINI et al., 2013). O corticoide é uma das drogas mais comumente utilizadas no tratamento das glomerulopatias que cursam com SNO, e pelo estudo citado não é possível definir se a redução na concentração desses marcadores foi por interferência do corticóide ou efeito protetor das CETR.

Outro aspecto importante é a presença de proteinúria maciça, que pode inibir a reabsorção de alguns marcadores como NGAL e β 2M, por saturação dos receptores megalina das CETR pela grande quantidade de albumina na urina. Assim, a presença desses marcadores não necessariamente estaria associada à lesão ao epitélio tubular e diferentes pontos de corte podem ser necessários em condições de proteinúria nefrótica (NEJAT et al., 2012). A definição do papel dos biomarcadores para LRA ou identificação de novos marcadores não invasivos com alta sensibilidade e especificidade para diferenciar atividade de doença e progressão de piora abrupta de doença por dano agudo tubulointersticial seria de grande valia no acompanhamento dos pacientes com SNO, pois implica em condutas terapêuticas divergentes e a biópsia renal seriada acarreta risco ao paciente e tem alto custo.

Tabela 1: Características dos estudos sobre marcadores para necrose tubular aguda em pacientes com doenças glomerulares.

| Estudo | Marcador | N | Idade** | Glomerulopatia | Resultado | P | Resultado | P |
|---------------------------------|------------------|---------|-----------------|---|--|-------------------------|--|------------|
| Hruby et al, 1998 | β 2M | 46 | 41,2 \pm 14,1 | Pacientes com glomerulonefrite e síndrome nefrótica. | As concentrações urinárias de β 2M ($\mu\beta$ 2M) tiveram correlação com TFGe 6 (r=-0,312) e 24 (r=-0,408) meses após biópsia | P=0,032 P=0,0005 | | |
| Bienias' et al, 2015 | KIM-1*, NGAL# | 39 | 13,7 | SNO | Proteína/creatinina urinária | P=0,001* | SNO corticoresistente vs corticodependente | P=0,002*,# |
| van de Brand et al, 2012 | β 2M | 10 4 | 52 \pm 13 | Pacientes com glomerulonefrite membranosa, proteinúria \geq 3g e creatinina sérica < 1,5 mg/dl. | Avaliou poder prognóstico das concentrações de $\mu\beta$ 2M para risco de progressão (\uparrow Creatinina sérica 50%; 25% + creatinina > 1,5 mg/dl; necessidade de imunossupressor). | AUC 0,80 (0,71-0,89) | | |
| Peters et al, 2009 | β 2M | 70 | 39 | Pacientes adultos com | Concentrações de $\mu\beta$ 2M correlacionar | P= 0,01 P<0,05 | Análise multivariada, concentrações de | NS |

| | | | | NiGA e am com proteinúria. | am com creatinina sérica (r=0,62) e proteinúria/dia (r=0,28) | | $\mu\beta 2M$ não foi preditor de progressão (↑Creatinina sérica 50%) ou EFDR. | |
|------------------------------|-------------------|----|-----------|---|---|--------------------|---|--------------------|
| Ogrizovic et al, 2013 | KIM-1 (expressão) | 60 | 34,4±12,2 | Pacientes com glomerulonefrite (LM, NiGA, GNM, GNMP). | Expressão de KIM-1 em túbulos localizados em áreas com fibrose intersticial inicial, túbulos dilatados e atrofia incipiente. Correlação com fibrose (r=0,317) e inflamação (r=0,4563) tubulointersticial. | P=0,021 P=0,004 | Houve correlação entre a expressão de KIM-1 e proteinúria (r=0,394) e TFGe (r=-0,442) 6 meses após biópsia. | P=0,026 P=0,002 |
| Seo et al, 2013 | KIM-1 | 37 | 39,2±11,6 | NiGA | Não houve correlação entre as concentrações urinárias de KIM-1 e proteinúria (mg/dia) | P=0,993 | Redução concentrações urinárias de KIM-1 após tratamento | P<0,0001 |
| Ding et al, 2007 | NGAL | 70 | 28,6±10,5 | Pacientes com NiGA e vários graus de classificação | Concentrações maiores nos pacientes com escore Lee grau III. | P=0,001 | Em pacientes com escore Lee grau III, correlação com escore proliferação mesangial (r=0,582) | P<0,001 |

| | | | | pele score de Lee. | Correlação com proteinúria (r=0,752). | | e lesão tubulointersticial (r=0,659) | |
|-------------------------------|------|----|-----------|---|---|---------|--|---------|
| Kitiyakara et al, 2016 | NGAL | 51 | 39,3±19,3 | Glomerulonefrite primária | Correlação entre as concentrações urinárias de NGAL e proteína/creatinina urinária (rs=0,4) | P=0,011 | Concentrações urinárias de NGAL maiores nos pacientes com fibrose intersticial moderada a severa | P=0,030 |
| Bolignano et al, 2008 | NGAL | 33 | 55±26 | Pacientes com proteinúria > 1 g/dia, diagnóstico de glomerulonefrite membranoproliferativa ou glomerulonefrite membranosa | Concentrações urinárias significantemente maiores em relação aos controles. | P=0,001 | Correlação com creatinina sérica (r=0,588), TFG (r=-0,528) e proteinúria (r=0,294) | P=0,004 |

Nota: SNO, Síndrome Nefrótica; NIgA, Nefropatia por IgA; LM, Lesão Mínima; GN, Glomerulonefrite; GNM, Glomerulonefrite Membranosa; GNMP, Glomerulonefrite Membranoproliferativa; TFGe, Taxa de Filtração Glomerular estimada; EFDR, Estágio Final de Doença Renal.

1.5 ESTUDO DO PROTEOMA URINÁRIO

O desenvolvimento tecnológico permitiu o estudo em larga escala de amostras complexas e a urina é uma fonte de potenciais marcadores para doenças renais e sistêmicas, por conter proteínas provenientes da filtração plasmática e derivadas dos diversos compartimentos renais, como aquelas secretadas pelos túbulos (THOMAS et al., 2016). O estudo das proteínas excretadas na urina, ou proteoma urinário, em estágios diferentes de doenças ou diferentes processos patológicos poderá identificar marcadores para diagnósticos ou esclarecer mecanismos fisiopatológicos, definindo possíveis alvos terapêuticos. Todavia, para definir proteínas envolvidas em processos patológicos é necessário estabelecer o proteoma urinário normal. Atualmente, mais de 1500 proteínas já foram identificadas no proteoma urinário normal, sendo que maioria dessas proteínas são extracelulares ou proteínas de membrana, mas sendo identificadas também proteínas nucleares, citoplasmáticas e lisossomais (ADACHI et al., 2006).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite caracterizar moléculas pela relação massa/carga de seus íons e é uma importante ferramenta para estudo de composição qualitativa e quantitativa de amostras complexas. Nesta técnica, as proteínas são digeridas e seus peptídeos ionizados em forma gasosa; a decomposição e análise dessas massas gera um espectro que permite identificar a origem dos peptídeos presentes nas amostras. A separação das proteínas pode ser feita previamente ou posteriormente à digestão enzimática das mesmas. Porém, em amostras complexas como a urina, quando a digestão é realizada antes da separação a complexidade da amostra aumenta consideravelmente dificultando a identificação de moléculas presentes em menor quantidade. Portanto, técnicas de separação das proteínas previamente à análise por espectrometria de massas são utilizadas em amostras complexas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é uma técnica comumente utilizada no estudo e separação de proteínas de uma amostra na qual há migração de proteínas carregadas por um gradiente elétrico. O gel de

poliacrilamida é formado pela polimerização da acrilamida, sendo que as proteínas irão migrar de acordo com seu peso molecular permitindo a análise qualitativa de proteínas de uma amostra. A SDS-PAGE é um método de separação utilizado previamente à identificação das proteínas por espectrometria de massas, pois o fracionamento de amostras complexas permite melhor identificação de moléculas menos abundantes. No estudo do proteoma urinário normal, Adachi e colaboradores conseguiu identificar mais de 1500 proteínas por espectrometria de massas após separação por 1D SDS-PAGE (ADACHI et al., 2006).

Além do mais, como a SDS-PAGE possibilita a separação de proteínas por peso molecular, o perfil de proteínas presentes da SDS-PAGE pode ser indicativo de determinadas patologias. A análise do perfil de proteínas presentes em uma determinada amostra por meio da 1D SDS-PAGE pode ser útil no processo de identificação de marcadores para diagnóstico de doenças renais e sistêmicas. Em pacientes com carcinoma de pulmão de não pequenas células, Zhang e colaboradores identificaram uma banda de 40 KDa com abundância de proteína significativamente maior que em voluntários saudáveis, que correspondia à alfa1-antiquimotripsina, sendo que os níveis de excreção dessa proteína na urina estimados por western-blot foram maiores, constituindo um potencial marcador para diagnóstico desta neoplasia (ZHANG et al., 2010). De forma semelhante, Tantipaiboonwong e colaboradores demonstraram diferentes padrões de distribuição de bandas na faixa de 28 a 42 KDa na 1D SDS-PAGE em pacientes com câncer de pulmão comparado a voluntários saudáveis (TANTIPAIBOONWONG et al., 2005). Em pacientes em pós operatório de cirurgia oncológica, e a análise seriada das proteínas urinárias por 1D SDS-PAGE demonstrou aumento na excreção de proteínas de baixo peso molecular a partir do segundo dia após cirurgia, algumas proteínas identificadas estão relacionadas com lesão tubular proximal, como a retinol binding protein, α 1-microglobulina e β 2M (YOKOMIZO et al., 2005).

A SNO é caracterizada pela perda maciça e proteína na urina, > 3,5 g em 24 horas, sendo que há predominância de proteínas de alto peso molecular

(> 60 KDa), sendo as proteínas mais comuns a albumina, haptoglobina, imunoglobulina e transferrina. Brocklebank e colaboradores avaliaram o perfil de excreção de proteínas por 1D SDS-PAGE em pacientes com SNO e doenças tubulares, e os pacientes com glomerulopatias apresentavam predominantemente proteínas com peso molecular > 60 KDa ao passo que os pacientes com doenças tubulares renais não apresentaram proteínas com peso molecular acima de 60 KDa (BROCKLEBANK; COOPER; RICHMOND, 1991).

Entretanto, pode haver perda de proteínas de baixo peso molecular quando a proteinúria não é seletiva, denominada de proteinúria tubular pois essas proteínas são completamente reabsorvidas pelas células dos túbulos proximais em condições normais. A proteinúria tubular correlaciona com dano tubulointersticial e está associada a pior prognóstico nas glomerulopatias que cursam com SNO. Na nefropatia por IgA, Woo e colaboradores avaliaram o perfil de seletividade da proteinúria por 1D SDS-PAGE, e os pacientes com proteinúria de baixo peso molecular tiveram maior incidência de DRC após 6 anos de seguimento (WOO et al., 1991). Além de ser um preditor de progressão para DRC, a presença de proteinúria tubular foi associada com pior resposta terapêutica e menor chance de remissão da SNO em pacientes com GNM e GESF (BAZZI et al., 2001)(BAZZI et al., 2003). Em vista disso, a caracterização do perfil de excreção de proteínas na urina por meio da 1D SDS-PAGE permite identificar a presença de proteínas de baixo peso molecular que estão associadas à lesão tubulointersticial, porém não há estudos correlacionando diferencialmente o perfil de proteínas na 1D SDS-PAGE com lesões tubulares agudas ou crônicas na SNO.

Como a análise por 1D SDS-PAGE consiste em uma etapa importante na separação de proteínas e análise qualitativa de amostras complexas, a avaliação da excreção diferencial de proteínas em pacientes com SNO na presença ou ausência de NTA pode ser de grande valia por possibilitar a correlação das mudanças no perfil de proteínas urinárias com lesões confirmadas histologicamente, com possibilidade de descoberta de novos

marcadores para diagnóstico diferencial de LRA em pacientes com doenças glomerulares.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A LRA é uma condição comum em paciente com SNO, sendo o diagnóstico etiológico diferencial precoce mandatório para definição de conduta terapêutica. As glomerulonefrites crescênticas ou proliferativas cursam com LRA e o tratamento com imunossupressor é fundamental para evitar a progressão para DRC. Por outro lado, a NTA é uma lesão frequente em pacientes com SNO e quando ocorre em glomerulopatias como GESF, LM e GNM podem mimetizar glomerulonefrite crescêntica ou proliferativa com o uso desnecessário de imunossupressão que acarreta riscos de infecção e complicações, como hemorragia digestiva, cistite hemorrágica e infertilidade. Atualmente o diagnóstico diferencial é realizado por meio da biópsia renal, procedimento invasivo e de alto custo, que não está amplamente disponível. Ademais, o tempo entre a realização da biópsia renal e disponibilidade do diagnóstico histológico pode levar a retardo no tratamento de condições graves como a glomerulonefrite rapidamente progressiva.

Diversos marcadores não invasivos têm sido descritos para diagnóstico mais acurado de LRA, entre eles NGAL, KIM-1, IL-18 e β 2-microglobulina. Os estudos que identificaram esses marcadores como preditores de LRA envolveram modelos experimentais de nefrotoxicidade e isquemia, pacientes em pós-operatório de cirurgia cardíaca e pacientes críticos; assim a presença desses marcadores na urina de pacientes com LRA seria indicativo de NTA que é o principal mecanismo de LRA.

A nossa hipótese é que os novos marcadores para LRA podem ser úteis no diagnóstico diferencial entre NTA e glomerulonefrite crescêntica ou proliferativa em pacientes com SNO e LRA. Entretanto, na SNO há perda de grande quantidade de proteína na urina, o que pode interferir na excreção dos marcadores para LRA por diminuição da reabsorção, mesmo na ausência de lesão aguda do epitélio tubular. Marcadores que estão associados à atividade inflamatória como IL-18 podem estar presente na urina consequentemente à inflamação glomerular nas glomerulonefrites proliferativas e crescênticas, e não pela indução da produção dessa citocina pelo epitélio tubular proximal

renal na NTA. Portanto, é necessário estudar a expressão desses marcadores especificamente em condições de proteinúria nefrótica, correlacionar com achados histológicos para definir se a sua presença na urina reflete dano ao epitélio tubular e se poderia ser utilizado no diagnóstico diferencial de LRA na SNO.

O desenvolvimento de novas técnicas para estudo de amostra complexas como a urina possibilitou a identificação de milhares de proteínas. A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma importante ferramenta na separação de proteínas de amostra complexas para posterior identificação das proteínas. A identificação de padrões diferentes de expressão protéica em pacientes com condições patológicas diversas constitui um passo inicial para descoberta de novos marcadores. Nos pacientes com SNO com LRA, a presença de lesão ao epitélio tubular ou glomerulonefrite proliferativa ou crescêntica pode levar à excreção de diferentes proteínas na urina e consequente perfis diferentes de distribuição de bandas protéicas em gel de eletroforese de poliacrilamida, que pode ser utilizado para posterior análise por espectrometria de massas na tentativa de identificar biomarcadores específicos para estas condições.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores biológicos para diagnóstico diferencial entre necrose tubular aguda e lesão proliferativa glomerular em pacientes com síndrome nefrótica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Identificar alterações do sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica, com ou sem lesão renal aguda, e com ou sem necrose tubular aguda estabelecida histologicamente;

3.2.2 Avaliar o desempenho dos marcadores urinários de lesão renal aguda (KIM-1, NGAL, β 2-microglobulina, IL-18) em pacientes com síndrome nefrótica, com ou sem lesão renal aguda, e com ou sem necrose tubular aguda estabelecida histologicamente;

3.2.3 Caracterizar o perfil eletroforético de proteínas excretadas na urina de pacientes com síndrome nefrótica, com ou sem necrose tubular aguda estabelecida histologicamente, e com lesão proliferativa glomerular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Esse foi um estudo de corte transversal no qual foram incluídos 40 pacientes com SNO submetidos à biópsia para fins de diagnóstico nos hospitais Ana Nery e Hospital Geral Roberto Santos e encaminhadas ao CPqGM FIOCRUZ no período de janeiro de 2012 a janeiro de 2014. Os pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com a presença ou ausência de NTA histologicamente definida (considerada presente quando comprometendo área \geq que 10% da cortical representada na biópsia); e presença de glomerulonefrite proliferativa: grupo CON sem NTA ou lesão proliferativa glomerular, grupo GNTA com NTA e sem proliferação glomerular, e grupo GNP com lesão proliferativa glomerular incluindo crescentes, independente da presença de NTA. O número amostral foi definido com base em estudo prévio da frequência de necrose tubular aguda em pacientes com glomerulopatias com e sem insuficiência renal, tendo em perspectiva um poder do teste de 85% e significância de 5% (Tavares, 2011). Foram obedecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Síndrome Nefrótica (proteinúria $>3,5\text{g}/24\text{h}$);
- Biópsias com pelo menos sete glomérulos nas secções histológicas e percentual de fibrose intersticial menor que 30% da cortical representada.
- Pacientes que concordarem em participar do estudo e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão:

- Presença diabetes mellitus e discrasias sanguíneas que cursam com picos de proteínas monoclonais no soro ou urina;
- Pacientes com rins transplantados;

- Pacientes com infecções agudas.

4.2 VARIÁVEIS ANALISADAS

As variáveis analisadas foram: sexo, idade, raça, níveis séricos de creatinina, triglicérides, colesterol e albumina, dosagem de proteinúria em urina de 24 horas, diagnóstico histológico, presença de hipertensão arterial sistêmica, uso de antihipertensivos.

Lesão renal aguda (LRA) foi definida de acordo com os critérios do KDIGO sendo considerada LRA todos os casos que apresentaram elevação da creatinina sérica em maior ou igual a 0,3 mg/dl em período de 48 horas ou > 50% em relação ao nível de admissão ou valor basal do paciente tendo ocorrido em período inferior a 7 dias. O valor basal de creatinina sérica foi considerado o menor valor apresentado no último ano ou menor valor durante o período de internamento quando o paciente não tinha exames prévios.

4.3 ESPÉCIMES TECIDUAIS E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foram revistas as lâminas contendo secções de biópsia renal fixadas em fluido de Bouin, embebidas e incluídas em parafina, cortadas com 2 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. As seguintes alterações foram utilizadas como evidência de necrose tubular: dilatação tubular, adelgaçamento do epitélio tubular, cilindros, edema intersticial, evidência de regeneração epitelial como hiper Cromatismo celular e mitoses. Os espécimes foram avaliados e graduados quanto à intensidade da NTA conforme protocolo estabelecido previamente (TAVARES 2011) por meio da estimativa semiquantitativa em percentual da área cortical com características de NTA. De acordo com este estudo, NTA envolvendo > 10% da cortical renal representada na biópsia está significativamente associada com o diagnóstico de lesão renal aguda. Portanto, este ponto de corte foi utilizado para dividir os

pacientes nos grupos de estudo: com NTA $\geq 10\%$ ou sem NTA quando estimada em $< 10\%$. As secções de biópsia renal também foram avaliadas quanto ao percentual de lesão tubulointersticial crônica e fibrose intersticial por meio de estimativa semiquantitativa e foram excluídos os pacientes que apresentavam percentual de fibrose intersticial maior que 30% da cortical representada na biópsia renal.

4.4 BIOQUÍMICA E ANÁLISE URINÁRIA

As dosagens de creatinina, colesterol, triglicérides, albumina séricas e proteinúria de 24 horas foram obtidas através da revisão do prontuário médico.

A amostra de urina foi coletada por meio de diurese espontânea no dia da realização da biópsia renal e submetidas às seguintes análises: bioquímica convencional e análise do sedimento, dosagem de marcadores biológicos para LRA (KIM-1, NGAL, IL-18 e beta-2 microglobulina), análise do perfil de proteínas excretadas por 1D SDS-PAGE.

4.4.1 Bioquímica convencional e análise do sedimento

O sedimento urinário foi analisado por técnico de laboratório com experiência em rotina de análise de urina na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Os seguintes elementos do sedimento urinário foram avaliados: células epiteliais, hemácias, cilindros céreos, hemáticos, granuloses e hialinos.

4.4.2 Dosagem de marcadores biológicos

Alíquotas de 2ml da urina coletada foram centrifugadas e congeladas a -80°C . As dosagens dos marcadores para LRA foram realizadas pelo método de

ELISA (enzime-linked immunosorbed assay) e as leituras foram feitas em espectrofotômetro Spectra Max 340PC, Molecular Device.

Para dosagem das concentrações urinárias de NGAL foi utilizado kit NGAL Rapid ELISA kit; Bioporto, Gentofte, Denmark seguindo as orientações do fabricante. Os limites de detecção do teste foram 0,2 – 20 ng/ml. Todas as amostras e controles foram analisados em duplicata. Foram pipetados 50 µl de anticorpo de detecção conjugado a horseradish peroxidase (HRP) em placa de 96 poços revestidos com anticorpo de captura anti-NGAL. As amostras de urina foram diluídas em diluente próprio na proporção de 1/50 e 50 µl da amostra diluídas foram pipetadas em duplicata em cada poço. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. O conteúdo da placa foi aspirado e posteriormente os poços foram lavados com 300 µl de solução de lavagem por 3 vezes. Após a lavagem, foi adicionado 100 µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB) e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. Imediatamente após incubação, foram adicionados 50 µl da solução “stop” para parar a reação. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 450 nm e corrigido para 620 nm.

A concentração de KIM-1 na urina dos pacientes foi estimada pelo método de ELISA (Human TIM-1/KIM-1/HAVCR DuoSet Economy Pack; R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA). O limite de detecção do método foi de 31,3 – 2.000 pg/ml e todas as amostras e controles foram analisadas em duplicata. Todo o processo foi realizado em temperatura ambiente. O anticorpo de captura de cabra anti-TIM-1 humano foi diluído em 1 ml de tampão fosfato-salino (PBS) e uma placa de 96 poços foi recoberta com 100 µl do anticorpo diluído e incubado durante a noite. Então a placa foi lavada por 3 vezes com 400 µl de solução composta por PBS pH 7,2 – 7,4 e TWEEN a 0,05% (tampão de lavagem). Posteriormente a placa foi bloqueada por 3 vezes com solução de albumina sérica bovina a 1% diluída em PBS pH 7,2 – 7,4 e incubada por 1 hora. Foram adicionados 100 µl das amostras diluídas em 1:40, 1:60 e 1:80 e controles, incubado por 2 horas, lavado por 3 vezes com 400 µl da solução de lavagem, adicionado 100 µl do anticorpo de detecção e incubado por 2 horas. Após incubação foi repetida lavagem com solução de

lavagem por 3 vezes e adicionado 100 µl de estreptavidina-HRP e incubado por 20 minutos protegido da luz e procedida nova lavagem com solução de lavagem conforme descrito acima. Adicionados 100 µl da solução de substrato (peróxido de hidrogênio e TMB 1:1), deixado 20 minutos protegido da luz e então a reação foi finalizada com 50 µl de solução de ácido sulfúrico a 2 normal. A leitura da placa foi realizada a 450 nm e corrigida para 570 nm.

Para mensurar as concentrações urinárias de IL-18 foi utilizado o Human IL-18 Elisa Kit (MBL International Corporation, MA, USA). As amostras foram diluídas na proporção de 1:2 em reagente de diluição e após 150 µl da amostra diluída foram transferidos para placa 96 poços em duplicata e incubada por 1 hora. Foi realizada lavagem da placa por 4 vezes, incubada a placa por 60 minutos com 100 µl da solução com anticorpo anti-IL-18 humana conjugada com peroxidase e lavada por 2 vezes após incubação. Acrescentado 100 µl da solução com substrato (TMB/H₂O₂), incubado por 30 minutos e a reação interrompida com 100 µl de ácido sulfúrico a 0,5 M. A leitura da placa foi realizada a 450 nm e corrigida para 620 nm.

A análise das concentrações de beta-2 microglobulina (β₂M) foram mensuradas pelo método de ELISA (Human beta 2-Microglobulin Quantikine IVD ELISA Kit; R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA). Para evitar degradação da beta-2 microglobulina, o pH das amostras de urina foi ajustado para > 7,0 utilizando hidróxido de sódio. Posteriormente, procedida análise das amostras e controles em duplicata conforme instruções do fabricante. O limite de detecção do método foi de 0,4 – 12 µg/ml. Adicionados 20 µl das amostras e controles a placa de 96 poços revestida com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo e pipetados 100 µl de solução contendo β₂M conjugada a HRP em cada poço. Após foram adicionados 100 µl da solução com anticorpo monoclonal anti- β₂M e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. O conteúdo da placa foi então decantado e feito lavagem da placa por 3 vezes com 400 µl de solução tampão surfactante. Imediatamente após última lavagem foram adicionados 100 µl da solução de substrato (TMB) e incubado por 15 minutos. A reação foi parada com 100 µl de solução de ácido

clorídrico a 1 normal e leitura das densidades ópticas realizada a 450 nm com correção do comprimento de onda a 620 nm.

4.4.3 Precipitação de proteínas e depleção de albumina e imunoglobulinas

Alíquotas de 1,5 ml de urina foram incubados com acetona em volume 1:3 a temperatura -20°C e deixadas de um dia para o outro. A amostra foi então centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet seco ao ar livre. Para ressuspensão do pellet, foi utilizado 1 ml de solução tampão. Na primeira alíquota, foi utilizado tampão contendo 50 mM de ditioneína (DTT), 2 M de uréia, 8 M de tiouréia e 1% 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato (CHAPS) e as concentrações das proteínas foram dosadas pelo método de Bradford utilizando kit Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As amostras de urina foram depletadas de albumina utilizando o ProteoPrep® Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit (Sigma Aldrich, MO, USA). Para segunda alíquota foi utilizado tampão contendo CHAPS a 1% e 0,1 mM de beta mercaptoetanol e as concentrações de proteínas nas amostras foram dosadas pelo método de do ácido bicicrônico utilizando kit Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras de proteínas foram analisadas em gel de poliacrilamida a 8% e 15% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) sob condições (LEAMMLI, et al., 1970). As amostras foram preparadas adicionando alíquotas com 50 μg de proteínas diluídas em tampão de amostra com agente redutor beta mercaptoetanol. Após adição do tampão, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos e posteriormente centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Juntamente com as amostras foi aplicada um padrão de proteínas com massas moleculares conhecidas (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A

voltagem de corrida foi fixada em 15 mA. Foi utilizada coloração por nitrato de prata para visualização das bandas utilizando o Bio-Rad Silver Stain e Silver Stain Plus (Bio-Rad, CA, USA). Após revelação, as imagens foram analisadas utilizando o programa Image Quant TL 8.1 (GE Healthcare, IN, USA).

4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido de acordo com resoluções No. 196/96 Conselho Nacional de Saúde (http://conselho.saude.gov.br/Web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/23_out_versao_final_196_ENCEP2012.pdf) e No. 039/2011 (http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/carta_circular/Usode_dados_de_prontuarios_para_fins_de_Pesquisa.pdf) e os procedimentos foram aprovados pela Comitê de ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz, Protocolo No. 380/12.

De acordo com essas resoluções, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) escrito foi obtido de todos os pacientes envolvidos no estudo, e estão armazenados no Laboratório de Patologia e Biointervenção-LPBI, FIOCRUZ-Bahia.

4.6 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em tabelas e gráficos como números absolutos ou relativos, ou sumarizados com média, desvio padrão, e mediana utilizando quartis inferiores e superiores quando indicado. Os desempenhos dos marcadores e da intensidade de NTA para diagnóstico de LRA foram avaliados pela análise da curva ROC (receiver operating characteristic). A comparação entre os grupos foi realizada utilizando teste T ou Mann-Whitney (não paramétrico) quando indicado; o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferença quando mais de 2 grupos foram comparados. Diferenças envolvendo proporções foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado. A correlação entre variáveis foi examinada utilizando testes de correlação de

Spearman. O nível crítico para significância dos resultados foi estabelecido para um $P < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software Prisma 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA) e o StataIC11 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

5. RESULTADOS

5.1 PACIENTES

No período de janeiro de 2012 a janeiro de 2014 foram coletadas amostras de urina de 65 pacientes sendo que 25 preencheram os seguintes critérios de exclusão: 20 (30%) apresentava fibrose intersticial maior que 30% e 5 (8%) por conter menos que 7 glomérulos na cortical representada, restando 40 casos para análise. A média de idade dos pacientes foi de 35 ± 16 anos, 22 (55%) eram do sexo feminino. Hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi diagnosticada na maioria dos pacientes (27, 68%). Os principais diagnósticos histológicos foram e GESF (10; 25%) e GNM (10, 25%), LM (7; 18%) seguidos da glomerulonefrite lúpica proliferativa (NL) (6, 15%) e Glomerulonefrite Proliferativa Aguda (3, 8%).

Os pacientes foram divididos em 3 grupos conforme descrito previamente: grupo CON (n=17), grupo GNTA, (n=14) e grupo GNP (n=9). As características demográficas e clínicas dos pacientes de acordo com os grupos estabelecidos estão representadas na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à média de idade, distribuição entre os sexos, frequência de HAS, níveis séricos de creatinina, uréia e albumina, e proteinúria de 24 horas. Os valores da concentração sérica de colesterol foram menores nos pacientes do GNP em relação aos grupos CON e GNTA ($P = 0,009$).

Em relação à análise histológica, os diagnósticos histológicos mais comuns nos pacientes dos grupos CON e GNTA foram GNM (7/17, 42%) e GESF (5/14 36%), respectivamente, ($P = 0,371$); nos pacientes de grupo GNP o diagnóstico mais comum foi a glomerulonefrite lúpica (6/9, 67%) seguido da glomerulonefrite proliferativa aguda (3/6, 33%). A intensidade de NTA estimada foi significativamente maior nos pacientes do GNTA em comparação aos pacientes do CON e GNP ($P < 0.0001$), porém não houve diferença entre os grupos CON e GNP ($P = 0,878$). Em relação à intensidade de fibrose intersticial estimada não foi diferente entre os 3 grupos de estudo ($P = 0,713$)

Os critérios de KDIGO para LRA foram aplicados em 31 pacientes cujas dosagens de creatinina séricas seriadas durante internamento ou basal estavam disponíveis. Em nove pacientes, não havia informação em relação ao valor basal de creatinina sérica e não havia disponibilidade de valores seriados de creatinina sérica para aplicar os critérios KDIGO para LRA. Destes pacientes, sete tinham valor de creatinina sérica isolada dentro da normalidade. Dezenove (59%) dos 31 pacientes apresentaram critérios para LRA. A presença de NTA histologicamente definida na biópsia renal teve excelente desempenho para diagnóstico de LRA, com área sobre a curva ROC de 0,8387 (95% IC = 0,7349-0,9425) (Figura 1).

Tabela 2: Comparação dos dados demográficos e clínicos dos pacientes com síndrome nefrótica com e sem necrose tubular aguda e com lesão glomerular proliferativa.

| PARÂMETRO | CON | GNTA | GNP | P |
|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| N | 17/40 (43%) | 14/40 (35%) | 9/40 (23%) | |
| Sexo: | | | | |
| Masculino | 9/17 (53%) | 6/14 (43%) | 3/9 (33%) | 0,718 |
| Idade: | | | | |
| Média ± SD | 37 ± 16 | 39 ± 18 | 26 ± 11 | 0,066 |
| Mediana[interquatile] | 35 [21-53] | 43 [21-52] | 25 [21-25] | |
| Creatinina (mg/dl)* | 1,1 ± 0,4 | 1,5 ± 0,8 | 1,2 ± 0,7 | 0,148 |
| Uréia (mg/dl)* | 61 ± 46 | 74 ± 44 | 40 ± 18 | 0,185 |
| Albumina (g/dl)* | 1,88 ± 0,71 | 1,67 ± 0,28 | 2,21 ± 0,54 | 0,092 |
| Colesterol (mg/dl) | 368,1 ± 88,02 ^a | 376,8 ± 137,5 ^b | 224,4 ± 71,6 ^{a,b} | 0,009 ^{a,b} |
| Proteinúria 24 horas (mg) Mediana[p25-p75] | 4988 [3276-9040] | 8399 [3391-15088] | 2897 [2400-8817] | 0,268 |
| HAS | 12/17 (71%) | 10/14 (71%) | 5/9 (56%) | 0,753 |
| iECA/BRA | 12/16 (75%) | 12/14 (86%) | 4/9 (44%) | 0,128 |
| AHO | 8/16 (50%) | 6/14 (43%) | 5/9 (56%) | 0,847 |
| Diagnóstico | | | | |

| | | | | |
|-----------|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| LM | 5/17 (29%) | 2/14 (14%) | | 0,371 |
| GESF | 5/17 (29%) | 5/14 (36%) | | 0,371 |
| GNM | 7/17 (42%) | 3/14 (21%) | | 0,371 |
| Outros | | 4/14 (29%)** | | 0,371 |
| NL | | | 6/9 (67%) | |
| GNP | | | 3/9 (33%) | |
| LTIC (%)# | 4,7 ± 6,9 | 4,6 ± 4,6 | 6,7 ± 7,5 | 0,713 |
| NTA (%)# | 3 ± 3 ^a | 46 ± 26 ^{a,c} | 11 ± 11 ^c | <0,0001 ^{a,c} |
| NTA | 0/17 | 14/14 | 5/9 | |

Nota: * Dados expressos como média ± desvio padrão, HAS, hipertensão arterial sistêmica; iECA/BRA inibidor enzima conversora angiotensina/bloqueador receptor angiotensina; AHO, anti-hipertensivo oral; LM, doença por lesão mínima; GESF, glomeruloesclerose segmentar e focal; GNM, glomerulonefrite membranosa; NL, nefrite lúpica; GNP, glomerulonefrite proliferativa aguda; NTA, necrose tubular aguda; LTIC, lesão tubulointersticial crônica,** Outros; Amiloidose (n=1), glomerulonefrite membranoproliferativa (n=1), diagnóstico descritivo (n=2). # Dados expressos em média ± desvio padrão do percentual de área da cortical representada na biópsia renal acometida por LTIC e NTA.

5.2 BIOQUÍMICA E ANÁLISE URINÁRIA

5.2.1 Bioquímicas convencional e análise sedimento urinário

Dos 40 pacientes incluídos no estudo, foram encaminhadas amostras de urina de 33 pacientes para bioquímica convencional e análise do sedimento urinário, sendo que 7 pacientes não apresentaram diurese suficiente para fracionamento da amostra sendo priorizado armazenamento para dosagem dos marcadores para LRA e análise por SDS-PAGE. A presença de cilindros hemáticos não foi relatada em nenhuma amostra e cilindros céreos foram encontrados em apenas 2 pacientes. De forma oposta, neutrófilos e células epiteliais estiveram presentes em todas as amostras encaminhadas. Como todos os pacientes apresentaram células epiteliais na análise do sedimento urinário, os pacientes foram divididos em 2 grupos: células epiteliais algumas ou raras, e células epiteliais numerosas ou frequentes. Os dados referentes à comparação da presença dos elementos do sedimento urinário entre os pacientes com e sem NTA, com e sem LRA e entre os grupos de estudo estão representados na Tabela 3. Quando comparamos os grupos de estudo CON, GNTA e GNP, não houve diferença estatisticamente significativa entre em relação à frequência de hemácias ($P = 0,28$), células epiteliais ($P = 0,08$), cilindros hialinos ($P = 0,06$) e cilindros granuloso ($P = 0,71$). Da mesma forma, quando avaliamos os pacientes em relação à presença ou ausência de NTA, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à frequência de hemácias ($P = 0,11$), células epiteliais ($P = 0,08$), nem de cilindros granuloso ($P = 0,35$). Em relação aos pacientes com e sem LRA, houve um número maior de paciente com hemácias ($P = 0,01$) nos pacientes com LRA, porém não houve diferença no número de pacientes que apresentaram cilindros granuloso ($P = 0,16$) ou células epiteliais ($P = 0,05$) na análise do sedimento urinário.

Tabela 3: Comparação dos dados da análise do sedimento urinário dos pacientes com síndrome nefrótica com e sem necrose tubular aguda, com lesão glomerular proliferativa, e com ou sem lesão renal aguda.

| PARÂMETRO | GRUPOS | | | |
|-----------------------------|----------------|-------------|-----------|------|
| | CON | GNTA | GNP | P |
| Células epiteliais | | | | |
| Numerosas | 0/0 | 3/13 (23%) | 0/0 | 0,08 |
| Hemáceas | | | | |
| Presente | 4/13 (30%) | 8/13 (62%) | 3/7 (43%) | 0,28 |
| Cilindros granulosos | | | | |
| Presente | 4/13 (31%) | 6/13 (46%) | 3/7 (43%) | 0,71 |
| | sem NTA | NTA | P | |
| Células epiteliais | | | | |
| Numerosas | 0/0 | 3/17 (18%) | 0,08 | |
| Hemáceas | | | | |
| Presente | 5/16 (31%) | 10/17 (59%) | 0,11 | |
| Cilindros granulosos | | | | |
| Presente | 5/16 (31%) | 8/17 (47%) | 0,35 | |

| | sem LRA | LRA | P |
|-----------------------------|----------------|-------------|----------|
| Células epiteliais | | | |
| Numerosas | 2/9 (22%) | 0/16 | 0,05 |
| Hemáceas | | | |
| Presentes | 1/9 (11%) | 10/16 (63%) | 0,01 |
| Cilindros granulosos | | | |
| Presente | 3/9 (33%) | 10/16 (63%) | 0,16 |

5.2.2 Dosagens dos marcadores biológicos

As concentrações urinárias de KIM-1 (uKIM-1), NGAL (uNGAL), β 2-microglobulina (u β 2M) e IL-18 (uIL-18) foram mensuradas pelo método de ELISA para avaliar o papel destes marcadores no diagnóstico de LRA em pacientes com síndrome nefrótica. Avaliamos os pacientes de acordo com a presença ou ausência de NTA, LRA, e foi realizada a comparação entre os grupos de estudo CON, GNTA e GNP.

Avaliamos inicialmente se havia correlação entre as concentrações urinárias dos marcadores com a intensidade de NTA histologicamente definida. Houve correlação positiva entre as concentrações de uKIM ($r = 0,4884$ 95% IC 0,1856 a 0,7065, $P = 0,0008$), de uNGAL ($r = 0,5299$ 95% IC 0,2290 a 0,7383, $p = 0,001$) e de u β 2M ($r = 0,6505$ 95% IC 0,297 a 0,8488, $p = 0,0014$), mas não de IL-18 ($r = 0,3236$ 95% IC -0,4677 a 0,5167, $p = 0,902$) com o percentual da biópsia renal acometida por NTA (Figura 1). Adicionalmente, comparamos os pacientes com e sem NTA, e observamos que os pacientes com NTA tiveram concentrações mais altas de uKIM-1 (4299 [630-9534] pg/ml), uNGAL (126,1 [22,8-1195] ng/ml) e u β 2M (1,2 [0,001-23,31] ug/ml), comparado aos pacientes sem NTA (uKIM-1=1508 [202-5308] pg/ml, $P = 0,0157$; uNGAL=41 [6,4-587,2] ng/ml, $P = 0,023$); e u β 2M (0,11 [0,04-0,27] ug/ml, $p = 0,0167$), mas não houve diferença nas concentrações de IL-18 entre os pacientes com e sem NTA ($p = 0,4747$).

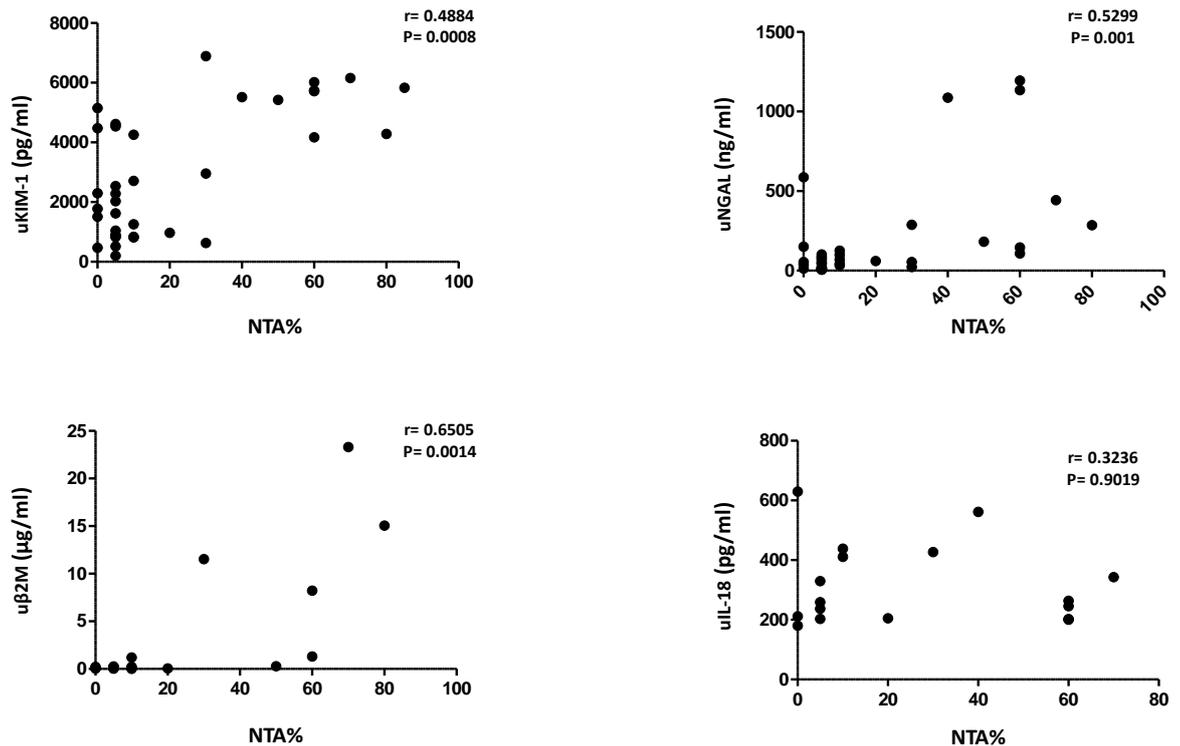


Figura 7: Correlação dos marcadores biológicos para lesão renal aguda com intensidade de necrose tubular aguda estimada em percentual da cortical renal com evidência de necrose tubular na biópsia renal.

Os dados referentes às concentrações dos marcadores para LRA e comparação entre os grupos estão representados na Tabela 4. As concentrações de uNGAL e uKIM-1 foram maiores nos pacientes com NTA sem glomerulonefrite proliferativa (GNTA) em relação aos pacientes com glomerulonefrite proliferativa (GNP) (uNGAL 146,2 [2,8-1195] ng/ml vs 48,9 [13,1-287,9] ng/ml, $P = 0,0034$) (uKIM-1 4884 [630-9534] pg/ml vs 1218 [202-6889, $P = 0,024$).

As concentrações de uKIM-1 e uNGAL foram maiores nos pacientes com LRA (uKIM-1 = 4254 [815-9534] pg/ml e uNGAL = 102,4 [33,50-1195] ng/ml) definida pelo critério KDIGO em comparação aos pacientes sem LRA (uKIM-1 = 1006 [202-2539] pg/ml), $P = 0,009$; e uNGAL = 23,1 [6,6-182,1] ng/ml, $P = 0,002$).

Não houve correlação entre as concentrações urinárias de KIM-1 ($r = 0,3169$, 95% IC -0,0924 a 0,6346, $P = 0,115$), NGAL ($r = 0,21$, 95% IC -

0,2138 a 0,5673, $P = 0,314$), $\beta 2M$ ($r = 0,4107$, 95% IC -0,1452 a 0,7695, $P = 0,129$) e IL-18 ($r = 0,1209$, 95% IC -0,4752 a 0,6409, $P = 0,694$) com a proteinúria (mg/dia).

Tabela 4. Biomarcadores para necrose tubular aguda (NTA) em pacientes com síndrome nefrótica: associação com necrose tubular aguda (NTA) e glomerulonefrite proliferativa (GNP).

| PARÂMETRO | CON | GNTA | GNP |
|---|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| NGAL (ng/ml) | | | |
| Média ± SD | 79,7 ± 149,6 | 381,5 ± 445,7 ^a | 81,9 ± 93,5 ^a |
| Mediana [interquartil 25-75] | 41 [8,1 - 80,4] | 146,2 [84,6 - 765] | 48,9 [21,8 - 126,3] |
| KIM-1 (pg/ml) | | | |
| Média ± SD | 1967 ± 1543 | 4443 ± 2789 ^b | 1951 ± 2121 ^b |
| Mediana [interquartil 25-75] | 1508 [877 - 2539] | 4884 [1568 - 6224] | 1218 [820 - 2294] |
| β2-microglobulina (μg/ml) N=21 ^c | | | |
| Média ± SD | 0,013 ± 0,09 | 5,53 ± 8,41 | 2,96 ± 5,72 |
| Mediana [interquartil 25-75] | 0,11 [0,06 - 0,21] | 1,20 [0,14 - 11,64] | 0,15 [0,03 - 8,7] |
| IL-18 (pg/ml) N=17 | | | |
| Média ± SD | 236,7 ± 53,1 ^d | 304,2 ± 128,4 | 498,2 ± 113,8 ^d |
| Mediana [interquartil 25-75] | 224,1 [197,2 - 276,9] | 254,7 [203,1 - 394,1] | 438,3 [426,8 - 629,5] |

Nota: ^a: P = 0,0034, ^b P = 0,024, ^c: P = 0,116, ^d: P = 0,04

Tabela 5. Biomarcadores para necrose tubular aguda (NTA) em pacientes com síndrome nefrótica: associação com lesão renal aguda (LRA) definida pelos critérios KDIGO.

| PARÂMETRO | s/LRA | c/LRA | |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| NGAL (ng/ml) | | | |
| Média ± SD | 43,6 ± 52,7 | 301,8 ± 412,5 | P = 0,002 |
| Mediana [interquartil 25-75] | 23,1 [11,7 – 61,5] | 102,4 [54,5 – 365,2] | |
| KIM-1 (pg/ml) | | | |
| Média ± SD | 1226 ± 763 | 3993 ± 2778 | P = 0,009 |
| Mediana [interquartil 25-75] | 1006 [590 – 2002] | 4254 [1420 – 5831] | |
| β2-microglobulina (μg/ml)* | | | |
| Média ± SD | 0,15 ± 0,10 | 4,12 ± 7,17 | P = 0,292 |
| Mediana [interquartil 25-75] | 0,12 [0,06 – 0,24] | 0,22 [0,07 – 8,22] | |
| IL-18 (pg/ml) N=15** | | | |
| Média ± SD | 251,4± 57,5 | 321,2± 122,6 | P = 0,557 |
| Mediana [interquartil 25-75] | 235,3 [206,7 – 312,1] | 263,4 [202,8 – 426,8] | |

5.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A Figura 2 demonstra os perfis eletroforéticos das proteínas urinárias de quatro pacientes com SNO, sendo dois pacientes do grupo GNTA e dois pacientes do grupo GNP, antes e após a depleção de albumina. Os perfis obtidos demonstraram presença de banda com grande quantidade de proteína na faixa de 66 KDa, compatível com a grande quantidade de albumina presente na urina dos pacientes com SNO. Após a depleção de albumina, foi observada melhor resolução das bandas na faixa de 45 a 90 KDa, entretanto houve perda ou redução na intensidade de bandas em outras faixas de peso molecular não correspondente ao peso molecular da albumina, conforme demonstrado no densitograma na Figura 2. Visto que a proteinúria tubular é composta por proteínas de baixo peso molecular e como houve perda da intensidade de bandas após depleção de albumina, optamos por prosseguir a análise dos perfis eletroforéticos sem a depleção de albumina mantendo a concentração do gel de poliacrilamida em 15% para melhor resolução das proteínas com peso molecular menor que 66 KDa.

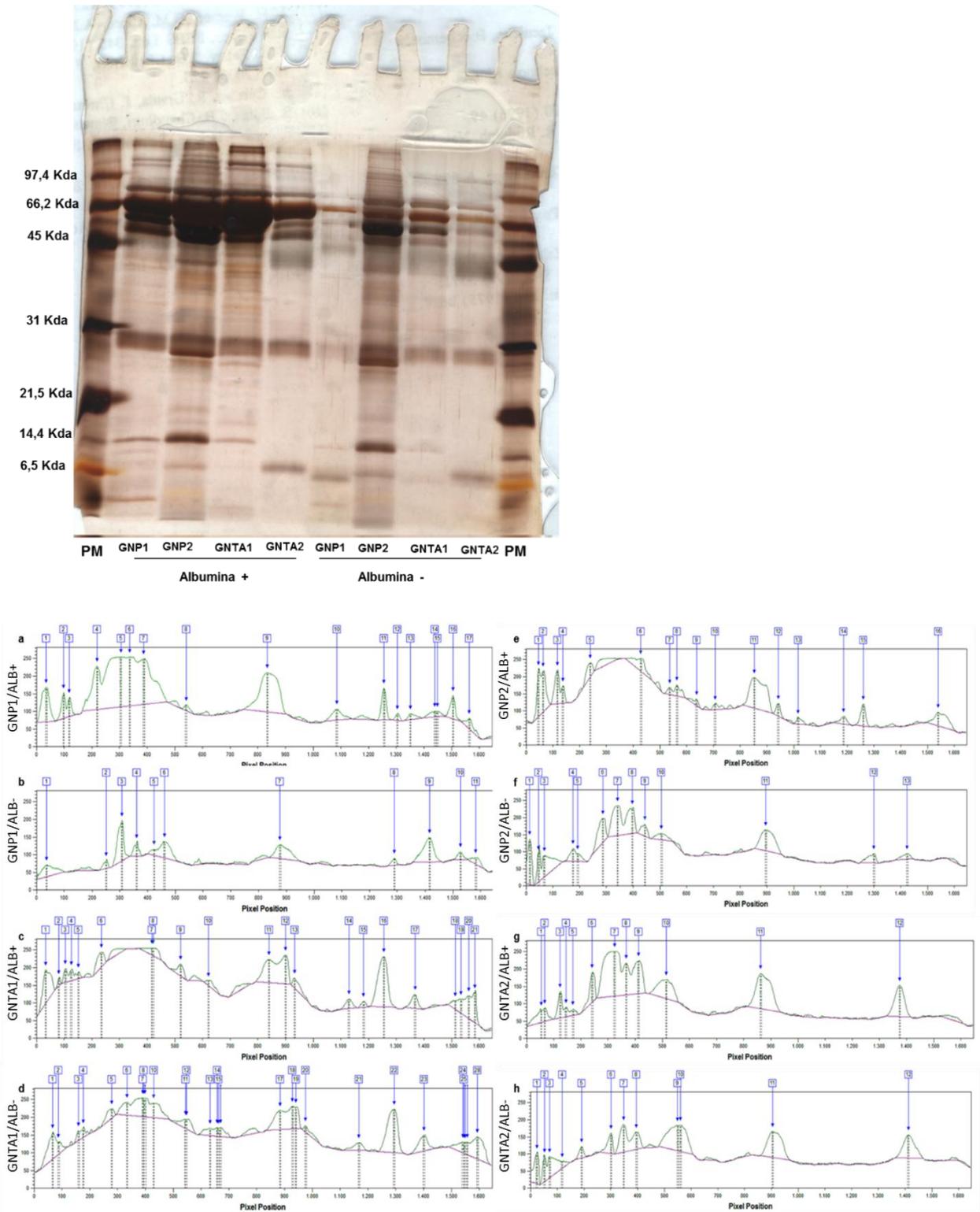


Figura 2, Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% de urina de 4 pacientes com síndrome nefrótica antes (Albumina +) e após (Albumina -) depleção de albumina, Densitograma representativo das bandas correspondentes aos pacientes GNP1 (a,b), GNP2 (c,d), GNTA1 (e,f) e GNTA2 (g,h); a,c,e,g anterior à depleção de albumina; b,d,f e h após depleção de albumina

A análise dos perfis eletroforéticos dos pacientes dos grupos de estudo não demonstrou presença de banda que estivesse diferencialmente expressa em um dos grupos conforme demonstrado na Figura 3. Porém, mesmo com a normatização da quantidade de proteína aplicada ao gel após estimar a concentração pelo método de Bradford, observamos heterogeneidade na quantidade de proteínas visualizadas no gel de eletroforese podendo interferir na intensidade ou presença de bandas. Portanto, foi realizada extração de proteína e ressuspensão em tampão compatível com o método do ácido bicrônico para quantificação de proteínas nas amostras e posteriormente realização de nova eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%.

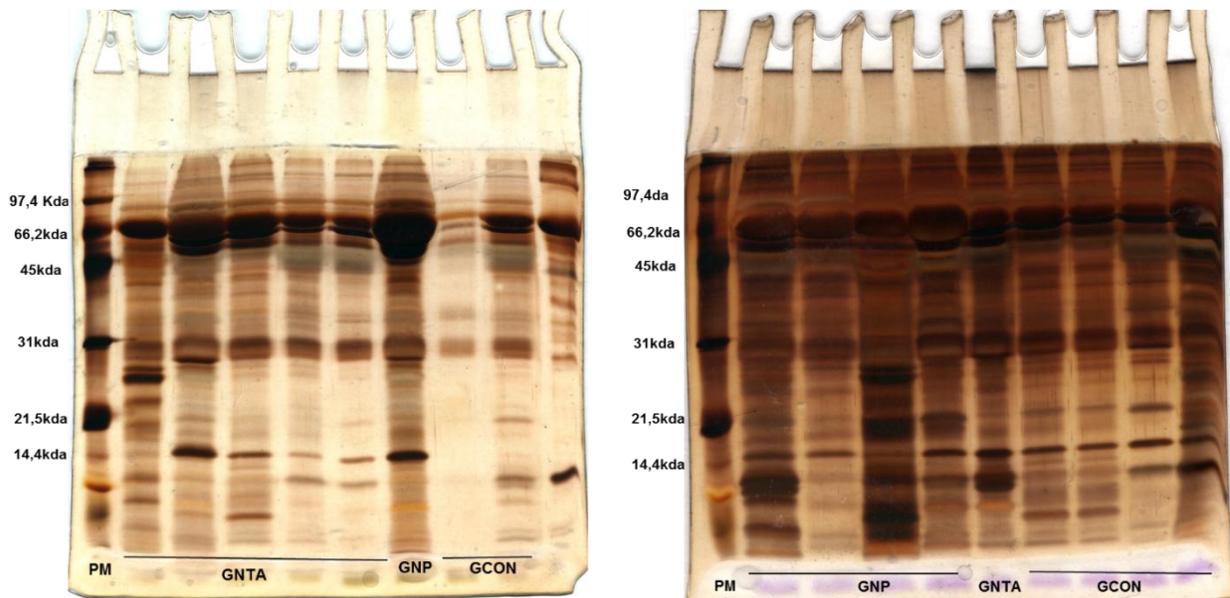


Figura 3, Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% de urina de pacientes com síndrome nefrótica, GNTA: pacientes com necrose tubular sem lesão proliferativa glomerular; GNP: pacientes com lesão proliferativa glomerular; GCON: pacientes sem lesão proliferativa glomerular ou necrose tubular aguda

A extração de proteínas foi realizada em amostras isoladas e em pool com amostra de urina de três pacientes por pool, sendo dois pools por grupo de estudo (CON, GNTA, GNP). A Figura 4 representa os perfis eletroforéticos das amostras em pool. Observamos que houve desaparecimento de banda correspondente a peso molecular de 35 KDa nos grupos GNTA e GNP em comparação com o grupo CON (Figura 4). No grupo GNP, houve perda de uma banda correspondente a faixa de peso molecular de 27 KDa quando comparado aos grupos CON e GNTA. Entretanto, quando analisamos

amostras isoladas de pacientes dos três grupos de estudo, não observamos diferença no padrão de distribuição de bandas nos perfis eletroforéticos entre pacientes dos diferentes grupos de estudo.

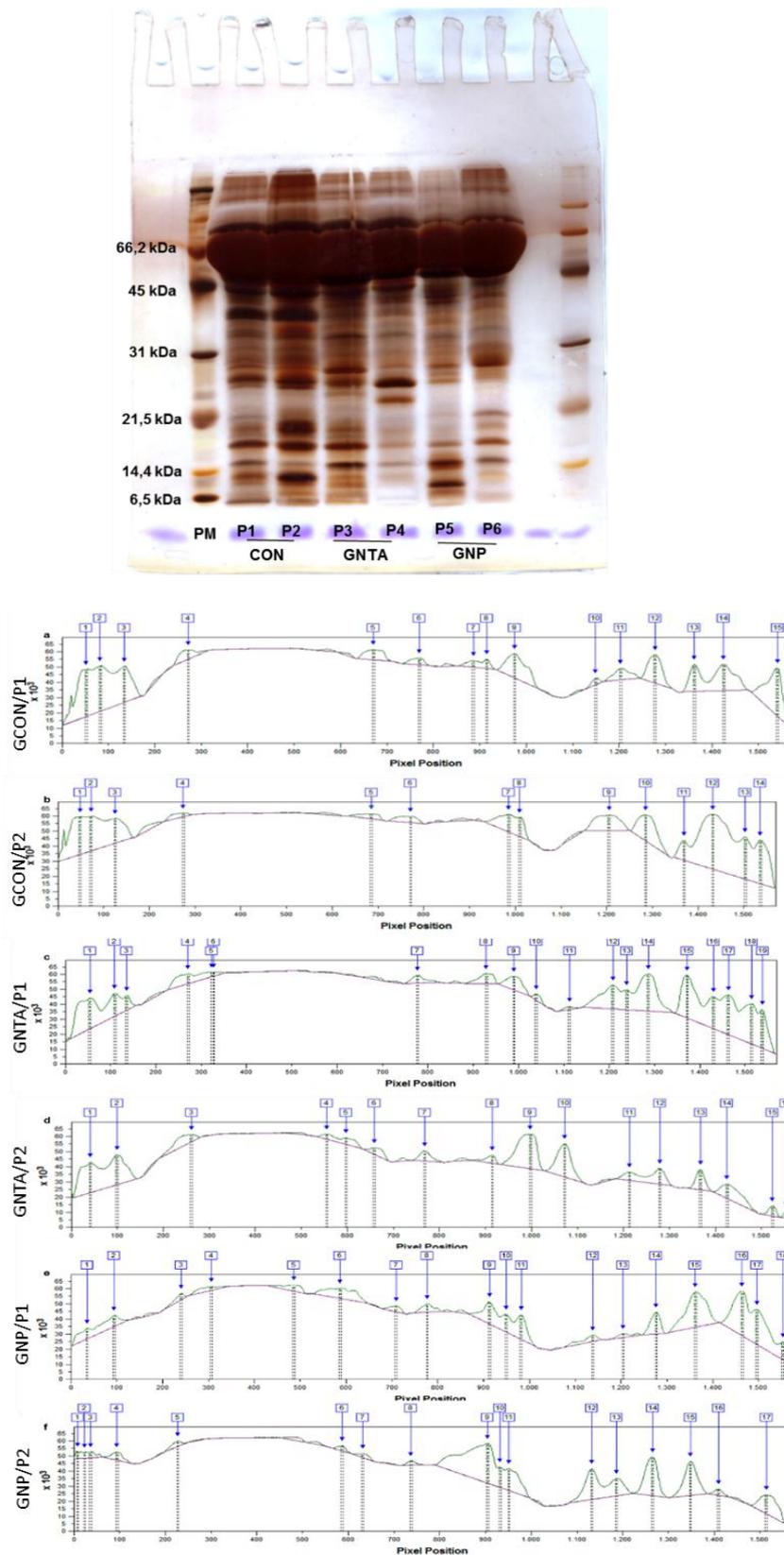


Figura 4, Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% de urina de pools (P1 a P6) de pacientes com síndrome nefrótica,, Densitograma representativo das bandas correspondentes ao P1 (a), P2 (b), P3 (c), P4 (d), P5 (e) e P6 (f), P1 e P2 pacientes GCON: pacientes sem lesão proliferativa glomerular ou necrose tubular aguda; P3 e P4 pacientes GNTA: pacientes com necrose tubular sem lesão proliferativa glomerular; P5 e P6 pacientes GNP: pacientes com lesão proliferativa glomerular

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos o papel de marcadores para LRA no diagnóstico diferencial da NTA em 40 pacientes com síndrome nefrótica com e sem glomerulonefrite proliferativa. A amostra foi composta de pacientes jovens, com igual distribuição entre os sexos. Os principais diagnósticos histológicos nos pacientes sem glomerulonefrite proliferativa foram GESF, GNM e LM; e nos pacientes com glomerulonefrite proliferativa houve predominância da NL. Outras séries de biópsias renais publicadas no Brasil e em outros países demonstram que esses são os diagnósticos mais frequentes nos pacientes com síndrome nefrótica (POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010). Entretanto, em outros trabalhos, a nefropatia por IgA (NIgA) tem sido descrita como a glomerulopatia mais prevalente (FIORENTINO et al, 2016). Acreditamos que a divergência entre os trabalhos mencionados pode ser atribuída a diferença entre as populações de estudo e critérios para indicação de biópsia renal nos serviços envolvidos, havendo maior frequência da NIgA nos serviços onde a hematúria microscópica isolada é a principal alteração encontrada, havendo mudança nesse perfil quando a SNO é a principal manifestação clínica nos pacientes submetidos à biópsia renal.

Foram avaliadas a presença de NTA histologicamente definida e LRA de acordo com os critérios KDIGO para diagnóstico e classificação de LRA. Em estudo prévio, demonstramos que lesões histológicas de NTA são comuns em pacientes com glomerulopatias e que a intensidade da lesão correlacionava com a frequência de insuficiência renal (TAVARES et al, 2012). Estudos que avaliaram as lesões histológicas da NTA em humanos são escassos, visto que a NTA não constitui indicação para realização de biópsia renal, sendo esta realizada quando há suspeita de outras causas para LRA como glomerulonefrites, nefrite intersticial ou vasculites. Portanto, o impacto da intensidade das lesões histológicas de NTA na função renal é pouco estudado. Solez e colaboradores (1979) avaliaram biópsias renais de pacientes com LRA oligúrica, não-oligúrica e em fase de recuperação da função renal. As alterações morfológicas mais importantes encontradas em humanos foram a

perda da borda em escova dos túbulos proximais e necrose de células tubulares proximais (presença de células tubulares na luz tubular ou desnudamento da membrana basal tubular) nos pacientes com LRA. Entretanto, mesmo nos pacientes com oligúria, dos quais 20/24 (83%) encontravam-se em TRS, a média dos escores atribuídos à necrose tubular e perda da borda em escova foram 0,69 e 1,95 (escore de 0-3+), demonstrando que as alterações histológicas na NTA são focais e esparsas, não refletindo a gravidade da LRA clinicamente definida (SOLEZ; MOREL-MAROGER; SRAER, 1979). Em biópsias de pacientes com SNO e LRA, achados compatíveis com NTA foram considerados leves em 14/22 (64%) dos casos (WALDMAN; AUSTIN, 2009). Recentemente, Chu e colaboradores (2014) avaliaram a correlação de LRA definidas pelos critérios KDIGO com lesão histológica em 303 pacientes submetidos à biópsia renal e que tiveram diagnóstico final de nefrite intersticial aguda, glomerulonefrite crescêntica, microangiopatia trombótica ou NTA. Nos pacientes com diagnóstico final de NTA, com critério de definição de > 50% da cortical representada com lesões histológicas compatíveis com NTA, 20% não preencheram critérios para LRA (CHU et al., 2014). Em trabalho realizado previamente pelo nosso grupo com pacientes com SNO, quando a intensidade da NTA foi estimada em $\geq 10\%$ da cortical renal representada, a especificidade para diagnóstico de insuficiência renal foi > 90% (Tavares, 2012). Portanto, esse ponto de corte foi utilizado para categorizar os pacientes em com e sem NTA no presente estudo. Nesta amostra, NTA esteve presente em 19 (48%) dos pacientes, e quando utilizados os critérios de KDIGO, 19/31 (59%) pacientes apresentavam LRA. A frequência da LRA encontrada neste trabalho foi maior que a relatada em estudos prévios. Em adultos com LM, Waldman e colaboradores encontraram LRA em 24/99 (24%) dos pacientes concomitante à apresentação inicial ou durante recidiva (WALDMAN et al, 2007). No Brasil, em uma série envolvendo 170 pacientes com LM e GESF, a frequência de LRA foi significativamente maior nos pacientes com GESF (39% vs 12% LM, $P = ,013$) (MOURA; FRANCO; KIRSZTAJN, 2015). Utilizando os critérios de RIFLE para diagnóstico e classificação de LRA, Chen e colaboradores acharam que 95/277 (34%) dos adultos com SNO idiopática preencheram critérios para diagnóstico de LRA

(CHEN et al, 2011). Os critérios utilizados nos estudos citados foram diferentes do adotados neste estudo onde foram aplicados os critérios recomendados pela International Society of Nephrology, KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, que foi baseado nos critérios de RIFLE e AKIN para diagnóstico de LRA (“Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group, KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury,”, 2012). Portanto, a diferença na definição de LRA pode ter contribuído para maior frequência de LRA nesta análise. Nos estudos previamente citados não foram incluídos pacientes com glomerulonefrites proliferativas que via de regra se apresentam com síndrome nefrítica e insuficiência renal, ao passo que neste estudo, 5 dos 19 pacientes que apresentaram LRA foram diagnosticados com glomerulonefrite proliferativa. As dosagens prévias de creatinina ou valores seriados não estavam disponíveis em 9/40 (23%) dos pacientes envolvidos neste estudo, sendo que em 7 destes pacientes a dosagem isolada de creatinina sérica encontrava-se dentro do valor da normalidade. Ademais, o diagnóstico de LRA pode ter contribuído para indicação de biópsia renal nestes pacientes, e devido aos fatores citados, a real frequência de LRA pode ter sido superestimada no presente estudo.

Os critérios de KDIGO para diagnóstico de LRA foram aplicados em 31 pacientes. Uma limitação que encontramos no uso dos critérios KDIGO para LRA foi a ausência da creatinina basal em alguns pacientes. Alguns trabalhos utilizaram o cálculo da creatinina basal estimada por meio de fórmulas para estimativa da taxa de filtração glomerular como a MDRD modificada (Modification of Diet in Renal Disease) que leva em consideração idade, sexo, raça e creatinina sérica. Assim considerando um determinado valor para o clearance de creatinina normal, pode-se calcular a creatinina sérica esperada (SIEW et al., 2010). Porém, Bagshaw e colaboradores avaliaram o desempenho do cálculo da creatinina basal estimada em pacientes com LRA e demonstraram que quando utilizada creatinina basal calculada pela fórmula MDRD a prevalência de LRA foi superestimada (BAGSHAW et al., 2009). Achados semelhantes foram encontrados por Pickering e colaboradores; o uso

da creatinina basal estimada pela fórmula MDRD superestimou a prevalência de LRA, sendo que quando utilizada como creatinina basal a menor creatinina mensurada em uma semana de internamento, a prevalência de LRA foi corretamente estimada quando comparada com os critérios RIFLE (PICKERING; ENDRE, 2010). Portanto, além das limitações citadas anteriormente referente ao uso da creatinina sérica no diagnóstico de LRA, a necessidade de valor basal para aplicar os critérios da KDIGO inviabiliza o uso deste critério em alguns pacientes, reforçando a necessidade de novos marcadores mais sensíveis e específicos para LRA associada a NTA.

O diagnóstico diferencial de LRA constitui um desafio e um marcador não invasivo, que seja capaz de diagnosticar precocemente a LRA, correlacione com prognóstico e tenha capacidade de diferenciar o diagnóstico etiológico da lesão renal ainda não está disponível. Em pacientes hospitalizados, a NTA isquêmica ou tóxica é a causa mais frequente de LRA e está associada a aumento na morbimortalidade, custo e tempo de internamento (CHERTOW et al., 2005). O diagnóstico precoce seria útil para definição de medidas de proteção renal, ajuste de doses de drogas que poderiam agravar a lesão tóxica ou isquêmica, e identificação de pacientes com alto risco para pior desfecho. Por outro lado, em pacientes cuja etiologia na LRA não pode ser definida por parâmetros clínicos e laboratoriais disponíveis na atualidade, a biópsia renal é mandatória para definição de diagnóstico e conduta terapêutica (PHILIPPONNET et al., 2013). Entretanto, a biópsia renal é um procedimento invasivo, de alto custo, e que não está disponível amplamente principalmente da rede pública e saúde. Portanto, nos últimos anos houve uma intensa busca por marcadores biológicos para diagnóstico de LRA, especificamente a NTA. A urina constitui uma importante fonte de moléculas e proteínas com potencial uso para diagnóstico nas doenças renais e sistêmicas. Primeiramente, a amostra pode ser facilmente adquirida de forma não invasiva permitindo que que repetidas amostras sejam analisadas sem inconvenientes ao paciente. Segundo, as proteínas presentes na urina podem ser derivadas da filtração de proteínas plasmáticas, falha da reabsorção de proteínas filtradas, proteínas decorrentes de lesão glomerular, tubular, infiltrado inflamatório, proveniente

de tecido conjuntivo, trato urológico (COCA; PARIKH, 2008). Portanto, os componentes da urina têm sido estudados há décadas no intuito de estabelecer padrões que sirvam no diagnóstico diferencial das doenças renais.

Neste trabalho não observamos diferença na presença dos elementos do sedimento urinário (células – hemácias, leucócitos e células epiteliais, e cilindros – granulados). Diversos fatores podem interferir na preservação dos elementos do sedimento urinário limitando sua utilidade e acurácia. O tempo entre a coleta e análise do sedimento urinário não deve ultrapassar 2 a 4 horas, pois a identificação de células, como leucócitos e hemácias, e cilindros pode ser prejudicada pela lise desses elementos principalmente em condições de pH alcalino e densidade relativa baixa da urina (DELANGHE; SPEECKAERT, 2014). A análise do sedimento urinário neste trabalho foi realizada no laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, portanto o tempo entre a coleta do material nos hospitais, transporte e análise variou entre os pacientes. Estes fatores pré-análise podem ter contribuído para não ter sido identificado diferença entre os grupos de estudos.

Todos os pacientes envolvidos nesta análise tinham diagnóstico confirmado de glomerulopatia e SNO, portanto a presença de hemáceas na urina provavelmente estavam relacionadas à doença renal, e não houve diferença na frequência de hematúria entre os grupos de estudo. A presença de hematúria tem sido relacionada com glomerulonefrites proliferativas ou crescênticas. Foagzzi e colaboradores (2005) compararam 52 pacientes com glomerulonefrite proliferativa (GNP) com 48 pacientes com glomerulonefite não proliferativa (não-GNP) e identificaram que pacientes com GNP apresentaram maior frequência de hematúria assim como maior número de hemáceas no sedimento urinário. Entretanto, 67% dos pacientes com não-GNP tinham hemáceas no sedimento urinário, porém em número significativamente menor quando quantificadas em campo de grande aumento no referido estudo ($764,2 \pm 720,4$ GNP vs $95,0 \pm 137,1$, $P = 0,0001$), sugerindo que a presença ou ausência de hematúria pode não ser suficiente no diagnóstico diferencial das glomerulonefrites (FOGAZZI et al., 2005). Ademais, outros (FOGAZZI et al.,

2005) estudos demonstraram que a hematúria microscópica é comum em glomerulopatias não exsudativas. Em estudo envolvendo 19,895 pacientes submetidos à biópsia renal, cerca de metade dos pacientes com LM, GESF e GNM apresentaram hematúria microscópica (42%, 53% e 53%, respectivamente) (YUSTE et al., 2016). Waldman e colaboradores (2007) avaliaram 95 adultos com LM e evidenciaram hematúria microscópica em 29% dos pacientes, enquanto Rydel e colaboradores (1995) relataram esta alteração em 37% das análises do sedimento urinário de 81 pacientes com GESF (RYDEL et al., 1995; WALDMAN et al., 2007).

Em série com 249 pacientes hospitalizados com diagnóstico de LRA, um escore do sedimento urinário baseado da frequência de cilindros granulosos e células epiteliais foi avaliado. O escore foi preditor de NTA e esteve associado com a gravidade no momento do diagnóstico e piora da LRA considerando critérios de AKIN para diagnóstico e estratificação de LRA (PERAZELLA et al., 2008). Porém, o escore utilizado nesses estudos não foram testados em pacientes com glomerulopatias. No presente estudo, células epiteliais estiveram presente em todos os pacientes e o achado de cilindros granulosos não foi capaz de diferenciar entre pacientes com e sem NTA histologicamente definida. Fogazzi e colaboradores não encontraram diferença na frequência ou número de cilindros granulosos entre pacientes com ou sem glomerulonefrite proliferativa (GNP), entretanto os pacientes com GNP apresentaram frequência e número maior de CETRs e cilindros epiteliais em comparação com os pacientes sem GNP (FOGAZZI et al., 2005). No estudo citado os achados não foram correlacionados com alterações histológicas de NTA, ademais a lesão aguda ao epitélio tubular renal pode ocorrer no contexto de glomerulonefrites exsudativas levando ao achado de CETRs e cilindros granulosos no sedimento urinário desses pacientes, limitando seu uso para diagnóstico diferencial de LRA em pacientes com glomerulopatias. Apesar das limitações citadas, a análise do sedimento urinário ainda é preconizada como exame inicial importante no diagnóstico diferencial das doenças renais sendo que a avaliação do sedimento urinário por nefrologista treinado pode ter acurácia superior ao exame de rotina realizado em larga escala na rotina laboratorial.

Tsai e colaboradores avaliaram o desempenho da análise urinária em 26 pacientes com diagnóstico de LRA comparando análise do sedimento realizada por nefrologista e por laboratório certificado. O nefrologista que realizou a análise do sedimento urinário referiu diagnóstico correto em 24/26 (92,3%) pacientes quando a suspeita diagnóstica foi baseada na análise do sedimento feita por ele mesmo, porém quando era utilizado o relatório de análise da rotina laboratorial o mesmo nefrologista só diagnosticou corretamente 6/26 (23,1%) dos casos; esses dados foram semelhantes quando um segundo nefrologista foi solicitado a avaliar os casos com base nas duas análises do sedimento (TSAI et al., 2005). A identificação de CETRs, cilindros granulosos, cilindros de células epiteliais e hemáceas dismórficas foi maior na análise feita pelo nefrologista. Esses dados sugerem que a análise minuciosa e direcionada do sedimento urinário por nefrologista treinado em casos de alteração da função renal pode fornecer informações adicionais importantes para diagnóstico diferencial etiológico na LRA. Adicionalmente, a utilização de técnicas de citocentrifugação e coloração por Papanicolau podem facilitar a diferenciação dos componentes do sedimento urinário, sendo uma técnica simples e de baixo custo (EGGENSPERGER et al., 1989). Neste estudo, a análise do sedimento foi realizada em rotina laboratorial envolvendo pacientes ambulatoriais, portanto elementos importantes para o diagnóstico podem não ter sido identificados ou mencionados.

Atualmente os critérios diagnósticos para LRA são baseados nos níveis de creatinina sérica e débito urinário que apresentam diversas limitações. Fatores como idade, sexo, massa muscular, estado nutricional e de hidratação podem interferir nos níveis séricos de creatinina limitando a acurácia para estimar a taxa de filtração glomerular (COCA; PARIKH, 2008). Portanto, os últimos anos foram marcados pela busca da identificação de marcadores não invasivos com capacidade de diagnosticar precocemente a LRA, que tenham alta sensibilidade e especificidade para NTA e que estejam relacionados com prognósticos. Neste trabalho avaliamos o papel dos marcadores NGAL, KIM-1, IL-18 e β 2M no diagnóstico da NTA e a correlação desses marcadores com lesão histológica de NTA em pacientes com SNO.

Inicialmente avaliamos se havia correlação entre a intensidade de NTA definida histologicamente com as concentrações urinárias de KIM-1, NGAL, IL-18 e β 2M. Demonstramos que há correlação positiva entre a intensidade de lesão tubular com as concentrações urinárias de KIM-1, NGAL e β 2M, mas não de IL-18. A patogênese da NTA em pacientes com SNO não é bem estabelecida e pode divergir da NTA isquêmica ou nefrotóxica, especialmente pelo tempo de lesão que pode ser determinado nestes, mas em pacientes com doenças glomerulares nem sempre podemos determinar quando ocorreu a lesão tubular renal e mais importante, se este é um evento em contínuo ou consequência de episódio único de isquemia ou nefrotoxicidade. Apesar dessas limitações, demonstramos que as concentrações elevadas de KIM-1, NGAL e β 2M na urina de pacientes com SNO refletem NTA e sua intensidade de lesão. Estudos prévios têm avaliado o papel da IL-18 e as citocinas do inflamossoma na fisiopatologia de doenças glomerulares. Hu e colaboradores encontraram aumento na expressão de IL-18 em rins de pacientes com nefrite lúpica proliferativa, e achados semelhantes foram demonstrados em pacientes com vasculite associada a anticorpo anticitoplasma de neutrófilo (HEWINS et al., 2006; HU et al., 2010). A expressão dessa citocina nesses estudos foi evidenciada não só em células tubulares renais, mas também em glomérulos e podócitos. Portanto, como nosso trabalho envolveu pacientes com nefrite lúpica, glomerulonefrites proliferativas, a presença de IL-18 na urina pode ser proveniente de lesão a outros compartimentos renais que não células de túbulos proximais interferindo na correlação das concentrações urinárias desse marcador com os achados de lesão histológica de NTA e suas maiores concentrações nos pacientes com glomerulonefrite proliferativa em relação ao grupo controle. Apesar dos trabalhos prévios terem demonstrado a expressão dos marcadores para LRA em modelos experimentais de NTA e em biópsias renais de pacientes com LRA, os estudos que avaliaram a correlação das concentrações urinárias dessas proteínas com a intensidade de lesão histológica são escassos em humanos, visto que a LRA por NTA não constitui indicação de biópsia renal.

Diversos estudos foram publicados avaliando o desempenho de NGAL, KIM-1 e IL-18 como marcador precoce na LRA em condições de isquemia (ex.: pós operatório de cirurgia cardíaca) e tóxica (ex.: nefropatia por contraste) (VANMASSENHOVE et al., 2013). Entretanto, o papel desses marcadores em paciente com SNO não está elucidado. Para avaliar o desempenho dos marcadores no diagnóstico diferencial entre NTA e glomerulonefrite proliferativa em pacientes com SNO utilizamos duas abordagens: primeiramente avaliando NTA definida histologicamente quando presente na biópsia renal em pacientes com e sem glomerulonefrites proliferativas; e então avaliando LRA definida clinicamente pelos critérios de KDIGO,

A avaliação dos marcadores na urina de pacientes com SNO conta com algumas limitações devido à grande quantidade de proteína excretada na urina. Todos os pacientes envolvidos neste estudo encontravam-se em atividade de doença e com SNO no momento da biópsia e da coleta da urina, com proteinúria média em urina de 24 horas de 7576 ± 1170 mg. A proteinúria maciça isoladamente pode estar relacionada com maior excreção de proteínas de baixo peso molecular na urina independente da presença de lesão aguda ao epitélio tubular. Proteínas de baixo peso molecular são filtradas pelo glomérulo e reabsorvidas pelas células tubulares proximais. As proteínas megalina e cubilina são receptores de endocitose presentes na membrana apical das células do túbulo proximal renal e são responsáveis pela reabsorção de proteínas de baixo peso molecular como proteína ligadora do retinol, proteína ligadora de vitamina D, lizosima e β 2-microglobulina, e também foi demonstrado que a megalina tem alta afinidade por NGAL e é mediador da endocitose desta proteína por células epiteliais (HVIDBERG et al., 2005; LEHESTE et al., 1999),

Portanto, em condições de proteinúria maciça pode haver saturação desses receptores das células dos túbulos proximais renais diminuindo a reabsorção da NGAL filtrada levando a maior excreção e elevação nas concentrações de uNGAL sem que haja lesão aguda ao epitélio tubular (NEJAT et al., 2012). Em modelo experimental de proteinúria induzida por sobrecarga protéica, foi observado aumento transitório na excreção de uNGAL e aumento

na expressão tecidual e excreção de uKIM-1 (VAN TIMMEREN et al., 2006) (NEJAT et al., 2012). Bolignano (2007) reportou concentrações elevadas de uNGAL em pacientes com proteinúria quando comparado a controles sadios (BOLIGNANO et al., 2007). No presente trabalho, não houve correlação significativa entre as concentrações dos marcadores analisados e proteinúria em urina de 24 horas, esse dado sugere que nos pacientes analisados, a elevação das concentrações de uNGAL, uKIM-1, uIL-18 e u β 2-microglobulina não pode ser justificada pela proteinúria per si. Ribichini et al (2013) demonstraram menor elevação nas concentrações urinárias de KIM-1 e NGAL em pacientes que usaram corticoide em estudo que avaliou estes marcadores para diagnóstico de nefropatia por contraste. No presente trabalho, o uso de corticoide foi relatado em apenas dez dos quarenta pacientes, não sendo possível avaliar se o uso de corticoterapia poderia alterar a exceção destes marcadores em pacientes com SNO e NTA. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações dos marcadores avaliados entre os pacientes que estavam em uso de corticoide em relação aos demais pacientes.

Quando categorizamos os pacientes de acordo com a presença ou ausência de NTA definida histologicamente, as concentrações dos marcadores foram significativamente maiores nos pacientes com NTA, exceto para IL-18, sendo que não havia diferença na taxa de excreção de proteína na urina entre esses pacientes. Assim, acreditamos que a elevação nas concentrações urinárias dos marcadores está relacionada com lesão aguda ao epitélio tubular. Ademais, a elevação das concentrações dos marcadores avaliados mesmo em pacientes com evidência de lesão histológica de NTA em apenas 10% da cortical renal representada na biópsia renal sugere que mesmo lesões consideradas leves já podem refletir lesão subletal mais extensa que não pode ser evidenciada na microscopia óptica convencional e levar a repercussão na função renal. Nos pacientes analisados neste trabalho, encontramos que as concentrações urinárias de KIM-1, NGAL foram significativamente elevadas nos pacientes com LRA. Estes dados associados ao achado de que esses marcadores refletem a intensidade de lesão histológica de NTA e também estão

aumentadas nos pacientes que apresentam sinais de NTA na biópsia renal sugere que a estimativa da concentração de KIM-1, NGAL em amostra isolada de urina pode ser útil no diagnóstico de LRA em pacientes com síndrome nefrótica.

As concentrações urinárias de NGAL e KIM-1 foram maiores nos pacientes com NTA associada a doença glomerular não proliferativa quando comparado com pacientes com glomerulonefrite proliferativa, porém nenhuma diferença foi encontrada nos outros marcadores. Por outro lado, foi observada maior concentração urinária de IL-18 nos pacientes com glomerulonefrite proliferativa em comparação aos pacientes do grupo controle sem lesão glomerular proliferativa ou NTA.

Estudos prévios demonstraram a indução de NGAL em células epiteliais no contexto de processo inflamatório; e no rim, existe expressão precoce de NGAL em células de túbulos proximais renal em estágios iniciais de lesão por isquemia-reperfusão (MISHRA, 2003). Em pacientes com glomerulonefrite lúpica, a excreção de NGAL na urina foi capaz de prever atividade renal da doença com acurácia melhor que os títulos de anticorpo anti-DNA dupla hélice, e as concentrações urinárias de NGAL parecem correlacionar com atividade de doença e estão elevados quando há recidiva (TORRES-SALIDO et al., 2014). Em modelo experimental de glomerulonefrite mediada por anticorpo, camundongos que não expressam NGAL apresentaram lesão histopatológica atenuada e disfunção renal menos severa quando comparado aos animais que produzem NGAL (PAWAR et al., 2012). Entretanto, Eller e colaboradores sugeriram que NGAL exerce efeito protetor em modelo murinho de nefrite nefrotóxica por ser capaz de induzir apoptose de células inflamatórias que estariam mediando a lesão renal (ELLER et al., 2013).

A ausência de expressão de KIM-1 em rins normais e o achado de expressão desta proteína em células de túbulo proximal em condições de isquemia ou toxicidade sugerem que este é um marcador específico para lesão ao epitélio tubular renal e suas concentrações urinárias estão elevadas na LRA associada a NTA em comparação a outras doenças renais (HAN et al., 2002; VAN TIMMEREN et al., 2007). Porém, os estudos que avaliaram a expressão

de KIM-1 em pacientes com glomerulopatia demonstra que a expressão de KIM-1 está relacionada a presença de fibrose intersticial (VAN TIMMEREN et al., 2007). No presente trabalho os pacientes que apresentavam fibrose intersticial acometendo mais que 30% da área de cortical representada na biópsia renal foram excluídos e houve correlação entre as concentrações urinárias desta marcador com a intensidade histológica de NTA. Lieberthal e colaboradores demonstraram que NGAL e KIM-1 urinários foram capazes de distinguir atividade de doença renal da remissão em pacientes com vasculite associada a ANCA, mas os critérios utilizados para definir atividade renal foram hematúria, presença de cilindros hemáticos e/ou elevação da creatinina sérica em > 30%, e apenas 2 pacientes tinham biópsia renal realizada na época da definição de atividade renal da doença. Então, não é possível definir se as maiores concentrações de KIM-1 e NGAL urinários nos pacientes em atividade de doença renal estejam associadas à NTA ou atividade glomerular da doença (LIEBERTHAL et al., 2013).

Acreditamos que as elevadas concentrações de NGAL e KIM-1 na urina de pacientes com NTA no presente estudo quando comparada com os pacientes com glomerulonefrite proliferativa pode ser atribuída a lesão tubular aguda mais severa nos pacientes com NTA, e não a inibição da expressão dessa proteína em pacientes com glomerulonefrites proliferativas. Estudos prospectivos com maior número de pacientes seriam úteis para definir o papel da NGAL e KIM-1 e avaliar possíveis ponto de corte da concentração urinária desses marcadores para diagnóstico diferencial de NTA pacientes com SNO. A avaliação de um maior números de pacientes seria necessário para definir o papel das IL-18 e β 2M urinárias no diagnóstico diferencial da NTA em pacientes com SNO, visto que um grande número de pacientes apresentaram valores abaixo do limite de detecção de método, constituindo uma importante limitação neste estudo.

Os critérios de KDIGO para diagnóstico de LRA foram aplicados em 31 pacientes. Entretanto, além das limitações citadas anteriormente referente ao uso da creatinina sérica no diagnóstico de LRA, a necessidade de valor basal para aplicar os critérios da KDIGO inviabiliza o uso deste critério em alguns

pacientes, reforçando a necessidade de novos marcadores mais sensíveis e específicos para LRA associada a NTA. Nos pacientes analisados neste trabalho, encontramos que as concentrações urinárias de KIM-1, NGAL foram significativamente elevadas nos pacientes com LRA. Estes dados associados ao achado de que esses marcadores refletem a intensidade de lesão histológica de NTA e também estão aumentadas nos pacientes que apresentam sinais de NTA na biópsia renal sugerem que a estimativa da concentração de KIM-1, NGAL em amostra isolada de urina pode ser útil no diagnóstico de LRA em pacientes com SNO.

Além da importância do diagnóstico de NTA, estes marcadores indicam pacientes com lesão tubulointersticial em atividade. Está bem definida que a lesão tubulointersticial crônica é um importante marcador prognóstico nas glomerulopatias, entretanto, o impacto da LRA na história natural da doença não está definido (PEI; CATTRAN; GREENWOOD, 1992; WALSH et al., 2010). A proteinúria esteve associada à resposta antioxidativa inapropriada, lesão e apoptose em células epiteliais tubulares renais em modelos experimentais de necrose tubular aguda. Apesar das células epiteliais tubulares proximais serem capazes de regenerar e restaurar a função renal, estudos recentes têm demonstrado que a LRA está associada a aumento no risco de desenvolvimento de DRC (COCA; SINGANAMALA; PARIKH, 2012). A persistência da expressão de KIM-1 foi associada a fibrose intersticial e progressão de doença renal em modelo lesão renal (HUMPHREYS et al., 2013). Em animais submetidos à lesão renal por isquemia-reperfusão, os genes para KIM-1 e NGAL estavam supra regulados mesmo após 28 dias da lesão, e foram associados a presença de fibrose intersticial, sugerindo que estes marcadores, podem indicar transição entre LRA e DRC (KO et al., 2010). Alterações fenotípicas no epitélio tubular e o trânsito anômalo de moléculas para compartimento intersticial renal associados a NTA pode contribuir para progressão de doença renal (YANG et al., 2010, 2015). Portanto, o impacto da NTA no prognóstico das glomerulopatias não está estabelecido, e entender os mecanismos de lesão da NTA em pacientes com síndrome nefrótica pode ser útil para estabelecer estratégias terapêuticas de prevenção das DRC. Assim,

os marcadores urinários de LRA que denotam que há lesão aguda no epitélio tubular nesses pacientes podem ser úteis para estudos futuros que avaliem se a alta excreção dessas proteínas na urina de pacientes com SNO como consequência da NTA está associada a pior prognóstico e maior risco de progressão para EFDR.

Para definir se há diferença no perfil de proteínas excretadas na urina de pacientes com SNO com NTA ou lesão proliferativa glomerular utilizamos a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Observamos que há diferença na excreção de proteínas na urina de pacientes com lesão glomerular proliferativa em comparação aos pacientes sem lesão proliferativa com ou sem NTA; e na excreção de proteínas no grupo controle sem lesão proliferativa ou NTA quando comparado aos pacientes com essas alterações. Entretanto, esses achados foram encontrados quando analisadas amostras em pools e não foram semelhantes quando avaliadas amostras de pacientes isoladamente. A utilização de pool de amostras foi utilizada em trabalho prévio demonstrando ser estratégia útil em análise inicial na busca de biomarcadores; especialmente quando há heterogeneidade na patologia estudada, como nos pacientes avaliados neste trabalho que apresentam diferentes glomerulopatias, a análise em pool pode facilitar a identificação de marcadores em comum (HEWITT, 2004; SIGDEL et al., 2009).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma ferramenta importante na separação de proteínas de amostras complexas, sendo uma forma preparatórias para posterior análise e identificação das proteínas por espectrometria de massas. O proteoma urinário humano contém mais de 1500 proteínas e em doenças renais como SNO há perda de quantidades maciças de proteínas na urina, proteinúria em 24 horas maior que 3,500 mg quando valor norma é inferior a 150 mg, aumentando a complexidade da amostra a ser analisada.

Em estudo realizado com urina de pessoas saudáveis, Adachi e colaboradores (2006) analisaram o proteoma urinário em amostras individuais e de pools, separadas por 1D SDS-PAGE ou cromatografia líquida

previamente à realização da espectrometria de massas. Maior número de proteínas foram identificadas nas amostras de pools (1,055 proteínas) e houve sobreposição importante entre as proteínas identificadas nas amostras individuais e em pools. Apesar deste achado que demonstra que o proteoma urinário individual tem distribuição típica, o proteoma urinário pode variar, incluindo diferenças no mesmo indivíduo em momentos diferentes (ADACHI et al., 2006). Adicionalmente, a presença de uma proteína na urina que pode ser usada como biomarcador para determinada condição patológica, não necessariamente representará padrão dicotômico de ausente ou presente, podendo sofrer variação nas suas concentrações de acordo com a presença ou ausência da patologia analisada. Assim, acreditamos que na análise em pool permitiu a identificação de uma fração proteica que está presente em maior abundância em pacientes sem NTA, que não foi identificada na análise individual por variações inter-indivíduos na excreção dessa proteína.

Chama atenção que a fração proteica diferencialmente encontrada nos pools do grupo controle sem lesão aguda ao epitélio tubular não foi identificada nos outros dois grupos de estudo que constituíam glomerulopatias com fisiopatologia distintas, portanto analisamos os dados dos pacientes cujas amostras de urina foram utilizadas para a formação dos pools e observamos que os pacientes do grupo GNP apresentavam também NTA significativa na biópsia renal. Assim, uma hipótese para o desaparecimento da fração proteica nestes dos grupos distintos de paciente é que esta diferença é decorrente da presença da NTA nos outros dois grupos de estudos.

Todavia, uma limitação importante quando utilizamos a 1D SDS-PAGE para análise diferencial no perfil de excreção de proteínas é que proteínas mais abundantes podem impedir a visualização de diferença no perfil de excreção de proteínas menos abundantes presentes na mesma faixa de peso molecular. Na SNO, há perda de grande quantidade de proteínas com predominância da albumina. A depleção de albumina da amostra previamente à realização da eletroforese constitui uma alternativa que permitiria a melhor resolução e visualização de proteínas menos abundantes (FILIP et al., 2015). Entretanto,

observamos que após a depleção houve redução na intensidade de bandas que não correspondem ao peso molecular da albumina. A albumina é a proteína mais abundante do plasma humano e é importante carreador de lipídeos, minerais, drogas e metabólitos. Assim, a depleção de albumina da amostra pode ocasionar perda de outras proteínas ligadas à albumina. Ademais, estudos prévios demonstraram a presença de agregados, isoformas e produtos da degradação da albumina na urina de pacientes com SNO, sendo que a degradação da albumina não é uniforme (CANDIANO et al., 2006). A análise em 1D SDS-PAGE da urina de 10 pacientes com síndrome nefrótica seguida de western blot para albumina humana demonstrou diferentes graus de degradação da albumina. No mesmo estudo citado, foram analisados em gel de poliacrilamida de duas dimensões pool de urina de pacientes com SNO e pacientes com anormalidades urinárias mas sem SNO. Os autores identificaram 16 spots que estavam diferencialmente expressos na urina de pacientes com SNO dos quais 12 correspondiam a fragmentos de albumina após identificação por espectrometria de massas (MAGISTRONI et al., 2009). Achado similar foi descrito por Candiano e colaboradores (2006) que observaram a presença de fragmentos de albumina com pesos moleculares variando de 20 a 64 kD. Portanto, a depleção de albumina pode ter levado a redução de identificação de bandas na eletroforese por perda de outras proteínas ou fragmentos de proteínas carreados pela albumina ou pela depleção de fragmentos da degradação da albumina na urina desses pacientes.

Outra limitação observada na análise diferencial da expressão de proteínas na eletroforese em 1D SDS-PAGE é que nem sempre uma banda que se apresenta em maior intensidade corresponderá a um maior número de proteínas. Sun e colaboradores (2005) estudaram o proteoma urinário de voluntários saudáveis por 3 abordagens diferentes incluindo 1D SDS-PAGE seguida por espectrometria de massas. Na eletroforese unidimensional o gel foi dividido em 30 frações para digestão das proteínas e análise proteômica. Um maior número de proteína pôde ser identificado em fração que havia menor concentração de proteínas (SUN et al., 2005).

A identificação de biomarcadores em condições patológicas permite diagnóstico não invasivo, monitorização de toxicidade por drogas ou resposta terapêutica, avaliação de progressão de doença entre outras aplicabilidades. Um biomarcador pode constituir teste qualitativo estando presentes ou ausentes em condições patológicas, por exemplo; porém muitos marcadores podem ter suas expressões reduzidas ou aumentadas sendo possível diagnóstico ou estadiamento de riscos a partir de concentrações diferentes.

A identificação de uma banda diferencialmente expressa na eletroforese de urina de pacientes com SNO sem lesão proliferativa ou NTA sugere neste estudo que a perda de excreção de proteína ou produto de degradação de proteína está associada a lesão tubular e/ou proliferação, visto que mais da metade (5/9) dos pacientes com lesão proliferativa apresentavam evidência histológica de NTA histologicamente definida. Contudo, com a metodologia utilizada não podemos identificar proteínas que estejam presentes nos diferentes grupos de estudo mas em concentrações diferentes. Os últimos anos foram marcados por notável avanço nas técnicas de espectrometria de massas, a proteômica quantitativa utiliza marcadores para os peptídeos permitindo a quantificação destes ao passo que são identificados. Sigdel e colaboradores avaliaram pacientes com disfunção do enxerto com diagnóstico histológico confirmado, e com a realização da proteômica quantitativa foi possível identificar proteínas que estavam presentes em maior abundância nos pacientes com rejeição aguda e posteriormente validaram três das proteínas identificadas por meio de ensaio imunoenzimático (SIGDEL et al., 2010). Portanto, acreditamos que a identificação das proteínas presentes nas frações diferencialmente encontradas neste trabalho pode contribuir para apontar possíveis novos marcadores para a lesão aguda ao epitélio tubular renal.

7. CONCLUSÃO

- A análise do sedimento urinário realizada em rotina de laboratório não foi capaz de diferenciar NTA de glomerulonefrite proliferativa em pacientes com síndrome nefrótica;
- As concentrações urinárias de Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule 1 (KIM-1) e beta 2-microglobulina correlacionam com lesão histológica de NTA;
- As concentrações urinárias de KIM-1 e NGAL foram capazes de distinguir pacientes com e sem LRA, mesmo na presença de síndrome nefrótica;
- As dosagens de NGAL e KIM-1 urinários pode ser úteis no diagnóstico diferencial entre NTA e glomerulonefrite proliferativa em pacientes com síndrome nefrótica;
- A presença de lesão proliferativa glomerular ou NTA resulta no desaparecimento de uma fração protéica de 35 kDa, e a lesão proliferativa, em redução na excreção protéica de fração de 28 kDa da urina de pacientes com síndrome nefrótica;
- O estudo dessas frações protéicas pode contribuir para novas estratégias no diagnóstico diferencial da LRA em pacientes com síndrome nefrótica.

REFERÊNCIAS

ADACHI, J. et al. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. **Genome Biology**, v. 7, n. 9, p. R80–R80.16, 2006.

AN, S. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) may play a protective role against rats ischemia/reperfusion renal injury via inhibiting tubular epithelial cell apoptosis. **Renal Failure**, v. 35, n. 1, p. 143–9, 2013.

BAGCHI, S. et al. Pattern of biopsy-proven kidney disease in the elderly in a tertiary care hospital in India: a clinicopathological study. **International Urology and Nephrology**, v. 48, n. 4, p. 553–560, 2016.

BAGSHAW, S. M. et al. A comparison of observed versus estimated baseline creatinine for determination of RIFLE class in patients with acute kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 2739–2744, 2009.

BAGSHAW, S. M. et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 3, p. 452–461, 2010.

BAZZI, C. et al. Urinary excretion of IgG and alpha(1)-microglobulin predicts clinical course better than extent of proteinuria in membranous nephropathy. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 2, p. 240–248, 2001.

BAZZI, C. et al. Fractional excretion of IgG predicts renal outcome and response to therapy in primary focal segmental glomerulosclerosis: A pilot study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 41, n. 2, p. 328–335, 2003.

BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **The Lancet**, v. 380, n. 9843, p. 756–766, 2012.

BENNETT, M. R. et al. NGAL distinguishes steroid sensitivity in idiopathic nephrotic syndrome. **Pediatric Nephrology**, v. 27, n. 5, p. 807–812, 2012.

BOLIGNANO, D. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 1, p. 414–416, 2007.

BRENNER, B. M.; RECTOR, F. C. **Brenner & Rector's the kidney**. 7th. ed. [s.l: s.n.].

BROCKLEBANK, T.; COOPER, E. H.; RICHMOND, K. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteinuria in various renal diseases of childhood. **Pediatric Nephrology**, v. 5, n. 4, p. 371–375, 1991.

BROWN, J. R. et al. Hospital Mortality in the United States following Acute Kidney Injury. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

CANDIANO, G. et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 3139–48, 2006.

CHAMBERLAIN, M. J.; PRINGLE, A.; WRONG, O. M. Oliguric renal failure in the nephrotic syndrome. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 35, n. 138, p. 215–235, 1966.

CHEN, T. et al. Acute kidney injury in adult idiopathic nephrotic syndrome. **Renal Failure**, v. 33, n. 2, p. 144–149, 2011.

CHERTOW, G. et al. Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 11, p. 3365–3370, 2005.

CHRISTENSEN, E. I.; BIRN, H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 280, p. 562–573, 2001.

CHU, R. et al. Assessment of KDIGO definitions in patients with histopathologic evidence of acute renal disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 7, p. 1175–1182, 2014.

CLARKSON, M. R. et al. Acute interstitial nephritis: Clinical features and response to corticosteroid therapy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 11, p. 2778–2783, 2004.

COCA, S. G.; PARIKH, C. R. Urinary biomarkers for acute kidney injury: Perspectives on translation. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 2, p. 481–490, 2008.

COCA, S. G.; SINGANAMALA, S.; PARIKH, C. R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Kidney International**, v. 81, n. 5, p. 442–448, 2012.

DELANGHE, J.; SPEECKAERT, M. Preanalytical requirements of urinalysis. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 1, p. 89–104, 2014.

DIETERLE, F. et al. Urinary clusterin, cystatin C, β 2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 463–469, 2010.

DING, H. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. **Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, p. 227–234, 2007.

DU BUF-VEREIJKEN, P. W. G.; BRANTEN, A. J. W.; WETZELS, J. F. M. Idiopathic membranous nephropathy: Outline and rationale of a treatment strategy. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 46, n. 6, p. 1012–1029, 2005.

EDDY, A. A. Proteinuria and interstitial injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 2, p. 277–281, 2004.

EGGENSPERGER, D et al. Cytodiagnostic Urinalysis Three Years Experience with a New Laboratory Test. **American Journal of Clinical Pathology** v. 91, p. 202–206, 1989.

ELLER, K. et al. Lipocalin-2 Expressed in Innate Immune Cells Is an Endogenous Inhibitor of Inflammation in Murine Nephrotoxic Serum Nephritis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

ENDRE, Z. H.; PICKERING, J. W.; WALKER, R. J. Clearance and beyond: the complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 301, n. 4, p. F697-707, 2011.

FAIRLEY, K. F.; BIRCH, D. F. Hematuria: A simple method for identifying glomerular bleeding. **Kidney International**, v. 21, n. 1, p. 105–108, 1982.

FILIP, S. et al. Comparison of depletion strategies for the enrichment of low-Abundance proteins in urine. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.

FIORENTINO, M. et al. Renal biopsy in 2015 - From epidemiology to evidence-based indications. **American Journal of Nephrology**, v. 43, n. 1, p. 1–19, 2016.

FOGAZZI, G. B. et al. Urinary sediment features in proliferative and non-proliferative glomerular diseases. **Journal of Nephrology**, v. 18, n. 6, p. 703–710, 2005.

FOGAZZI, G. B.; VERDESCA, S.; GARIGALI, G. Urinalysis: Core Curriculum 2008. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 51, n. 6, p. 1052–1067, 2008.

GIPSON, D. S. et al. Inpatient health care utilization in the united states among children, adolescents, and young adults with nephrotic syndrome. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 61, n. 6, p. 910–917, 2013.

GONG, L. et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Protects Renal Tubular Epithelial Cell in Ischemic/Reperfusion Injury Rats via Apoptosis-Regulating Proteins. **Renal Failure**, v. 34, n. 6, p. 777–783, 2012.

GONZÁLEZ, E. et al. Early steroid treatment improves the recovery of renal function in patients with drug-induced acute interstitial nephritis. **Kidney International**, v. 73, n. 8, p. 940–946, 2008.

HAASE, M. et al. Urinary interleukin-18 does not predict acute kidney injury after adult cardiac surgery: a prospective observational cohort study.

Critical Care, v. 12, n. 4, p. R96, 2008.

HAASE, M. et al. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 54, n. 6, p. 1012–1024, 2009.

HAASE, M. et al. The Outcome of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)-positive Subclinical Acute Kidney Injury: A Multicenter Pooled Analysis of Prospective Studies. **Journal American College Cardiology**, v. 57, n. 17, p. 1752–1761, 2016.

HAN, W. K. et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**, v. 62, n. 1, p. 237–244, 2002.

HEWINS, P. et al. IL-18 is upregulated in the kidney and primes neutrophil responsiveness in ANCA-associated vasculitis. **Kidney International**, v. 69, n. 3, p. 605–15, 2006.

HEWITT, S. M. Discovery of Protein Biomarkers for Renal Diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 7, p. 1677–1689, 2004.

HSU, R. K. et al. Temporal Changes in Incidence of Dialysis-Requiring AKI. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 1, p. 37–42, 2013.

HU, D. et al. Expressions of IL-18 and its binding protein in peripheral blood leukocytes and kidney tissues of lupus nephritis patients. **Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 7, p. 717–721, 2010.

HUMPHREYS, B. D. et al. Chronic Epithelial Kidney Injury Molecule-1 Expression Causes Kidney Inflammation and Fibrosis. **Journal Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 4023–4035, 2013.

HVIDBERG, V. et al. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. **FEBS Letters**, v. 579, n. 3, p. 773–777, 2005.

ICHIMURA, T. 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 4135–4142, 1998.

ICHIMURA, T. et al. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 5, p. 1657–1668, 2008.

Intensity of Renal Support in Critically Ill Patients with Acute Kidney Injury. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 1, p. 7–20, 2008.

JENNETE, J. C. et al. **Heptinstall's Pathology of the Kidney**. 6th. ed. 2v. [s.l: s.n.].

KAYALI, F. et al. Venous thromboembolism in patients hospitalized with nephrotic syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 3, p. 226–230, 2008.

KELLUM, J. et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Kidney International supplements**, v. 2, p. 1–138, 2012.

KILIŚ-PSTRUSIŃSKA, K. et al. Interleukin-18 in Urine and Serum of Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 31, p. 122–126, 2008.

KITIYAKARA, C. et al. Independent associations of urine neutrophil gelatinase–associated lipocalin and serum uric acid with interstitial fibrosis and tubular atrophy in primary glomerulonephritis. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, p. 111, abr. 2016.

KJELDSEN, L. et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 14, p. 10425–10432, 1993.

KO, G. J. et al. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. **American Journal of Physiology. Renal physiology**, v. 298, n. 6, p. F1472–F1483, 2010.

KODNER, C. Diagnosis and Management of Nephrotic Syndrome in Adults. 2016. **American Family Physician**, v. 96, n. 6, p. 479-485, 2016.

LEHESTE, J.-R. et al. Megalin Knockout Mice as an Animal Model of Low Molecular Weight Proteinuria. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1361–1370, 1999.

LIEBERTHAL, J. G. et al. Urinary biomarkers in relapsing antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. **Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 5, p. 674–683, 2013.

LIN, X. et al. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. **Journal of Nephrology**, v. 28, n. 1, p. 7–16, 2014.

LÓPEZ-GÓMEZ, J. M.; RIVERA, F. Renal biopsy findings in acute renal failure in the cohort of patients in the Spanish Registry of Glomerulonephritis. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 3, p. 674–681, 2008.

MAGISTRONI, R. et al. Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 5, p. 1672–1681, 2009.

MATSUMOTO, K.; KANMATSUSE. Elevated Interleukin-18 Levels in the Urine of Nephrotic Patients. **Nephron**, v. 88, n. 4, p. 334–339, 2001.

MELNIKOV, V.; FAUBEL, S. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1–and IL-18–mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 110, n. 8, p. 1083–1091, 2002.

MELNIKOV, V. Y. et al. Impaired IL-18 processing protects caspase-1 – deficient mice from ischemic acute renal failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 9, p. 1145–1152, 2001.

MISHRA, J. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 10, p. 2534–2543, 2003.

MISHRA, J. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. **Lancet**, v. 365, n. 9466, p. 1231–1238, 2005.

MISHRA, J. et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. **Pediatric Nephrology**, v. 21, n. 6, p. 856–863, 2006.

MORITA, Y. et al. Complement activation products in the urine from proteinuric patients. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 11, n. 4, p. 700–707, 2000.

MOURA, L. R. R.; FRANCO, M. F.; KIRSZTAJN, G. M. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adults: response to steroids and risk of renal failure. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 4, p. 475–480, 2015.

NEJAT, M. et al. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. **Kidney International**, v. 81, n. 10, p. 1254–1262, 2012a.

NEJAT, M. et al. Albuminuria increases cystatin C excretion: Implications for urinary biomarkers. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, Supl. 3, p. 96–103, 2012b.

NICKOLAS, T. L. et al. Diagnostic and prognostic stratification in the emergency department using urinary biomarkers of nephron damage: A multicenter prospective cohort study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 3, p. 246–255, 2012a.

NICKOLAS, T. L. . et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. **Annals of Internal Medicine**, v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012b.

OGRIZOVIC, S. S. et al. Tissue kidney injury molecule-1 expression in the prediction of renal function for several years after kidney biopsy. **Disease Markers**, v. 35, n. 5, p. 567–572, 2013.

PARIKH, C. R. et al. Urinary Interleukin-18 Is a Marker of Human Acute Tubular Necrosis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 43, n. 3, p. 405–414, 2004.

PARIKH, C. R. Urine IL-18 Is an Early Diagnostic Marker for Acute Kidney Injury and Predicts Mortality in the Intensive Care Unit. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 10, p. 3046–3052, 2005.

PARIKH, C. R. et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. **Kidney International**, v. 70, n. 1, p. 199–203, 2006.

PAWAR, R. D. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody-mediated nephritis in mice. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 5, p. 1620–1631, 2012.

PEI, Y.; CATTRAN, D. C.; GREENWOOD, C. Predicting chronic renal insufficiency in idiopathic membranous glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 42, n. 4, p. 960–966, 1992.

PÉPIN, M. N. et al. Diagnostic Performance of Fractional Excretion of Urea and Fractional Excretion of Sodium in the Evaluations of Patients With Acute Kidney Injury With or Without Diuretic Treatment. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 50, n. 4, p. 566–573, 2007.

PERAZELLA, M. A. et al. Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 6, p. 1615–1619, 2008.

PHILIPPONNET, C. et al. Kidney biopsy in the critically ill patient, results of a multicentre retrospective case series. **Minerva Anestesiologica**, v. 79, n. 1, p. 53–62, 2013.

PICKERING, J. W.; ENDRE, Z. H. Back-calculating baseline creatinine with MDRD misclassifies acute kidney injury in the intensive care unit. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 7, p. 1165–1173, 2010.

PICKERING, J. W.; RALIB, A. M.; ENDRE, Z. H. Combining creatinine and volume kinetics identifies missed cases of acute kidney injury following cardiac arrest. **Critical Care**, v. 17, n. 1, p. R7, 2013.

POLITO, M. G.; DE MOURA, L. A. R.; KIRSZTAJN, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: Clinical and pathological patterns based on 9617 native kidney biopsies. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 2, p. 490–496, 2010.

RAIJ, L. et al. Irreversible acute renal failure in idiopathic nephrotic syndrome. **American Journal of Medicine**, v. 61, n. 2, p. 207–214, 1976.

REN, H. et al. Assessment of urinary kidney injury molecule-1 and interleukin-18 in the early post-burn period to predict acute kidney injury for various degrees of burn injury. **BMC Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 142, 2015.

RHEAULT, M. N. et al. Increasing frequency of acute kidney injury amongst children hospitalized with nephrotic syndrome. **Pediatric Nephrology**, v. 29, n. 1, p. 139–147, 2014.

RIBICHINI, F. et al. Effects of prednisone on biomarkers of tubular damage induced by radiocontrast in interventional cardiology. **Journal of Nephrology**, v. 26, n. 3, p. 586–593, 2013.

RISDON, R. A.; SLOPER, J. C.; DE WARDENER, H. E. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. **Lancet**, v. 2, n. 7564, p. 363–366, 1968.

RODAMILANS, M. F. et al. Challenges in clinical-pathologic correlations: acute tubular necrosis in a patient with collapsing focal and segmental glomerulosclerosis mimicking rapidly progressive glomerulonephritis. **Renal Failure**, v. 32, n. 8, p. 1005–1008, 2010.

RYDEL, J. J. et al. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: Presentation, course, and response to treatment. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 25, n. 4, p. 534–542, 1995.

SCHRAMEK, P. et al. Value of urinary erythrocyte morphology in assessment of symptomless microhaematuria. **Lancet**, v. 2, n. 8675, p. 1316–1319, 1989.

SEO, M. S. et al. Effect of treatment on urinary kidney injury molecule-1 in IgA nephropathy. **BMC Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 139, 2013.

SHAO, X. et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: A meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

SIEW, E. D. et al. Commonly used surrogates for baseline renal function affect the classification and prognosis of acute kidney injury. **Kidney International**, v. 77, n. 6, p. 536–42, 2010.

SIGDEL, T. K. et al. Urinary peptidomic analysis identifies potential biomarkers for acute rejection of renal transplantation. **Clinical Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 103–113, 2009.

SIGDEL, T. K. et al. Shotgun proteomics identifies proteins specific for acute renal transplant rejection. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 4, n. 1, p. 32–47, 2010.

SOLEZ, K.; MOREL-MAROGER, L.; SRAER, J.-D. The morphology of “acute tubular necrosis” in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. **Medicine**, v. 58, n. 5, p. 362–376, 1979.

SUN, W. et al. Human urine proteome analysis by three separation approaches. **Proteomics**, v. 5, n. 18, p. 4994–5001, 2005.

TANG, S. et al. Apical proteins stimulate complement synthesis by cultured human proximal tubular epithelial cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 1, p. 69–76, 1999.

TANG, S. et al. Transferrin but not albumin mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 37, n. 1, p. 94–103, 2001.

TANTIPAIBOONWONG, P. et al. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1140–1149, 2005.

TAVARES, M. B. et al. Acute Tubular Necrosis and Renal Failure in Patients with Glomerular Disease. **Renal Failure**, v. 34, n. 10, p. 1252–1257, 2012.

THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J. V. Acute Renal Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 22, p. 1448–1460, 1996.

THOMAS, S. et al. Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 10, n. 4, p. 358–370, 2016.

TORRES-SALIDO, M. T. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for lupus nephritis. **Nephrol Dial Transplant**, p. 1–10, 2014.

TSAI, J. J. et al. Comparison and interpretation of urinalysis performed by a nephrologist versus a hospital-based clinical laboratory. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 46, n. 5, p. 820–829, 2005.

UEZONO, S. et al. Renal biopsy in elderly patients: a clinicopathological analysis. **Renal Failure**, v. 28, p. 549–555, 2006.

VAIDYA, V. S. et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 478–485, 2010.

VAN TIMMEREN, M. et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. **Journal of Pathology**, v. 212, n. 2, p. 209–217, 2007.

VAN TIMMEREN, M. M. et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 291, n. 2, p. F456–F464, 2006.

VANMASSENHOVE, J. et al. Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: An in-depth review of the literature. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 2, p. 254–273, 2013.

WAIKAR, S. S.; BONVENTRE, J. V. Creatinine kinetics and the definition of acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, p. 672–679, 2009.

WALDMAN, M. et al. Adult Minimal-Change Disease: Clinical Characteristics, Treatment, and Outcomes. **Clinical Journal American Society Nephrology**, v. 2, p. 445–453, 2007.

WALDMAN, M.; AUSTIN, H. A. Controversies in the treatment of idiopathic membranous nephropathy. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 5, n. 8, p. 469–479, 2009.

WALSH, M. et al. Histopathologic features aid in predicting risk for progression of IgA nephropathy. **Clinical Journal American Society Nephrology**, v. 5, n. 3, p. 425–430, 2010.

WASHBURN, K. K. et al. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 2, p. 566–572, 2008.

WOO, K. T. et al. Pattern of proteinuria in IgA nephritis by SDS-PAGE: clinical significance. **Clinical Nephrology**, v. 36, n. 1, p. 9–11, 1991.

YANG, L. et al. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. **Nature Medicine**, v. 16, n. 5, p. 535–543, 2010.

YANG, L. et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 4, p. 1620–1636, 2015.

YOKOMIZO, K. et al. Urinary Protein Analysis in Pre- and Postoperative Cancer Patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 19, p. 253–259, 2005.

YUSTE, C. et al. Haematuria on the Spanish Registry of Glomerulonephritis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19732, 2016.

ZENG, X. et al. Urinary β 2-Microglobulin Is a Good Indicator of Proximal Tubule Injury : A Correlative Study with Renal Biopsies. **Journal Biomarkers**, 2014.

ZHANG, A. et al. Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 41, 2016.

ZHANG, Y. et al. Comparative analysis of the human urinary proteome by 1D SDS-PAGE and chip-HPLC-MS/MS identification of the AACT putative urinary biomarker. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 32, p. 3395–3401, 2010.

ZOJA, C. et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- κ B activation. **Kidney International**, v. 53, n. 6, p. 1608–1615, 1998.