Camila Lima

Biomarcadores de função tubular, filtração e permeabilidade renal no perioperatório de transplante hepático: utilidade no diagnóstico e no prognóstico da injúria renal aguda

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Etienne Maria
Vasconcellos de Macedo

São Paulo

2021

Camila Lima

Biomarcadores de função tubular, filtração e permeabilidade renal no perioperatório de transplante hepático: utilidade no diagnóstico e no prognóstico da injúria renal aguda

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Etienne Maria
Vasconcellos de Macedo

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Camila

Biomarcadores de função tubular, filtração e permeabilidade renal no perioperatório de transplante hepático : utilidade no diagnóstico e no prognóstico da injúria renal aguda / Camila Lima. -- São Paulo, 2021.

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Etienne Maria Vasconcellos de Macedo.

Descritores: 1.Lesão renal aguda 2.Transplante de fígado 3.Biomarcadores 4.Cistatina-C 5.Interleucina-18 6.Lipocalina-2 7.Albuminas 8.Ureia 9.Quimiocina CCL2 10.Uromodulina

USP/FM/DBD-131/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

À minha família, em especial, à minha primogênita Isadora Dorado Cagnina, meu presente de Deus, ao meu esposo Alex Ferreira Cagnina, pelo suporte e incentivo sempre, aos meus pais, Cleusa Maria e Laérte Dorado, pela base, confiança e integridade, ao meu irmão Lucas Dorado de Lima, sempre presente em todos os momentos.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Etienne Maria Vasconcellos de Macedo, por seus ensinamentos, dedicação – mesmo em períodos de férias –, incentivos, contribuições e comprometimento nas orientações desta pesquisa.

Aos enfermeiros Eliana Pardelli e José Roberto, que, apesar das dificuldades, sempre se empenharam em me ajudar nas coletas do protocolo.

À Márcia e à Mirela, por sua colaboração e seu auxílio no processamento das amostras e pela disposição em sempre ajudar.

À equipe de enfermagem da Enfermaria do Fígado e da UTI do 9º. andar, por seu auxílio e pela dedicação na coleta de dados.

Às enfermeiras da coordenação, por seus telefonemas avisando sobre os transplantes de fígado, pelas orientações e pelo auxílio que proporcionaram à pesquisa.

Aos funcionários do HGSM, em especial, à Marli, à Enfa. Alessandra, à Enfa. Mara e ao Dr. Edésio.

À Dra. Luciana, por sua simpatia e pela ajuda na realização da pesquisa.

Ao Dr. Luis Marcelo e ao Dr. Luis Carneiro D’Albuquerque, por viabilizarem condições para a realização deste estudo.

À Dra. Leila e à Caroline, pelo auxílio prestado durante as dosagens.

A equipe do laboratório da Universidade de San Diego pelas dosagens em especial a Sucheta.

À FAPESP, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa. Aos pacientes e seus familiares, que voluntariamente contribuíram com sua participação no estudo.

A todos aqueles que, de alguma forma, possibilitaram a realização deste estudo e demonstraram desejo e sucesso na sua concretização.

Muito Obrigado.

*“A meta sempre se afasta de nós, pois quanto mais
Progredimos, mais nos tornamos conscientes de nossa fraqueza.
Mas é no esforço que encontramos a satisfação, não no êxito”.*
Mahatma Gandhi

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Introdução do objetivo principal	2
1.2	A injúria renal aguda e o transplante hepático	7
1.3	Biomarcadores para o diagnóstico de IRA	10
1.4	Artigos publicados sobre biomarcadores pela discente e pela docente resultantes desta defesa de Doutorado	12
2.	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo principal	19
2.2	Objetivos secundários	19
3.	PROTOCOLO DE ESTUDO	20
3.1	Desenho do estudo	21
3.2	Seleção da amostra.....	21
3.2.1	<i>Critérios de inclusão</i>	<i>21</i>
3.2.2	<i>Critérios de exclusão</i>	<i>21</i>
3.3	Cálculo da amostra.....	22
3.4	Aspectos éticos	22
3.5	Avaliação dos pacientes de transplante hepático	23
3.6	Coleta de dados do paciente.....	23
3.6.1	<i>Perioperatório</i>	<i>23</i>
3.6.2	<i>Durante a internação</i>	<i>24</i>
3.6.3	<i>Após a alta hospitalar</i>	<i>24</i>
3.7	Coleta específica do protocolo	25
3.7.1	<i>Coleta de material biológico e encaminhamento</i>	<i>25</i>

3.7.2	<i>Preparo do material para armazenamento</i>	26
3.7.3	<i>Encaminhamento do material para o Laboratório da Universidade de San Diego – Califórnia</i>	26
3.7.4	<i>Seleção do painel dos biomarcadores no estudo</i>	27
3.7.5	<i>Dosagem do NGAL sérico e urinário</i>	27
3.7.6	<i>Dosagem do KIM-1, GST-pi, L-FABP e da IL-18</i>	29
3.7.7	<i>Dosagem da creatinina pelo método de Jaffé</i>	29
3.7.8	<i>Dosagem da creatinina pelo método de quimioluminescência</i>	30
3.7.9	<i>Dosagem da bioquímica urinária</i>	31
3.7.10	<i>Dosagem dos demais biomarcadores na Universidade de San Diego</i>	32
3.7.11	<i>Resumo dos biomarcadores analisados no estudo</i>	33
3.8	Desfechos	34
3.8.1	<i>Primário</i>	34
3.8.2	<i>Secundários</i>	35
3.9	Análise estatística	36
3.9.1	<i>Análise estatística do CART</i>	36
4.	RESULTADOS	18
4.1	Rastreamento	87
4.1.1	<i>Classificação dos pacientes incluídos em relação à IRA</i>	88
4.1.2	<i>Classificação dos pacientes incluídos em relação à definição do grupo de IRA</i>	89
4.2	Características demográficas do grupo não IRA/IRA leve e IRA grave ..	89
4.3	Avaliação da função renal dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave ..	94
4.4	Dados intraoperatórios dos pacientes do transplante hepático	96
4.5	Evolução clínica na primeira semana após o transplante hepático	98
4.6	Nível de expressão dos biomarcadores no pré e no pós-operatórios de transplante hepático	100
4.7	Biomarcadores e diagnóstico da IRA no transplante hepático	106
4.7.1	<i>Os biomarcadores e o diagnóstico da IRA no pré-operatório de transplante hepático</i>	106

4.7.2	<i>Os biomarcadores de filtração e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático</i>	<i>107</i>
4.7.3	<i>Os biomarcadores de injúria e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático</i>	<i>108</i>
4.7.4	<i>Os biomarcadores de estresse oxidativo e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>110</i>
4.7.5	<i>Os biomarcadores de reabsorção e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>110</i>
4.7.6	<i>Os biomarcadores de secreção e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>111</i>
4.7.7	<i>O biomarcador de concentração e diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático</i>	<i>111</i>
4.7.8	<i>Outros biomarcadores e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>112</i>
4.8	<i>Desempenho de todos os biomarcadores de diagnóstico da IRA no transplante hepático</i>	<i>117</i>
4.8.1	<i>Desempenho dos biomarcadores pela Árvore de Classificação e Regressão - CART</i>	<i>117</i>
4.8.2	<i>Desempenho dos biomarcadores pela regressão multivariada.....</i>	<i>119</i>
4.9	<i>Biomarcadores e os desfechos no transplante hepático.....</i>	<i>121</i>
4.9.1	<i>Os biomarcadores e os desfechos no pré-operatório do transplante hepático.....</i>	<i>122</i>
4.9.2	<i>Os biomarcadores de filtração e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>124</i>
4.9.3	<i>Os biomarcadores de injúria e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>124</i>
4.9.4	<i>Os biomarcadores de estresse oxidativo e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>127</i>
4.9.5	<i>Os biomarcadores de reabsorção e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>129</i>
4.9.6	<i>Os biomarcadores de secreção e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático.....</i>	<i>129</i>

4.9.7 O biomarcador de concentração e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático.....	130
4.9.8 Outros biomarcadores e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático.....	132
4.10 O desempenho de todos os biomarcadores e os desfechos no transplante hepático.....	135
4.10.1 Desempenho dos biomarcadores pela Árvore de Classificação e Regressão - CART.....	135
4.10.2 Desempenho dos biomarcadores pela regressão multivariada	138
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÕES	31
7. ANEXOS	33
7.1 Anexo 1 – Artigo “Urinary Biochemistry in the Diagnosis of Acute Kidney Injury”	34
7.2 Anexo 2 – Artigo “Comprehensive Assessment of Kidney Health in Acute Kidney Injury: Can It Be Archived?”	41
7.3 Anexo 3 – Artigo “Early detection of acute kidney injury in the perioperative period of liver transplant with neutrophil gelatinase-associated lipocalin”	46
7.4 Anexo 4 – Artigo “Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel”	57
7.5 Anexo 5 – Capítulo de Livro “Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury”	73
7.6 Anexo 6 – Certificado de participação e finalista para o Prêmio Jovem Pesquisador	84
7.7 Anexo 7 – Certificado de participação como Congressista no 1º Encontro da Pós-Graduação do Vídeo “Elas Fazem Ciência”	85
7.8 Anexo 8 – Aprovação da Comissão de Ética	86
7.9 Anexo 9 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	89
7.10 Anexo 10 – Clinical Trials	94
7.11 Anexo 11 – Formulário de coleta de dados - Red Cap	97
7.12 Anexo 12 – Manual do Procedimento Operacional Padrão	111

7.13	Anexo 13 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sobre o transporte do material	116
7.14	Anexo 14 - Aprovação da Importação do material biológico pelo Centro de Controle de Doenças do EUA	120
8.	REFERÊNCIAS.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADQI	<i>Acute Dialysis Quality Initiative</i>
ALB	Albumina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANAC	Agência Nacional de Aviação Civil
AKIN	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
AUC	Área sob a curva
A-1M	Alfa 1 microglobulina
BM	Biomarcador
BH	Balanço hídrico
CART	<i>Classification Regression Tree</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CYS	Cistatina C
Cl	Cloro
Cr	Creatinina
CVC	Cateter venoso central
CVD	Cateter vesical de demora
DP	Desvio padrão
DVA	Droga vasoativa
DRC	Doença renal crônica
E	Especificidade
EUA	Estados Unidos da América
FeHA	Fração de excreção do hipurato
FeNa	Fração de excreção de sódio
FePCS	Fração de excreção do p-creasol sulfato
FeU	Fração de excreção de ureia
GFR	Grau de filtração glomerular
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IC	Intervalo de confiança
ICA	<i>International Club of Ascites</i>
IL-18	Interleucina 18
IMC	Índice de massa corpórea
IRA	Injúria renal aguda
KDIGO	<i>Kidney Disease Global Outcomes</i>
KIM1	Molécula-1 de injúria renal
MCP	Proteína quimiotática de monócito-1
MELD	<i>Model for end-stage liver disease</i>
Na	Sódio
NGAL	Lipocalina associada com gelatinase de neutrófilos humanos
NTA	Necrose tubular aguda
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
P	Plasmático
Pai	Pressão arterial invasiva
PENK	Pro-encefalina
PETIA	Imunoensaio turbidimétrico de partícula reforçada
PNGAL	NGAL plasmático
RIFLE	<i>Risk, Injury, Loss end stage renal disease</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
S	Sensibilidade
SAPS	<i>Simplified Acute Physiology Score</i>
Scr	Creatinina sérica
SHR	Síndrome hepatorenal
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TIPS	<i>Transjugular Intra-hepatic Portosystemic Shunts</i>
TRS	Terapia de substituição renal
Tx	Transplante
TH	Transplante hepático

U	Urinário
UCSD	Universidade California San Diego
UMOD	Uromodolina
UNGAL	NGAL urinário
UNOS	<i>United Network for Organ Sharing</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VHC	Vírus da hepatite C
VHB	Vírus da hepatite B
VM	Ventilação mecânica
VPN	Valor preditivo positivo
VPP	Valor preditivo negativo
vs	versus

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo da fisiopatologia e função principal dos biomarcadores selecionados no estudo	4
Tabela 2 -	Resumo das dosagens dos biomarcadores, assim como os períodos dosados.....	33
Tabela 3 -	Características demográficas dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave	90
Tabela 4 -	Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave conforme comorbidades.....	91
Tabela 5 -	Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme as causas principais de insuficiência hepática para o transplante	93
Tabela 6 -	Avaliação da função renal conforme distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave.....	94
Tabela 7 -	Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme a diurese na primeira semana após o transplante hepático	95
Tabela 8 -	Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme o balanço hídrico (BH) na primeira semana após o transplante	96
Tabela 9 -	Parâmetros de tempos intraoperatórios do transplante hepático e dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave.....	97
Tabela 10 -	Uso de hemocomponentes no intraoperatórios do transplante hepático e dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave	98
Tabela 11 -	Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme evolução clínica na primeira semana após o transplante hepático .	99
Tabela 12 -	Nível de expressão dos biomarcadores, de acordo com os períodos pré e pós-operatórios de transplante hepático.....	102
Tabela 13 -	Nível de expressão dos biomarcadores na predição da IRA, pelo critério KDIGO, no pós-operatório de transplante hepático	113
Tabela 14 -	<i>Nível de expressão dos biomarcadores na determinação da IRA grave, pelo KDIGO, no pós-operatório de transplante hepático</i>	<i>115</i>

Tabela 15 - Valores da curva ROC AUC, valor de corte pelo ponto “J” index, sensibilidade e especificidade dos biomarcadores, na determinação da IRA grave, no pós-operatório de transplante hepático.....	116
Tabela 16 - Tabela da precisão do diagnóstico de IRA grave pelo PENK no pré-operatório	117
Tabela 17 - Tabela da precisão do diagnóstico de IRA grave pelo PENK, OSM e TIMP-1 no pós-operatório	118
Tabela 18 - Odds ratio dos BM preditores de IRA grave no pré-operatório..	120
Tabela 19 - Odds ratio dos BM preditores de IRA grave no pós-operatório .	121
Tabela 20 - Nível de expressão dos biomarcadores na predição da TRS no pós-operatório de transplante hepático.....	133
Tabela 21 - Nível de expressão dos biomarcadores na predição da mortalidade no pós-operatório de transplante hepático.....	134
Tabela 22 - <i>Odds ratio</i> dos BM preditores de necessidade de TRS no pré-operatório	139
Tabela 23 - <i>Odds ratio</i> dos BM preditores de mortalidade no pré-operatório...	140
Tabela 24 - <i>Odds ratio</i> dos BM preditores de necessidade de TRS no pós-operatório	141
Tabela 25 - <i>Odds ratio dos BM preditores de mortalidade no pós-operatório ..</i>	142

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Causas principais da insuficiência hepática para o transplante	92
Gráfico 2 -	Valores medianos pré e pós-operatórios dos biomarcadores conforme função	103
Gráfico 3 -	Diagrama de caixa, os grupos de IRA do PENK e a curva ROC AUC do PENK no grupo IRA grave	108
Gráfico 4 -	Diagrama de caixa, os grupos de IRA do U NGAL e a curva ROC AUC do U NGAL no grupo IRA grave.....	109
Gráfico 5 -	Diagrama de caixa, os grupos de IRA da U IL-18 e a curva ROC AUC da U IL-18 no grupo IRA grave	109
Gráfico 6 -	Diagrama de caixa, os grupos de IRA da L-FABP e a curva ROC AUC da U L-FABP no grupo IRA grave	110
Gráfico 7 -	Diagrama de caixa, os grupos de IRA da osmolaridade e a curva ROC AUC da osmolaridade no grupo IRA grave.....	111
Gráfico 8 -	Diagrama de caixa, os grupos de IRA da TIMP-1 e a curva ROC AUC do TIMP-1 no grupo IRA grave	112
Gráfico 9 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS do UNGAL e a curva ROC AUC do UNGAL no grupo com necessidade de TRS no pré-operatório.....	123
Gráfico 10 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS do PENK e a curva ROC AUC do PENK no grupo com necessidade de TRS	124
Gráfico 11 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS do UNGAL e a curva ROC AUC do UNGAL no grupo com necessidade de TRS no pós-operatório.....	125
Gráfico 12 -	Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes do UNGAL e a curva ROC AUC do UNGAL no grupo de não sobreviventes..	126
Gráfico 13 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS da IL-18 e a curva ROC AUC da IL-18 no grupo com necessidade de TRS.....	127
Gráfico 14 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS da GST-pi e a curva ROC AUC da GST-pi no grupo com necessidade de TRS.....	128

Gráfico 15 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS da L-FABP e a curva ROC AUC da L-FABP no grupo com necessidade de TRS	128
Gráfico 16 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS da FeU e a curva ROC AUC da FeU no grupo com necessidade de TRS	130
Gráfico 17 -	Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes do FeU e a curva ROC AUC do FeU no grupo de não sobreviventes	130
Gráfico 18 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS da OSM e a curva ROC AUC da OSM no grupo com necessidade de TRS.....	131
Gráfico 19 -	Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes da OSM e a curva ROC AUC da OSM no grupo de não sobreviventes.....	131
Gráfico 20 -	Diagrama de caixa, os grupos de TRS do MCP-1 e a curva ROC AUC do MCP-1 no grupo com necessidade de TRS.....	132
Gráfico 21 -	Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes do MCP-1 e a curva ROC AUC do MCP-1 no grupo de não sobreviventes ...	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Expressão de biomarcadores ao longo do néfron	6
Figura 2 -	Resumo do protocolo de estudo	35
Figura 3 -	Diagrama demonstrando os motivos de exclusão no protocolo	87
Figura 4 -	Os pacientes incluídos e o diagnóstico de IRA.....	88
Figura 5 -	Definição do grupo de IRA no estudo	89
Figura 6 -	Nível de concordância pela CART no diagnóstico da IRA grave pelo PENK pré-TH	118
Figura 7 -	Nível de concordância pela CART no diagnóstico da IRA grave pelo PENK, OSM e TIMP-1 no pós-operatório	119
Figura 8 -	Nível de concordância pela CART na predição de TRS.....	136
Figura 9 -	Nível de concordância pela CART na predição de TRS no pós-operatório.....	137
Figura 10 -	Nível de concordância pela CART na predição de mortalidade no pré-operatório	137
Figura 11 -	Nível de concordância pela CART na predição de mortalidade no pós-operatório.....	138

RESUMO

LIMA C. Biomarcadores de função tubular, filtração e permeabilidade renal no perioperatório de transplante hepático: utilidade no diagnóstico e no prognóstico da injúria renal aguda [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: A injúria renal aguda (IRA) é uma complicação comum no pós-operatório de transplante hepático (TH) e está associada às altas taxas de morbidade e mortalidade. O objetivo deste manuscrito é analisar se a avaliação da função renal, em diferentes segmentos do néfron, permite a predição – no diagnóstico e na progressão da IRA – da necessidade de terapia renal substitutiva (TRS) e da mortalidade. **Métodos:** Amostras de sangue e urina foram coletadas no perioperatório de TH em 100 pacientes elegíveis. Foi avaliado o nível de expressão dos biomarcadores (BM), de acordo com a função afetada no néfron: filtração (P CYS e PENK); injúria (IL-18, KIM-1, NGAL e U CYS); estresse (GST-pi e L-FABP); reabsorção glomerular (a-1M e U ALB); secreção tubular (FePCS, FeHA, FeNa e FeU), concentração (OSM); fibrose (TIMP-1 e MCP-1) e de reserva tubular (UMOD) parada de ciclo celular (lesão DNA). O diagnóstico da IRA foi baseado no critério do *Kidney Disease International Global Outcomes* (KDIGO) pela creatinina sérica. O KDIGO 1 foi subclassificado de acordo com o *International Club of Ascites* (ICA). **Resultados:** Dos 100 pacientes submetidos ao TH, 89 (89%) desenvolveram IRA, pelo critério KDIGO, na primeira semana após o TH. Os pacientes sem IRA e KDIGO 1-A 37 (37%) foram resumidos como o grupo sem IRA e IRA leve, enquanto os KDIGO 1-B, 2 e 3 63 (63%) foram categorizados como o grupo com IRA grave; 34 pacientes necessitaram de TRS na primeira semana e 21 morreram dentro de 60 dias após o TH. Houve aumento significativo do nível dos BM: PENK, KIM-1, UNGAL, PNGAL, IL-18, GST-pi, L-FABP, a-1M, ALB, MCP-1 e TIMP-1 entre pré e pós-operatório. Na determinação da IRA grave, destacaram-se os BM PENK, UNGAL e IL-18 com AUC/OR no pré e pós operatório, respectivamente: PENK pré-0,69/ 4,40 pós-0,83/ 46,01; UNGAL pré-0,69/ 2,46 pós-0,70/ 2,74 e IL-18 pré-0,77/ 8,85 pós-0,80/ 4,80. Na análise de decisão da árvore de classificação e regressão (CART), a melhor variável para determinar IRA grave foi o PENK no pré e no pós-TH, com precisão de 69,7% no pré. O PENK, junto com OSM e TIMP-1, teve precisão de 81% no pós-TH. Na predição de TRS, os BM com resultados promissores no pré e no pós-operatório com AUC/OR, respectivamente, foram: UNGAL pré- 0,71/ 4,45 pós- 0,76/ 10,45, L-FABP pré – 0,29/ 1,15, pós- 0,66/ 5,01 e MCP-1 pré – 0,68/ 2,65, pós- 0,80/6,81. No pós-TH também destacaram-se os BM: PENK, PNGAL, GST-pi, FeU, OSM e lesão DNA. As variáveis de escolha na CART no pré-TH foram UNGAL e L-FABP, com precisão de 75,76%; no pós-TH, foi a OSM, com precisão de 83% para TRS. Na predição da mortalidade, os BM com resultados promissores no pré e no pós-operatório com AUC/OR, respectivamente, foram: UNGAL pré- 0,67/ 2,33 pós- 0,67/ 12,52 e MCP-1 pré- 0,69/ 1,29, pós- 0,80/ 25,53. O BM MCP-1 do pós-TH também foi escolhido, pela CART, como melhor BM para determinar não sobreviventes, com precisão de 83%. **Conclusão:** A análise dos BM por segmentos do néfron permite uma visão mais ampliada da função renal além da filtração, assim como a seleção dos melhores BM em

destaque por função no rim. O PENK provou ser o melhor biomarcador de filtração; o UNGAL e a IL-18 os melhores BM de injúria; o L-FABP o melhor BM de estresse; a FeU o melhor BM de secreção; a OSM o melhor BM de concentração; enquanto o MCP-1 e o TIMP-1 os melhores BM de fibrose. Os BM: FeU e OSM estão disponíveis na prática clínica e seus resultados promissores apontam uma janela de utilização clínica. Os resultados do estudo pontuaram que alguns BM (PENK, UNGAL, IL-18, L-FABP e MCP-1) conseguiram prever desfechos de gravidade de IRA, necessidade de TRS e mortalidade no período pré-operatório – e isto pode auxiliar o manejo dos pacientes, quando esses BM estiverem disponíveis na prática clínica.

Descritores: Lesão renal aguda; Transplante de fígado; Biomarcadores; Cistatina-C; Interleucina-18; Lipocalina-2; Albuminas; Ureia; Quimiocina CCL2; Uromodulina.

ABSTRACT

LIMA C. Biomarkers of tubular function, filtration, and renal permeability in the perioperative period of liver transplantation: useful in the diagnosis and prognosis of acute kidney injury [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introduction: Acute kidney injury (AKI) is a common postoperative complication following liver transplantation (LT) and is associated with high rates of morbidity and mortality. The objective of this study is to analyze whether the evaluation of renal function in different nephron segments can predict the diagnosis and progression of AKI, the need for dialysis and mortality. **Methods:** Blood and urine samples were collected during the perioperative period of LT in 100 eligible patients. The expression level of the biomarkers (BM) was evaluated according to the function affected in the nephron: filtration (plasma (P) CYS-C and PENK); injury (IL-18, KIM-1, NGAL P and urinary (U) CYS-C); stress (GST-pi e L-FABP); glomerular resorption (a-1M and U ALB); tubular secretion (FePCS, FeHA, FeNa and FeU); concentration (OSM); fibrosis (TIMP-1 and MCP-1); tubular reserve (UMOD) and cell cycle arrest (DNA damage). AKI diagnosis was based on the Kidney Disease International Global Outcomes (KDIGO) criteria using serum creatinine. KDIGO 1 was subclassified according to the International Club of Ascites (ICA). **Results:** Of the 100 patients undergoing LT, 89 (89%) developed AKI according to the KDIGO criteria in the first week after LT. Thirty-seven patients without AKI and with KDIGO 1-A (37%) were allocated to the no AKI/mild AKI group, whereas 63 patients with KDIGO 1-B, 2 and 3 (63%) were allocated to the severe AKI group. A total of 34 patients were dialyzed in the first week, and 21 died within 60 days after LT. There was a significant increase in the levels of the following BMs between pre and post LT: PENK, KIM-1, UNGAL, PNGAL, IL-18, GST-pi, L-FABP, a-1M, ALB, MCP-1 e TIMP-1. In the determination of severe AKI, the following BMs were best predictions, with AUC/OR before and after surgery, respectively: PENK pre-0,69/ 4,40 post-0,83/ 46,01; UNGAL pre-0,69/ 2,46 post-0,70/ 2,74 e IL-18 pre-0,77/ 8,85 post-0,80/ 4,80. In the decision analysis using classification and regression trees (CART), the best variable for determining severe AKI was pre and post-LT PENK, with an accuracy of 69,7% in the pre and PENK together with OSM and TIMP-1 had an accuracy of 81% in the post-LT. In the prediction of the need for dialysis, the BM with promising results in the pre and postoperative with AUC/OR respectively were: UNGAL pre-0,71/4,45 post-0,76/10,45, L-FABP pre-0,29/1,15, post- 0,66/5,01 and pre-0,68/2,65 MCP-1, post- 0,80/6,81, In the post-LT the BM also were best predictions: PENK, PNGAL, GST-pi, FeU, OSM and DNA lesion, The variables of choice in CART in the pre-LT were UNGAL and L-FABP with an accuracy of 75,76% and in the post-LT it was the OSM with an accuracy of 83%. In predicting mortality, the BMs with promising results in the pre and postoperative with AUC/OR respectively were: UNGAL pre- 0,67/2,33 post- 0,67/12,52 and MCP-1 pre- 0,69/1,29, post-0,80/25,53, The post-LT BM MCP-1 was also chosen by CART as the best BM to determine non-survivors with an accuracy of 83%. **Conclusion:** The analysis of BMs in different nephron segments allows a broader view of renal function, besides filtration, as well as the selection of the

best BMs stood by kidney function. PENK was the best filtration BM, UNGAL/ IL-18 were the best injury BMs; L-FABP best stress BM, FeU the best secretion BM, OSM the best concentration BM and MCP-1/TIMP-1 the best fibrosis BM. FeU and OSM showed promising results; considering its available in clinical practice, it should be further explored. The results of the study pointed out that some BM (PENK, UNGAL, IL-18, L-FABP and MCP-1) were able to predict outcomes of AKI severity, dialysis need and mortality in the preoperative period, this can help the management of these patients in the future.

Keywords: Acute Kidney Injury; Liver transplant; Biomarkers; Cystatin C; Interleukin-18; Lipocalin-2; Albumins; Urea; Chemokine CCL2; Uromodulin.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução do objetivo principal

A injúria renal aguda (IRA) é uma complicação comum em pacientes com cirrose crônica e submetidos a transplante hepático (TH) ¹⁻². A incidência de IRA no TH é maior do que em outras grandes cirurgias não cardíacas, em pacientes com função renal previamente normal ³. O diagnóstico da IRA resulta em impacto significativo na sobrevivência do órgão e do paciente ⁴⁻⁵.

O último consenso do diagnóstico da IRA foi publicado em 2012, pelo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO)⁶, baseado em mudanças na creatinina sérica (Scr) e no débito urinário. Recentemente, em 2015, o *International Club of Ascites* (ICA) ⁷ demonstrou um critério de IRA em pacientes cirróticos que foi baseado em uma modificação do KDIGO, na qual foi excluído o critério do débito urinário que, devido à oligúria, pode estar presente em pacientes com função renal preservada. O mesmo grupo ICA fez mais uma modificação, dividindo o KDIGO estágio 1 em dois subgrupos, baseado no nível da creatinina sérica (Scr): estágio 1A (Scr < 1,5 mg/dL) e estágio 1B (Scr ≥ 1,5 mg/dL), sendo que esta subclassificação é suportada por desfechos diferenciais ^{8,9}.

Mesmo com essas considerações, o diagnóstico da IRA em pacientes cirróticos é ainda um desafio devido as limitações: desnutrição, estado de hidratação alterado, perda de massa muscular e uso de diuréticos que alteram o valor da Scr (subestimando) ¹⁰.

Além disso, a Scr é parte do modelo matemático de priorização de alocação do transplante hepático, o *Model End Stage Liver Disease* (MELD), tendo aumentado consideravelmente o número de pacientes com deficiência da função renal como candidatos ao TH ¹¹. Em adição, o método de Jaffé, comumente usado para avaliar a creatinina sérica, pode superestimar seu valor quando níveis elevados de bilirrubina são encontrados ¹².

Devido as limitações da creatinina sérica neste cenário e considerando a IRA um processo complexo e heterogêneo, envolvendo a dinâmica da patologia, é improvável que apenas um único biomarcador (BM) possa responder todas as questões envolvendo o diagnóstico da IRA. Por isso, nós buscamos um painel de BM para este estudo, que provavelmente representem os locais principais na

patogênese da IRA, incluindo os BM de função: filtração (plasma cystatina C – CYS/ plasma pró-encefalina – PENK); injúria (urinário: interleucina-18 – IL-18, molécula de injúria renal – KIM-1, cystatina C – CYS, plasma e urina: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos humanos - NGAL); estresse tubular (glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP), reabsorção glomerular (urina: alfa 1 microglobulina – a-1M e albumina - ALB,); secreção fração de excreção (Fe) sódio Na e Fe ureia – U, Fe p-creasol sulfato – PCS e Fe hipurato – HA); concentração (osmolaridade – OSM); fibrose (proteína quimiotática de monócito-1 – MCP-1, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1); reserva tubular (uromodulina - UMOD) e lesão DNA.

Os vinte BM selecionados estão listados na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1 - Resumo da fisiopatologia e função principal dos biomarcadores selecionados no estudo

TIPO DE MARCADOR	BM	FUNÇÃO PRINCIPAL	FISIOPATOLOGIA
FILTRAÇÃO	S CYS	Filtração	é produzida constantemente por todas as células nucleadas, livremente filtrada pelo glomérulo, reabsorvida e metabolizada na células tubulares proximais.
FILTRAÇÃO	P PENK	Permeabilidade	estabelecido como um marcador substituto confiável para a encefalina, devido ao seu baixo peso molecular, é livremente filtrável através do glomérulo.
INJÚRIA	U KIM-1	Injúria Tubular	glicoproteína transmembranar produzida após insultos isquêmicos/nefrotóxicos; está aumentada na IRA e associada à progressão da DRC (fibrose).
INJÚRIA	U P NGAL	Injúria Tubular	polipeptídeo secretado que é regulado em resposta à lesão tubular e detectável rapidamente no plasma e na urina.
INJÚRIA	U IL-18	Inflamação Tubular	citocina pró-inflamatória; aumentada na IRA de insulto isquêmico e inflamatório.
INJÚRIA	U CYS	Injúria Tubular	a presença de CYS na urina reflete disfunção tubular, lesão isquêmica, declínio da TFG e progressão da DRC.
ESTRESSE	GST-pi	Estresse Tubular	é uma enzima citosólica solúvel em citocromo, produzida no túbulo distal, que desempenha papel de desintoxicação dos radicais livres.
ESTRESSE	L-FABP	Estresse Tubular	é uma proteína que participa do transporte dos ácidos graxos para as mitocôndrias e os peroxissomos, que serão metabolizados e reduzem o estresse oxidativo.
REABSORÇÃO	U a-1M	Reabsorção	proteína de baixo peso molecular, filtrada no glomérulo, mas quase totalmente reabsorvida pelas células epiteliais tubulares proximais, onde é degradada; sua presença reflete dano tubular proximal.
REABSORÇÃO	U ALB	Permeabilidade	filtrado por glomérulo, reabsorvido e metabolizado no túbulo renal proximal; sua presença está associada à predição de risco cardiovascular e progressão da DRC.
SECREÇÃO	FeNa	Secreção	baseado na premissa de que os túbulos intactos podem reabsorver o Na e os túbulos lesionados não.
SECREÇÃO	FeU	Secreção	baseado na premissa de que os túbulos intactos podem reabsorver a ureia e os túbulos lesionados não.

Continua.

TIPO DE MARCADOR	BM	FUNÇÃO PRINCIPAL	FISIOPATOLOGIA
SECREÇÃO	FeHA	Secreção	manipulado por transportadores de ânions orgânicos na membrana basolateral, a secreção diminuída reflete a disfunção tubular. Baixa excreção tem sido associada à progressão da DRC.
SECREÇÃO	FePCS	Secreção	é um metabólito produzido por bactérias intestinais que é eliminado via secreção renal, sua diminuição também reflete disfunção tubular. Também está associado com a doença cardiovascular e a progressão da DRC.
CONCENTRAÇÃO	OSM	Concentração	mensura a quantidade de solutos <i>versus</i> solventes na urina.
REPARAÇÃO-FIBROSE	U MCP-1	Fibrose	é membro da família das quimiocinas – regula o tráfego de monócitos em resposta a sinais inflamatórios, é aumentado na lesão de isquemia – reperfusão.
REPARAÇÃO - FIBROSE	TIMP-1	Fibrose	é um inibidor fisiológico das enzimas que degradam a matriz colágena, considerado um BM de fibrose.
REPARAÇÃO	U UMOD	Reserva Tubular	proteínas produzidas exclusivamente no rim por células do ramo espesso ascendente da alça de Henle e túbulo contorcido distal, altos níveis de proteína estão associados à redução de mortalidade, DRC e IRA.
PARADA CICLO CELULAR	Lesão DNA	Parada do ciclo celular	Danos no DNA nuclear ou mitocondrial levam à parada do ciclo celular e à apoptose, sua elevação foi associada à IRA de DRC.

Conclusão.

Soro - S, plasma - P, urinário - U, cistatina - CYS, pró-encefalina - PENK, interleucina-18 - IL-18, molécula de lesão renal - KIM-1, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, alfa 1 microglobulina - a1-M, albumina - ALB, fração de excreção - Fe, sódio - Na, ureia - U, sulfato de p-creasol - PCS, hipurato - HA, osmolaridade – OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, uromodulina – UMOD, injúria renal aguda – IRA, doença renal crônica – DRC, taxa de filtração glomerular - TFG.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 1 - Expressão de biomarcadores ao longo do néfron

Fonte: Elaborado pela autora.

1.2 A injúria renal aguda e o transplante hepático

Como relatado no capítulo anterior, a IRA é uma complicação comum em pacientes submetidos ao transplante hepático, com alta incidência – que varia de 17 a 95%, associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, afetando a evolução dos pacientes a curto e a longo prazos ^{1,13}.

O desenvolvimento da IRA, seguida de transplante hepático, é influenciado por numerosos fatores, presentes no pré, no intra e no pós-operatório. A síndrome hepatorenal (SHR) é comumente observada no pré-operatório, caracterizada por vasodilatação arterial, principalmente nos vasos sanguíneos da circulação esplâncnica, e severa vasoconstrição renal. Fatores intraoperatórios incluem longos períodos de clampeamento vascular, hipotensão, altas doses de vasopressores e sobrecarga de volume. No pós-operatório, a hipotensão e o uso de inibidores da calcineurina, tais como ciclosporina e tacrolimus, também são condições que potencialmente se associam ao desenvolvimento da IRA¹⁴.

Antes do MELD, a alocação do transplante hepático era por tempo de lista de espera; em 2006, o Ministério da Saúde adotou o critério do MELD, modificando a classificação para o critério de gravidade na alocação do transplante. O MELD é um modelo matemático que prediz a mortalidade em até 3 meses em pacientes aguardando o transplante hepático; o cálculo é baseado nos exames: bilirrubina sérica, creatinina sérica e índice internacional normalizado (INR) ¹⁵. Devido a creatinina ser um dos exames utilizados no cálculo do MELD, houve aumento considerável no número de pacientes com comprometimento da função renal em lista de espera do transplante de fígado ^{16,17}. O valor da creatinina pesa muito no escore do MELD, ocorrendo prioridade significativa para pacientes com função renal prejudicada ^{18,11}. Além disso, o método de mensuração da creatinina pode interferir no valor real da creatinina. O método de Jaffé superestima a creatinina do soro quando a concentração da bilirrubina é superior a 25mg/dl e isto pode interferir no aumento de 1 a 2 pontos no escore do MELD ^{10,12}.

A IRA após o transplante hepático está associada à menor viabilidade do órgão transplantado ^{4,5} e ao aumento dos custos hospitalares ¹⁹, reduzindo a

sobrevida do órgão transplantado quando associada à terapia renal substitutiva (TRS) ²⁰, além do aumento da probabilidade de desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) a longo prazo ^{4,21}.

Devido à falta de definição uniforme no diagnóstico da IRA, a *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) sugeriu, em 2004, uma classificação com base na gravidade da injúria renal; o *Risk, Injury, Loss end Stage Renal Disease* (RIFLE). Em 2007, houve uma revisão do RIFLE e a *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) propôs a adição do aumento da creatinina sérica igual ou $>0,3\text{mg/dl}$ em 48 horas para definição de IRA. Em 2012, o *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) utilizou critérios das classificações de RIFLE e AKIN. Assim, a nova classificação de IRA determina que:

Estádio 1 – aumento da creatinina sérica igual ou $>1,5\text{-}1,9$ vezes o valor basal em 7 dias ou $\geq 0,3\text{mg/dl}$ ($> 26,5$ micromol/l), em até 48 horas, ou débito urinário $<0,5\text{ml/kg/h}$ durante 6 a 12 horas.

Estádio 2 – aumento da creatinina sérica igual ou $>2,0\text{-}2,9$ vezes o valor basal ou débito urinário $<0,5\text{ml/kg/h}$ por > 12 horas.

Estádio 3 – aumento da creatinina sérica 3,0 vezes o valor basal ou igual ou $> 4,0\text{mg/dl}$ ($\geq 353,6$ micromol/l) ou débito urinário $<0,3\text{mg/kg/h}$, por 24 horas, ou anúria por >12 horas ou início de terapia de substituição renal ou, em pacientes $<$ de 18 anos, diminuição da taxa de filtração glomerular estimada $<35\text{ml/min}$. por $1,73\text{m}^2$ ⁶.

Em 2015, o *International Club of Ascites* (ICA) apresentou uma modificação do critério KDIGO em pacientes cirróticos, na qual foi retirado o critério do débito urinário e mantido apenas a creatinina sérica para o diagnóstico da IRA ⁷. O motivo da remoção do débito urinário foi suportado devido ao fato de as alterações no volume de urina não estarem relacionadas à taxa de filtração glomerular (TFG), visto que alguns pacientes com oligúria apresentavam a TFG preservada.

Recentemente, o mesmo grupo sugeriu uma subclassificação do KDIGO 1 em dois subgrupos, baseado no valor da creatinina sérica (Scr): estágio 1A (Scr $< 1,5$ mg/dL) e estágio 1B (Scr $\geq 1,5$ mg/dL). Esta subclassificação foi suportada por desfechos diferenciais, por isto, foi aplicada esta subclassificação nesta pesquisa ⁸⁻⁹.

As etiologias mais comuns de IRA em hepatopata são azotemia pré-renal, necrose tubular aguda (NTA) e SHR. Porém, a diferenciação da etiologia da IRA é crítica e os tratamentos diferem acentuadamente. Portanto, estabelecer o diagnóstico diferencial preciso é extremamente desafiador ^{22, 23}.

O teste mais frequentemente utilizado para diferenciar a IRA pré-renal da NTA é a fração de excreção de sódio (FeNa) e a fração de excreção de ureia (FeU) ²⁴. Na IRA pré-renal, a FeNa é frequentemente baixa e a concentração é menor do que 20mEq/L – apesar disso, o uso de diuréticos torna difícil a interpretação de FeNa, enquanto que a sepse pode alterar a FeU ^{25, 26}.

A IRA também pode ser classificada em anormalidade funcional ou estrutural. A avaliação é baseada na TFG e na Scr; no entanto, a avaliação da lesão renal funcional e estrutural não é completa, a menos que tenham sido realizados exames de urina – incluindo exame de sedimento urinário e exames de imagem ²⁷.

Apesar dos avanços na classificação da IRA na última década, o biomarcador utilizado na prática clínica para o diagnóstico de IRA é a creatinina. Os níveis de Scr são influenciados por outros fatores não relacionados à taxa de filtração glomerular: idade, sexo, massa muscular, metabolismo muscular, medicação e estado de hidratação¹⁸. Além disso, as mudanças agudas na TFG não são acompanhadas de aumento concomitante na Scr. Como o estado de equilíbrio entre produção e eliminação demora dias para ocorrer, a Scr subestima o grau de perda de função renal, principalmente nas primeiras 48 horas após o insulto ^{28, 29}.

Em pacientes hepatopatas, as limitações do uso da Scr são mais graves devido à frequente presença de desnutrição, à diminuição da massa muscular e ao menor volume intravascular efetivo ²⁹.

Devido às limitações do uso da Scr e das suas baixas sensibilidade e especificidade, existem inúmeras pesquisas investigando, como possíveis biomarcadores, diferentes marcadores na urina e no plasma que são mais expressos nos rins no início da lesão e são mais sensíveis e específicos para o diagnóstico precoce de IRA ³⁰. Nesse sentido, os marcadores urinários são mais promissores para a detecção precoce de IRA: identificação do mecanismo de lesão, avaliação do local e gravidade da lesão ³¹.

O marcador ideal deve facilitar a identificação precoce e a estratificação de risco e contribuir para a classificação diagnóstica ³². O painel de biomarcador de IRA será útil para determinar o momento inicial do insulto e, na avaliação da duração da IRA, para ajudar a distinguir entre os vários tipos e a patogênese da IRA e para prever o prognóstico global em relação à necessidade de diálise e mortalidade ³³.

A IRA continua um problema associado com alta mortalidade, apesar da melhora da técnica cirúrgica, da invenção de fármacos com baixa nefrotoxicidade e do desenvolvimento do manuseio perioperatório ³⁴.

As dificuldades na intervenção precoce contribuem significativamente para o mau prognóstico da IRA. Pacientes com doença hepática em estágio final frequentemente apresentam queda da filtração glomerular, embora a desnutrição, a diminuição da massa muscular e a alteração de função hepática possam contribuir para a presença de valores da Scr pouco alterada.

Dessa forma, o diagnóstico de IRA com base na creatinina pode ser tardio e o uso de um painel de biomarcador precoce de injúria renal se torna necessário e eficaz para identificar mais precocemente o insulto da IRA – comum neste grupo de pacientes ^{34, 35}.

1.3 Biomarcadores para o diagnóstico de IRA

Vimos, no capítulo anterior, que a creatinina não é um biomarcador ideal, menos ainda no cenário do paciente hepatopata. Por isso, a busca por um biomarcador de IRA ideal é antiga. O objetivo é que o diagnóstico seja precoce a ponto de se conseguir uma intervenção terapêutica e, assim, mudar o curso natural da doença renal.

O termo biomarcador foi introduzido em 1989, para descrever qualquer indicador diagnóstico mensurável usado para avaliar o risco ou a presença de uma dada doença ³⁶.

Neste contexto, os biomarcadores podem ser classificados em: biomarcadores constitutivos (proteínas/enzimas que são normalmente presentes nas células tubulares renais e normalmente não encontradas na urina em

concentração significativa, mas que são liberadas na urina em resposta direta a uma lesão celular) e biomarcadores induzidos (proteínas que não são normalmente encontradas em altas concentrações em células tubulares renais ou urina até que a sua produção seja diretamente regulada em resposta à lesão celular)³⁷.

A capacidade dos biomarcadores para prever IRA foi estudada intensamente em vários contextos clínicos diferentes, pois o biomarcador deve provar ser mais preciso e precoce do que o padrão ouro atual da creatinina sérica (Scr)³⁸.

A avaliação conjunta de um painel de biomarcadores permite não apenas a estratificação no diagnóstico da IRA, mas também avaliar o local da lesão (glomerular, tubular proximal ou distal e renal), o tipo de lesão – isquêmica, nefrotóxica e NTA.

O conceito de BM no cenário da IRA é antigo, contudo recentemente o ADQI consortium incentivou a análise de BM promissores (estresse, funcional e dano) através de 11 consensos³⁹. O fato é que o uso de BM na predição da IRA, permanece incerto, vários estudos clínicos multicêntricos tem falhado em demonstrar uma performance como da “troponina” no miocárdio⁴⁰.

Estas falhas podem estar associada a complexidade do rim por isto quanto mais biomarcadores estão envolvidos, mais processos fisiopatológicos podem ser explicados após lesão renal⁴¹. Portanto a mais aprofundada desses biomarcadores fornecerá uma visão que pode ser aplicada para desenvolver novos agentes terapêuticos para IRA⁴².

Nesta pesquisa, escolhemos um painel de biomarcadores classificados conforme a função afetada ao longo do nefrón, como visualizado na Figura 1. Neste estudo, foram avaliados os BM de função: filtração (PCYS, PENK); injúria (IL-18, – KIM-1, – CYS, NGAL); estresse tubular (L-FABP, GST-pi) reabsorção (α-1M e - ALB); secreção (Fe Na and Fe U, FePCS e FeHA); concentração (OSM) fibrose (MCP-1, TIMP-1), reserva tubular (UMOD) e lesão DNA.

1.4 Artigos publicados sobre biomarcadores pela discente e pela docente resultantes desta defesa de Doutorado

Em março de 2018, foi submetido o artigo “Urinary Biochemistry in the Diagnosis of Acute Kidney Injury”, o qual foi aceito em maio e publicado em junho de 2018, no periódico *Disease Markers* ⁴³. Trata-se de uma revisão de literatura sobre os marcadores tradicionais de bioquímica (FeNa e FeU) e microscopia urinária no diagnóstico diferencial da IRA.

Resumo:

“Acute kidney injury (AKI) is a common complication, impacting short- and long-term patient outcomes. Although the application of the classification systems for AKI has improved diagnosis, early clinical recognition of AKI is still challenging, as increments in serum creatinine may be late and low urine output is not always present. The role of urinary biochemistry has remained unclear, especially in critically ill patients. Differentiating between a transient and persistent acute kidney injury is of great need in clinical practice, and despite studies questioning their application in clinical practice, biochemistry indices continue to be used while we wait for a novel early injury biomarker. An ideal marker would provide more detailed information about the type, intensity, and location of the injury. In this review, we will discuss factors affecting the fractional excretion of sodium (FeNa) and fractional excretion of urea (FeU). We believe that the frequent assessment of urinary biochemistry and microscopy can be useful in evaluating the likelihood of AKI reversibility. The availability of early injury biomarkers could help guide clinical interventions.”

O artigo na íntegra encontra-se no Anexo 1.

Em abril de 2019, foi submetido o artigo “Comprehensive Assessment of Kidney Health in Acute Kidney Injury: Can It Be Achieved?”, o qual foi aceito em julho e publicado em setembro de 2019, no periódico *Nephron* ⁴⁴. Trata-se de uma revisão de literatura sobre os biomarcadores em destaque nos últimos anos,

ampliando o conceito da avaliação dos biomarcadores para além da filtração e da injúria, como função da capacidade reabsortiva, permeabilidade, concentração, secreção e reserva renal.

Resumo:

“Acute kidney injury (AKI) is a frequent event in hospitalized patients, with an incidence that continues to rise, reaching as high as 70–80% in intensive care settings. The need for dialysis and progression to end-stage kidney disease (ESKD) after an episode of AKI is relatively low, from 5 to 20%. However, it is now recognized that patients with AKI may have very different kidney outcomes, varying from complete recovery, incipient chronic kidney disease (CKD), to progression to ESKD. Recent studies have shown that even mild AKI episodes can be associated with a 90% increased risk of developing CKD during long-term follow-up. There is a significant need to focus our efforts on factors that could mitigate the progression of kidney dysfunction and ultimately improve outcomes from AKI. The first step toward this goal encompasses a better understanding of tubular and glomerular alterations during and following an AKI episode. Our current approach, based solely on glomerular filtration rate (GFR), is flawed, since the loss of kidney function does not correspond to the degree of decline in estimated GFR (eGFR), and eGFR does not reflect tubular function. Changes in tubular concentration, reabsorptive and secretory capacity are recognized in AKI; however, they have not been incorporated in clinical assessments of overall kidney function. Here we review a few candidates to assess glomerular filtration/permeability, tubular dysfunction, and injury and how we expect these markers to alter during the development and recovery phase of AKI.”

O artigo na íntegra encontra-se no Anexo 2.

Em dezembro de 2018, foi submetido o artigo “Early detection of acute kidney injury in the perioperative period of liver transplant with neutrophil gelatinase-associated lipocalin”, o qual foi aceito em setembro de 2019 e publicado em outubro de 2019, no periódico *BMC Nephrology*⁴⁵. Trata-se de um

artigo original sobre o papel do NGAL no diagnóstico precoce da IRA, gravidade, necessidade de terapia renal substitutiva e mortalidade no perioperatório de transplante hepático.

Resumo:

“Background: Acute kidney injury (AKI) is a common complication in patients undergoing liver transplant (LT) and is associated with high morbidity and mortality. We aim to evaluate the pattern of urine and plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) elevation during the perioperative period of LT and to assess it as a prognostic marker for AKI progression, need for dialysis and mortality. Methods: We assessed NGAL levels before induction of anesthesia, after portal reperfusion and at 6, 18, 24, and 48 h after surgery. Patients were monitored daily during the first week after LT. Results: Of 100 enrolled patients undergoing liver transplant, 59 developed severe AKI based on the KDIGO serum creatinine (sCr) criterion; 34 were dialysed, and 21 died within 60 days after LT. Applying a cut-off value of 136 ng/ml, UNGAL values 6 h after surgery was a good predictor of AKI development within 7 days after surgery, having a positive predictive value (PPV) of 80% with an AUC of 0.76 (95% CI 0.67–0.86). PNGAL at 18 h after LT was also a good predictor of AKI in the first week, having a PPV of 81% and AUC of 0.74 (95% CI 0.60–0.88). Based on PNGAL and UNGAL cut-off criteria levels, time to AKI diagnosis was 28 and 23 h earlier than by sCr, respectively. The best times to assess the need for dialysis were 18 h after LT by PNGAL and 06 h after LT by UNGAL. Conclusion: In conclusion, the plasma and urine NGAL elevation pattern in the perioperative period of the liver transplant can predict AKI diagnosis earlier. UNGAL was an early independent predictor of AKI development and need for dialysis. Further studies are needed to assess whether the clinical use of biomarkers can improve patient outcomes.”

O artigo na íntegra encontra-se no Anexo 3.

Em dezembro de 2018, foi submetido o artigo “Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel”, o qual foi aceito em agosto de 2019 e publicado em outubro de 2019, no periódico *Science Translational Medicine* ⁴⁶. Trata-se de um artigo original sobre o papel do UMOD na proteção renal e sistêmica; foram utilizados dados de estudo clínico e experimentação *in vitro* para confirmação dos achados.

Resumo:

*“High serum concentrations of kidney-derived protein uromodulin [Tamm-Horsfall protein (THP)] have recently been shown to be independently associated with low mortality in both older adults and cardiac patients, but the underlying mechanism remains unclear. Here, we show that THP inhibits the generation of reactive oxygen species (ROS) both in the kidney and systemically. Consistent with this experimental data, the concentration of circulating THP in patients with surgery-induced acute kidney injury (AKI) correlated with systemic oxidative damage. THP in the serum dropped after AKI and was associated with an increase in systemic ROS. The increase in oxidant injury correlated with postsurgical mortality and need for dialysis. Mechanistically, THP inhibited the activation of the transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) channel. Furthermore, inhibition of TRPM2 *in vivo* in a mouse model mitigated the systemic increase in ROS during AKI and THP deficiency. Our results suggest that THP is a key regulator of systemic oxidative stress by suppressing TRPM2 activity, and our findings might help explain how circulating THP deficiency is linked with poor outcomes and increased mortality.”*

O artigo na íntegra encontra-se no Anexo 4.

Em julho de 2020, foi submetido o capítulo de livro “Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury”, o qual foi aceito em agosto de 2020 e publicado em setembro de 2020, no livro “Inflammations”, da editora IntechOpen ⁴⁷. Trata-se de um texto de revisão sobre o neutrófilo NGAL como biomarcador promissor no diagnóstico da IRA. O

capítulo traz informações relevantes sobre estudos com o uso desse biomarcador, interpretação no cenário da IRA e em outros desfechos, assim como limitações e pontos-chave para ajudar outros pesquisadores a mover o NGAL para a prática clínica.

Resumo:

“Acute kidney injury (AKI) is a common complication in several settings inside and outside hospitals. It affects millions of people around the world, and despite high levels of research funding, there is no specific treatment that changes the disease course. The basis for unfavorable outcomes related to this disease is the failure to provide early diagnosis. Currently, the diagnosis of AKI is based on serum creatinine and urine output, and both measures have several limitations, making early diagnosis difficult. In recent decades, several biomarkers of kidney injury have been proposed, with neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) being one of most studied and promising for use in early diagnosis. Despite there being several studies on NGAL, it has not yet been applied in clinical practice; thus, furthering the understanding of the development, interpretation, and limitations of NGAL in the diagnosis of AKI is the objective of this chapter.”

O artigo na íntegra encontra-se no Anexo 5.

Em julho de 2020, foi submetido o resumo para o Congresso Brasileiro de Nefrologia 2020, intitulado “Proencefalina como promissor biomarcador de filtração renal no transplante hepático”,⁴⁸ o qual foi selecionado para participar do prêmio Jovem Pesquisador, apresentado em outubro de 2020, no qual foi finalista. Trata-se de texto sobre o uso da proencefalina, no pós-operatório do transplante hepático, como um biomarcador confiável de filtração renal.

Resumo:

“Introdução: Nas últimas décadas, de intensivas publicações sobre os biomarcadores (BM), a proencefalina (Penk) tem sido apontada como um novo

BM da função renal. A Penk é um marcador substituto estável da encefalina, devido ao seu baixo peso molecular, sendo livremente filtrável através do glomérulo. O cenário de IRA foi o pós-operatório de transplante hepático (TH). Método: Amostras de sangue e urina foram coletadas no perioperatório de transplante hepático em 100 pacientes elegíveis. Foi avaliada a função da filtração glomerular pelo BM PenK. O diagnóstico da IRA foi baseado no critério KDIGO e subclassificado pela International Club of Ascites (ICA), baseado no valor da creatinina sérica (SCr): estágio 1A (SCr < 1,5 mg/dL) e estágio 1B (SCr ≥ 1,5 mg/dL). Resultados: Dos 100 pacientes submetidos ao TH, 89 (89%) desenvolveram IRA pelos critérios KDIGO, na primeira semana após o TH, o grupo Não IRA e o grupo KDIGO 1-A 37 (37%) foram resumidos como o sem IRA/IRA leve e os grupos KDIGO 1-B, 2 e 3 63 (63%) foram categorizados como IRA grave. O PENK apresentou ótimo desempenho, com aumento do nível de BM de acordo com a gravidade do KDIGO; para o grupo sem IRA/IRA leve, mostrou mediana de 81 (IC 61,25 - 101,50) vs 161,45 (122,85 - 294,03) pmol/l na IRA grave, atingiu uma AUC 0,83 (IC 0,72 - 0,94) com um ponto de corte de 119,05 pmol/l, sensibilidade de 0,80 e especificidade de 0,90. Conclusão: A Penk foi um biomarcador promissor neste estudo. Assim, pensando-se nas limitações atuais da creatinina na avaliação da filtração renal, a Penk poderá ajudar a sinalizar os danos na filtração renal.”

O certificado encontra-se no Anexo 6.

Em outubro de 2020, foi submetido o vídeo para o 1º encontro da pós-graduação da Universidade de São Paulo – “Elas fazem ciência”, aceito em outubro e apresentado em novembro de 2020 durante o encontro. Trata-se de um vídeo sobre a tese no contexto dos 17 objetivos da Organizações da Nações Unidas para o desenvolvimento sustentável, o manuscrito se enquadrava no objetivo 3 – saúde e bem estar – visando o diagnóstico precoce de uma doença que afeta 13 milhões de pessoas por ano a Injúria Renal Aguda e têm mortalidade alta que chega à 80% em ambiente de unidade de terapia intensiva. O diagnóstico precoce, visa mudar o curso da doença e diminuir sua incidência e mortalidade.

O certificado encontra-se no Anexo 7.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar se um painel de biomarcadores de função refletindo diferentes funções do néfron poderia ser uma ferramenta prognóstica para determinar a gravidade e o risco de progressão da IRA no período perioperatório de TH (no pré-operatório e no pós-operatório até 48 horas após TH).

2.2 Objetivos secundários

1. Construir um painel ideal de biomarcador para avaliar a função afetada na IRA, sendo o painel dividido em BM: filtração (P CYS C e PENK); injúria (IL-18, KIM-1, NGAL e U CYS-C); estresse tubular (GST-pi e L-FABP), reabsorção glomerular (α -1M e U ALB); secreção tubular (FeNa, FeU, FePCS e FeHA), concentração (OSM) fibrose (MCP, TIMP-1), reserva tubular (UMOD) e lesão de DNA.
 2. Avaliar a diferença no nível de expressão dos biomarcadores entre os períodos pré e pós-operatórios.
 3. Avaliar se um painel de BM de função refletindo diferentes funções do néfron poderia ser uma ferramenta prognóstica para prever a necessidade de TRS, em uma semana, e a mortalidade, em 60 dias, no período perioperatório de TH (no pré-operatório e no pós-operatório até 48 horas após TH).
-

3. PROTOCOLO DE ESTUDO

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de coorte, observacional e prospectivo, que foi realizado em pacientes no perioperatório de transplante hepático. Acompanhamos os pacientes maiores de 18 anos, no pré, no intra e no pós-operatórios de transplante hepático. Os pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram acompanhados após sua inclusão no estudo. Seis amostras de sangue e urina foram colhidas no pré, no intra e no pós-operatórios, para a avaliação de microscopia, bioquímica urinária, creatinina e biomarcadores precoces de injúria renal aguda.

3.2 Seleção da amostra

O protocolo foi apresentado aos pacientes maiores de 18 anos, no pré-operatório de transplante hepático, que possuíam os critérios de inclusão e não tinham os critérios de exclusão, sendo que, os que aceitaram participar deste estudo, assinaram o TCLE. Em caso de impossibilidade física ou mental, o TCLE foi assinado por um representante legal.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Idade maior do que 18 anos.
- Pacientes ativos em lista de espera de transplante hepático.
- Assinatura do TCLE.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Retransplante de fígado.
 - Transplantes combinados.
 - Transplantados renais.
 - Pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) dialítica.
-

- Pacientes anúricos.
- Pacientes em tratamento dialítico no pré-operatório de transplante hepático.

3.3 Cálculo da amostra

O cálculo da amostra foi baseado no objetivo principal do estudo, de avaliar se o padrão de elevação dos biomarcadores pode preceder o diagnóstico da IRA baseado na creatinina.

Baseados em estudos epidemiológicos em transplante hepático, e aplicando-se o critério da creatinina sérica da classificação de KDIGO, estimamos que a incidência de IRA na população de pacientes críticos, com critérios de alto risco, seria de 70% em 7 dias. Os estudos experimentais e alguns estudos clínicos comparando o tempo para diagnóstico da IRA mostram que os biomarcadores precoces apresentam elevação entre 24 e 48 horas antes da creatinina sérica em pacientes que evoluem com injúria renal. Com esses dados, calculamos que, para mostrar a diferença de, pelo menos, 1 dia entre o diagnóstico baseado em biomarcadores precoces (60% da população nas primeiras 24/48h) e a classificação atual (30% da população nas primeiras 24/48h), baseada na creatinina sérica, em 25% dos pacientes com IRA, com poder de 80% e erro alfa de 0,05, precisaríamos incluir 101 pacientes no estudo.

3.4 Aspectos éticos

Este estudo recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, com registro na plataforma Brasil CAAE: 06636513.4.0000.0068 (Anexo 8). Antes do início da apresentação do instrumento de pesquisa, a pesquisadora explicou aos pacientes ou a seu representante legal a finalidade e a relevância do estudo, sendo enfatizado que a recusa do paciente não implicaria em qualquer prejuízo ao seu tratamento. Assim, foi obtido o termo de consentimento dos pacientes (Anexo 9) que concordaram em participar da pesquisa. Após assinatura do

TCLE, a história clínica do paciente foi coletada, com base nas informações do prontuário.

O protocolo foi registrado no *Clinical Trials*, estando disponível em <https://clinicaltrials.gov> (pelo identificador NCT 02095431), desde março de 2014, conforme (Anexo 10).

3.5 Avaliação dos pacientes de transplante hepático

A inclusão dos pacientes maiores de 18 anos ocorreu em dois momentos:

1. No ambulatório do fígado (Prédio dos Ambulatórios, 4º. andar), foram abordados os pacientes ativos em lista de espera de transplante de fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) que apresentaram o MELD maior do que 15, que não demonstraram nenhum dos critérios de exclusão e que concordaram em assinar o TCLE. Foi realizada visita eletiva, todas às quintas-feiras, às 14 horas, quando os pacientes passavam em consulta de rotina na Coordenação do Transplante para a atualização do MELD ou inclusão na lista.
2. No pré-operatório de transplante hepático, os pacientes internados, que se encontravam ativos na lista de espera de transplante hepático, que foram incluídos como prioridade, que não foram abordados anteriormente no ambulatório, que não apresentavam nenhum dos critérios de exclusão e que concordaram em assinar o TCLE.

3.6 Coleta de dados do paciente

3.6.1 Perioperatório

Após assinatura do TCLE, foram coletados, do prontuário médico, dados relativos à história, aos antecedentes e às comorbidades do paciente. Dados laboratoriais e clínicos foram registrados em folha específica, conforme o

protocolo (Anexo 11). As amostras de sangue e urina foram coletadas através de dispositivos comuns para a monitorização hemodinâmica deste tipo de paciente; o sangue, através de cateter venoso central (CVC) ou pressão arterial invasiva (PAI), e a urina, através do cateter vesical de demora (CVD) – ambos procedimentos rotineiros para o transplante de fígado.

3.6.2 *Durante a internação*

Após o período de coleta de amostras de sangue e urina, dados laboratoriais, referentes à função renal e à diurese, foram anotados no prontuário, diariamente, pelo período de sete dias. Resultados de exames de rotina e fatores associados à terapêutica foram também registrados durante a internação hospitalar e até a alta ou o óbito. A etiologia presumível da IRA, de acordo com o médico nefrologista ou intensivista, foi anotada.

3.6.3 *Após a alta hospitalar*

O acompanhamento das funções renal e hepática, após a alta hospitalar, foi realizado através do prontuário eletrônico em até um ano após o transplante. As seguintes informações foram anotadas:

1. Data de alta da UTI e do hospital.
2. Necessidade de diálise em UTI e no hospital.
3. Função renal na alta da UTI e do hospital.
4. Mortalidade na UTI, hospitalar, em 30 e 60 dias da internação.

As informações coletadas foram armazenadas no programa Red Cap. Os modelos de formulários de coleta estão no Anexo 11.

3.7 Coleta específica do protocolo

3.7.1 Coleta de material biológico e encaminhamento

Foram coletadas seis amostras de sangue e urina após a inclusão na pesquisa:

- 1° - no pré-operatório: antes da indução anestésica
- 2° - no intraoperatório: após a reperfusão portal
- 3° - no pós-operatório: 6 horas após o término da cirurgia
- 4° - no pós-operatório: 18 horas após a cirurgia
- 5° - no pós-operatório: 24 horas após a cirurgia
- 6° - no pós-operatório: 48 horas após a cirurgia

A coleta foi realizada utilizando-se 4 tubos roxos, totalizando 16 ml de sangue, e 4 frascos tipo Falcon de urina, totalizando 30ml de urina. A coleta de sangue foi realizada por dispositivos venosos, como pressão arterial invasiva ou cateter venoso central, respeitando normas de antissepsia e isolamento de contato dos pacientes. A urina coletada, pelo cateter vesical de demora, foi de diurese recente; foi recomendada a retirada da urina do frasco, para a coleta de uma nova urina. Após cada coleta, o material foi mantido no gelo até o encaminhamento ao laboratório.

Três frascos de urina tipo Falcon foram encaminhados ao Laboratório Central, no 2º. andar do Prédio dos Ambulatórios. No pedido, foram solicitadas bioquímica urinária (creatinina, U, Na, potássio - K, fósforo - P e cloro - Cl) e osmolaridade urinária, padrão microscópico (Urina tipo 1). O pedido foi identificado com o carimbo vermelho do protocolo PR 982.

3.7.2 *Preparo do material para armazenamento*

As amostras de sangue e urina foram centrifugadas no Laboratório da Nefrologia (5º. andar do prédio dos ambulatórios) para remoção de componentes celulares, detritos e sobrenadante. O sangue foi centrifugado à velocidade de 3.000 rotações por minuto (rpm), por 15 minutos, enquanto a urina foi à velocidade de 1.000 rpm, por 10 minutos. Após a centrifugação, o material foi aspirado com uma pipeta pequena e foi colocado em 8 ependorfs, sendo 4 de plasma e 4 de urina. Os tubos não foram preenchidos até o topo, evitando a abertura do frasco após o congelamento. Todas as amostras foram previamente identificadas com nome e sobrenome, tipo de material (plasma ou urina), número da coleta (1 a 6) e data da obtenção da amostra.

O material (ependorf) foi encaminhado ao refrigerador -80°C, localizado no 7º. andar, na sala de pesquisa do transplante renal, com sua localização identificada na planilha de controle das caixas.

Foi preparado um manual de procedimento operacional padrão (POP) para os participantes diretos e indiretos do processo, para a manutenção de padrão de qualidade na execução do estudo (Anexo 12).

Os resultados destas análises não foram avaliados durante o período de acompanhamento e não afetaram o cuidado médico do paciente.

3.7.3 *Encaminhamento do material para o Laboratório da Universidade de San Diego – Califórnia*

O material biológico (sangue e urina) foi encaminhado para o laboratório da Universidade de San Diego, na Califórnia - UCSD, para análise de filtração, injúria, estresse tubular, reabsorção glomerular, secreção tubular, concentração, fibrose e reserva tubular, com o objetivo de construir um painel ideal de biomarcador para avaliar/determinar o local da lesão, o tipo e o estadiamento da IRA.

O transporte do material biológico somente foi realizado após a aprovação da CAPPesq local (HCFMUSP) – esta aprovação encontra-se no Anexo 13. O

transporte obedeceu as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da Agência Nacional de Aviação Civil (ANAC), conforme legislação vigente: ABNT NBR 7500:2013, ABNT NBR 15481:2013, ABNT NBR 7501:2011, ABNT NBR 9735:2014, ABNT NBR 14785:2002 ⁴⁹. Também foi solicitada a aprovação da importação do material biológico pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) – esta carta de aprovação encontra-se no Anexo 14.

A análise do material no exterior teve a finalidade exclusiva de ensino e pesquisa, visto que trata-se de uma ampliação do protocolo inicial conduzido pelas pesquisadoras responsáveis – a Dra. Etienne Macedo e a executante Camila Lima. Atualmente, a Dra. Etienne Macedo é médica assistente e professora da Universidade de San Diego, assim como professora convidada na Universidade de São Paulo. A ampliação desta pesquisa será a defesa de doutorado da pesquisadora Camila Lima.

3.7.4 Seleção do painel dos biomarcadores no estudo

Foram avaliados os níveis de expressão dos BM conforme o local afetado no néfron: BM de filtração (P CYS C e PENK); BM de injúria (IL-18, KIM-1, NGAL e U CYS-C); de estresse oxidativo (GST-pi e L-FABP); BM de reabsorção glomerular (a-1M e U ALB); BM de secreção tubular (FeNa, FeU, FePCS e FeHA), BM de concentração (OSM); BM de fibrose (MCP e TIMP-1); BM de reserva tubular (UMOD) e parada de ciclo celular (lesão DNA); no perioperatório do TH. Os BM selecionados foram baseados em revisão de literatura.

3.7.5 Dosagem do NGAL sérico e urinário

O NGAL Test™ (Bioporto, Gentofte, Dinamarca) é um imunoensaio turbidimétrico com aumento de partículas reforçadas (PETIA - particle-enhance turbidimetric immunoassay; NGAL Test TM; Bioporto Diagnosis A/S), para a quantificação de NGAL em urina humana, plasma com heparina e EDTA em uma variedade de analisadores automatizados de química clínica. As amostras foram

processadas no analisador automático Labmax 560, no Laboratório Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante.

No analisador automático Labmax 560, 3 µL da amostra (plasma ou urina) do paciente foram automaticamente misturados com 150 µL de solução tampão (R1). Após curta incubação, de 300 segundos a 37 °C, foi iniciada a adição de 50 µL, a partir de uma suspensão do reagente (R2), que contém micropartículas de poliestireno revestidas com anticorpos monoclonais para NGAL humano. A presença de NGAL na amostra provoca a agregação de imunopartículas (turvação), sendo quantificada pela perda de intensidade da luz transmitida devido às propriedades de dispersão das partículas agregadas. A reação de absorção da luz foi medida a 570 nm, a cada 15 e 300 segundos após a adição de R2.

A determinação de NGAL foi realizada em amostras de urina e plasma humanos colhidas em EDTA utilizando-se o produto NGAL Turbiquest Ref. 365, calibrado com o Calibra NGAL Ref. 367 e submetido ao controle de qualidade com o Qualitrol NGAL Ref. 366.

A concentração de NGAL na amostra foi então calculada por interpolação em uma curva de calibração estabelecida; utilizaram-se solução de cloreto de sódio 0,85% (salina), como branco, e cinco calibradores, que compõem o produto Calibra NGAL Ref. 367, nas concentrações de 150, 600, 1.500, 3.000 e 5.000 ng/mL. Os resultados dos testes são relatados em ng/ml.

Na sequência, dois níveis de material controle, que compõem o produto Qualitrol NGAL Ref. 366, foram ensaiados e avaliados conforme a recuperação de valor proposta pelo fabricante. Tanto o controle quanto os calibradores foram ensaiados em triplicata e o coeficiente de variação (%) foi determinado.

As amostras, então, foram ensaiadas para a determinação de NGAL; aquelas que apresentavam valores superiores ao último ponto de calibração N5000 ng/mL foram diluídas em 1:10 com solução salina, reensaiadas e, então, a concentração foi multiplicada pelo fator de diluição para recuperar o valor exato do analito.

3.7.6 Dosagem do KIM-1, GST-pi, L-FABP e da IL-18

O KIM-1, GST-pi, L-FABP e a IL-18 foram analisados pelo princípio Luminex, o qual possui o princípio similar ao ELISA sanduíche. Microesferas coloridas fluorescentes (também chamadas de *beads*) ligam-se de forma covalente aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. Após uma série de lavagens, para remover as proteínas não ligadas, anticorpos de detecção são adicionados, para criar o complexo sanduíche. A detecção final do complexo é formada com a adição do conjugado de streptavidina-ficoeritrina. A ficoeritrina serve como um indicador fluorescente.

O princípio do Luminex está baseado em três principais elementos da tecnologia xMAP (citometria de fluxo adaptada para distinguir *beads* coloridas):

- a) *Beads* que possuem um código de cor distinto ou um endereço espectral que permite discriminação individual na suspensão multiplex. Isto permite detecção simultânea de números tipos diferentes de moléculas em um único poço.
- b) Citômetro de fluxo com 2 *lasers* associados, para medir diferentes moléculas ligadas à superfície das *beads*: (1) *Laser* vermelho – 635nm – classifica as *beads* em cores distintas, portanto, identifica os diferentes biomarcadores; (2) *Laser* verde – 532nm – ao excitar a ficoeritrina, gera um sinal proporcional à concentração do biomarcador na amostra.
- c) Processador de sinal digital que administra os dados da fluorescência. Milliplex®.

3.7.7 Dosagem da creatinina pelo método de Jaffé

As creatininas séricas e urinárias apresentadas no estudo, para o diagnóstico da IRA, e outras apresentações, exceto por período de coleta, foram determinadas pelo método de ensaio colorimétrico cinético baseado no método de Jaffé.

O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante com ou sem gel com capacidade de 4 a 5 ml (tampa vermelha ou amarela). O volume mínimo para a análise foi de 3,0 ml de sangue. O transporte foi realizado à temperatura ambiente, tendo estabilidade de até 48 horas entre 15 e 25 °C.

A diurese foi coletada no frasco de urina com o volume mínimo ideal de 10 ml. A urina foi coletada em pacientes que possuíam CVD e volume de diurese suficiente para realizar a análise. Toda coleta de urina foi realizada de uma urina recente. O transporte foi realizado no gelóx até o Laboratório Central, imediatamente após a coleta.

A descrição do ensaio colorimétrico cinético foi baseada no método Jaffé: numa solução alcalina, a creatinina forma um complexo amarelo-avermelhado com picrato. A taxa de formação do corante é proporcional à concentração de creatinina na amostra. Os ensaios que utilizam *rate-blanking* minimizam a interferência por bilirrubina. Para corrigir a reação não específica causada pelos cromogênios pseudocreatinínicos, incluindo proteínas e cetonas, os resultados para soro ou plasma são corrigidos em -0,3 mg/dL.

O reagente utilizado foi um kit da Roche (artigo nº 06407137190). O analisador foi o Cobas c720 da Roche.

As análises foram dosadas no Laboratório Central, o qual tem inúmeras certificações de qualidade nacionais (NBR ISO 9001, OHSAS 18001, NBR ISO 14001) e internacionais (The International Certification Network e College of American Pathologists), vigentes durante a realização do estudo, validando os resultados da análise.

3.7.8 *Dosagem da creatinina pelo método de quimioluminescência*

As creatininas séricas das coletas (pré-operatório e até 48 horas após a cirurgia) foram determinadas pelo método de quimioluminescência no equipamento Olympus. Todos os dias, foi passado o controle da seguinte forma: nível 1 = 1,66 - 2,34, o valor encontrado foi de 1,94mg/dl; nível 2 = 4,71 - 5,89, o valor encontrado foi de 5,17 mg/dl.

Os reagentes utilizados para análise por quimioluminescência foram:

Reagente A: solução contendo creatinase 36 kU/l, sarcosina oxidase 11 kU/l, catalase 300 kU/l, ascorbato oxidase 3 kU/l e tampão Goods 20 mmol/l pH 8,2 com N-etil-N-2- hidroxi-3-sulfopropil-3-metilanilina (TOOS) 1 mmol/l. B.

Reagente B: solução contendo 4-aminofenazona (4-AF) 4 mmol/l, creatinase 370 kU/l, peroxidase 15 kU/l, azida de sódio 0,8 g/l e tampão 20 mmol/l pH 8,0

3.7.9 Dosagem da bioquímica urinária

A urina foi coletada no frasco de urina com o volume mínimo ideal de 10 ml para cada análise (bioquímica) e mais 10 ml isolado somente para análise da osmolaridade. A urina foi coletada em pacientes que possuíam CVD e volume de urina suficiente para realizar a análise. Toda coleta de urina foi realizada de uma urina recente. O transporte foi realizado no gelóx até o Laboratório Central, imediatamente após a coleta.

As análises da bioquímica e microscopia urinária foram realizadas no Laboratório Central do HCFMUSP.

Os materiais utilizados para análise da osmolaridade foram: ponteiras e cotonetes específicos do equipamento (descartáveis) e micropipeta específica do equipamento. O método foi o abaixamento crioscópico, no equipamento osmômetro da Advanced Instruments, modelo 3320.

Na análise da bioquímica urinária para dosagem de potássio, sódio (Na) e cloro (Cl), foi utilizada a técnica de eletrodo íon seletivo indireto no analisador Cobas, modelo ISE, utilizando o kit da Roche; para avaliação do fósforo, foi utilizada a técnica de molibdato UV no analisador Cobas, modelo c720, utilizando o kit da Roche; e, para avaliação da ureia, foi utilizado o método cinético UV com ação da uréase, no analisador Cobas, modelo c720, utilizando o kit da Roche.

3.7.10 Dosagem dos demais biomarcadores na Universidade de San Diego

As amostras de urina humana foram centrifugadas a 2.000 rpm, por 10 min, para dissolver os detritos. Para a análise do BM a-1M, o sobrenadante foi diluído 400 vezes e analisado usando o kit ABCAM (Ab226899). As amostras de urina foram diluídas 200 vezes e a albumina foi medida usando o kit Abnova (KA0455). O biomarcador Cistatina C foi medido na urina (diluída 5 vezes) e no plasma (diluído 50 vezes) usando o kit BioLegend (445507) (San Diego, CA, EUA). O QuantiChrom™ Urea Assay Kit (DIUR-100), da Bioassay Systems (Hayward, CA, EUA), foi utilizado para medir a ureia em 5 µl da amostra (urina/plasma). As medições de ureia em (mg/dL) = [ureia]/2,14. (1 mg/dL de ureia é igual a 167 µM, 0,001% ou 10 ppm). O kit de imunensaio Sphingotest® penKid® (PEK96) mede, no Proenkephalin119-159 plasmático, um substituto estável para o hormônio estimulador renal encefalina por ensaio imunoluminométrico em pmol/L. MCP-1, após a diluição de amostras de urina 1: 1 usando sistemas de P&D, biotecnologia Imunensaio de CCL2/MCP1 (DCP100) (Minneapolis, MB, EUA). Cistatina C na urina e alfa 1-Microglobulina foram ajustadas para creatinina na urina. As concentrações de UMOD em amostras de plasma humano foram medidas usando um kit ELISA da Sigma-Aldrich (número de catálogo RAB0751), com o protocolo do fabricante.

Análise das amostras de urina do hipurato (HA) e pre-creasol (PCS): 0,5ml da amostra de urina foi filtrada através de filtros Nanosep® 3000da MWCO pré-lavados. Amostra de 0,5% foi usada para análise. Análise de hipurato de amostras de plasma e soro: 0,25ml de amostra de soro / plasma foi tratada com acetonitrila para extração de hipurato. Amostra de 5% foi usada para análise. A análise *Ultra-Performance Liquid Chromatography* foi realizada usando o sistema LC de ultra-desempenho Waters Acquity™ com detectores de UV e fluorescência conectados em tandem. A coluna Acquity UPLC® BEH C18 de 1,7 µm, 2,1x100 mm foi usada com taxa de fluxo de 0,4mL / min e volume de injeção de amostra de 10 µL.

Método de eluição: tempo total de execução 30min, sendo :0min -5min, acetonitrila aquosa a 8% (0,1% TFA), 5min - 15min, 8% a 80% um gradiente linear de aq. acetonitrila (0,1% TFA), 15 min -21 min, manter a 80% aq.

acetonitrila (0,1% TFA), 22 min -30 min, equilíbrio da coluna a 8% aq. acetonitrila (0,1% TFA). Para detecção de HA UV (232nm) foi usado e para detecção de fluorescência de PCS (260nm - 288nm).

Para a quantificação do HA e do PCS foi obtida uma curva de calibração na faixa de 0,0312µg -1µg utilizando padrões. Valores desconhecidos foram calculados usando o software Chromeleon 7 (Thermo Scientific).

Para calcular a excreção fracionária do biomarcador (HA e PCS), foi utilizada a fórmula: $[(\text{biomarcador em questão (BM) urinário}) \div ((\text{plasma BM}) \times ((\text{creatinina urinário}) \div (\text{Creatinina plasma})))] \times 100$.

3.7.11 Resumo dos biomarcadores analisados no estudo

O método de análise e marca utilizado na dosagem dos biomarcadores apresentados no manuscrito estão resumidos na Tabela 2. Como não foi possível, dosar todos os seis períodos de coleta de todos os biomarcadores, foi selecionado alguns períodos, disponíveis na Tabela 2. O valor do pós-operatório até 48 horas após o TH, em biomarcadores com mais de uma dosagem, foi considerado o valor mais alto de todos os períodos.

Tabela 2 - Resumo das dosagens dos biomarcadores, assim como os períodos dosados

BM	MÉTODO DE ANÁLISE	MARCA	PERÍODOS DOSADOS
U/ P NGAL	PETIA	BIOPORTO S/A	Pré-op, APR, 6, 18, 24 e 48 h após TH.
IL-18/ KIM-1/ GST-pi/ L-FABP	LUMINEX	Milliplex®	Pré-op, APR, 6, 18, 24 e 48 h após TH.
A-1M	ELISA	ABCAM	Pré-op, 18, e 48 h após TH.
ALB	ELISA	Abnova	Pré-op, 18, e 48 h após TH.
CYS	ELISA	Biolegend	Pré-op, 18, e 48 h após TH.

Continua.

BM	MÉTODO DE ANÁLISE	MARCA	PERÍODOS DOSADOS
PENK	ELISA	Sphingotest®	Pré-op, 18, e 48 h após TH.
MCP-1	ELISA	P&D	Pré-op, 18, e 48 h após TH.
UMOD	ELISA	Sigma-Aldrick	Pré-op, 18, e 48 h após TH.
HA e PCS	UPLC	Sigma-Aldrick	Pré-op, 18, e 48 h após TH.

Conclusão.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.8 Desfechos

3.8.1 Primário

O desfecho primário do estudo foi a avaliação de que um painel de biomarcadores, representando diferentes funções do nefrón, pode determinar o desenvolvimento, a progressão e a gravidade da IRA no perioperatório de TH.

O diagnóstico da IRA foi definido pelo critério KDIGO, baseado na creatinina sérica até 7 dias após o TH, definido como:

Estádio 1 – aumento da creatinina sérica igual ou $>1,5$ - $1,9$ vezes o valor basal em 7 dias ou igual ou $>0,3$ mg/dl ($>26,5$ micromol/l), em até 48 horas, ou débito urinário $<0,5$ ml/kg/h durante 6 a 12 horas.

Estádio 2 – aumento da creatinina sérica igual ou $>2,0$ - $2,9$ vezes o valor basal ou débito urinário $<0,5$ ml/kg/h por >12 horas.

Estádio 3 – aumento da creatinina sérica 3,0 vezes o valor basal ou igual ou $>4,0$ mg/dl ($\geq 353,6$ micromol/l) ou débito urinário $<0,3$ mg/kg/h, por 24 horas, ou anúria por >12 horas ou início de terapia de substituição renal ou, em pacientes < 18 anos, diminuição da taxa de filtração glomerular estimada <35 ml/min por $1,73\text{m}^2$ ⁶.

Foi utilizada uma subclassificação do KDIGO 1, suportada pelo Clube Internacional da Ascite, para o diagnóstico da IRA em pacientes cirróticos, na qual o KDIGO 1 é subclassificado em dois subgrupos, baseado no valor da creatinina sérica (SCr): estágio 1A (SCr < 1,5 mg/dL) e estágio 1B (SCr ≥ 1,5 mg/dL) ⁸⁻⁹.

3.8.2 Secundários

- Desenvolvimento de IRA baseado na creatinina.
- Progressão da IRA pelo critério do KDIGO.
- Necessidade de TRS na primeira semana.
- Mortalidade hospitalar em 60 dias.

A figura 2, abaixo demonstra um resumo do fluxograma do protocolo de pesquisa, os biomarcadores e os desfechos analisados.

Figura 2 - Resumo do protocolo de estudo

Fonte: Elaborado pela autora.

3.9 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas em número (%), as variáveis contínuas foram expressas como médias e desvios-padrão e as variáveis não paramétricas foram expressas como mediana e percentis de 25-75.

A distribuição gaussiana foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a correlação (análise) da variável contínua com distribuição normal, utilizou-se o teste t ou teste de Pearson e, para variáveis contínuas com distribuição não normal, utilizamos o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon rank) ou o teste de Spearman. Os dados categóricos foram comparados utilizando-se qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística. Para calcular a sensibilidade e a especificidade para as medições dos biomarcadores em valores de corte variáveis, foi gerada uma curva de característica de operação de receptor convencional (ROC); a área sob a curva (AUC) foi calculada para quantificar a precisão dos biomarcadores para predição da IRA, da gravidade, da necessidade TRS e da mortalidade. O intervalo de confiança (IC) de 95% foi demonstrado nos resultados.

O modelo de regressão logística múltipla utilizado no estudo incluiu os BM em destaque com $p \leq 0,05$, com variáveis controle: idade, tempo de anestesia, diurese e balanço hídrico; as variáveis relacionadas aos desfechos foram expressas através de *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95%. As análises foram realizadas no *software* estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 20 (Chicago, Illinois).

3.9.1 Análise estatística do CART

A *Classification and Regression Tree* (CART) é uma análise não paramétrica, que combina valores de variáveis, na qual estas são classificadas por ordem de melhor discriminação. No nosso estudo, a hipótese seria qual biomarcador tem a melhor discriminação entre os pacientes com IRA grave e sem IRA/IRA leve, necessidade de TRS e mortalidade.

A combinação das variáveis e os possíveis valores de corte usados para a classificação são determinados através de exaustiva pesquisa de todas as possibilidades no algoritmo da CART ⁵⁰.

Os resultados são apresentados na árvore de decisão, com muitas variáveis. A seleção dessas variáveis é baseada em qual delas melhor discrimina os grupos definidos – por ordem de concordância com o diagnóstico, a acurácia, a sensibilidade e a especificidade, quando é demonstrado um valor de corte. Trata-se de uma estratégia útil no nosso cenário, no qual foram analisados vários biomarcadores. O resultado da árvore permite exemplificar, na prática clínica, a decisão de primeira escolha (variável principal) na determinação do grupo com IRA grave, a predição dos desfechos, a necessidade de TRS e a mortalidade. As demais variáveis melhoram a *performance* da primeira, aumentando a probabilidade de concordância do diagnóstico correto.

A análise da CART foi realizada usando o pacote R “tree” no R (versão 3.3.1, 2016).

4. RESULTADOS

4.1 Rastreamento

A inclusão dos pacientes elegíveis para o estudo foi realizada em dois momentos: no ambulatório do fígado, abordando os pacientes ativos em lista de espera de transplante de fígado, com MELD maior do que 15, e no pré-operatório, nos pacientes incluídos como prioridade, não abordados anteriormente no ambulatório. O TCLE foi coletado para todos os pacientes que aceitaram participar do estudo.

De junho de 2013 a junho de 2015, 189 pacientes foram submetidos a transplante de fígado (Figura 3). Dos 138 pacientes elegíveis para o estudo, 100 pacientes foram incluídos nele.

Figura 3 - Diagrama demonstrando os motivos de exclusão no protocolo

Fonte: Elaborado pela autora.

Dos 189 pacientes submetidos a transplante hepático no período, 21 estavam em diálise pré-transplante, 18 eram de retransplante, 7 foram

submetidos a transplante duplo e 3 apresentavam doença renal crônica. Entre os 138 pacientes elegíveis para o estudo, em 16 houve problema na comunicação da coordenação do transplante com a pesquisadora executante, em 13 casos, o laboratório da nefrologia, responsável pelo preparo das amostras, estava fechado. Três pacientes se recusaram a participar do estudo e seis não tinham familiar responsável para assinar o TCLE.

4.1.1 Classificação dos pacientes incluídos em relação à IRA

O diagnóstico da IRA foi realizado pelo critério do KDIGO, baseado apenas na creatinina sérica: aumento de 0,3mg/dl em 48 horas ou >1,5 do valor de referência em 7 dias. A creatinina de referência foi considerada no lugar da creatinina de base, nos pacientes que não tinham Scr de base, sendo o menor valor da última semana antes do transplante e, na ausência desse valor, foi utilizada creatinina do pré-operatório.

Foram diagnosticados 89 pacientes (89%) com IRA na primeira semana, pelo critério KDIGO baseado na creatinina sérica.

Figura 4 - Os pacientes incluídos e o diagnóstico de IRA

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2 Classificação dos pacientes incluídos em relação à definição do grupo de IRA

Os grupos foram divididos entre o KDIGO máximo atingido na primeira semana de pós-operatório. O KDIGO máximo atingido nos 7 dias pós-operatórios foram: KDIGO 1 (32), KDIGO 2 (24) e KDIGO 3 (33). A subclassificação do KDIGO 1, conforme a critério da ICA, foi: KDIGO 1 A – 26 pacientes e KDIGO 1B – 6 pacientes. Os grupos foram sumarizados em grupo não IRA/IRA leve definidos como KDIGO 0 e 1-A, com 37 pacientes, e grupo IRA grave, com os KDIGO 1-B, 2 e 3, com 63 pacientes. Conforme a figura abaixo:

Figura 5 - Definição do grupo de IRA no estudo

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Características demográficas do grupo não IRA/IRA leve e IRA grave

Os resultados das características demográficas estão representados na Tabela 3. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao sexo, ao índice de massa corpórea (IMC), à raça e ao estado civil. O MELD funcional é determinado pela fórmula: $3,8 [\log \text{ e bilirrubina sérica (mg/dl)}] + 11,2 [\log \text{ INR}] + 9,6 [\log \text{ creatinina sérica (mg/dl)}] + 6,4$, enquanto o MELD do transplante é definido pelo valor da fórmula somado com as pontuações de situações

especiais. Pacientes do grupo IRA grave apresentam MELD funcional e o MELD do transplante maiores do que no grupo não IRA/IRA leve.

Tabela 3 - Características demográficas dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave

	TOTAL	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
	100 (100)	37 (37)	63 (63)	
Idade	58 (12,25)	56,80 (12,81)	54 (11,13)	0,123
Sexo (M)	64 (64)	26 (40,6)	38 (59,4)	0,31
IMC	26 (4,38)	25,67 (3,14)	26,05 (5,18)	0,476
Raça				0,649
Branco	86 (86)	32 (37,2)	54 (62,8)	
Mulato	06 (06)	01 (16,7)	05 (83,3)	
Negro	06 (06)	03 (50)	03 (50)	
Amarelo	02 (02)	01 (50)	01 (50)	
Estado Civil				
Casado	63 (63)	20 (32)	43 (68)	
Solteiro	21 (21)	09 (43)	12 (57)	
Amasiado	07 (07)	03 (43)	04 (57)	0,63
Viúvo	05 (05)	03 (60)	02 (40)	
Divorciado	04 (04)	02 (50)	02 (50)	
MELD funcional	15 (11-19)	13,83 (4,57)	17,81 (6,86)	0,014
MELD transplante de fígado	29 (29-29)	27,67 (3,37)	29,25 (3,33)	0,044

Nota: Os dados são expressos conforme sua distribuição: a distribuição paramétrica foi idade, MELD funcional e MELD transplante de fígado e IMC representado em média e desvio-padrão; as demais estão representadas como número e porcentagem (%). O teste de normalidade realizado foi de Shapiro-Wilk. M (masculino), IMC (índice de massa corpórea).

Fonte: Elaborado pela autora.

Não houve diferença entre os grupo de acordo com as comorbidades (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave conforme comorbidades

COMORBIDADES	TOTAL	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
Diabetes Mellitus	28 (28)	13 (46,4)	15 (53,6)	0,25
Ex-tabagismo	28 (28)	11 (39,3)	17 (60,7)	0,819
Ex-etilismo	22 (22)	09 (41)	13 (59)	0,803
Hipertensão Arterial Sistêmica	33 (33)	11 (33,3)	22 (66,7)	0,66
Hipotireoidismo	13 (13)	05 (38,5)	08 (61,5)	1,00

Nota: Os dados são expressos em n (%) conforme sua distribuição.

Fonte: Elaborado pela autora.

A causa da insuficiência hepática Gráfico 1, mais prevalente no grupo é o vírus da hepatite C, representando 46 casos (46%), seguida da cirrose alcoólica, com 13 casos (13%), e da cirrose criptogênica, com 12 casos (12%) – representando mais de 70% das patologias do transplante de fígado (Tabela 5).

Gráfico 1 - Causas principais da insuficiência hepática para o transplante

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 - Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme as causas principais de insuficiência hepática para o transplante

INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA PARA TRANSPLANTE	TOTAL	NÃO IRA/ IRA LEVE	IRA GRAVE	P
Vírus da hepatite C	46 (46)	14 (30,4)	32 (69,6)	0,44
Cirrose alcoólica	13 (13)	07 (53,8)	06 (46,2)	0,68
Cirrose criptogênica	12 (12)	05 (42)	07 (58)	0,96
Hepatite aguda grave	06 (06)	02 (33,3)	04 (66,7)	0,64
Vírus da hepatite B	04 (04)	03 (75)	01 (25)	0,7
Cirrose biliar primária	03 (03)	02 (67)	01 (33)	0,35
Hepatocarcinoma	02 (02)	01 (50)	01 (50)	0,79
Síndrome de Budd Chiari	02 (02)	00 (00)	02 (100)	0,23
Colangite esclerosante primária	02 (02)	00 (00)	02 (100)	0,23
Hepatite autoimune	02 (02)	00 (00)	02 (100)	0,79
Cirrose biliar secundária	02 (02)	02 (100)	00 (00)	0,08
Atresia de vias biliares	02 (02)	01 (50)	01 (50)	0,79
Hemacromatose	01 (01)	00 (00)	01 (100)	0,4
Esteato Hepatite Não Alcoólica	01 (01)	00 (00)	01 (100)	0,4
Doença de Wilson	01 (01)	00 (00)	01 (100)	0,4
Doença hepática policística	01 (01)	00 (00)	01 (100)	0,22

Nota: Os dados são expressos em n (%) conforme sua distribuição.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Avaliação da função renal dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave

A Scr base apresentou distribuição semelhante entre os grupos (Tabela 6). O grupo com IRA grave apresentou uma Scr referência significativamente maior. A TFG calculada pelo CKD-EPI foi menor no grupo com IRA grave – tanto pela creatinina base quanto pela creatinina na admissão do hospital.

Tabela 6 - Avaliação da função renal conforme distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave

	TOTAL	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
Scr base	0,85 (0,36)	0,80 (0,42)	0,88 (0,33)	0,104
Scr referência	0,85 (0,35)	0,79 (0,36)	0,89 (0,34)	0,048
eTFG base (EPI) ml/min	92,31 (25,64)	98,07 (23,55)	89,66 (26,21)	0,289
eTFG adm. (EPI) ml/min	100,46 (25,13)	100,27 (23,95)	98,03 (25,13)	0,104

Nota: Os dados são expressos em média e desvio-padrão, conforme sua distribuição paramétrica. O teste de normalidade realizado foi Shapiro-Wilk. Scr (creatinina sérica), eTFG (taxa de filtração glomerular estimada), adm. (admissão).

Fonte: Elaborado pela autora.

O valor da diurese foi incluído apenas nos pacientes que tinham controle do débito urinário durante a primeira semana de internação da UTI. Pacientes que receberam alta da UTI ou que estavam sem medida de quantificação urinária não foram incluídos.

A média da diurese é representada na Tabela 7. Os valores de diurese dos pacientes não IRA/IRA leve foram superiores na primeira semana após o transplante hepático, com diferença estatística $p < 0,05$, na maioria dos períodos da coleta, exceto no 6º. dia e no 7º. dia.

Tabela 7 - Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme a diurese na primeira semana após o transplante hepático

	TOTAL	NÃO IRA/ IRA LEVE	IRA GRAVE	P
Diurese SO	1.063,95 (742,35)	1.346,18 (853,85)	929,91(649,87)	0,007
Diurese 1º dia UTI	488,30 (432,02)	667,35 (468,84)	375,56 (368,78)	0,001
Diurese 2º dia UTI	698,82 (613,77)	1.037,65 (643,64)	472,94 (478,91)	<0,001
Diurese 3º dia UTI	885,73 (870,01)	1275,81 (811,57)	547,38 (766,80)	<0,001
Diurese 4º dia UTI	756,23 (835,11)	1.217,90 (811,57)	547,38 (766,80)	<0,001
Diurese 5º dia UTI	844,40 (931,98)	1.356,92 (740,44)	664,32 (933,44)	0,004
Diurese 6º dia UTI	556,90 (664,68)	576,25 (416,69)	552,35 (715,52)	0,289
Diurese 7º dia UTI	549,09 (901,28)	630 (42,43)	543,87 (930,56)	0,307

Nota: Os dados são expressos em média e desvio-padrão, conforme sua distribuição paramétrica. O teste de normalidade realizado foi Shapiro-Wilk. SO (sala de operação), UTI (unidade de terapia intensiva).

Fonte: Elaborado pela autora.

A média do balanço hídrico é representada na Tabela 8. Os valores do balanço hídrico foram maiores no grupo IRA grave no intraoperatório, primeiro e segundo dias de UTI, mas sem significância estatística.

Tabela 8 - Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme o balanço hídrico (BH) na primeira semana após o transplante

	TOTAL	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
BH SO	3.918,20 (3251)	3.468,70 (2928)	4.203,46 (3437)	0,478
BH 1º dia UTI	1.554,85 (1212)	1.156,47 (950)	1.642,72 (1326)	0,106
BH 2º dia UTI	1.150,81 (1324)	919,82 (923)	1.304,80 (1525)	0,198
BH 3º dia UTI	491,17 (1638)	535,50 (1033)	465,09 (1916)	0,567
BH 4º dia UTI	(-)180,66 (1444)	(-) 87,69 (671,28)	(-) 222,71 (1688)	0,703
BH 5º dia UTI	100,64 (1223)	(-) 152,31 (791)	189,51 (1339,72)	0,293
BH 6º dia UTI	(-) 93,42 (1506)	121,25 (803)	(-) 142,49 (1629)	0,635
BH 7º dia UTI	(-) 15 (1505)	523,33 (711,22)	(-) 65,47 (1556)	0,635

Nota: Os dados são expressos em mediana e percentil (25-75), conforme sua distribuição não paramétrica. O teste de normalidade realizado foi Shapiro-Wilk. BH (balanço hídrico), SO (sala de operação), UTI (unidade de terapia intensiva).

Fonte: Elaborado pela autora.

O diurético foi utilizado, na primeira semana após o transplante, em 42 (42%) pacientes. O diurético de escolha foi o diurético de alça; na sala operatória, houve apenas um caso de utilização de diurético osmótico.

4.4 Dados intraoperatórios dos pacientes do transplante hepático

O tipo de doador foi prevalentemente cadáver (99), com apenas um caso de doação intervivos. A técnica cirúrgica predominante foi piggyback sem clamp veia cava (80), seguida de 9 casos com piggyback com clamp de veia cava e 11 convencionais. O peso médio do enxerto foi de 1.328 gramas (g), com DP de 315g, mínimo de 750g e máximo de 2.290g.

Os pacientes apresentam distribuições semelhante quanto ao tipo de doador, à técnica cirúrgica e ao peso do enxerto, entre os grupos não IRA/IRA leve e IRA grave. Os tempos intraoperatórios seguem na Tabela 9. A nossa coorte apresenta tempo cirúrgico médio de 7 horas e anestésico de 10 horas aproximadamente, sendo que todos foram maiores no grupo com IRA grave. O tempo de isquemia quente foi significativamente menor no grupo com IRA grave e não houve diferença entre os grupos pelo tempo de isquemia fria e total.

Tabela 9 - Parâmetros de tempos intraoperatórios do transplante hepático e dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave

	TOTAL	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
Tempo de anestesia (HH:MM)	09:56 (01:59)	09:05 (1:16)	10:27 (02:10)	0,009
Tempo de cirurgia (HH:MM)	07:20 (01:54)	06:33 (01:37)	07:48 (01:53)	0,001
Tempo de hepatectomia (HH:MM)	03:11 (00:54)	02:52 (00:41)	03:25 (00:59)	0,01
Tempo de isquemia quente (HH:MM)	00:42 (1:11)	00:42 (01:25)	00:41 (01:02)	0,003
Tempo de isquemia fria (HH:MM)	06:04 (01:55)	06:05 (01:52)	06:03 (01:57)	0,673
Tempo de isquemia total (HH:MM)	06:04 (01:55)	06:37 (01:58)	06:14 (02:33)	0,946

Nota: Os dados são expressos em média e desvio-padrão, conforme sua distribuição paramétrica. O teste de normalidade realizado foi Shapiro-Wilk.

Fonte: Elaborado pela autora

No total, o grupo utilizou 1.437 hemocomponentes durante o período intraoperatório, sendo: 187 plasmas, 97 plaquetas, 261 crioprecipitados, 225 concentrados de hemácias e 667 albuminas. O grupo com IRA grave utilizou, em maior quantidade, o concentrado de hemácias, albumina e volume de *cell saver*, com significância estatística (Tabela 10).

Tabela 10 - Uso de hemocomponentes no intraoperatórios do transplante hepático e dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave

	TOTAL	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
Plasma	1,96 (1,78)	1,64 (3,18)	2,21 (3,04)	0,293
Plaqueta	1,90 (1,82)	0,81 (2,07)	1,17 (2,37)	0,22
Crioprecipitado	9,81 (13)	1,78 (3,15)	3,40 (4,81)	0,179
CH	29(28)	1,42 (2,71)	3,00 (2,86)	0,001
Albumina	7,10 (3,7)	5,92 (3,07)	7,83 (4,02)	0,023
Vol. Cell Saver	571 (786)	375,36 (730,41)	691,93 (800,94)	0,008

Nota: Os dados são expressos em média e desvio-padrão, conforme sua distribuição paramétrica. O teste de normalidade realizado foi Shapiro-Wilk. CH (concentrado de hemácias).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Evolução clínica na primeira semana após o transplante hepático

A evolução clínica na primeira semana após o transplante foi avaliada por variáveis como: tempo de droga vasoativa (DVA), tempo de ventilação mecânica (VM), tempo de internação de unidade de terapia intensiva (UTI) e tempo de internação hospitalar (Tabela 11). O tempo foi representado em dias nessas variáveis.

A DVA de escolha nos pacientes foi a noradrenalina, podendo ser associada com outras drogas, como dopamina, dobutamina e vasopressina. Apesar de não descrevermos a modalidade de ventilação mecânica, os pacientes necessitavam estar em entubação-oro-traqueal para serem pontuados em dia de VM; os casos sem entubação-oro-traqueal, como *Continuous Positive Airway Pressure* (CPAP) e *Bi-level Positive Airway Pressure* (BIPAP), não foram considerados.

O tempo médio de uso de DVA e de VM foram, em média, de aproximadamente 2 dias, sendo ambos significativamente maiores no grupo com IRA grave.

O tempo de internação em UTI foi 2,5 vezes maior no grupo com IRA grave, com média de aproximadamente 12 dias. O menor tempo de permanência na UTI foi de 1 dia, enquanto o tempo máximo foi de 83 dias.

O tempo de internação hospitalar também foi maior no grupo IRA grave. O tempo mínimo de internação (exceto óbitos) foi de 6 dias e o tempo máximo foi de 145 dias.

Tabela 11 - Distribuição dos grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, conforme evolução clínica na primeira semana após o transplante hepático

	TOTAL	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
Tempo de DVA (dias)	1,97 (1,79)	1,15 (1,05)	2,45 (1,97)	<0,001
Tempo de VM (dias)	1,90 (1,77)	0,91 (0,45)	2,48 (1,98)	<0,001
Tempo de UTI (dias)	9,49 (13,08)	5,12 (5,84)	12,05 (15,34)	0,001
Tempo de Internação (dias)	29,40 (28,28)	18,41 (12,33)	35,84 (32,78)	0,01
SAPS na adm UTI	66,73 (13,98)	61,44 (9,01)	69,83 (15,44)	0,013
SOFA na adm UTI	12,60 (3,21)	10,91 (3,11)	13,58 (2,87)	<0,001
Necessidade de TRS	34 (34)	01 (2,9)	33 (97,1)	<0,001
Necessidade de re-tx	11 (11)	02 (18,2)	9 (81,8)	0,2
Mortalidade em 60 dias	21 (21)	01 (4,8)	20 (95,2)	<0,001

Nota: Os dados são expressos em média e desvio-padrão, conforme sua distribuição paramétrica. O teste de normalidade realizado foi Shapiro-Wilk. DVA (droga vasoativa), VM (ventilação mecânica), UTI (unidade de terapia intensiva), SAPS (*Simplified Acute Physiology Score*), SOFA (*Sepsis related Organ Failure Assessment*), TRS (terapia renal substitutiva) e tx (transplante).

Fonte: Elaborado pela autora.

O valor do escore do *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS) e *Sepsis related Organ Failure Assessment* (SOFA) na admissão da UTI foram significativamente maior no grupo com IRA grave.

O número de pacientes que necessitaram de TRS foi 38; destes, 36 (94,7%) eram IRA grave, sendo que a necessidade de TRS, na primeira semana após o transplante, ocorreu em 34 pacientes.

O principal motivo de terapia renal substitutiva (TRS) foi a oligúria, com 33 pacientes, correspondendo a 87% das causas de TRS, seguido de hipercalemia 3 (08%), hipervolemia 1 (2,5%) e distúrbio hidroeletrólítico 1 (2,5%).

A incidência de re-transplante foi de 11 casos, sendo 2 (8,2%) no grupo nãoIRA/IRA leve e 9 casos (81,8%) no grupo IRA grave. As causas de retransplante foram 4 casos de disfunção primária do enxerto, 4 de trombose da artéria hepática e 3 de disfunção tardia do enxerto.

Houve 26 óbitos, sendo que 21 foram durante a internação hospitalar, após o transplante de fígado, e 5 foram óbitos após a alta hospitalar. De acordo com o tempo entre o transplante hepático e o óbito: em até 30 dias, houve 17 casos; até 60 dias, houve 4 casos; até 90 dias, 2 casos; e mais de 90 dias, 3 casos de não sobreviventes.

As principais causas de mortalidade foram choque séptico 30,77% (8); disfunção primária do enxerto 11,54% (3); e choque hipovolêmico 11,54% (3) – juntas, representam mais da metade das causas de óbito.

Não foi possível realizar associações entre a causa de mortalidade e a relação com os grupos não IRA/IRA leve e IRA grave, exceto com o choque séptico, o qual foi a causa mais prevalente de não sobreviventes: 7 casos (100%), no grupo IRA grave ($p < 0,001$).

4.6 Nível de expressão dos biomarcadores no pré e no pós-operatórios de transplante hepático

Foi avaliada a hipótese de haver alteração do nível de expressão dos biomarcadores entre o período pré-operatório (antes da injúria) e o pós-operatório (considerado o período até 48 horas após o TH). Entre os

biomarcadores com mais de uma coleta, foi considerado o valor mais alto do período pós-operatório.

Houve elevação do nível de expressão, com significância estatística no biomarcador de filtração PENK, mas não na cistatina plasmática. Os biomarcadores de injúria também apresentaram grande aumento (U KIM-1, U NGAL, P NGAL e U IL-18), em relação aos períodos pré e pós-operatórios, exceto a cistatina C urinária, que não apresentou diferença (Tabela 12). Os biomarcadores de estresse GST-pi e L-FABP se elevaram consideravelmente no pós-operatório. Os biomarcadores de reabsorção U a-1M e U ALB apresentaram aumento entre os períodos. Todos os biomarcadores de secreção – FePCS, FeHA, FeNa e FeU – mostraram diminuição de seus níveis, refletindo comprometimento da função renal, com significância estatística notável. A osmolaridade não apresentou alteração entre os períodos. Os biomarcadores de fibrose, como MCP-1 e TIMP-1, mostraram elevação no pós-LT, enquanto o UMOD, que representa a reserva funcional dos túbulos, diminuiu no mesmo período.

Tabela 12 - Nível de expressão dos biomarcadores, de acordo com os períodos pré e pós-operatórios de transplante hepático

	SEM TRS	COM TRS	P
P CYS (MG/L)	0,45 (0,33 – 0,91)	0,55 (0,43 – 1,78)	0,678
PENK (PMOL/L)	93,75 (62 – 159)	194,44 (143 – 311)	0,001
U KIM-1 (PG/ML)	5,27 (1,78 – 15,27)	5,24 (3,49 – 12,76)	0,565
U NGAL (NG/ML)	135 (51 – 507)	1559 (473 – 3917)	<0,0001
P NGAL (NG/ML)	287,5 (191 – 438)	669 (368 – 1662)	<0,0001
U IL-18 (PG/ML)	214,5 (119 – 412)	1116,5 (298 – 1682)	0,002
U CYS / CR (MG/G)	0,18 (0,01 – 0,33)	0,10 (0,002 – 0,44)	0,736
GST-PI (PG/ML)	43,01 (23,60 – 247,01)	822,63 (28,79 – 1446)	0,041
L-FABP (PG/ML)	212,28 (50,86 – 931,55)	923,74 (156,94 – 3193)	0,012
U A-1M /CR (MG/G)	0,28 (0,08 – 0,83)	0,72 (0,22 – 1,08)	0,09
U ALB /CR (MG/G)	0,17 (0,47 – 0,45)	0,22 (0,15 – 0,72)	0,30
FE PCS (%)	7,76 (0,11 – 14,64)	6,93 (2,58 – 21,85)	0,34
FE HÁ (%)	32,33 (6,71 – 532,67)	192,5 (98,28 – 1219)	0,06
FE NA (%)	0,23 (0,11 – 0,59)	0,31 (0,22 – 0,39)	0,587
FE U (%)	13,38 (6,59 – 38,91)	7,26 (2,84 – 12,15)	0,018
OSM (MOSM/L)	534 (IC 420 – 725)	337,5 (IC 331 – 353,5)	<0,0001
U MCP-1 (PG/ML)	488 (232 – 1447)	3976,50 (727 – 5371)	<0,0001
TIMP-1 (PG/ML)	16,29 (5,03 – 425,81)	25,99 (12,22 – 425,81)	0,139
U UMOD (PG/ML)	78 (42,5 – 143)	64 (42 – 122)	0,755
LESÃO DNA (PG/ML)	8,56 (5,81 – 11,99)	13,96 (7,97 – 20,81)	0,046

plasma - P, urinário - U, cistatina - CYS, pró-encefalina - PENK, interleucina-18 - IL-18, molécula de lesão renal - KIM-1, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, alfa 1 microglobulina- α 1-M, albumina - ALB, fração de excreção - Fe, sódio - Na, ureia - U, sulfato de p-creasol - PCS, hipurato - HA, osmolaridade - OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, uromodulina - UMOD.

Fonte: Elaborado pela autora

Gráfico 2 - Valores medianos pré e pós-operatórios dos biomarcadores conforme função

BM filtração

BM injúria

BM estresse

BM reabsorção

BM secreção

Continua.

Conclusão.

BM concentração

BM fibrose

BM reserva tubular

Fonte: Elaborado pela autora

4.7 Biomarcadores e diagnóstico da IRA no transplante hepático

Foi avaliada a hipótese se um painel de BM de função, conforme o local afetado no néfron – [BM de filtração (P CYS C e PENK); BM de injúria (IL-18, KIM-1, NGAL e U CYS-C) BM de estresse oxidativo (GST-pi, L-FABP); BM de reabsorção glomerular (α -1M e U ALB); BM de secreção tubular (FeNa, FeU, FePCS e FeHA), BM de concentração (osmolaridade), BM de fibrose (MCP e TIMP-1); BM de reserva tubular (UMOD) e BM de lesão de DNA] –, no perioperatório do transplante hepático (pré-operatório e pós-operatório até 48 horas após o TH), pode ser uma ferramenta prognóstica para determinar a gravidade e o risco de progressão da IRA no perioperatório de TH.

4.7.1 Os biomarcadores e o diagnóstico da IRA no pré-operatório de transplante hepático

Os BM que tiveram relevância significativa ($p < 0,05$) para determinação da IRA grave no período pré-operatório, antes da cirurgia, foram: PENK, UNGAL, IL-18, L-FABP e MCP-1. O PENK apresentou uma mediana de 90,16 (IC 6,47 – 135,78) no grupo com IRA grave vs 55 (IC 44,25 – 94,55) pmol/l no grupo sem IRA/IRA leve, AUC de 0,69 (IC 0,54 – 0,83) $p = 0,02$. O UNGAL teve uma mediana

de 106 (IC 21 – 372) no grupo com IRA grave vs 26,5 (IC 16,75 – 145,25) ng/ml no grupo sem IRA/IRA leve, AUC de 0,63 (IC 0,50 – 0,77), $p=0,05$. A IL-18 teve ótima *performance* no pré-operatório, determinando o grupo com IRA grave mediana de 192,5 (IC 102,5 – 333,25) vs 86,50 (IC 58,75 – 162) $p=0,012$, AUC de 0,77 (IC 0,61 – 0,92) $p=0,01$. O L-FABP apresentou maior elevação no grupo sem IRA/IRA leve, com uma mediana de 92,61 (IC 26,61 – 274,19) vs 22,90 (IC 6,01 – 117,61), uma AUC baixa de 0,31 (IC 0,14 – 0,43) $p=0,01$. O MCP-1 obteve maior expressão no grupo com IRA grave mediana de 683 (IC 258 – 2410) vs 320 (IC 113,5 – 829) no grupo sem IRA/IRA leve, uma AUC de 0,67 (IC 0,53 – 0,82), $p=0,02$.

4.7.2 Os biomarcadores de filtração e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático

O PENK apresentou ótimo desempenho para predizer o KDIGO, com aumento do nível do biomarcador de acordo com a gravidade do KDIGO, mostrando uma mediana no grupo não IRA/IRA leve de 81 (IC 61,25 - 101,50) *versus* 161,45 (122,85 - 294,03) pmol/l no grupo IRA grave, tendo alcançado uma AUC 0,83 (IC 0,72 - 0,94), com ponto de corte 119,05 pmol/l, sensibilidade de 0,80 e especificidade de 0,90. O P CYS não alcançou aumento significativo na progressão da IRA grave (Tabela 13).

Gráfico 3 - Diagrama de caixa, os grupos de IRA do PENK e a curva ROC AUC do PENK no grupo IRA grave

Fonte: Elaborado pela autora

4.7.3 Os biomarcadores de injúria e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático

O KIM-1 mostrou resultados semelhantes entre os grupos e não serviu para determinar a IRA grave. A U CYS também não mostrou bom desempenho para avaliar a progressão da IRA. O U NGAL apresentou desempenho melhor do que o P NGAL, com mediana de 135 (IC 51 - 552,5) no grupo não IRA/IRA leve *versus* 739 (CI 154,5 - 3722) ng/ml no grupo IRA grave, representando aumento de 5,4 vezes ($p < 0,001$), AUC 0,70 (IC 0,59 - 0,81), com um valor de corte de 193 ng/ml.

A U IL-18 produziu ótimos resultados para determinar a IRA grave, com uma mediana de 132 (IC 75 - 257) no grupo não IRA/IRA leve *versus* 426,5 (CI 211 - 1246) pg/ml no grupo IRA grave, com uma AUC 0,80 (IC 0,62 - 0,98); obteve sensibilidade de 0,73 e especificidade de 0,80, com um valor de corte de 242 pg/ml.

Gráfico 4 - Diagrama de caixa, os grupos de IRA do U NGAL e a curva ROC AUC do U NGAL no grupo IRA grave

Fonte: Elaborado pela autora

Gráfico 5 - Diagrama de caixa, os grupos de IRA da U IL-18 e a curva ROC AUC da U IL-18 no grupo IRA grave

Fonte: Elaborado pela autora

4.7.4 Os biomarcadores de estresse oxidativo e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático

O GST-pi foi superior no grupo com IRA grave, com mediana 63,85 vs 38,64 pg/ml, mas não alcançou significância estatística. A L-FABP apresentou maior expressão no grupo com IRA grave 512,77 (IC 81,30 – 2738,61) vs 105,06 (IC 37,50 – 768,67) pg/ml $p=0,017$, uma AUC de 0,65 (IC 0,53 -0,76) Tabela 13.

Gráfico 6 - Diagrama de caixa, os grupos de IRA da L-FABP e a curva ROC AUC da U L-FABP no grupo IRA grave

Fonte: Elaborado pela autora

4.7.5 Os biomarcadores de reabsorção e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático

A a-1M/cr apresentou discreta elevação na mediana no grupo não IRA/IRA leve 0,36 mg/g (IC 0,06 – 0,91) *versus* 0,55 mg/g (IC 0,10 – 1,01) no grupo IRA grave, mas sem significância estatística. A U ALB também não apresentou bom desempenho para avaliar a progressão da IRA (Tabela 13).

4.7.6 Os biomarcadores de secreção e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático

A FeHA e a FePCS tiveram resultados semelhantes e não conseguiram determinar a IRA grave. A FeNa apresentou pequeno aumento na IRA grave, com uma mediana de 0,31% (IC 0,11 - 0,48) no grupo IRA grave e 0,22% (IC 0,15 - 0,53) no grupo não IRA/IRA leve, $p=0,44$. A FeU diminuiu, apresentando uma mediana de 12,74 (6,91 - 70,95) no grupo não IRA/IRA leve e 8,04 (IC 4,06 - 26,16) no grupo IRA grave, $p=0,09$ (Tabela 13).

4.7.7 O biomarcador de concentração e diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático

Houve maior expressão da osmolaridade em pacientes sem IRA/IRA leve 574 (IC 511 – 785) vs 356 (IC 337 – 407) mOsm/l na IRA grave $p < 0,0001$, com uma AUC de 0,08 (IC 0,001 – 0,156) $p < 0,001$ (Tabela 13).

Gráfico 7 - Diagrama de caixa, os grupos de IRA da osmolaridade e a curva ROC AUC da osmolaridade no grupo IRA grave

Fonte: Elaborado pela autora

4.7.8 Outros biomarcadores e o diagnóstico da IRA no pós-operatório de transplante hepático

O UMOD diminuiu, na mediana do grupo com IRA grave, 64 *versus* 85 ng/ml não IRA/IRA leve, mas sem significância estatística. Os níveis de MCP-1 foram maiores nos indivíduos que desenvolveram IRA grave, 1.263 pg/ml (IC 440 - 4308), em comparação com os pacientes não IRA/ IRA leve, 754 (IC 258 - 1541) pg/ml. O TIMP-1 apresentou maior nível de expressão no grupo com IRA grave, com mediana de 22,46 (IC 9,17 – 425,81) *versus* 7,94 (IC 4,29 – 51,34) pg/ml não IRA/IRA leve p 0,022, AUC de 0,64 (IC 0,52 – 0,77), com valor de corte de 11,49 p/ml, apresentando sensibilidade de 75% e especificidade de 57% p 0,023. O BM lesão de DNA não apresentou diferenças entre os grupos (Tabela 13).

Gráfico 8 - Diagrama de caixa, os grupos de IRA da TIMP-1 e a curva ROC AUC do TIMP-1 no grupo IRA grave

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 13 - Nível de expressão dos biomarcadores na predição da IRA, pelo critério KDIGO, no pós-operatório de transplante hepático

	KDIGO 0	KDIGO 1	KDIGO 2	KDIGO 3	P
P CYS (MG/L)	0,51 (0,46 – 0,56)	0,45 (0,36 – 0,75)	0,33 (0,88 – 0,56)	0,83 (0,49 – 2,02)	0,557
PENK (PMOL/L)	86,9 (58,50 – 169)	75,50 (58 – 119)	121,30 (89 – 222)	178,67 (146 – 299)	0,001
U KIM-1 (PG/ML)	2,31 (0,80 – 6,89)	8,51 (2,51 – 19,54)	5,75 (3,28 – 13,97)	4,77 (3,42 – 10,84)	0,098
U NGAL (NG/ML)	88 (47,25 – 696)	140,5 (54,25 – 700)	179 (95 – 1175)	1524 (264 – 3912)	<0,001
P NGAL (NG/ML)	234 (122,5 – 370,5)	316 (192,5 – 654,75)	376 (227 – 986)	484,5 (318 – 731)	0,014
U IL-18 (PG/ML)	158 (129,5 – 1126)	161 (106 – 242)	290 (164,5 – 638,5)	1030 (290 – 1451)	0,024
U CYS /CR (MG/G)	41 (16,09 – 358,90)	0,18 (0,10 – 25,56)	24,70 (9,08 – 100,9)	7,19 (0,18 – 31,44)	0,119
GST-PI (PG/ML)	57,39 (21,43 – 1446)	37,60 (23,87 – 1446)	96,33(30,40 – 1446)	57,91(25,26 – 1446)	0,845
L-FABP (PG/ML)	112,33(36,91– 1973)	121,48 (39,27 – 2618)	348 (90,80– 1902)	592 (81,30– 1567)	0,279
U A-1M/CR (MG/G)	0,21(0,13 – 1,12)	0,54 (0,25 – 1,00)	0,28 (0,21 – 1,13)	0,49 (0,08 – 0,86)	0,74
U ALB /CR (MG/G)	0,32 (0,25 – 0,86)	0,17 (0,19 – 0,32)	0,12 (0,20 – 0,27)	0,24 (0,17 – 0,78)	0,18
FE PCS (%)	4,47 (0,45 – 9,42)	10,02 (1,07 – 24,18)	6,37 (0,10 – 12,73)	7,15 (0,51 – 23,44)	0,676

Continua...

	<i>KDIGO 0</i>	<i>KDIGO 1</i>	<i>KDIGO 2</i>	<i>KDIGO 3</i>	<i>P</i>
<i>FE HÁ (%)</i>	13,94 (6,67 – 363)	131,43 (0,94 – 611,51)	43,59 (31,57– 220)	122,41 (63 – 1388)	0,38
<i>FE NA (%)</i>	0,34 (0,08 – 0,77)	0,22 (0,12 – 0,35)	0,32 (0,13 – 0,63)	0,31 (0,17 – 0,48)	0,633
<i>FE UN (%)</i>	23,59 (5,23 – 55,07)	13,38 (7,31 – 73,37)	15,00 (6,73 – 38,59)	6,61 (2,48 – 10,93)	0,098
<i>OSM (MOSM/L)</i>	574 (518 – 755)	562 (379 – 889)	422 (352 – 567)	356 (336 – 407)	0,002
<i>U MCP-1 (PG/ML)</i>	872(262,25– 1437)	825 (321,50 – 1718,50)	479,50 (153 – 1610)	2.810,50(497– 5336)	0,047
<i>TIMP-1 (PG/ML)</i>	7,14 (2,67 – 425,81)	16,95 (4,29 – 51,34)	22,18 (7,50 -287,44)	19,18 (9,60 –425,81)	0,664
<i>UMOD (PG/ML)</i>	78 (66 – 197,50)	96 (59 – 140)	56 (41 – 61)	78 (46 – 129,50)	0,350
<i>L. DNA(PG/ML)</i>	16,78(12,66 – 17,96)	7,88 (6,02 – 11,47)	9,66 (5,89 – 20,47)	12,39 (7,03 – 16,23)	0,409

Conclusão.

plasma - P, urinário - U, cistatina - CYS, pró-encefalina - PENK, interleucina-18 - IL-18, molécula de lesão renal - KIM-1, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, alfa 1 microglobulina–a1-M, albumina - ALB, fração de excreção - Fe, sódio - Na, ureia - U, sulfato de p-creasol - PCS, hipurato - HA, osmolaridade – OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, uromudolina – UMOD.

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 14 - Nível de expressão dos biomarcadores na determinação da IRA grave no pós-operatório de transplante hepático

	NÃO IRA/IRA LEVE	IRA GRAVE	P
P CYS (MG/L)	0,45 (0,39 – 0,56)	0,83 (0,41 – 2,15)	0,105
PENK (PMOL/L)	81 (61,25 – 101,50)	161,45 (123 – 244)	<0,0001
U KIM-1 (PG/ML)	5,27 (1,76 – 16,51)	5,24 (3,44 – 13,69)	0,72
U NGAL (NG/ML)	135 (51 – 552,5)	739 (1545 – 3722)	0,001
P NGAL (NG/ML)	298 (182 – 442)	440 (299 – 756)	0,002
U IL-18 (PG/ML)	132 (75 – 257,25)	1030 (290 – 1451)	0,005
U CYS /CR (MG/G)	41 (17,75 – 358,9)	38,29 (15,73 – 147,54)	0,796
GST-PI (PG/ML)	38,64 (22,73 – 1230)	63,85 (28,68 – 1445,75)	0,264
L-FABP (PG/ML)	105,06 (37,50 – 768,67)	512,77 (81,30 – 2739)	0,017
U A-1M /CR (MG/G)	0,36 (0,06 – 0,91)	0,55 (0,10 – 1,01)	0,30
U ALB /CR (MG/G)	0,17 (0,02 – 0,39)	0,20 (0,11 – 0,48)	0,155
FE PCS (%)	6,95 (0,18 – 14,42)	7,15 (0,27 – 16,09)	0,745
FE HÁ (%)	26,71 (5,07 – 505,10)	119,29 (31,28 – 619,41)	0,16
FE NA (%)	0,22 (0,15 – 0,53)	0,31 (0,11 – 0,48)	0,44
FE UN (%)	12,74 (6,91 – 70,95)	8,04 (4,06 – 26,16)	0,098
OSM (MOSM/L)	574 (511 – 785)	356 (337 – 407)	<0,0001
U MCP-1 (PG/ML)	759 (258 – 1541)	1.263 (440 – 4308)	0,11
TIMP-1 (PG/ML)	7,94 (4,29 – 51,34)	22,46 (9,7 – 425,81)	0,022
U UMOD (PG/ML)	85 (33,75 – 179,75)	64 (44,50 – 129,50)	0,815
LESÃO DNA (PG/ML)	10,39 (6,82 – 17,37)	9,28 (6,13 – 15,87)	0,90

plasma - P, urinário - U, cistatina - CYS, pró-encefalina - PENK, interleucina-18 - IL-18, molécula de lesão renal - KIM-1, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, alfa 1 microglobulina - a1-M, albumina - ALB, fração de excreção - Fe, sódio - Na, ureia - U, sulfato de p-creasol - PCS, hipurato - HA, osmolaridade - OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, uromodulina - UMOD.

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 15 - Valores da curva ROC AUC, valor de corte pelo ponto “J” index, sensibilidade e especificidade dos biomarcadores, na determinação da IRA grave, no pós-operatório de transplante hepático

BM	AUC	IC	VC	S	E	P
S CYS	0,720	(0,475 – 0,965)	0,46	0,70	0,80	0,09
P PENK	0,828	(0,715 – 0,941)	119	0,80	0,90	<0,0001
U KIM-1	0,522	(0,395 – 0,648)	3,37	0,70	0,43	0,723
U NGAL	0,701	(0,592 – 0,811)	193	0,74	0,65	0,001
P NGAL	0,686	(0,578 – 0,793)	332,5	0,68	0,65	0,002
U IL-18	0,800	(0,621 – 0,979)	242,5	0,73	0,80	0,006
U CYS	0,529	(0,322 – 0,735)	17,99	0,50	0,57	0,780
GST-PI	0,410	(0,271 – 0,549)	21,67	0,60	0,30	0,224
L-FABP	0,646	(0,53 -0,76)	137,38	0,75	0,56	0,017
U A-1M	0,573	(0,387 – 0,759)	44,5	0,67	0,47	0,43
U ALB	0,658	(0,480 – 0,836)	22,61	0,65	0,60	0,148
FE NA	0,554	(0,415 – 0,693)	0,24	0,63	0,57	0,44
FE U	0,388	(0,255 – 0,521)	10,07	0,42	0,42	0,098
FE PCS	0,534	(0,338 – 0,731)	6,25	0,60	0,50	0,73
FE HA	0,640	(0,440 – 0,839)	53,99	0,64	0,42	0,159
OSM	0,079	(0,001 – 0,156)	525	0,11	0,32	<0,0001
U MCP-1	0,622	(0,482 – 0,762)	440	0,76	0,45	0,113
TIMP-1	0,64	(0,52 – 0,77)	11,49	0,75	0,57	0,023
U UMOD	0,472	(0,237 – 0,707)	55	0,68	0,40	0,798
LESÃO DNA	0,484	(0,272 – 0,696)	8,69	0,60	0,50	0,696

plasma - P, urinário - U, cistatina - CYS, pró-encefalina - PENK, interleucina-18 - IL-18, molécula de lesão renal - KIM-1, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, alfa 1 microglobulina – a1-M, albumina - ALB, fração de excreção - Fe, sódio - Na, ureia - U, sulfato de p-creasol - PCS, hipurato - HA, osmolaridade – OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, uromodulina – UMOD, área sob a curva- AUC, intervalo de confiança – IC, valor de corte – VC, sensibilidade – S, especificidade – E.

Fonte: Elaborado pela autora

4.8 Desempenho de todos os biomarcadores de diagnóstico da IRA no transplante hepático

4.8.1 Desempenho dos biomarcadores pela Árvore de Classificação e Regressão - CART

O desempenho dos vinte biomarcadores, descritos anteriormente, foi analisado juntamente, para avaliar o melhor preditor de IRA. A análise foi realizada através da Árvore de Classificação e Regressão (CART).

As variáveis foram divididas em melhor *performance* por período: pré-operatório e pós-operatório. No pré-operatório: a variável que melhor conseguiu classificar o grupo com IRA grave foi o PENK, com o valor de corte de >54,5 pmol/l, apresentando sensibilidade de 95,16%, especificidade 27,03%, valor preditivo positivo (VPP) de 68% e valor preditivo negativo (VPN) de 77% (Tabela 16).

Tabela 16 - Tabela da precisão do diagnóstico de IRA grave pelo PENK no pré-operatório

Observed	PREDICTED		CLASS	PREDICTED
	No	Yes	Accuracy	Values
NO	10	27	27,03%	76,92%
YES	3	59	95,16%	68,60%

Fonte: Elaborado pela autora

Erro de coeficiente de validação cruzada – 38,38%

A Figura 6 demonstra a seleção dos pacientes conforme o nó à direita, com valor de corte (direita) <54,5 pmol/l (pacientes sem IRA/IRA leve) e à esquerda >54,5 pmol/l (pacientes com IRA grave) – uma precisão no diagnóstico de 69%.

Figura 6 - Nível de concordância pela CART no diagnóstico da IRA grave pelo PENK pré-TH

Fonte: Elaborado pela autora

No pós-operatório: as variáveis que melhor conseguiram classificar o grupo com IRA grave foram: PENK, OSM e TIMP-1. O PENK, com o valor de corte de >119,05 pmol/l, o OSM > 470 e o TIMP < 7,265 determinaram o grupo com IRA grave com sensibilidade de 80,95%, especificidade de 81,05%, valor VPP de 87,93% e VPN de 71,43% (Tabela 16).

Tabela 17 - Tabela da precisão do diagnóstico de IRA grave pelo PENK, OSM e TIMP-1 no pós-operatório

	PREDICTED		CLASS	PREDICTED
OBSERVED	No	Yes	Accuracy	Values
NO	10	27	27,03%	76,92%
YES	3	59	95,16%	68,60%

Nota: Erro de coeficiente de validação cruzada – 29%

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 7 demonstra a seleção dos pacientes conforme o nó à E, determinando o grupo com IRA grave, e à D, sem IRA/IRA leve. Observe que os pacientes com o PENK maior (119,05 pmol/l), mas com a OSM >470 mOsm/l e o TIMP <7,265 pg/ml formam um nó puro (8 pacientes) sem IRA/IRA leve. Agora, na determinação da IRA grave, os pacientes com valor de corte > de 119,05 pmol/l e OSM < 470 mOsm/l tiveram precisão de 90% no diagnóstico de IRA grave.

Figura 7 - Nível de concordância pela CART no diagnóstico da IRA grave pelo PENK, OSM e TIMP-1 no pós-operatório

Fonte: Elaborado pela autora.

4.8.2 Desempenho dos biomarcadores pela regressão multivariada

As variáveis que apresentaram $p < 0,05$ na univariada no período pré-operatório para determinação de IRA grave foram selecionadas, para se analisar a predição independente pela regressão logística. Foram selecionadas as variáveis: idade, tempo de anestesia, débito urinário, balanço hídrico, PENK, UNGAL, IL-18, L-FABP e MCP-1 (Tabela 18).

Tabela 18 - Odds ratio dos BM preditores de IRA grave no pré-operatório

BM	OR	IC	P
PENK	4,40	(1,40 – 13,88)	0,01
UNGAL	2,46	(0,86 – 7,03)	0,09
IL-18	8,85	(1,90 – 41,23)	0,005
L-FABP	1,37	(0,48 – 3,95)	0,55
MCP-1	2,66	(0,89 - 7,91)	0,07
IDADE	0,96	(0,92 – 1,01)	0,12
T. ANESTESIA	1,72	(1,20 – 2,47)	0,003
BH	1,00	(1,00 – 1,00)	0,92
DIURESE	0,99	(0,99 – 0,99)	0,004

plasma - P, urinário - U, pró-encefalina - PENK, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, interleucina-18 - IL-18, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, tempo-T, balanço hídrico-BH, biomarcador – BM, *odds ratio* – OR, intervalo de confiança – IC.

Fonte: Elaborado pela autora

A IL-18 se mostrou a melhor variável independente de IRA grave, com OR de 8,85. Também se destacou o PENK, com OR de 4,40. O L-FABP não alcançou significância estatística na regressão, enquanto UNGAL e MCP-1 mostraram tendência de estratificar os grupos. Nas variáveis controle, o tempo de anestesia e a diurese também se apresentaram preditores de IRA, porém essas variáveis não estão disponíveis no período pré-operatório.

As variáveis que apresentaram $p \leq 0,05$ na univariada no período pós-operatório, para determinação de IRA grave, foram selecionadas, para se analisar a predição independente pela regressão logística. Foram selecionadas as variáveis: idade, tempo de anestesia, débito urinário, balanço hídrico, PENK, UNGAL, PNGAL, IL-18, OSM e TIMP-1 (Tabela 19).

Tabela 19 - Odds ratio dos BM preditores de IRA grave no pós-operatório

BM	OR	IC	P
PENK	46,01	(5,55 – 384)	<0,0001
UNGAL	2,74	(0,95 – 7,92)	0,06
PNGAL	2,71	(0,95 – 7,72)	0,06
IL-18	4,80	(1,09 – 21,06)	0,04
OSM	18,21	(3,31 – 100)	0,001
TIMP-1	5,09	(1,57 – 16,54)	0,007
IDADE	1,01	(0,93 – 1,10)	0,75
T. ANESTESIA	1,54	(0,87 – 2,73)	0,13
BH	1,00	(1,00 – 1,00)	0,33
DIURESE	0,99	(0,99 – 1,00)	0,51

plasma - P, urinário - U, pró-encefalina - PENK, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, interleucina-18 - IL-18, osmolaridade – OSM, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, tempo-T, balanço hídrico-BH, biomarcador – BM, odds ratio – OR, intervalo de confiança – IC.

Fonte: Elaborado pela autora

O PENK se mostrou a melhor variável independente de IRA grave, com OR de 46,01. Também se destacaram os BM: OSM, com OR de 18,21 e TIMP-1 OR de 5,09. Lembrando que esses três BM (PENK, OSM e TIMP-1) foram úteis para o diagnóstico da IRA grave pela CART. A IL-18 também apresentou ótimo OR de 4,80.

4.9 Biomarcadores e os desfechos no transplante hepático

Foi avaliada a hipótese se um painel de BM de função, conforme o local afetado no néfron – [BM de filtração (P CYS C e PENK) ; BM de injúria (IL-18, KIM-1, NGAL e U CYS-C) BM de estresse oxidativo (GST-pi e L-FABP); BM de reabsorção glomerular (a-1M e U ALB); BM de secreção tubular (FeNa, FeU,

FePCS e FeHA), BM de concentração (osmolaridade), BM de fibrose (MCP e TIMP-1); BM de reserva tubular (UMOD) e BM de lesão de DNA] –, no perioperatório do transplante hepático (no pré-operatório e no pós-operatório até 48 horas após o TH), pode ser uma ferramenta prognóstica para prever a necessidade de TRS, em 1 semana, e a mortalidade, em 60 dias, no perioperatório de TH.

4.9.1 Os biomarcadores e os desfechos no pré-operatório do transplante hepático

Os BM que tiveram relevância significativa ($p < 0,05$) para determinação da TRS no período pré-operatório, antes da cirurgia, foram: UNGAL, L-FABP e MCP-1. O UNGAL apresentou uma mediana de 159 (IC 49 – 435,25) no grupo com necessidade de TRS vs 28 (IC 17 – 127) ng/ml no grupo sem TRS (Gráfico 9), com AUC de 0,71 (IC 0,59 – 0,84) $p = 0,003$. O L-FABP apresentou maior elevação no grupo sem TRS, com uma mediana de 67,76 (IC 19 – 234) vs 8,94 (IC 4,68 – 79,09) pg/ml, uma AUC baixa de 0,29 (IC 0,16 – 0,43) $p = 0,004$. O MCP-1 obteve maior expressão no grupo com TRS, com uma mediana de 752 (IC 364 – 2414) vs 354 (IC 149 – 768) pg/ml no grupo sem TRS, com uma AUC de 0,68 (IC 0,54 – 0,81), $p = 0,02$.

Gráfico 9 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS do UNGAL e a curva ROC AUC do UNGAL no grupo com necessidade de TRS no pré-operatório

Fonte: Elaborado pela autora.

Os BM que tiveram relevância significativa ($p < 0,05$) para determinação da mortalidade no período pré-operatório, antes da cirurgia, foram: UNGAL, TIMP-1, a1M e MCP-1. O UNGAL apresentou uma mediana de 127 (IC 39 – 526) no grupo de não sobreviventes vs 33 (IC 19 – 210) ng/ml no grupo dos sobreviventes, com AUC de 0,67 (IC 0,51 – 0,82) $p = 0,05$. O TIMP-1 apresentou maior elevação no grupo de não sobreviventes, com uma mediana de 10,72 (IC 6,01 – 19,31) vs 5,55 (IC 1,79 – 12,47) pg/ml, uma AUC baixa de 0,66 (IC 0,51 – 0,81) $p = 0,06$. O a1-M apresentou aumento no grupo de não sobreviventes, com uma mediana de 0,39 (IC 0,13 – 1,46) vs 0,07 (IC 0,03 – 0,50) mg/g no grupo dos sobreviventes, com uma AUC de 0,75 (IC 0,55 – 0,96), $p = 0,04$. O MCP-1 obteve maior expressão no grupo de não sobreviventes, com uma mediana de 1.376 (IC 383 – 4.313) vs 466 (IC 180 – 1.151) pg/ml no grupo dos sobreviventes, com uma AUC de 0,69 (IC 0,54 – 0,85), $p = 0,04$.

4.9.2 Os biomarcadores de filtração e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático

O PENK apresentou ótimo desempenho para predizer necessidade de TRS (Gráfico 10), mostrando uma mediana no grupo sem TRS de 93,75 (IC 62 – 159) *versus* 194,44 (IC 143 – 311) pmol/l no grupo com necessidade de TRS, tendo alcançado uma AUC 0,76 (IC 0,63 - 0,89), com um ponto de corte 147,79 pmol/l, sensibilidade de 0,76 e especificidade de 0,75. O PENK encontrou maiores níveis de expressão em pacientes não sobreviventes, conforme Tabela 17, mas sem alcançar significância estatística. A P CYS não conseguiu predizer necessidade de TRS e mortalidade.

Gráfico 10 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS do PENK e a curva ROC AUC do PENK no grupo com necessidade de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

4.9.3 Os biomarcadores de injúria e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático

O UNGAL apresentou ótimo desempenho para predizer necessidade de TRS, com uma mediana de 135 (IC 51 – 507), no grupo sem TRS, e 1.559 (IC 473 – 3917) ng/ml no grupo com TRS $p < 0,0001$, AUC de 0,80 (IC 0,72 – 0,89), valor de corte de 158,5 ng/ml, sensibilidade de 97% e especificidade de 55%

(Gráficos 11). No plasma, também teve ótima *performance*, com uma mediana no pós-operatório de 287,5 (IC 191 – 438) no grupo sem TRS, e 669 (IC 368 – 1662) ng/ml, no grupo com necessidade de TRS $p<0,0001$.

Gráfico 11 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS do UNGAL e a curva ROC AUC do UNGAL no grupo com necessidade de TRS no pós-operatório

Fonte: Elaborado pela autora.

Na determinação da mortalidade, o UNGAL conseguiu prever, no pré-operatório, o grupo de não sobreviventes, esta determinação se manteve no período pós-operatório, com uma mediana de 210 (IC 79 – 1524) no grupo sobrevivente e 1364 (IC 283 – 3923) ng/ml no grupo não sobreviventes $p=0,014$, AUC 0,67 (CI 0,55 – 0,81), um valor de corte de 228,5 ng/ml, sensibilidade de 85% e especificidade de 54%, $p=0,014$ (Gráficos 12). No plasma (P NGAL), houve elevação no grupo de não sobreviventes, mas não alcançou significância estatística (Tabela 18).

Gráfico 12 - Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes do UNGAL e a curva ROC AUC do UNGAL no grupo de não sobreviventes

Fonte: Elaborado pela autora.

A IL-18 também foi um biomarcador de injúria em destaque nesta pesquisa, pois apresentou ótima *performance* para determinar necessidade de TRS no pós-operatório, com uma mediana de 214,5 (IC 119 – 412), no grupo sem necessidade de TRS, e 1.116,5 (IC 298 – 1682) ng/ml, no grupo com necessidade de TRS - $p=0,002$ (Tabela 19), uma AUC de 0,795 (IC 0,64 – 0,95) – $p=0,003$, valor de corte de 309,5 pg/ml, sensibilidade de 79% e especificidade de 73% – Gráfico 13. A IL-18 encontrou maiores níveis de expressão em pacientes não sobreviventes, conforme Tabela 20, com uma mediana de 242,50 (IC 125,25 – 910,25), no grupo de sobreviventes, *versus* 743 (IC 328,75 – 1439,5) pg/ml no grupo dos não sobreviventes, $p=0,05$ e AUC de 0,73 (IC 0,56 – 0,89), um valor de corte de 266,5 pg/ml, sensibilidade de 87,5% e especificidade de 54%. O KIM-1 e a U CYS-C apresentaram resultados semelhantes entre os grupos, tanto na predição da necessidade de TRS, quanto na mortalidade.

Gráfico 13 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS da IL-18 e a curva ROC AUC da IL-18 no grupo com necessidade de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

4.9.4 Os biomarcadores de estresse oxidativo e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático

O GST-pi apresentou maior expressão em pacientes com TRS 822,23 (IC 28,79 – 1443) vs 43,01 (IC 23,60 – 247,01) pg/ml sem TRS, $p=0,041$, uma AUC de 0,626 (IC 0,50 – 0,75) - Gráfico 14. No grupo de não sobreviventes, também houve maior expressão de GST-pi mas sem significância estatística.

Gráfico 14 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS da GST-pi e a curva ROC AUC da GST-pi no grupo com necessidade de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

O L-FABP apresentou maior nível de expressão em pacientes com TRS 923,74 (IC 156,94 – 3193) vs 212,28 (IC 50,86 – 931,55) sem TRS, $p=0,012$, uma AUC de 0,66 (IC 0,54 – 0,77) – Gráfico 15. No grupo de não sobreviventes, também houve maior expressão de L-FABP, mas sem significância estatística.

Gráfico 15 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS da L-FABP e a curva ROC AUC da L-FABP no grupo com necessidade de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

4.9.5 Os biomarcadores de reabsorção e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático

A a-1M se elevou no grupo com necessidade de TRS, com uma mediana de 0,72 (0,22 – 1,08), com TRS *versus* 0,28 (0,08 – 0,83) mg/g sem TRS, $p=0,09$. Na predição da mortalidade, também houve elevação do biomarcador, mas sem significância estatística. A U ALB não demonstrou diferenças entre os grupos de TRS e mortalidade (Tabelas 20 e 21).

4.9.6 Os biomarcadores de secreção e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático

A FeHA apresentou maior nível de expressão em pacientes com necessidade de TRS com uma mediana de 192,5 (98,28 – 1219) com TRS *versus* 32,33 (6,71 – 532,67) % sem TRS $p=0,06$. Na determinação da mortalidade, também houve elevação do biomarcador no grupo de não sobreviventes. A FePCS apresentou resultados semelhantes na determinação da TRS e da mortalidade em ambos os grupos (Tabela 20 e 21). A FeU apresentou ótimo desempenho para determinar os desfechos de necessidade de TRS e mortalidade. Na predição da necessidade de TRS, a FeU mostrou uma mediana no grupo sem TRS de 13,38 (IC 6,59 – 38,91) *versus* 7,26 (IC 2,84 – 12,15)% com necessidade de TRS, $p=0,018$ alcançou uma AUC 0,33 (IC 0,21 - 0,46) – Gráfico 16. A FeU encontrou menores níveis de expressão em pacientes não sobreviventes, conforme Tabela 20, com uma mediana de 6,15 (2,07 – 10,14), no grupo de não sobreviventes, *versus* 11,44 (IC 6,62 – 34,35)% no grupo dos sobreviventes, $p=0,048$ e AUC de 0,33 (IC 0,18 – 0,48). A FeNa apresentou resultados semelhantes em ambos os grupos, tanto na predição da necessidade de TRS, quanto na mortalidade (Tabelas 20 e 21).

Gráfico 16 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS da FeU e a curva ROC AUC da FeU no grupo com necessidade de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 17 - Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes do FeU e a curva ROC AUC do FeU no grupo de não sobreviventes

Fonte: Elaborado pela autora.

4.9.7 O biomarcador de concentração e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático

A OSM foi útil na determinação da necessidade de TRS e da mortalidade. A mediana do grupo com TRS foi de 337,5 (IC 331 – 353,5) vs 534 (IC 420 – 725) mOsm/l sem TRS, com uma AUC de 0,017 (IC 0 – 0,045) $p < 0,0001$ –

Gráfico 18. Na predição da mortalidade, também apresentou menor expressão em não sobreviventes 354 (IC 336 – 440,5) vs 490 (IC 373 – 618) em sobreviventes AUC 0,294 (IC 0,102 – 0,487) p=0,059 – Gráfico 19.

Gráfico 18 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS da OSM e a curva ROC AUC da OSM no grupo com necessidade de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 19 - Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes da OSM e a curva ROC AUC da OSM no grupo de não sobreviventes

Fonte: Elaborado pela autora.

4.9.8 Outros biomarcadores e os desfechos no pós-operatório de transplante hepático

O MCP-1 se elevou no grupo com necessidade de TRS, com uma mediana de 3.976,50 (IC 727,25 – 5.370,50) com TRS vs 488 (IC 232 – 1.447) pg/ml sem TRS, uma AUC 0,803 (IC 0,69 - 0,92) $p < 0,0001$ (Gráfico 20), com um ponto de corte 463 pg/ml, sensibilidade de 0,92 e especificidade de 0,49. Na predição da mortalidade, também houve elevação do BM, com uma mediana de 761 (IC 324 – 1.654) em sobreviventes vs 5.030 (IC 814 – 6.000) pg/ml em não sobreviventes, uma AUC 0,76 (IC 0,58 – 0,95) $p=0,004$ (Gráfico 21/Tabelas 20 e 21). O TIMP-1 foi maior no grupo com necessidade de TRS e em não sobreviventes, mas sem significância estatística. A lesão de DNA teve maior expressão em pacientes com TRS 13,96 (IC 7,97 – 20,81) vs 8,56 (IC 5,81 – 11,99) sem TRS, $p=0,046$; não houve diferença entre os grupos de não sobreviventes. O UMOD apresentou menor expressão entre os pacientes com desfechos positivo de TRS e não-sobreviventes.

Gráfico 20 - Diagrama de caixa, os grupos de TRS do MCP-1 e a curva ROC AUC do MCP-1 no grupo com necessidade de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 21 - Diagrama de caixa, os grupos de sobreviventes do MCP-1 e a curva ROC AUC do MCP-1 no grupo de não sobreviventes

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 20 - Nível de expressão dos biomarcadores na predição da TRS no pós-operatório de transplante hepático

	SEM TRS	COM TRS	P
P CYS (MG/L)	0,45 (0,33 – 0,91)	0,55 (0,43 – 1,78)	0,678
PENK (PMOL/L)	93,75 (62 – 159)	194,44 (143 – 311)	0,001
U KIM-1 (PG/ML)	5,27 (1,78 – 15,27)	5,24 (3,49 – 12,76)	0,565
U NGAL (NG/ML)	135 (51 – 507)	1559 (473 – 3917)	<0,0001
P NGAL (NG/ML)	287,5 (191 – 438)	669 (368 – 1662)	<0,0001
U IL-18 (PG/ML)	214,5 (119 – 412)	1116,5 (298 – 1682)	0,002
U CYS / CR (MG/G)	0,18 (0,01 – 0,33)	0,10 (0,002 – 0,44)	0,736
GST-PI (PG/ML)	43,01 (23,60 – 247,01)	822,63 (28,79 – 1446)	0,041
L-FABP (PG/ML)	212,28 (50,86 – 931,55)	923,74 (156,94 – 3193)	0,012
U A-1M /CR (MG/G)	0,28 (0,08 – 0,83)	0,72 (0,22 – 1,08)	0,09
U ALB /CR (MG/G)	0,17 (0,47 – 0,45)	0,22 (0,15 – 0,72)	0,30
FE PCS (%)	7,76 (0,11 – 14,64)	6,93 (2,58 – 21,85)	0,34
FE HÁ (%)	32,33 (6,71 – 532,67)	192,5 (98,28 – 1219)	0,06
FE NA (%)	0,23 (0,11 – 0,59)	0,31 (0,22 – 0,39)	0,587
FE U (%)	13,38 (6,59 – 38,91)	7,26 (2,84 – 12,15)	0,018

Continua.

	SEM TRS	COM TRS	P
OSM (MOSM/L)	534 (IC 420 – 725)	337,5 (IC 331 – 353,5)	<0,0001
U MCP-1 (PG/ML)	488 (232 – 1447)	3976,50 (727 – 5371)	<0,0001
TIMP-1 (PG/ML)	16,29 (5,03 – 425,81)	25,99 (12,22 – 425,81)	0,139
U UMOD (PG/ML)	78 (42,5 – 143)	64 (42 – 122)	0,755
LESÃO DNA (PG/ML)	8,56 (5,81 – 11,99)	13,96 (7,97 – 20,81)	0,046

Conclusão.

plasma - P, urinário - U, cistatina - CYS, pró-encefalina - PENK, interleucina-18 - IL-18, molécula de lesão renal - KIM-1, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, alfa 1 microglobulina – a1M, albumina - ALB, fração de excreção - Fe, sódio - Na, ureia - U, sulfato de p-creasol - PCS, hipurato - HA, osmolaridade – OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, uromudolina – UMOD.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 21 - Nível de expressão dos biomarcadores na predição da mortalidade no pós-operatório de transplante hepático

	SOBREVIVENTE	NÃO SOBREVIVENTE	P
P CYS (MG/L)	0,46 (0,42 – 0,91)	0,83 (0,33 – 1,80)	0,617
PENK (PMOL/L)	120,1 (73 – 205)	159,5 (100 – 337)	0,11
U KIM-1 (PG/ML)	5,39 (2,35 – 15,04)	4,23 (2,8 – 9,49)	0,422
U NGAL (NG/ML)	210 (79 – 1524)	1364 (283 – 3923)	0,014
P NGAL (NG/ML)	335 (227 – 673)	619 (224,5 – 734,5)	0,49
U IL-18 (PG/ML)	242,5 (125 – 910)	743 (329 – 1440)	0,005
U CYS / U CR (MG/G)	0,174 (0,002 – 41)	0,13 (0,02 – 0,47)	0,897
GST-PI (PG/ML)	53,73 (23,34 – 1446)	181,87 (34,39 – 1446)	0,127
L-FABP (PG/ML)	261,40 (54,47 – 1201)	922,79 (156,97 – 3088)	0,168
U A-1M / CR (MG/G)	0,38 (0,15 – 0,87)	0,55 (0,05 – 1,13)	0,732
U ALB / CR (MG/G)	0,18 (0,05 – 0,35)	0,26 (0,14 – 1,37)	0,167
FE PCS (%)	7,76 (0,16 – 19,25)	6,93 (2,08 – 13,51)	0,98
FE HÁ (%)	56,75 (11,11 – 532,67)	165 (31,57 – 9776)	0,335

Continua.

	SOBREVIVENTE	NÃO SOBREVIVENTE	P
FE NA (%)	0,24 (0,11 – 0,49)	0,33 (0,25 – 0,49)	0,282
FE UN (%)	11,44 (6,62 – 34,35)	6,15 (2,07 – 10,14)	0,048
OSM (MOSM/L)	490 (IC 373 – 618)	354 (IC 336 – 440,5)	0,059
U MCP-1 (PG/ML)	761 (324 – 1654)	5030 (814 – 6000)	0,004
TIMP-1 (PG/ML)	716,37 (5,92 – 333,56)	35,84 (1191 – 425,81)	0,105
U UMOD (PG/ML)	78 (50 – 137)	49 (36,50 – 77,50)	0,179
LESÃO DNA (PG/ML)	9,66 (6,21 – 16,23)	8,39 (6,06 -17,13)	0,743

Conclusão.

plasma - P, urinário - U, cistatina - CYS, pró-encefalina - PENK, interleucina-18 - IL-18, molécula de lesão renal - KIM-1, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, glutathione S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, alfa 1 microglobulina – a1M, albumina - ALB, fração de excreção - Fe, sódio - Na, ureia - U, sulfato de p-creasol - PCS, hipurato - HA, osmolaridade – OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, uromodulina – UMOD.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.10 O desempenho de todos os biomarcadores e os desfechos no transplante hepático

4.10.1 Desempenho dos biomarcadores pela Árvore de Classificação e Regressão - CART

O desempenho dos vinte biomarcadores, descritos anteriormente, foi analisado juntamente, para avaliar o melhor preditor de necessidade de TRS e mortalidade. A análise foi realizada através da Árvore de Classificação e Regressão (CART).

As variáveis foram divididas em melhor *performance* por período: pré-operatório e pós-operatório. No pré-operatório: as variáveis que melhor conseguiram classificar o grupo com necessidade de TRS foram o UNGAL e a

L-FABP – juntas apresentaram sensibilidade de 35,29%, especificidade 96,92%, VPP de 85,74% e VPN de 74,12%.

A Figura 8 demonstra a seleção dos pacientes conforme o nó à esquerda, com valor de corte de 43 ng/ml. A L-FABP <13,765 apresentou precisão no diagnóstico de 75,76%.

Figura 8 - Nível de concordância pela CART na predição de TRS

Fonte: Elaborado pela autora.

No pós-operatório: a variável que melhor conseguiu classificar o grupo com necessidade de TRS foi a OSM, o valor de corte de >383,5 mOsm/l, apresentou uma sensibilidade de 62%, especificidade 94%, VPP de 84% e VPN de 83%.

A Figura 9 demonstra a seleção dos pacientes conforme o nó à esquerda, determinando o grupo com necessidade de TRS. Os pacientes com o OSM menor >383,5 mOsm/l apresentaram precisão na predição de TRS de 83%.

Figura 9 - Nível de concordância pela CART na predição de TRS no pós-operatório

Fonte: Elaborado pela autora.

Na predição da mortalidade no pré-operatório, o L-FABP foi a variável de escolha pela CART, pois apresentou sensibilidade de 25%, especificidade 97%, VPP de 71% e VPN de 83% (Figura 10). O nó à esquerda, com valor de corte 4,25 pg/ml, teve precisão no diagnóstico de 82,83%.

Figura 10 - Nível de concordância pela CART na predição de mortalidade no pré-operatório

Fonte: Elaborado pela autora.

Na predição da mortalidade no pós-operatório, o MCP-a foi a variável de escolha pela CART, pois apresentou sensibilidade de 33%, especificidade 96%, VPP de 70% e VPN de 84% (Figura 11). O nó à esquerda, com valor de corte 4.677,5 pg/ml, teve precisão no diagnóstico de 83%.

Figura 11 - Nível de concordância pela CART na predição de mortalidade no pós-operatório

Fonte: Elaborado pela autora.

4.10.2 Desempenho dos biomarcadores pela regressão multivariada

Foram selecionadas as variáveis que apresentaram $p < 0,05$ na univariada, no pré-operatório para a determinação da necessidade de TRS, para analisar a predição independente pela regressão logística. Foram selecionadas as variáveis: idade, tempo de anestesia, débito urinário, balanço hídrico, UNGAL, L-FABP e MCP-1 (Tabela 22).

Tabela 22 - Odds ratio dos BM preditores de necessidade de TRS no pré-operatório

BM	OR	IC	P
UNGAL	4,45	(1,43 – 13,83)	0,01
L-FABP	1,15	(0,36 – 3,70)	0,82
MCP-1	2,65	(0,89 – 7,92)	0,08
IDADE	0,99	(0,95 – 1,04)	0,73
T. ANESTESIA	1,17	(0,88 – 1,57)	0,28
BH	1,00	(1,00 – 1,00)	0,03
DIURESE	0,99	(0,99 – 1,00)	0,02

plasma - P, urinário - U, gelatinase neutrófila associada a lipocalina - NGAL, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, proteína quimiotática-1 de monócitos – MCP, tempo-T, balanço hídrico-BH, biomarcador – BM, odds ratio – OR, intervalo de confiança – IC.

Fonte: Elaborado pela autora.

O UNGAL apresentou-se como o BM com a melhor predição de necessidade de TRS, com OR de 4,45, seguido do MCP-1, com OR de 2,65, mas teve um $p=0,08$. Nas variáveis controle, o BH e a diurese também se apresentaram preditores de IRA, porém essas variáveis não estão disponíveis no período pré-operatório.

As variáveis que apresentaram $p \leq 0,05$ na univariada, para determinação da mortalidade no pré-operatório, foram selecionadas, para se analisar a predição independente pela regressão logística. Foram selecionadas as variáveis: idade, tempo de anestesia, débito urinário, balanço hídrico, UNGAL, TIMP-1, a1M e MCP-1 (Tabela 23).

Tabela 23 - Odds ratio dos BM preditores de mortalidade no pré-operatório

BM	OR	IC	P
UNGAL	2,33	(0,63 – 8,65)	0,21
TIMP-1	3,50	(0,94 – 12,98)	0,06
A1M	2,07	(0,41 – 10,45)	0,38
MCP-1	1,29	(0,37 – 4,55)	0,68
IDADE	0,99	(0,94 – 1,05)	0,78
T. ANESTESIA	1,74	(1,25 – 2,43)	0,001
BH	1,00	(1,00 – 1,00)	0,23
DIURESE	0,99	(0,99 – 1,00)	0,16

plasma - P, urinário - U, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, inibidor de tecido de metaloproteinase-1 - TIMP-1, alfa 1 microglobulina- a1M, proteína quimiotática-1 de monócitos – MCP, tempo-T, balanço hídrico-BH, biomarcador – BM, odds ratio – OR, intervalo de confiança – IC.

Fonte: Elaborado pela autora.

Dos BM selecionados, nenhum alcançou significância estatística $p \leq 0,05$. O BM com melhor predição de mortalidade na regressão foi o TIMP-1, com OR de 3,50, $p=0,06$. Nas variáveis controle, o tempo de anestesia foi preditor independente de mortalidade, com OR de 1,74.

As variáveis que apresentaram $p \leq 0,05$ na univariada, para determinação da necessidade de TRS, foram selecionadas, para se analisar a predição independente pela regressão logística. Sendo assim, foram selecionadas as variáveis: idade, tempo de anestesia, débito urinário, balanço hídrico, PENK, UNGAL, PNGAL, IL-18, GST-pi, L-FABP, FeU, OSM, MCP-1 e lesão DNA (Tabela 24).

Tabela 24 - Odds ratio dos BM preditores de necessidade de TRS no pós-operatório

BM	OR	IC	P
PENK	15,10	(1,90 – 120)	0,01
UNGAL	10,45	(2,05 – 53,35)	0,005
PNGAL	3,643	(1,13 – 11,8)	0,03
IL-18	2,657	(0,79 – 9,43)	0,13
GST-PI	2,25	(0,65 – 7,78)	0,20
L-FABP	5,008	(1,56 – 16,02)	0,007
FEU	3,85	(1,10 – 13,44)	0,035
OSM	5,68	(1,35 – 23,78)	0,01
MCP-1	6,81	(1,10 – 13,44)	0,003
LESÃO DNA	4,33	(1,11 – 16,89)	0,003
IDADE	0,96	(0,88 – 1,04)	0,36
T. ANESTESIA	1,47	(0,96 – 2,25)	0,07
BH	1,00	(1,00 – 1,00)	0,01
DIURESE	0,99	(0,99 – 1,00)	0,09

plasma - P, urinário - U, pró-encefalina - PENK, gelatinase neutrófila associada à lipocalina – NGAL, interleucina-18 - IL-18, glutationa S-transferase-pi - GST-pi, proteína de ligação de ácido graxo - L-FABP, fração de excreção ureia (FeU), osmolaridade – OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, tempo-T, balanço hídrico-BH, biomarcador – BM, odds ratio – OR, intervalo de confiança – IC.

Fonte: Elaborado pela autora.

Novamente, o PENK se apresentou como o BM com a melhor predição de necessidade de TRS (Tabela 24), com OR de 15, seguido do UNGAL, com OR de 10 – sendo, portanto, os melhores preditores independentes de TRS. Outros BM também apresentaram resultados promissores, como: PNGAL, L-FABP, FeU, OSM, MCP-1 e lesão DNA.

Tabela 25 - Odds ratio dos BM preditores de mortalidade no pós-operatório

BM	OR	IC	P
UNGAL	12,52	(1,14 – 137)	0,04
IL-18	3,63	(0,82 – 16,04)	0,09
FEU	4,44	(0,71 – 27,73)	0,11
OSM	1,82	(0,14 – 23)	0,64
MCP-1	25,53	(2,32 – 281)	0,008
IDADE	1,00	(0,95 – 1,07)	0,78
T. ANESTESIA	1,62	(1,14 – 2,30)	0,007
BH	1,00	(1,00 – 1,00)	0,60
DIURESE	0,99	(0,99 – 1,00)	0,28

plasma - P, urinário - U, gelatinase neutrófila associada à lipocalina - NGAL, interleucina-18 - IL-18, fração de excreção uréia (FeU), osmolaridade – OSM, proteína quimiotática-1 de monócitos - MCP, tempo-T, balanço hídrico-BH, biomarcador – BM, odds ratio – OR, intervalo de confiança – IC.

Fonte: Elaborado pela autora.

O número de variáveis que conseguiram determinar a mortalidade na univariada reduziu-se consideravelmente. Foram cinco BM, comparados às que conseguiram determinar necessidade de TRS: dez. Na regressão logística, apenas dois BM se mostraram preditores independentes de mortalidade; foram o MCP-1, também escolhido pela CART, e o UNGAL, com OR, respectivamente, de 25,53 e 12,52 (Tabela 25).

5. DISCUSSÃO

A presente tese amplia o conceito de visão do diagnóstico da IRA, pelo qual verifica-se que a maioria das publicações tem foco na função de filtração. Nosso objetivo foi avaliar para além da filtração renal e dos biomarcadores de injúria, avaliando outros segmentos do néfron – como a permeabilidade glomerular, o estresse oxidativo, a secreção tubular, a concentração, a reserva renal e a fibrose.

Sobre alguns biomarcadores, como PCS e HA, só tinham sido publicados no cenário da doença renal crônica, levantando dúvidas sobre a sua utilidade clínica na IRA. Além disso, a questão sobre o uso dos BM para prever desfechos, como a necessidade de diálise e a mortalidade, permanece obscura. Esta tese tentou responder a essas e outras questões dentro do cenário do transplante hepático (TH).

O cenário do TH é validado para diagnóstico da IRA, devido à alta incidência da patologia durante e após TH. Estudos anteriores mostraram a capacidade de avaliar biomarcadores para diagnóstico de IRA no TH ⁵¹⁻⁵⁶, contudo, notamos que nosso estudo é a maior coorte e tem mais biomarcadores avaliados do que publicações prévias.

A incidência da IRA no nosso estudo foi alta, de 89%; isto pode ser explicado parcialmente devido à gravidade da nossa coorte, a qual apresentou um escore de MELD alto, de 29 – superior ao encontrado em outros estudos norte-americanos, que ficam em torno de 21 ^{51,53}.

Este trabalho utilizou o critério KDIGO para o diagnóstico da IRA, tendo sido avaliada a função renal em até 7 dias. Estudos prévios com o uso de biomarcadores no cenário do transplante hepático utilizaram o AKIN ^{52, 56, 57}, o RIFLE ^{51, 53, 54, 55} e poucos utilizaram o KDIGO. Baron et al.⁵⁸ utilizaram o KDIGO, porém foi avaliado apenas em 48 horas. A avaliação em 7 dias permite uma visão mais ampliada do diagnóstico da IRA no transplante hepático, evitando uma possível subnotificação, resultando de uma avaliação de falso negativo do biomarcador. Recentemente, o grupo ICA modificou a subclassificação do critério KDIGO, dividindo o KDIGO 1 em 1-A e 1-B, devido estudos terem evidenciado desfechos diferenciais entre os grupos, nosso estudo também utilizou esta subclassificação ^{8, 9}.

A nossa coorte categorizou os pacientes em dois grupos, realizando um grupo com maior gravidade, o qual foi formado por KDIGO 1-B, 2 e 3. Estudos prévios com biomarcadores também escolheram analisar apenas a IRA moderada e grave – como no estudo FROG ICU ⁵⁹, com 2.087 pacientes incluídos, que avaliou os BM de parada do ciclo celular, e o artigo de Kashani et al. ⁶⁰, com 728 pacientes, no qual também se avaliou apenas a IRA moderada e grave, em 233 pacientes (14%). No cenário do transplante hepático, outros estudos também utilizaram esta categorização ^{58,61}.

Embora a aplicação dos sistemas de classificação para IRA tenha melhorado o diagnóstico, o reconhecimento clínico precoce da IRA ainda é um desafio, pois os aumentos na creatinina sérica podem ser tardios e o baixo débito urinário nem sempre está presente. Diante das limitações no diagnóstico atual, existem inúmeras pesquisas investigando, como possíveis biomarcadores, diferentes proteínas urinárias e do soro – que são mais expressas nos rins no início da lesão e são mais sensíveis e específicas para o diagnóstico precoce de IRA.

Existem inúmeros potenciais BM estudados na literatura, tornando difícil a escolha de alguns. Um dos motivos de haver tantos BM é devido à complexidade do néfron, que não permite que apenas um BM isolado responda a todas as questões sobre a precocidade no diagnóstico, o tipo de IRA, o local afetado etc. , por isto, se fala de um painel de BM. Este trabalho abordou alguns BM conforme sua função ao longo do néfron (Figura 1). Adicionalmente, é importante enfatizar que poucos estudos avaliaram a utilidade clínica prognóstica dos biomarcadores, sendo que alguns BM, dos utilizados na presente tese, ainda não foram utilizados na literatura para avaliação de desfechos, como necessidade de TRS e mortalidade, tornando os resultados apontados inovadores.

A filtração glomerular é uma importante função do néfron, assim como a mais comentada e difundida na literatura, com inúmeras fórmulas que a estimam baseadas na Scr. Encontrar um novo biomarcador neste campo pode preencher as lacunas da Scr em relação as suas limitações. A cystatina C é um biomarcador com melhor acurácia do que a Scr, visto que não é influenciada por sexo, raça ou massa muscular, também não é afetada pela bilirrubina – comum no paciente cirrótico ⁶². Neste estudo, não foi encontrada predição da cystatina-C entre os

períodos pré e pós-operatórios, assim como não foi possível determinar a IRA grave, nem desfechos de TRS e mortalidade.

Estudos prévios ⁶³⁻⁶⁶, incluindo pacientes cirróticos, também não alcançaram bons resultados com o uso da cystatina C. Isto pode ser parcialmente explicado pelo uso de imunossupressores, como glicocorticoides, que alteram a produção da cystatina C, sendo que o estado de inflamação também pode contribuir ⁶⁷⁻⁶⁹. Além disso, nas comorbidades, 13% da coorte tinham hipotireoidismo – o que diminui a produção de cystatina C ⁷⁰⁻⁷². No estudo de Sirota et al.⁵⁴, no cenário do transplante hepático, a cystatina C plasmática também falhou na determinação da IRA.

A proencefalina (PENK) é um biomarcador mais recente de lesão na filtração glomerular, o qual, diferentemente da cystatina C, não é influenciado pela inflamação ⁷³⁻⁷⁴. Nossos resultados, apontam para uma excelente *performance* deste BM na análise univariada, com elevação entre o período pré 81,8 (IC 55 – 125,5) e o pós-operatório 123,9 (IC 75,5 – 218,28) pmol/l $p < 0,0001$, capacidade de determinar a IRA grave mediana de 161,45 (122,85 - 294,03) vs 81 (IC 61,25 - 101,50) pmol/l no grupo não IRA/IRA leve, assim como na determinação da gravidade da IRA, elevando seu nível de expressão conforme o estadiamento KDIGO 1, mediana de 75,50 (CI 57,75 – 118,88) e KDIGO 3 178,67 (145,60 – 299,25) pmol/l.

Existem poucos estudos prévios com o uso da PENK no cenário da IRA e nenhum em pacientes cirróticos ou em transplante hepático. Os estudos em destaque usando PENK foram em pacientes sépticos. Em 2015, de Marino et al.⁷⁵, com 101 pacientes sépticos, no qual a PENK foi associada independentemente com o diagnóstico de IRA. Conforme o estadiamento do RIFLE, houve aumento da sua expressão ($p=0,001$). No estudo de 2017, de Kim et al.⁷⁶, com uma coorte maior, de 167 pacientes, o nível da PENK se elevou conforme a gravidade da sepse. Foi encontrado valor de corte, para o diagnóstico de IRA, de 154,5 pmol/l, com uma AUC de 0,73 (IC 0,65 – 0,79). Neste trabalho, o valor de corte foi de 119,05 pmol/l e a AUC 0,828 (IC 0,715 – 0,941) foi superior ao relatada nos estudos prévios, com sensibilidade de 0,80 e especificidade de 0,90. Além disso, foi considerado o melhor BM na determinação da IRA grave, tanto no pré-operatório quanto no pós-operatório

pela CART. A regressão apresentou OR de 4,40 (IC 1,40 – 13,88) $p=0,01$, no pré-operatório, e 46,01 (IC 5,55 – 384) $p<0,0001$, no pós-TH.

Em 2018, ainda no cenário da sepse, em um estudo com 978 pacientes incluídos⁷⁷, a PENK foi um bom determinante de IRA. O estudo também analisou desfechos, como necessidade de TRS e mortalidade. Foi encontrado *odds ratio* de 4,0 (IC 3,0 - 5,4), para necessidade de TRS na UTI, e de 1,5 (IC 1,2 - 1,8), para mortalidade em 90 dias. Nosso estudo também demonstrou que a PENK pode determinar defechos, como a necessidade de TRS, com uma mediana de 93,75 (IC 62 – 159), no grupo sem necessidade de TRS, e 194,44 (IC 143 – 311) $p=0,001$, OR de 15,10 (IC 1,90 – 120) $p=0,01$, no grupo com necessidade de TRS, mas não foi possível determinar a mortalidade em 60 dias.

Os estudos reportados anteriormente^{75, 76, 78, 59}, assim como o estudo multicentrico de Hollinger et al.⁷⁷, avaliaram o PENK com uma coleta única e apenas este biomarcador isolado. O nosso estudo avaliou três períodos, sendo pré-operatório, 24 e 48 horas após o transplante (apresentando, na tese, o valor máximo entre esses dois períodos) e também comparou com os demais 20 biomarcadores.

O NGAL é o biomarcador mais estudado em diversos cenários, incluindo no transplante hepático. Estudos prévios reportaram a habilidade do NGAL de determinar a IRA^{51–56,79,80}. O desempenho desse biomarcador no nosso estudo foi tão relevante que foi possível publicar um artigo original, em 2019, assim como divulgar um capítulo de livro, em 2020, relatando as principais facetas do NGAL^{45, 47}. Nossos achados demonstram a superioridade do U NGAL para determinar a IRA e outros desfechos, sua melhor habilidade pode ser explicada devido ao U NGAL ser liberado primeiro na urina, sendo que a análise compreendeu apenas as primeiras 48 horas após o transplante. Apesar disto, o P NGAL também tem papel importante, visto que pacientes sem diurese podem se beneficiar desse biomarcador, incluindo o momento de iniciar a terapia renal substitutiva, que é uma dúvida constante na prática clínica.

De acordo com uma recente revisão sistemática⁸¹, do uso do NGAL no cenário do transplante hepático para o diagnóstico da IRA, os intervalos relatados para as melhores AUC foram 0,54 - 0,86, para P NGAL, e 0,5 - 0,83, para U NGAL. Nosso estudo, encontrou valor de AUC, para o P NGAL, de 0,69

(IC 0,58 – 0,79) $p=0,002$ e, para o UNGAL, de 0,70 (IC 0,59 – 0,81) $p=0,001$ no diagnóstico da IRA grave. Adicionalmente, o UNGAL apresentou OR de 10,45 (IC 2,05 – 53,35) $p=0,005$.

Apesar de haver vários artigos com biomarcador em transplante hepático, os trabalhos falharam na avaliação dos desfechos de necessidade de TRS e mortalidade. Nosso estudo, o UNGAL conseguiu prever a necessidade de TRS e mortalidade no período pré-operatório, antes da cirurgia. Não foi encontrado estudo com resultado semelhante, no cenário do transplante hepático, para comparar nossos achados. Entretanto, em crianças submetidas ao bypass cardiopulmonar,⁸² foram avaliadas a necessidade de TRS e a mortalidade, encontrando uma AUC 2 horas após o bypass cardiopulmonar, respectivamente, de 0,86 e 0,91; entretanto, o número de eventos foi pequeno: 4 necessitaram de TRS e 3 não sobreviveram. Na recente meta-análise de Klein et al.⁸³, incluindo 1.696 pacientes, com número de eventos suficiente, 7 – 50% da coorte com necessidade de TRS, foi encontrada uma AUC de 0,73 (IC 0,68 – 0,78). Achados semelhantes foram encontrados com o UNGAL, no nosso estudo, com AUC de 0,80 (IC 0,72 – 0,89) $p < 0,0001$, se revelando preditor independente de TRS, com OR de 4,45 (IC 1,43 – 13,83) $p=0,01$, no pré-operatório, e 2,74 (IC 0,95 – 7,92) $p=0,06$, no pós-TH. Também foi a primeira variável de escolha pela CART, para a determinação da TRS no pré-operatório. Junto com OSM e TIMP-1, alcançaram precisão de 80% dos pacientes que precisariam de TRS.

Os demais biomarcadores de injúria estudados, como a U CYS-C e o KIM-1, não foram determinantes de IRA e de outros desfechos, como necessidade de TRS e mortalidade. Como abordado previamente, os fatores de confusão da CYS-C podem influenciar a expressão da U CYS-C. Adicionalmente, o estudo de Tsuchimoto et al.⁵⁷ não conseguiu determinar a IRA por CYS-C urinária após o transplante hepático em 31 pacientes.

Quando avaliou-se uma coorte pequena⁷⁹, com 16 crianças submetidas ao transplante hepático, o KIM-1 obteve significância estatística 24 horas após o transplante, com uma mediana 629,19 vs 235 $p=0,02$. No nosso estudo, o KIM-1 não determinou a IRA. Não foram encontrados outros estudos com uso desse biomarcador no cenário do transplante hepático, além do trabalho de Fuhrman et al.⁷⁹ reportado neste parágrafo.

A IL-18 foi um biomarcador de destaque neste estudo, tendo sido possível determinar o grupo com IRA grave, a necessidade de TRS e a mortalidade. No estudo de Sirota et al.⁵⁴, com 40 pacientes submetidos a transplante hepático, a IL-18 também permitiu bons resultados na determinação da IRA, com a mediana de 0 (IC 0 – 42,73) sem IRA e 883 (IC 0 – 5024,4) com IRA, $p = 0,0449$ e AUC de 0,742.

O GST-pi é uma enzima citosólica solúvel em citocromo, que desempenha um papel de desintoxicação dos radicais livres, sendo produzida no túbulo distal do néfron⁸⁴. Como um eliminador de radicais livres, o GST pode ajudar as células epiteliais tubulares a resistir às condições estressantes. Assim, seus valores foram associados ao desenvolvimento de IRA, à necessidade de diálise e à mortalidade⁸⁵. Nosso estudo revelou predição de diálise pela GST-pi com uma mediana de 43,01 sem TRS vs 822,63 com TRS, uma AUC de 0,63 (IC 0,50 – 0,75) $p=0,04$. Estudos prévios, reportaram essa habilidade⁸⁶, pois indivíduos nefropatas em pré-diálise apresentaram prevalência menor de superexpressão de GST – quando comparados aos pacientes em HD (20% vs. 72%)⁸⁷. No cenário do TH, estudo prévio com o GST-pi apresentou um pobre desempenho⁵⁶.

O L-FABP é uma proteína de 14kDa que participa do transporte dos ácidos graxos para as mitocôndrias e para os peroxissomos, em que serão metabolizados, reduzindo o estresse oxidativo. As L-FABP não são detectadas normalmente na urina, mas deixam de ser reabsorvidas por endocitose, aumentando sua expressão em células epiteliais tubulares proximais, em situações de lesão renal determinadas por isquemia ou estresse oxidativo no túbulo renal⁸⁸.

Em uma coorte com 31 pacientes submetidos ao TH⁵⁷, o L-FABP foi maior em pacientes com IRA do que sem IRA, com uma AUC 0,63 (CI 95% 0,51 - 0,76), $p=0,04$, valor de corte de 91,3 ng/mg, sensibilidade de 35% e especificidade de 97%. No nosso estudo, a L-FABP apresentou maior expressão no grupo com IRA grave 512,77 vs 105,06 pg/ml sem IRA/IRA leve, $p=0,017$, uma AUC de 0,65 (IC 0,53 - 0,76), valor de corte de 137,38 pg/ml, sensibilidade de 75 e especificidade de 56%. No estudo de Siew et al.⁸⁹, com 380 pacientes criticamente enfermos, o L-FABP urinário foi preditor independentemente de

necessidade de diálise – OR 2,36 (1,30 - 4,25). No nosso estudo, o L-FABP predizeu a necessidade de TRS, com uma AUC de 0,66 (IC 0,54 – 0,77). Também foi preditor independentemente de necessidade de diálise – OR 5,01 (1,56 – 16,02) $p=0,0007$.

Os biomarcadores de reabsorção glomerular, representados neste estudo por a1m e U ALB, não foram preditores de gravidade da IRA, nem de necessidade de TRS. Estudos prévios, no cenário da IRA com o uso da a1m, não foram encontrados. A avaliação deste BM na literatura se concentra em pacientes com DRC e na predição de doença cardiovascular^{90,91}. Nosso estudo, revelou que o a1M foi preditor de mortalidade apenas no pré-operatório, na univariada AUC de 0,75 (IC 0,55 – 0,96), mas o resultado não se sustentou na regressão múltipla. A U ALB é reconhecida como um marcador confiável da lesão renal devido à sua presença na urina refletir alteração na reabsorção glomerular, sendo utilizada como referência no diagnóstico da DRC – mas, nosso estudo não mostrou aplicabilidade para determinar os desfechos.

Apesar de a capacidade de secreção fornecer informações tão ou mais importantes que a filtração, existem poucos estudos avaliando esta função. Um dos motivos para isto é a dificuldade de coletar um *clearance* (24 horas), em uma urina que deverá ser armazenada corretamente, visto que, na sua maioria, os biomarcadores de secreção são metabólitos. O estudo de Garimella et al.⁹² comparou coletas isoladas com amostras de 24 horas e revelou que é possível, em uma coleta única, avaliar a secreção tubular pela fração de excreção, coletando amostras de urina e sangue – isto estimaria o *clearance* da substância com segurança.

Existem alguns solutos urêmicos utilizados para avaliar a função de secreção. Eles são substratos conhecidos como transportadores de ânions orgânicos (OAT) e transportadores de cátions orgânicos (OCT), como: HA, PCS, sulfato de indoxil, pre-creasol, ácido úrico, entre outros⁹³. Em nosso estudo, foram utilizados os biomarcadores PCS e HA. Ambos reduziram seu nível, entre os períodos pré e pós-operatórios, provalvemente refletindo a redução na capacidade secretora do rim no pós-operatório ($p < 0,0001$). Infelizmente, não foi possível fazer associação da FePCS e da FeHA com a gravidade da IRA. A FeHA apresentou maior expressão no grupo com necessidade de TRS, com uma

mediana de 192,5 (IC 98,28 – 1.219) *versus* 32,33 (IC 6,71 – 532,67) % sem TRS, valor de $p=0,06$, refletindo talvez a recuperação da função renal e o aumento da capacidade secretora no grupo em TRS. Como relatado anteriormente, existem poucos estudos avaliando esta função, porém, no estudo de Dicey et al.⁹⁴, avaliando HA, cinamoilglicina, PSC e sulfato de indoxil, em 298 pacientes com doença renal, o HA e o PCS foram associados à mortalidade independentemente da eTFG e da albuminúria. Neste trabalho, não foi possível prever a mortalidade por esses biomarcadores.

Os biomarcadores abordados neste estudo, até o momento, ainda não estão disponíveis na prática clínica diária; entretanto, a avaliação da bioquímica urinária está. Estes parâmetros (FeNa e FeU) são utilizados para diferenciar a IRA intrínseca da IRA pré-renal. Baseado na premissa de que túbulos intactos reabsorvem sódio/ureia e túbulos lesionados não, a fração de excreção de sódio, é utilizada desde a década de 1970^{43,95}. O diagnóstico diferencial é importante, pois pode determinar o início da TRS precoce ou indicar o tratamento para reverter a IRA pré-renal com a administração de fluídos. A discussão sobre o valor de corte é extensa, sendo que, para a FeNa, é de 1% e na FeU é de 35%. Nosso trabalho não encontrou esses valores; também não foi encontrado estudo prévio com a avaliação da bioquímica urinária na determinação da IRA no transplante hepático. Recentemente, Patidar et al. avaliaram retrospectivamente a FeU em 50 pacientes cirróticos, sendo que a FeU apresentou excelentes resultados para diferenciar a IRA estrutural da IRA funcional, com uma AUC de 0,96 (IC 0,91 – 100). O valor de corte de 33,41 mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 85%. Nosso estudo não mostrou associação da BU no diagnóstico da IRA grave, porém a FeU apresentou bom desempenho para prever necessidade de diálise e mortalidade no pós-TH, com uma AUC de 0,33 (IC 0,21 - 0,46) e AUC de 0,33 (CI 0,18 - 0,48), respectivamente. A baixa AUC reflete um fator protetivo; valores de FeU mais altos representam uma função tubular mais preservada.

Dentre as inúmeras funções do rim está a capacidade de concentração da urina. Mesmo em condições de diminuição da ingesta hídrica, o rim mantém as suas funções, trabalhando com alta habilidade de concentração de solutos-osmolaridade. O impacto da osmolaridade no desfecho de lesão renal não foi

bem explorado, trazendo dúvidas sobre sua aplicabilidade no diagnóstico da IRA e desfechos. Trata-se, portanto, de outro método disponível em muitos laboratórios. Assim, estudar sua faceta é importante como uma ferramenta de auxílio da função renal. Não foram encontrados muitos estudos avaliando sua aplicabilidade na IRA, talvez devido aos fatores de confusão tipicamente comuns em pacientes críticos e cirúrgicos, como: manejo de infusão de volumes, uso de diuréticos, entre outros. Mesmo sendo um desafio conseguir resultados promissores em uma coorte cirúrgica, nosso estudo demonstrou a excelente *performance* da osmolaridade na predição da IRA grave, da necessidade de TRS e da mortalidade. Nossos achados corroboram uma larga coorte, incluindo 1.999 pacientes com DRC, na qual a baixa osmolaridade foi um fator de risco independente para resultados renais adversos ⁹⁶. No nosso estudo, a OSM foi a segunda variável de escolha pela CART para determinar o grupo com IRA grave, junto com o UNGAL e o TIMP-1, tendo precisão de 81% no diagnóstico e sendo a primeira variável de escolha no pós-TH para necessidade de TRS, com precisão de 80%. A OSM também foi preditor independente pela regressão logística múltipla, com OR de 18,21 (IC 3,31 – 100) $p=0,001$, para IRA grave, e OR de 5,68 (IC 1,35 – 23,78) $p=0,01$, para necessidade de TRS.

A UMOD, também conhecida como proteína Tamn-Horsfall, é uma glicoproteína produzida exclusivamente no ramo ascendente espesso e contorcido distal do rim. Tem sido demonstrada sua regulação com a IRA em estudos prévios e está ligada a reserva tubular. Assim, maiores níveis de UMOD podem ser sugestivos de maior massa de néfron; além disso, a UMOD tem propriedades protetoras anti-inflamatórias ⁹⁷.

Existem poucos estudos *in vivo* que investigam a expressão da UMOD na IRA, sendo que os estudos geralmente se concentram no cenário da cirurgia cardíaca ^{98,99}.

Em um estudo com 98 pacientes cirróticos, foi analisado a UMOD na admissão. O nível do UMOD foi significativamente menor em pacientes que desenvolveram IRA vs sem IRA, mediana 9,30 vs 13,35 ng/ml $p=0,002$ ¹⁰⁰.

No cenário do transplante hepático, maiores níveis de UMOD no pré-operatório foram associados a menor risco de desenvolver IRA no pós-operatório ¹⁰¹.

Nosso estudo revelou redução considerável do nível de UMOD entre o pré-operatório 275 vs 73 no pós-operatório, com significância estatística $p < 0,0001$. Também apresentou menores níveis de expressão no grupo com IRA grave, refletindo o uso da reserva renal. Utilizando dados deste estudo, foi publicado o artigo de LaFavers et al.⁴⁶, os quais, em achados *in vitro*, demonstraram que a UMOD inibe a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), tanto no rim quanto sistemicamente. Esses achados foram corroborados com dados da nossa coorte, na qual a concentração de UMOD circulante se correlacionou com dano oxidativo sistêmico. Foi adicionado um grupo controle à coorte, tornando os resultados mais relevantes estatisticamente. Houve associação não apenas com a IRA, mas também com a mortalidade pós-cirúrgica e com a necessidade de diálise. Sem este grupo controle, nossos achados revelam menor expressão do UMOD em piores desfechos, como IRA grave, necessidade de TRS e mortalidade.

O TIMP-2, que faz parte do Nefro-Check, tem sido bem difundido na pesquisa clínica, com diversos estudos publicados. O mesmo não se aplica ao TIMP-1, utilizado no nosso estudo: ele é um inibidor fisiológico das enzimas que degradam a matriz colágena. Estudos relatando a *performance* do TIMP-1 na IRA são escassos na literatura e se concentram no cenário da sepse¹⁰¹⁻¹⁰³. O trabalho de Wang et al.¹⁰³ revelou que o TIMP-1 aumentou sua expressão conforme a gravidade da sepse. Estudos recentes demonstram o TIMP-1, dentre outros inibidores da metaproteínase, como potencial BM de fibrose¹⁰⁴. Nosso estudo revelou o TIMP-1 como preditor de IRA grave, com AUC de 0,64 (IC 0,52 – 0,77), OR de 5,09 (IC 1,57 – 16,54) $p = 0,007$. O trabalho também apresentou maior expressão de TIMP-1 na predição da mortalidade no pré-operatório, com AUC de 0,66 (IC 0,51 - 0,81), mas não no pós-TH.

O MCP-1 é produzido e secretado pelas células mesangiais renais nos túbulos distais, atuando como mediador em lesões renais agudas isquêmicas e tóxicas¹⁰⁵. Com uma grande coorte avaliando 976 pacientes, o nível de MCP-1 foi significativamente maior em pacientes que desenvolveram IRA e morreram¹⁰⁶.

No nosso estudo, o MCP-1 não alcançou significância estatística, apesar de se encontrar mais elevado no grupo com IRA grave 1.263 vs 759 pg/ml não

IRA/IRA leve. Houve distinção significativa para a gravidade da IRA, conforme o KDIGO 1 872 vs 2.810,5 pg/ml KDIGO 3, AUC de 0,71 (IC 0,56 – 0,86) p 0,008 e um valor de corte de 1279 pg/ml. O estudo de Tschimoto et al.⁵⁷, no cenário do transplante hepático, encontrou boa determinação do MCP-1 no diagnóstico da IRA, com uma AUC de 0,78 (IC 0,68 - 0,89), um valor de *cutoff* de 642 pg/mgcr, $p < 0,0001$.

Não foi encontrado estudo na literatura avaliando o MCP-1 e o desfecho de necessidade de diálise. O nosso estudo revelou que o MCP-1 foi capaz de prever a necessidade de diálise e a mortalidade mesmo no pré-operatório antes da cirurgia, com uma AUC, respectivamente, referente ao pós-TH de 0,803 (IC 0,69 - 0,92) $p < 0,0001$ e 0,76 (IC 0,58 - 0,95) $p = 0,004$, sendo preditor independente de ambos os desfechos, com OR 5,68 (IC 1,35 – 23,78) $p = 0,01$, para necessidade de diálise, e OR 25,53 (IC 2,32 – 23,78) $p = 0,008$, para mortalidade. O MCP-1 foi a variável de escolha, pela CART, para determinar não sobreviventes, com precisão de 83%.

Este estudo tem vários pontos fortes. Apesar de não ser um estudo multicêntrico, é a maior coorte em pacientes transplantados hepáticos publicada na literatura. A análise prospectiva permitiu que os dados fossem coletados de forma consistente. O diagnóstico da IRA foi realizado em 7 dias, sendo que, na maioria dos estudos, a avaliação é restrita às 48 horas. Assim, a análise em uma semana permite uma visão mais realística do diagnóstico da IRA e reduz a chance do diagnóstico de IRA subclínica. Não foram encontrados estudos prévios analisando as funções do néfron em filtração, permeabilidade, secreção, concentração, reserva tubular e fibrose. Como pontuado neste estudo, a maioria das publicações se concentra em biomarcadores de injúria e, mesmo quando analisado mais do que um BM, não foram avaliadas todas as facetas apresentadas neste trabalho. Alguns BM analisados não foram estudados no cenário da IRA, apenas na DRC, tornando os resultados aqui apontados inovadores.

Este estudo também tem algumas possíveis limitações, devido às dosagens apresentadas nos resultados nem sempre refletirem toda a coorte dos BM: P CYS C, PENK, IL-18, KIM-1, PNGAL, U NGAL, U CYS-C, GST-pi, L-FABP, a-1M, U ALB, FeNa, FeU, FePCS, FeHA, OSM, MCP, TIMP-1, UMOD e lesão

DNA – os quais foram dosados, respectivamente: 53, 57, 36, 96, 100, 98, 95, 95, 66, 42, 36, 74, 76, 43, 43, 46, 63, 95, 35 e 35 pacientes.

Neste estudo, a divisão do grupo sem IRA e KDIGO 1A foi categorizada como sem IRA/IRA leve, enquanto os pacientes que preencheram os critérios para KDIGO 1B, 2 ou 3 foram sumarizados como IRA grave. Essa proposta de análise foi publicada em estudos anteriores ^{58,61}.

6. CONCLUSÕES

A análise de BMs em diferentes segmentos/ funções do néfron, é um sinal de alerta de danos à: filtração, permeabilidade glomerular, lesão tubular, secreção renal, fibrose e reserva tubular, esta avaliação permite um diagnóstico diferencial / prognóstico mais preciso, além de avaliar os desfechos de necessidade de TRS e mortalidade.

O PENK provou ser o melhor biomarcador de filtração; o UNGAL e a IL-18 os melhores BM de injúria; o L-FABP mostrou-se o melhor BM de estresse; a FeU o melhor BM de secreção; a OSM o melhor BM de concentração, enquanto o MCP-1 e o TIMP-1 são os melhores BM de fibrose.

Os achados da CART permitem uma avaliação do painel em conjunto e informa o resultado dos BM mais relevantes de todos no período pré-operatório quanto no pós-operatório para cada desfecho avaliado.

Os BM em destaque pela CART no pré-op. são: IRA grave (PENK), necessidade de TRS (UNGAL e L-FABP) e mortalidade (L-FABP). Os BM em destaque pela CART no pós-op. são: IRA grave (PENK, OSM e TIMP-1), necessidade de TRS (OSM) e mortalidade (MCP-1).

A a-1M, a Fe PCS e a Fe HA não se mostram favoráveis no diagnóstico da IRA. Devido à escassez de artigos neste cenário, mais estudos são necessários para esclarecer esta questão.

Os resultados do estudo pontuam que alguns BM (PENK, UNGAL, IL-18, L-FABP e MCP-1) conseguem prever desfechos de gravidade de IRA, necessidade de TRS e mortalidade no período pré-operatório: isto pode auxiliar o manejo dos pacientes no futuro.

7. ANEXOS

7.1 Anexo 1 – Artigo “Urinary Biochemistry in the Diagnosis of Acute Kidney Injury”

Hindawi
Disease Markers
Volume 2018, Article ID 4907024, 7 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/4907024>

Review Article

Urinary Biochemistry in the Diagnosis of Acute Kidney Injury

Camila Lima ¹ and Etienne Macedo ^{1,2}

¹Internal Medicine Department, Nephrology Division, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

²Department of Medicine, Nephrology Division, University of California San Diego, San Diego, CA, USA

Correspondence should be addressed to Camila Lima; camilaxlima@gmail.com

Received 16 March 2018; Revised 3 May 2018; Accepted 20 May 2018; Published 12 June 2018

Academic Editor: Yi-Chia Huang

Copyright © 2018 Camila Lima and Etienne Macedo. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Acute kidney injury (AKI) is a common complication, impacting short- and long-term patient outcomes. Although the application of the classification systems for AKI has improved diagnosis, early clinical recognition of AKI is still challenging, as increments in serum creatinine may be late and low urine output is not always present. The role of urinary biochemistry has remained unclear, especially in critically ill patients. Differentiating between a transient and persistent acute kidney injury is of great need in clinical practice, and despite studies questioning their application in clinical practice, biochemistry indices continue to be used while we wait for a novel early injury biomarker. An ideal marker would provide more detailed information about the type, intensity, and location of the injury. In this review, we will discuss factors affecting the fractional excretion of sodium (FeNa) and fractional excretion of urea (FeU). We believe that the frequent assessment of urinary biochemistry and microscopy can be useful in evaluating the likelihood of AKI reversibility. The availability of early injury biomarkers could help guide clinical interventions.

1. Introduction

Despite considerable improvement in acute kidney injury (AKI) recognition achieved over the last decades, early diagnosis is still a challenge. The Dialysis Quality Initiative (ADQI) sought a uniform definition of AKI, and the most recent consensus published in 2012 by Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) is currently widely applied in clinical and research scenarios. However, AKI is still fundamentally dependent on changes in serum creatinine and urine output, and both have several limitations [1]. The importance of the timing of diagnosis has been poorly appreciated in AKI, as therapeutic interventions have been lacking and have failed to improve outcomes in many clinical studies. Still, the importance of determining potential reversibility has been emphasized in the early biomarker era. Urinary biochemistry has been utilized since the 1970s, mainly to help differentiate two conditions, namely, reversible (prerenal) or transient AKI (T-AKI), from an established AKI, acute tubular necrosis (ATN), or persistent AKI (P-AKI) [2].

Clinicians usually follow daily serum creatinine concentrations to assess the glomerular filtration rate (GFR), as

serum creatinine is freely filtered in the glomerulus, and a small proportion is normally secreted along the tubule [3]. However, serum creatinine levels are influenced by other factors not related to GFR: age, gender, muscle mass, muscle metabolism, medication, and hydration status [4]. Additionally, acute changes in GFR are not accompanied by concomitant increases in serum creatinine, as the balance between production and elimination takes days to occur. Thus, serum creatinine underestimates the degree of loss of renal function, especially in the first 48 hours after the insult [5, 6]. Another common limitation of creatinine is related to the cumulative fluid balance, common in severely ill patients. An increase in the volume of distribution of serum creatinine can cause an underestimation of the creatinine concentration, further delaying the diagnosis [7]. Also, in sepsis, the most frequent cause of AKI in hospitalized patients, production of serum creatinine is decreased [8]. Even in the absence of muscle mass loss, muscular production of serum creatinine has been shown to be reduced in sepsis, further diminishing its value as a marker of AKI [9].

Urinary output also has limitations. First, it is not possible to quantify urine volume in all patients. In children and

Continua.

neonates, the assessment of urine output using diapers is challenging, as weighing diapers is not ideal and subject to errors [10]. In addition, the risk of nosocomial urinary tract infection has reduced the use of urinary catheters and is restricted to severely ill patients [11]. Most importantly, 33% of patients at AKI diagnosis and between 25% and 80% of all cases of AKI are nonoliguric [12–15]. The nonoliguric state may be present in all types of AKI, including those following surgery, trauma, hypotension, nephrotoxins, and rhabdomyolysis. Several factors may contribute to the development of nonoliguric AKI: volume expansion, high-dose potent diuretic agents, and renal vasodilators. Other contributory factors are aggressive fluid resuscitation and improved supportive management of critically ill patients [16]. Therefore, although the residual level of GFR is the primary determinant of urine volume in patients with AKI, there is a distinction between spontaneous and induced urine flow, and urine flow does not correlate with the degree of renal dysfunction.

In some scenarios, urine volume decline may not represent a decline in renal function but an expected response to decreasing renal perfusion. Dehydration in the setting of diarrhea or vomiting is a frequent clinical situation in which renal hypoperfusion can occur, even in the presence of normal blood pressure [17]. In hepatorenal syndrome type 1, considered a reversible disease, the reduction in splanchnic and total vascular resistance occurs as a consequence of increased nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. Any additional insult caused by gastrointestinal losses, bleeding, or therapy with a diuretic or a non-steroidal anti-inflammatory drug precipitates a further decline in GFR. In this context, it is expected that an increase in renal perfusion can rapidly reverse the decline in GFR or the prerenal state. However, not all hypoperfusion states will respond to fluid expansion. In acute heart failure, impaired cardiac output causes decreased glomerular perfusion pressure and increased venous pressure, reducing the glomerular filtration. Medications that further decrease the effective volume, such as diuretics, or ones that interfere with glomerular perfusion pressure, for example, angiotensin blockers or NSAIDs, often affect the renal autoregulatory response and can trigger prerenal states.

Since the 1940s, laboratory tests to distinguish T-AKI conditions from P-AKI have been used. These diagnostic parameters present various exceptions, and the distinction between prerenal and renal causes are frequently not accurate. The plasma (P) urea/creatinine ratio, urine (U) osmolality, U/P osmolality, U/P creatinine ratio, urinary Na^+ level, and fractional excretions of Na^+ (FeNa) are the most frequently used tests. Serum U/P creatinine ratio helps to identify whether the oliguria is a result of water reabsorption ($\text{U/Pcr} > 20$) or loss of tubular function ($\text{U/Pcr} < 20$). In reversible states, the reabsorption of sodium is increased, not only from the increase in proximal tubular reabsorption of water but also by the increase in aldosterone level secondary to hypovolemia. The concentrations of sodium (UNa) and chloride (UCI) in the urine have been known to be high during established phases of P-AKI. Although the accuracy of UNa alone in determining the cause of AKI is limited,

the renal failure index ($\text{UNa} \div \text{U/P creatinine}$) or the fractional excretion of sodium (FeNa or $\text{U/PNa} \div \text{U/P creatinine} \times 100$) was found to have a high degree of accuracy in differentiating between TAKI and PAKI. Despite these caveats, the tests are easy to perform, cheap, noninvasive, and available in daily clinical practice. Understanding the limitations of urinary biochemistry can reveal their potential benefits to assist in the diagnosis, differentiation, and management of AKI [18, 19].

2. Fractional Excretion of Sodium (FeNa)

Espinell [20] conducted a landmark study with the fractional excretion of sodium (FeNa), which was one of the first analyses of urinary biochemistry used to differentiate T-AKI from P-AKI. The interpretation of FeNa is based on the premise that intact tubules reabsorb sodium in the prerenal states while the injured tubules do not [20, 21]. In that study published in 1976, FeNa was evaluated in 17 patients in the oliguric phase of acute renal failure. In patients who recovered from AKI, FeNa was less than 1% (Table 1), and in those with P-AKI, FeNa was more than 3% ($p < 0.01$) [20]. Other studies have confirmed FeNa as a possible tool to differentiate functional and structural AKI. Miller et al. [22] and Espinell and Gregory [23] showed that FeNa is more than 1% in oliguric and nonoliguric ATN and urinary tract obstruction, and low ($< 1\%$) in prerenal azotemia and in acute glomerulonephritis.

Despite the small number of patients, these studies revealed the potential to distinguish T-AKI from P-AKI. Prerenal AKI is accepted as a reversible form of renal dysfunction, caused by factors that compromise renal perfusion. The term has been used as part of a dynamic process that begins with a reversible condition, prerenal state, and can progress to an established disease, ATN. Although we consider P-AKI an established form of cell injury, most likely representing acute tubular necrosis, in most studies and in clinical practice the histopathological diagnosis is uncertain. The confirmation is most often retrospective, once renal function recovers over days to weeks.

The concept of T-AKI occurs when FeNa less than 1% is indicated, as increased reabsorption of sodium is the appropriate response of functioning nephrons to reduced renal perfusion; values greater than 1% are consistent with P-AKI due to inappropriate sodium excretion in the setting of tubular damage. Nevertheless, several subsequent studies were unable to reproduce these findings. Saha et al. [24] evaluated FeNa in 54 patients with acute intrinsic renal failure in whom renal biopsy was performed: 48 had tubulointerstitial nephritis and 6 had acute glomerulonephritis. By dividing patients into three groups based on FeNa $< 1\%$, $> 1\%$, and $> 3\%$, they found no association between histological findings and FeNa [24]. Bagshaw et al. evaluated the use of urinary biochemistry in septic AKI [25]. They found lower urinary sodium (UNa) in septic-AKI patients, as compared to non-septic-AKI patients, but the index was not useful to differentiate prerenal failure from P-AKI in these patients [18, 26]. The physiopathological mechanisms involved in septic AKI are different from those in ischemic-associated

Continua.

TABLE 1: Urinary index equations and reference values.

Urinary indices	Formula	Traditional reference value
FeNa	$\text{FeNa} = [(\text{NaU}/\text{NaS})/(\text{cru}/\text{crP})] \times 100$	<1% transient AKI >1% persistent AKI
FeU	$\text{FeU} = [(\text{Uu}/\text{US})/(\text{cru}/\text{crP})] \times 100$	<35% transient AKI >35% persistent AKI

Na—sodium, cr—creatinine, u—urinary, S—serum, P—plasma, U—urea, and AKI—acute kidney injury. Modified from [20, 37].

AKI [27]. The inflammatory and hormone system activation results in arterial vasodilatation and induction of an increase in tubular sodium reabsorption and a decrease in urinary sodium concentration. Thus, FeNa in this setting could be an inadequate parameter to evaluate the hypoperfusion state.

The primary goal in differentiating functional from structural AKI has been the assessment of reversibility with fluid therapy. The concept of prerenal implies that hemodynamic improvement can increase renal blood flow and reverse the prerenal state. Thus, these indices have been used to differentiate T-AKI from P-AKI. This differentiation could avoid inappropriate fluid infusions in patients who have P-AKI [28], possibly decreasing the risk of pulmonary edema and mechanical ventilation, both risk factors for increased mortality [29, 30]. On the other hand, low FeNa does not always imply functional AKI that can be reversible with fluid expansion. Especially in septic patients, this difference is unclear, as studies have shown a low value of FeNa to be common in septic patients with P-AKI. Vanmassenhove et al. [28], in a prospective study, analyzed FeNa and other biomarkers in 107 sepsis patients at admission on an intensive care unit (ICU), 4 hours and 24 hours after admission. They showed lower levels of FeNa in no AKI versus T-AKI; however, FeNa < 1% was found in 77.3% of all cohorts, and 50% of patients had a value < 0.36%, considered as the reference value in their study. Another recent study carried out by Bagshaw et al. [25] found similar results with FeNa < 1% in 57% of the cohort. These results emphasize the need for a revision of the reference value in septic patients.

Two other points deserve emphasis concerning the use of urinary biochemistries as a diagnostic tool in AKI. In some patients with nonoliguric ATN, P-AKI, and some vascular/glomerular disorders (acute glomerulonephritis, vasculitis, and thrombotic thrombocytopenic purpura) early in the course of urinary tract obstruction, urinary chemical indices can be indistinguishable from those seen with prerenal AKI and T-AKI. Conversely, several acute renal parenchymal disorders (e.g., interstitial nephritis, severe ischemic nephropathy, and exacerbations of chronic renal failure) are found to have a low value of FeNa, despite their severity and likelihood of reversibility [31–33].

In patients with normal kidney function, the level of FeNa depends on several factors, such as glomerular filtration and sodium intake. Thus, a single cutoff value may not be adequate in the interpretation of FeNa as a marker of tubular function. A recent study analyzed FeNa, GRF, and sodium intake in 761 children without AKI [34]. The authors compared the difference between measured and predicted

FeNa based on urinary sodium excretion and creatinine clearance and showed that the predicted FeNa was significantly lower than the measured FeNa in the children with tubular dysfunction. This study highlights the effect of salt intake and eGFR in FeNa values. Another common caveat in the interpretation of FeNa is the use of diuretics. Diuretic use is a common practice in AKI patients with volume overload. Diuretics decrease sodium reabsorption, increasing FeNa and so interfering with the performance of FeNa in differentiating between T-AKI and P-AKI [35]. In a prospective study [36] with 99 patients, 64 of whom received diuretics, FeNa values were not different within the 43 patients with T-AKI and 21 with P-AKI.

3. Fractional Excretion of Urea (FeU)

Fractional excretion of urea nitrogen (FeU) (Table 1) may be a more useful tool than FeNa in the differential diagnosis of AKI. Urea reabsorption is primarily dependent on passive forces and is, therefore, less influenced by diuretic therapy [18, 37]. FeU relates inversely to the proximal reabsorption of water, and urea reabsorption leads to a decrease in FeU and an increase in the BUN/creatinine ratio. In a prospective study, Carvounis et al. found that FeU < 35% (Table 1) was associated with a 98% chance of prerenal failure [37]. FeU had a high sensitivity (85%), a high specificity (92%), and a high positive predictive value, being a useful tool to differentiate T-AKI from P-AKI. Similarly, Dewitte et al. concluded that a FeU of less than 40% was a sensitive and specific index for differentiating T-AKI from P-AKI [38].

Still, there are also some limitations in the use of FeU. In osmotic diuresis and with the use of mannitol or acetazolamide, the proximal tubular reabsorption of salt and water is impaired, so there can be an increase in FeU, even in states of hypoperfusion [39]. The same can occur when a patient is given a high protein diet or presents excessive catabolism. In septic patients, the release of cytokines can interfere with the urea transporters in the kidney and colon; in these patients, FeU is not a good indicator of reversibility [40]. In critically ill patients, the use of FeU has also been questioned. In a multicenter study carried by Wlodzimirow et al. [41], 150 critically ill patients evaluated the performance of FeU to differentiate transient T-AKI in 51 patients from P-AKI in 41 patients. The use of FeU had a reduced ability to discriminate T-AKI from P-AKI on the day of diagnosis of AKI (AUC 0.61) and on the first (AUC 0.61) and second (AUC 0.58) days prior AKI. Other similar results were found in multicenter studies in an ICU population, reported by Darmon et al. [42] and Pons et al. [43]. Both studies concluded that FeU

Continua.

was not helpful in differentiating T-AKI from P-AKI on admission to ICU. Despite these discouraging findings, other studies have proposed the use of a combination of both FeNa and FeU tests, which may increase diagnostic sensitivity and specificity in the differential diagnosis of AKI, especially in the context of patient history, physical examination, and urinalysis [44].

4. Urine Microscopy

Urine microscopy (UM) is a frequently forgotten tool to evaluate AKI. The distinction between T-AKI and P-AKI is classically made by the presence of granular casts and muddy-brown or mixed cellular casts [45–49]. However, the number of renal tubular epithelial cell casts can be also helpful to distinguish less severe ATN and P-AKI cases and predict the likelihood of T-AKI. Marcussen et al. [50], in 51 patients with AKI, showed that the numbers of cylinders were higher in patients with ATN. In addition, 12 patients who needed dialysis had granular, waxy, leukocytic, and broad-cast cylinders. Chawla et al. [51] revisited this issue and developed a new score with the objective of standardizing urinary sediment analysis. This score was tested in 30 patients, 18 with ATN. They were able to show an association of higher scores with lower rates of renal recovery. In 2009, Perazella et al. [52] proposed a urinary sediment scale (Table 2) to evaluate the differential diagnosis of AKI. They created three groups, according to the numbers of granular casts and renal tubular epithelial cells (RTEC) present. Zero granular cast and zero RTEC were more frequent in the pre-renal state, while ATN and P-AKI patients had higher numbers of granular casts and RTEC. More recently, the revision of Perazella and Coca [21] suggests that the urinary sediment scale used in association with early biomarkers can be helpful in the prognosis of AKI severity, the need for RRT, and prevention of mortality.

In sepsis-associated AKI, UM has been shown to be more useful than urinary biochemistry, as it is less affected by hydration status and medications. Bagshaw et al. [53], evaluating the UM of 83 critical patients, showed that it was effective in discriminating septic AKI from nonseptic, with worse sediment found in septic AKI, and it was associated with worsening AKI, the need for RRT, and mortality. In a prospective study, Schinstock et al. [54] analyzed the use of NGAL and UM to detect AKI in patients admitted from the emergency department. Urinary NGAL levels had an only fair sensitivity (65%) and specificity (65%) to differentiate no AKI versus stages 1, 2, or 3 (area under the curve 0.70). In that study, the urinalysis with microscopy was very specific (91%) but not very sensitive (22%), with an area under the curve of 0.57.

These findings reveal the possible use of urinary biochemistry and UM in the differential diagnoses of AKI. The majority of studies of spot chemistries have been performed at a single point of time, relatively late in the course of AKI. The lack of serial data is an essential factor to consider in the interpretation of these results, as AKI is a dynamic process. Following the progression of daily urinary biochemistry and UM can improve the value of these parameters in AKI

TABLE 2: Differential diagnosis of AKI based on the numbers of casts in the urinary sediment.

Kinds of casts	Numbers	Reference values
Granular casts	0	Transient AKI
	1 to 10 by LPF	Persistent AKI
Epithelial cell casts	0	Transient AKI
	1 or more by HPF	Persistent AKI

AKI (acute kidney injury), LPF (low-power field), and HPF (high-power field). Modified from [51–53].

differential diagnosis. During the early phases of AKI, the renal tubular function is intact. Later, cell injury may result in the loss of tubular cell polarity. The resulting urine chemistries, therefore, are dependent on the phase of the course in which they were obtained.

5. Biomarkers

Over the last decades, several early markers of kidney injury have been proposed: urinary cystatin C [55], urinary Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) [56], urinary interleukin 18 (IL-18) [57], and urinary/plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) [58]. Although evaluated in different settings, few biomarkers have been introduced to clinical practice. Several studies have demonstrated the value of NGAL for early AKI diagnosis [59] and prediction of severity and need for dialysis [60]. Recently, biomarkers of cell cycle arrest, insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7), and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) [61] have added mechanistic insight into AKI physiopathology and increased hope for the prospect of early diagnosis and interventions for AKI. The availability of rapid assays for some of these markers [62, 63] and several ongoing trials will soon provide more guidance on early AKI management. However, the increased cost and lack of evidence of improvement in patients’ hard outcomes continue to be the main limitations for their use.

6. Conclusion

We believe that, by monitoring the parameters of urinary biochemistry and UM, we can predict the likelihood of early AKI recovery. The combined assessment of the urinary biochemistries of FeNa and FeU and UM can facilitate the differential diagnosis of AKI. Large studies with an early diagnosis of AKI should include urinary biochemistry/microscopy and correlate with early biomarkers of injury to help in the recognition of reversibility.

Disclosure

Camila Lima’s current address is 455 Av., Arnaldo Dr., 01246-903 Cerqueira Cesar, SP, Brazil. Etienne Macedo’s current address is 9500 Gilman Dr., La Jolla MC 0892, CA, USA.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] P. M. Palevsky, G. C. Curhan, and A. M. Sheridan, "Definition of acute kidney injury (acute renal failure)," 2017, <http://www.uptodate.com/contents/definition-of-acute-kidney-injury-acute-renal-failure>.
- [2] J. A. Armstrong, "Urinalysis in western culture: a brief history," *Kidney International*, vol. 71, no. 5, pp. 384–387, 2007.
- [3] C. Ronco, R. Bellomo, and J. A. Kellum, "Acute renal failure: pathophysiological principles," in *Book Critical Care Nephrology*, vol. 2009p. 215.
- [4] R. S. Brown Jr., M. Lombardero, and J. R. Lake, "Outcome of patients with renal insufficiency undergoing liver or liver-kidney transplantation," *Transplantation*, vol. 62, no. 12, pp. 1788–1793, 1996.
- [5] K. Yong, G. Dogra, N. Boudville, M. Pinder, and W. Lim, "Acute kidney injury: controversies revisited," *International Journal of Nephrology*, vol. 2011, Article ID 762634, 17 pages, 2011.
- [6] T. L. Nickolas, M. J. O'Rourke, J. Yang 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*, vol. 148, no. 11, pp. 810–819, 2008.
- [7] E. Macedo, J. Bouchard, S. H. Soroko et al., "Fluid accumulation recognition and staging of acute kidney injury in critically-ill patients," *Critical Care*, vol. 14, no. 3, article R82, 2010.
- [8] M. Godin, P. Murray, and R. L. Mehta, "Clinical approach to the patient with AKI and sepsis," *Seminars in Nephrology*, vol. 35, no. 1, pp. 12–22, 2015.
- [9] K. Doi, P. S. T. Yuen, C. Eisner et al., "Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 20, no. 6, pp. 1217–1221, 2009.
- [10] S. Oddie, R. Adappa, and J. Wyllie, "Measurement of urine output by weighing nappies," *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, vol. 89, no. 2, pp. 180F–1181, 2004.
- [11] M. Fernández-Ruiz, B. Calvo, R. Vara, R. N. Villar, and J. M. Aguado, "Inappropriate use of urinary catheters in patients admitted to medical wards in a university hospital," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 31, no. 8, pp. 523–525, 2013.
- [12] S. Martini and J. P. Guignard, "Polyuria, pollakiuria, and nocturia in children: diagnostic and therapeutic approach," *Revue Médicale de la Suisse Romande*, vol. 121, no. 3, pp. 197–204, 2001.
- [13] E. Macedo, R. Malhotra, R. Claire-Del Granado, P. Fedullo, and R. L. Mehta, "Defining urine output criterion for acute kidney injury in critically ill patients," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 26, no. 2, pp. 509–515, 2011.
- [14] D. N. Cruz, S. M. Bagshaw, C. Ronco, and Z. Ricci, "Acute kidney injury: classification and staging," *Contributions to Nephrology*, vol. 164, pp. 24–32, 2010.
- [15] E. Macedo, R. Malhotra, J. Bouchard, S. K. Wynn, and R. L. Mehta, "Oliguria is an early predictor of higher mortality in critically-ill patients," *Kidney International*, vol. 80, no. 7, pp. 760–767, 2011.
- [16] J. R. Prowle, Y. L. Liu, E. Licari et al., "Oliguria as predictive biomarker of acute kidney injury in critically ill patients," *Critical Care*, vol. 15, no. 4, article R172, 2011.
- [17] J. G. Abuelo, "Normotensive ischemic acute renal failure," *New England Journal of Medicine*, vol. 357, no. 8, pp. 797–805, 2007.
- [18] S. M. Bagshaw, C. Langenberg, and R. Bellomo, "Urinary biochemistry and microscopy in septic acute renal failure: a systematic review," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 48, no. 5, pp. 695–705, 2006.
- [19] J. Prowle, S. M. Bagshaw, and R. Bellomo, "Renal blood flow, fractional excretion of sodium and acute kidney injury: time for a new paradigm?," *Current Opinion in Critical Care*, vol. 18, no. 6, pp. 585–592, 2012.
- [20] C. H. Espinel, "The FeNa test use in the differential diagnosis of acute renal failure," *Journal of the American Medical Association*, vol. 236, no. 6, pp. 579–581, 1976.
- [21] M. A. Perazella and S. G. Coca, "Traditional urinary biomarkers in the assessment of hospital-acquired AKI," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 7, no. 1, pp. 167–174, 2012.
- [22] T. R. Miller, R. J. Anderson, S. L. Linas et al., "Urinary diagnostic indices in acute renal failure: a prospective study," *Annals of Internal Medicine*, vol. 89, no. 1, pp. 47–50, 1978.
- [23] C. H. Espinel and A. W. Gregory, "Differential diagnosis of acute renal failure," *Clinical Nephrology*, vol. 13, no. 2, pp. 73–77, 1980.
- [24] H. Saha, J. Mustonen, H. Helin, and A. Pasternack, "Limited value of the fractional excretion of sodium test in the diagnosis of acute renal failure," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 2, no. 2, pp. 79–82, 1987.
- [25] S. M. Bagshaw, M. Bennett, P. Devarajan, and R. Bellomo, "Urine biochemistry in septic and non-septic acute kidney injury: a prospective observational study," *Journal of Critical Care*, vol. 28, no. 4, pp. 371–378, 2013.
- [26] S. M. Bagshaw, C. Langenberg, L. Wan, C. N. May, and R. Bellomo, "A systematic review of urinary findings in experimental septic acute renal failure," *Critical Care Medicine*, vol. 35, no. 6, pp. 1592–1598, 2007.
- [27] H. Gomez, C. Ince, D. de Backer et al., "A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury," *Shock*, vol. 41, no. 1, pp. 3–11, 2014.
- [28] J. Vanmassenhove, G. Glorieux, E. Hoste, A. Dhondt, R. Vanholder, and W. van Biesen, "Urinary output and fractional excretion of sodium and urea as indicators of transient versus intrinsic acute kidney injury during early sepsis," *Critical Care*, vol. 17, no. 5, pp. R234–R210, 2013.
- [29] R. W. Schrier, "Diagnostic value of urinary sodium, chloride, urea, and flow," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 22, no. 9, pp. 1610–1613, 2011.
- [30] S. Perinel, F. Vincent, A. Lautrette et al., "Transient and persistent acute kidney injury and the risk of hospital mortality in critically ill patients: results of a multicenter cohort study," *Critical Care Medicine*, vol. 43, no. 8, pp. e269–e275, 2015.

Continua.

- [31] K. S. Kamel, J. H. Ethier, R. M. A. Richardson, R. A. Bear, and M. L. Halperin, "Urine electrolytes and osmolality: when and how to use them," *American Journal of Nephrology*, vol. 10, no. 2, pp. 89–102, 1990.
- [32] R. W. Steiner, "Interpreting the fractional excretion of sodium," *The American Journal of Medicine*, vol. 77, no. 4, pp. 699–702, 1984.
- [33] J. R. Diamond and D. Yoburn, "Nonoliguric acute renal failure associated with a low fractional excretion of sodium," *Annals of Internal Medicine*, vol. 96, no. 5, pp. 597–600, 1982.
- [34] M. F. Schreuder, A. Bökenkamp, and J. A. E. van Wijk, "Interpretation of the fractional excretion of sodium in the absence of acute kidney injury: a cross-sectional study," *Nephron*, vol. 136, no. 3, pp. 221–225, 2017.
- [35] C. J. Diskin, T. J. Stokes, L. M. Dansby, L. Radcliff, and T. B. Carter, "The comparative benefits of the fractional excretion of urea and sodium in various azotemic oliguric states," *Nephron Clinical Practice*, vol. 114, no. 2, pp. c145–c150, 2010.
- [36] M. N. Pépin, J. Bouchard, L. Legault, and J. Ethier, "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*, vol. 50, no. 4, pp. 566–573, 2007.
- [37] C. P. Carvounis, S. Nisar, and S. Guro-Razuman, "Significance of the fractional excretion of urea in the differential diagnosis of acute renal failure," *Kidney International*, vol. 62, no. 6, pp. 2223–2229, 2002.
- [38] A. Dewitte, M. Biais, L. Petit et al., "Fractional excretion of urea as a diagnostic index in acute kidney injury in intensive care patients," *Journal of Critical Care*, vol. 27, no. 5, pp. 505–510, 2012.
- [39] M. H. Goldstein, P. R. Lenz, and M. F. Levitt, "Effect of urine flow rate on urea reabsorption in man: urea as a "tubular marker"," *Journal of Applied Physiology*, vol. 26, no. 5, pp. 594–599, 1969.
- [40] C. Schmidt, K. Hoehlerl, and M. Bucher, "Cytokine-mediated regulation of urea transporters during experimental endotoxemia," *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, vol. 292, no. 5, pp. F1479–F1489, 2007.
- [41] K. A. Wlodzimirow, A. Abu-Hanna, A. A. N. M. Royakkers et al., "Transient versus persistent acute kidney injury and the diagnostic performance of fractional excretion of urea in critically ill patients," *Nephron. Clinical Practice*, vol. 126, no. 1, pp. 8–13, 2014.
- [42] M. Darmon, F. Vincent, J. Dellamonica et al., "Diagnostic performance of fractional excretion of urea in the evaluation of critically ill patients with acute kidney injury: a multicenter cohort study," *Critical Care*, vol. 15, no. 4, article R178, 2011.
- [43] B. Pons, A. Lautrette, J. Oziel et al., "Diagnostic accuracy of early urinary index changes in differentiating transient from persistent acute kidney injury in critically ill patients: multicenter cohort study," *Critical Care*, vol. 17, no. 2, article R56, 2013.
- [44] U. Schönermarck, K. Kehl, and W. Samtleben, "Diagnostic performance of fractional excretion of urea and sodium in acute kidney injury," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 51, no. 5, pp. 870–871, 2008.
- [45] S. Klahr and S. B. Miller, "Acute oliguria," *New England Journal of Medicine*, vol. 338, no. 10, pp. 671–675, 1998.
- [46] M. L. Esson and R. W. Schrier, "Diagnosis and treatment of acute tubular necrosis," *Annals of Internal Medicine*, vol. 137, no. 9, pp. 744–752, 2002.
- [47] N. Singri, S. N. Ahya, and M. L. Levin, "Acute renal failure," *JAMA*, vol. 289, no. 6, pp. 747–751, 2003.
- [48] E. Needham, "Management of acute renal failure," *American Family Physician*, vol. 72, no. 9, pp. 1739–1746, 2005.
- [49] N. Lameire, W. Vanbiesen, and R. Vanholder, "Acute renal failure," *The Lancet*, vol. 365, no. 9457, pp. 417–430, 2005.
- [50] N. Marcussen, J. Schumann, P. Campbell, and C. Kjellstrand, "Cytodiagnostic urinalysis is very useful in the differential diagnosis of acute renal failure and can predict the severity," *Renal Failure*, vol. 17, no. 6, pp. 721–729, 2009.
- [51] L. S. Chawla, A. Domm, A. Berger, S. Shih, and S. S. Patel, "Urinary sediment cast scoring index for acute kidney injury: a pilot study," *Nephron. Clinical Practice*, vol. 110, no. 3, pp. c145–c150, 2008.
- [52] M. A. Perazella, S. G. Coca, M. Kanbay, U. C. Brewster, and C. R. Parikh, "Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 6, pp. 1615–1619, 2008.
- [53] S. M. Bagshaw, M. Haase, A. Haase-Fielitz, M. Bennett, P. Devarajan, and R. Bellomo, "A prospective evaluation of urine microscopy in septic and non-septic acute kidney injury," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 27, no. 2, pp. 582–588, 2012.
- [54] C. A. Schinstock, M. H. Semret, S. J. Wagner et al., "Urinalysis is more specific and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is more sensitive for early detection of acute kidney injury," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 28, no. 5, pp. 1175–1185, 2013.
- [55] A. G. Schneider and R. Bellomo, "Urinalysis and pre-renal acute kidney injury: time to move on," *Critical Care*, vol. 17, no. 3, p. 141, 2013.
- [56] W. K. Han, V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani, and J. V. Bonventre, "Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury," *Kidney International*, vol. 62, no. 1, pp. 237–244, 2002.
- [57] C. R. Parikh, J. Mishra, H. Thiessen-Philbrook et al., "Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery," *Kidney International*, vol. 70, no. 1, pp. 199–203, 2006.
- [58] S. di Somma, L. Magrini, B. de Berardinis et al., "Additive value of blood neutrophil gelatinase associated lipocalin to clinical judgement in acute kidney injury diagnosis and mortality prediction in patients hospitalized from the emergency department," *Critical Care*, vol. 17, no. 1, pp. R29–R13, 2013.
- [59] M. Bennett, C. L. Dent, Q. Ma et al., "Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 3, pp. 665–673, 2008.
- [60] I. E. Hall, S. G. Yarlalagadda, S. G. Coca et al., "IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 1, pp. 189–197, 2010.
- [61] H. M. Jia, L. F. Huang, Y. Zheng, and W. X. Li, "Diagnostic value of urinary tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and insulin-like growth factor binding protein 7 for acute kidney injury: a meta-analysis," *Critical Care*, vol. 21, no. 1, p. 77, 2017.

Disease Markers

7

- [62] A. S. Bargnoux, L. Piéroni, and J. P. Cristol, "Analytical study of a new turbidimetric assay for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) determination," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, no. 12, pp. e293–e296, 2013.
- [63] J. H. Westhoff, B. Tönshoff, S. Waldherr et al., "Urinary tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7) predicts adverse outcome in pediatric acute kidney injury," *Plos One*, vol. 10, no. 11, article e0143628, 2015.

Conclusão.

7.2 Anexo 2 – Artigo “Comprehensive Assessment of Kidney Health in Acute Kidney Injury: Can It Be Achieved?”

nephron
Clinical
Practice

Clinical Practice: Mini-Review

Nephron 2019;143:188–192
DOI: 10.1159/000502381

Received: April 9, 2019
Accepted after revision: July 25, 2019
Published online: September 18, 2019

Comprehensive Assessment of Kidney Health in Acute Kidney Injury: Can It Be Achieved?

Etienne Macedo^{a,b} Camila Lima^b

^aDivision of Nephrology, Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA, USA;
^bLIM 12, Division of Nephrology, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Keywords

Biomarkers · Acute kidney injury

Abstract

Acute kidney injury (AKI) is a frequent event in hospitalized patients, with an incidence that continues to rise, reaching as high as 70–80% in intensive care settings. The need for dialysis and progression to end-stage kidney disease (ESKD) after an episode of AKI is relatively low, from 5 to 20%. However, it is now recognized that patients with AKI may have very different kidney outcomes, varying from complete recovery, incipient chronic kidney disease (CKD), to progression to ESKD. Recent studies have shown that even mild AKI episodes can be associated with a 90% increased risk of developing CKD during long-term follow-up. There is a significant need to focus our efforts on factors that could mitigate the progression of kidney dysfunction and ultimately improve outcomes from AKI. The first step toward this goal encompasses a better understanding of tubular and glomerular alterations during and following an AKI episode. Our current approach, based solely on glomerular filtration rate (GFR), is flawed, since the loss of kidney function does not correspond to the degree of decline in estimated GFR (eGFR), and eGFR does not reflect tubular function. Changes in tubular concentration, reabsorptive and secretory capacity are recognized in AKI; however, they have not been incorporat-

ed in clinical assessments of overall kidney function. Here we review a few candidates to assess glomerular filtration/permeability, tubular dysfunction, and injury and how we expect these markers to alter during the development and recovery phase of AKI.

© 2019 S. Karger AG, Basel

Introduction

Recent advances in urinary and serum biomarkers of kidney damage have provided new tools to identify tubular injury that can be mapped to specific sites; however, these injury markers have not been correlated with alterations in tubular function [1]. The combination of tubular function assessment in conjunction with kidney injury, glomerular filtration, and permeability markers would provide a more accurate overall evaluation of kidney health [2]. This overall assessment would enable cli-

Contribution from the AKI and CRRT 2019 Symposium at the 24th International Conference on Advances in Critical Care Nephrology, Manchester Grand Hyatt, San Diego, CA, USA, February 26 – March 1, 2019. This symposium was supported in part by the NIDDK funded University of Alabama at Birmingham–University of California San Diego O'Brien Center for Acute Kidney Injury Research (P30DK079337).

KARGER

© 2019 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/nef

Etienne Macedo
Division of Nephrology, UC San Diego
9452 Medical Center Drive
San Diego, CA 92037 (USA)
E-Mail emmacedo@ucsd.edu

Continua.

Table 1. Biomarkers rational for clinical use in acute kidney injury setting and/or CKD

Biomarkers		Mechanism in AKI	Limitations/confounding factors
Functional/ filtration	sCr	Freely filtered by glomerulus, also secreted by tubular cells	Affected by age, gender, muscle mass, muscle metabolism, medication, hydration status, sepsis and liver disease
	Cys C	Freely filtered by glomerulus, reabsorbed and metabolized in the proximal tubular cells	Affected by age, high glucocorticoids levels, systemic inflammation, cigarette smoking, hyperbilirubinemia, hypertriglyceridemia, malignance and thyroid and proliferative disorders
	Pro-ENK	Is an endogenous polypeptide hormone filtrated by the glomerulus; associated with GFR, is increased in AKI (sepsis and transplant)	Also elevated in cardiovascular failure, systemic inflammation and pain
Permeability/ tubular injury	Albuminuria	Filtered by glomerulus, reabsorbed and metabolized in the proximal renal tubule; prediction of cardiovascular risk and CKD progression	Affected by protein metabolism (drugs or liver diseases) and cardiovascular disease
Tubular injury	KIM-1	Transmembrane glycoprotein produced after ischemic/nephrotoxic insults; is increased in AKI and associated with CKD progression (fibrosis)	Increase in renal cell carcinoma, chronic proteinuria, CKD and sickle cell nephropathy
	NGAL	A 25 kDa polypeptide protease of the lipocalin superfamily; can predict AKI before sCr elevation. Also involved in tubular repair	Levels also increase in sepsis, COPD, cardiac dysfunction, malignancy, age, urinary tract infection, pancreatitis and endometrial hyperplasia
Tubular inflammation	IL-18	Pro-inflammatory cytokine; increased in ischemic and inflammatory AKI	Affected by other factors including: psoriasis, heart failure, inflammatory bowel disease, multiple sclerosis and metastatic melanoma
Tubular stress	TIMP-2/ IGFBP7	Proteins released in urine in response to stress (inflammation and ischemia); useful in AKI prediction	Also increases in inflammation, ischemic events in other organs and cancer (prostate, colorectal)
Reabsorption	$\alpha 1m$	Low molecular weight protein, its presence reflects proximal tubular damage; studies in nephrotoxic AKI and CKD progression	Is found in other tissues: lungs, intestine and placenta and could be affected in sepsis
Secretion	Fe hippurate	Handle by organic anion transporters on the basolateral membrane, decreased secretion reflects tubular dysfunction. Low excretion has been associated with CKD progression	Obesity, diabetes, gastrointestinal diseases, psychological disorders, autism, toxicity and parasitic infection affect excretion
	Fe ammonium	Low ammonium reflects a decreased ability of the tubules to generate ammonium	Also affected by dietary acid load, and changes in plasma potassium concentration

sCr, serum creatinine; AKI, acute kidney injury; CKD, chronic kidney disease; eGFR, estimated glomerular rate filtration; Cys C, cystatin C; Pro-enk, Pro-enkephalin; Alb, albuminuria; KIM-1, kidney injury molecule-1; NGAL, neutrophil gelatinase associated lipocalin; IL-18, interleukin-18; TIMP-2, Tissue inhibitor of metalloproteinase 2; IGFBP 7, Insulin-like growth factor-binding protein 7; $\alpha 1m$, $\alpha 1$ -microglobulin; Fe, fractional excretion; HA, hipurate.

nicians to be better equipped to diagnose kidney disease and manage patients with kidney dysfunction [3–5].

Despite the improvement in acute kidney injury (AKI) classification systems and putative biomarkers for AKI, timely diagnosis and assessment of AKI severity remain challenging [6]. Alterations in kidney function are generally assessed by serum creatinine (sCr), the most common surrogate for glomerular filtration rate (GFR), which has limitations since GFR poorly reflect tubular function, the main site of injury in AKI. Renal tubule cells perform many of the essential kidney functions, including reabsorption, electrolyte transport, secretion of endogenous molecules and medications, acid/base balance control, and concentration and dilution of urine [7]. In this mini

review, we will discuss some key pathophysiological mechanisms and key markers of kidney glomerular and tubular function, including filtration, absorption, secretion, and concentration that could provide a comprehensive evaluation of kidney function (Table 1).

The Concern about the Limitation of sCr and the Difficulty to Find a Reliable GFR

Our most recent diagnostic criteria for AKI, the KDIGO classification system [8], still relies on changes of sCr and urine output [9]. sCr has standardized assays widely available and is of easy interpretation by all providers. However, sCr is not only filtered but also secreted by the tubules, and affected by age, gender, muscle mass,

muscle metabolism, medication, and hydration status [10]. Thus, sCr- based evaluation of filtration is inaccurate. The more precise exogenous markers of filtration, inulin, iothalamate, CrEDTA or iohexol, can provide more reliable filtration estimation, but need to be injected, making the process time consuming and costly.

Urine and Plasma Uromodulin as a Marker of Tubular Reserve

Uromodulin, also called Tamm-Horsfall protein, is a glycoprotein expressed in the thick ascending limb and distal convoluted tubule of the kidneys. It is excreted as the most abundant urinary protein in healthy kidneys [11], and released into the circulation through the peritubular capillary network [12, 13]. Different than other markers for kidney function, uromodulin is exclusively produced by thick ascending limb cells, and thus it can be linked to tubular health and reserve [14–16]. Levels of urine and serum uromodulin has been correlated with kidney health and few experimental studies have suggested that it may a down regulation effect on systemic and kidney inflammation, playing a protective role in AKI [17]. In cardiac surgery, studies have shown that low urine uromodulin is associated with higher odds of AKI and higher peak sCr in the postoperative period [18, 19]. Plasma uromodulin can also be assessed and have 2 main advantages: less prone to enzymatic degradation by proteases [20] and does not require correction for urinary concentration [21].

Plasma Cystatin C: More Accurate Filtration Marker

Cystatin C (Cys C) is a low molecular weight, 13.36 kDa non-glycosylated protein, freely filtered through the glomerulus, reabsorbed and metabolized in the proximal renal tubule, not suffering renal or extrarenal secretion. Unlike creatinine, serum levels of Cys C are not significantly affected by sex, race or muscle mass. However, concentrations of Cys C are affected by age, high glucocorticoids levels, thyroid disorders, inflammation, cigarette smoking, and some proliferative disorders. In addition, in sepsis, the production of Cys C is decreased, and the nonrenal clearance is increased.

Proenkephalin is an Early Biomarker of Kidney Injury Not Influenced by Inflammation

Proenkephalin (proENK) is a monomeric peptide (approximately 4.5 kDa). It is a stable surrogate marker for endogenous enkephalins; it is cleaved from the precursor peptide preproenkephalin A alongside enkephalins (endogenous opioids) and filtrated by the glomerulus. PENK

has been associated with the worsening of kidney during AKI and accurately represents GFR in patients with sepsis. In a retrospective study including 101 patients admitted to the emergency department with suspected sepsis, in patients without AKI, ENK levels were mainly within the normal range, despite the presence of inflammation [22]. In the postoperative period of cardiac surgery, pro-ENK was an early marker of AKI development, while NGAL was elevated above the normal range for almost all patients without AKI [23].

Albuminuria as a Marker of Glomerular and Tubular Dysfunction

Urine albumin is a well-known marker glomerular permeability. The structure of the fenestrated endothelial layers, negative charge basement membrane, and podocytes do not allow albumin to enter the tubule. The presence of albumin in the urine reflects damage to this delicate and complex structure, being a useful marker of endothelial dysfunction, chronic kidney disease (CKD) progression, and an independent risk factor for cardiovascular disease and cardiovascular mortality [24–26]. However, the mechanism of albuminuria is complex as the normal glomerulus filters substantial amounts of albumin that is then processed by proximal tubular cells. Dysfunction in retrieval pathway dysfunction is associated with nephrotic range proteinuria. A small amount of filtered albumin that is not retrieved undergoes lysosomal degradation. In AKI, the dysfunction in the degradation pathway can lead to non-nephrotic proteinuria, and be a marker of tubular dysfunction as well.

Urinary Cystatin as a Marker of Tubular Injury

Serum Cys C is a more accurate marker of glomerular filtration, whereas urinary Cys C can be an early marker in tubular injury. Few studies have shown that serum Cys C can provide an earlier AKI diagnosis than sCr [27]. In the study by Park et al. [28] the urinary Cys C and creatinine were measured in 213 patients with AKI diagnosis, classified as pre-renal AKI and intrinsic AKI. The authors found that values of urinary Cys C increased in intrinsic AKI. Contradictory findings were reported in other studies. Royakkers et al. [29], found that urinary Cys C had no diagnostic value in the days prior to the diagnosis of AKI by sCr (AUC <0.50) and the plasma and urinary Cys C on the first day of AKI diagnosis were poor predictors of the need for dialysis (AUC 0.66).

Changes in Urine α 1-Microglobulin Levels Are Associated with Tubular Exposure to Nephrotoxin

In contrast to other biomarkers produced by proximal tubular epithelial cells, α 1-microglobulin (α 1m), a 26-kD lipocalin, is filtered at the glomerulus but fully reabsorbed by proximal tubular epithelial cells, where it is degraded. With kidney tubule dysfunction, elevated urine α 1m levels indicate decreased proximal tubular reabsorptive capacity. Utilizing samples from Multicenter AIDS Cohort Study, a large cohort of men with normal kidney function and HIV infection, Jotwani et al. [30], showed the association of tenofovir (TDF) exposure and higher urine levels of α 1m. Among HIV-infected men, cumulative TDF exposure was associated with incrementally higher α 1m levels, whereas time since TDF treatment discontinuation was associated with progressively lower α 1m levels.

These findings, in conjunction with the prior work demonstrating the prognostic significance of urine α 1m for CKD progression, highlight α 1m as a promising biomarker of tubular function compromise.

Urine Hippurate Levels Can Estimate Tubular Secretion Function

The combination of protein-binding and tubular secretion allows the kidney to clear some solutes at rates exceeding the renal plasma flow, and thus, is a more efficient mechanism than glomerular filtration and especially important for drug elimination. In a study using an untargeted mass spectrometry approach in healthy controls and dialysis patients, 13 endogenous solutes that are efficiently cleared by renal tubule secretion were identified [31]. Hippurate, was found to have a renal clearance 12-fold higher than sCr in healthy controls (mean hippurate clearance 1,868 mL/min), and was elevated >30 fold in dialysis patients relative to healthy controls. Similar to para-amino hippurate, hippurate is known to be actively secreted into the urinary filtrate by proximal tubule cells, and yet, unlike para-amino hippurate, hippurate is an endogenous compound that can be measured in serum and urine in humans without the need for intravenous loading. In a prospective cohort study of 298 patients with kidney disease, hippurate was measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometric assays, in serum and timed urine samples [32]. They show that tubular secretion rate modestly correlated with mGFR and was associated with fractional excretion of electrolytes. Lower levels of hippurate in the urine were associated with higher risk of death independent of estimated GFR. Thus, measuring tubular secretion may add information on overall kidney health.

Of note, in a small study, tubular secretion function assessment by spot serum and urine samples was compared with 24-h urine samples [33]. Fractional excretion of tubular secretion markers were shown to be relatively stable, supporting the use of spot urine specimens to assess tubular secretion.

Lower Urine Ammonium Measured in Spot Urine Samples can Reflect Decreased Tubular Function

In patients with CKD, the ability to adapt urinary ammonia excretion to increased or normal acid load is impaired. In a cohort study with 1,065 patients CKD stages 1–4, GFR by ^{51}Cr -EDTA, venous total CO_2 concentration and urinary ammonia excretion were assessed, over 24 h and in fasting spot samples, for a median follow-up period of 4.3 years [34]. Urinary ammonia concentration (in spot urine) decreased with GFR; for every 10 mEq/L decrease in fasting NH_4 urinary concentration. As the net endogenous acid production was the same at any mGFR level, the decrease in ammonia was likely due to an impaired ability of the tubules to generate ammonium and not a consequence of decreased acid load. Similar associations with CKD progression and death were found using 24-h urine or spot specimens. In acute worsening of kidney function, low ammonium may reflect a decreased ability of the tubules to generate ammonium, or perhaps to secrete hydrogen and keep ammonium in the urinary space.

Conclusion

The sequential assessment of the components of tubular health, before and during the course of AKI, could provide us with a unique opportunity to understand their pattern during AKI. The panel biomarkers discussed above offer a more comprehensive assessment of kidney health. Understanding the pattern of change of the components of tubular function and its correlation with tubular injury during an AKI episode can provide insights into the etiology and prognosis of AKI. Knowledge of the degree of dysfunction on the different components of tubular function can have clinical implications in drug dosing and prevention of toxicity. Whether the assessment of overall tubular health can improve the prediction of severity, non-recovery, and risk of CKD progression is still a challenge for the AKI research field.

Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

References

- Endre ZH, Kellum JA, Di Somma S, Doi K, Goldstein SL, Koyner JL, et al. Differential diagnosis of AKI in clinical practice by functional and damage biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Contrib Nephrol*. 2013;182:30–44.
- Murray PT, Mehta RL, Shaw A, Ronco C, Endre Z, Kellum JA, et al.; ADQI 10 workgroup. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int*. 2014 Mar;85(3):513–21.
- Matzke GR, Aronoff GR, Atkinson AJ Jr, Bennett WM, Decker BS, Eckardt KU, et al. Drug dosing consideration in patients with acute and chronic kidney disease—a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2011 Dec; 80(11):1122–37.
- Cruz DN, Bagshaw SM, Maisel A, Lewington A, Thadhani R, Chakravarthi R, et al. Use of biomarkers to assess prognosis and guide management of patients with acute kidney injury. *Contrib Nephrol*. 2013;182:45–64.
- Garimella PS, Katz R, Ix JH, Fried LF, Kritchevsky SB, Devarajan P, et al. Association of urinary uromodulin with kidney function decline and mortality: the health ABC study. *Clin Nephrol*. 2017 Jun;87(6):278–86.
- Malhotra R, Siew ED. Biomarkers for the Early Detection and Prognosis of Acute Kidney Injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Jan; 12(1):149–73.
- Ronco C, Chawla LS. Glomerular and Tubular Kidney Stress Test: New Tools for a Deeper Evaluation of Kidney Function. *Nephron*. 2016;134(3):191–4.
- Section 2: AKI Definition. *Kidney Int Suppl* (2011). 2012;2(1):19–36.
- Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney Int Suppl* (2011). 2013;3(1):19–62.
- Brown RS Jr, Lombardero M, Lake JR. Outcome of patients with renal insufficiency undergoing liver or liver-kidney transplantation. *Transplantation*. 1996 Dec;62(12):1788–93.
- El-Achkar TM, Wu XR. Uromodulin in kidney injury: an instigator, bystander, or protector? *Am J Kidney Dis*. 2012 Mar;59(3):452–61.
- Micanovic R, Khan S, Janosevic D, Lee ME, Hato T, Srour EF, et al. Tamm-Horsfall Protein Regulates Mononuclear Phagocytes in the Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Mar; 29(3):841–56.
- El-Achkar TM, McCracken R, Liu Y, Heitmeier MR, Bourgeois S, Ryerse J, et al. Tamm-Horsfall protein translocates to the basolateral domain of thick ascending limbs, interstitium, and circulation during recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Apr;304(8):F1066–75.
- Lehrer A, Muendlein A, Saely CH, Brandtner EM, Geiger K, Fraunberger P, et al. The value of uromodulin as a new serum marker to predict decline in renal function. *J Hypertens*. 2018 Jan;36(1):110–8.
- Scherberich JE, Gruber R, Nockher WA, Christensen EI, Schmitt H, Herbst V, et al. Serum uromodulin—a marker of kidney function and renal parenchymal integrity. *Nephrol Dial Transplant*. 2018 Feb;33(2):284–95.
- Micanovic R, LaFavers K, Garimella PS, Wu XR, El-Achkar TM. Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): guardian of urinary and systemic homeostasis. *Nephrol Dial Transplant*. 2019. Epub ahead of print.
- El-Achkar TM, Wu XR, Rauchman M, McCracken R, Kiefer S, Dagher PC. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Aug;295(2):F534–44.
- Garimella PS, Jaber BL, Tighiouart H, Liangos O, Bennett MR, Devarajan P, et al. Association of Preoperative Urinary Uromodulin with AKI after Cardiac Surgery. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Jan;12(1):10–8.
- Bennett MR, Pyles O, Ma Q, Devarajan P. Preoperative levels of urinary uromodulin predict acute kidney injury after pediatric cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Nephrol*. 2018 Mar;33(3):521–6.
- Youhanna S, Weber J, Beaujean V, Glaudemans B, Sobek J, Devuyst O. Determination of uromodulin in human urine: influence of storage and processing. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jan;29(1):136–45.
- McMahon GM, Waikar SS. Biomarkers in nephrology: core Curriculum 2013. *Am J Kidney Dis*. 2013 Jul;62(1):165–78.
- Marino R, Struck J, Hartmann O, Maisel AS, Rehfeldt M, Magrini L, et al. Diagnostic and short-term prognostic utility of plasma proenkephalin (pro-ENK) for acute kidney injury in patients admitted with sepsis in the emergency department. *J Nephrol*. 2015 Dec; 28(6):717–24.
- Shah KS, Taub P, Patel M, Rehfeldt M, Struck J, Clopton P, et al. Proenkephalin predicts acute kidney injury in cardiac surgery patients. *Clin Nephrol*. 2015 Jan;83(1):29–35.
- Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, et al.; HOPE Study Investigators. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA*. 2001 Jul;286(4):421–6.
- Feldt-Rasmussen B. Microalbuminuria, endothelial dysfunction and cardiovascular risk. *Diabetes Metab*. 2000 Jul;26 Suppl 4:64–6.
- Vishram JK, Dahlöf B, Devereux RB, Ibsen H, Kjeldsen SE, Lindholm LH, et al. Blood pressure variability predicts cardiovascular events independently of traditional cardiovascular risk factors and target organ damage: a LIFE substudy. *J Hypertens*. 2015 Dec;33(12):2422–30.
- Aydoğdu M, Gürsel G, Sancak B, Yeni S, Sarı G, Tasyürek S, et al. The use of plasma and urine neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and Cystatin C in early diagnosis of septic acute kidney injury in critically ill patients. *Dis Markers*. 2013;34(4):237–46.
- Park MY, Choi SJ, Kim JK, Hwang SD, Lee YW. Urinary cystatin C levels as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)*. 2013 Apr;18(4):256–62.
- Royakkers AA, Korevaar JC, van Suijlen JD, Hofstra LS, Kuiper MA, Spronk PE, et al. Serum and urine cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury and renal replacement therapy. *Intensive Care Med*. 2011 Mar;37(3):493–501.
- Jotwani V, Scherzer R, Estrella MM, Jacobson LP, Witt MD, Palella FJ Jr, et al. HIV Infection, Tenofovir, and Urine α1-Microglobulin: A Cross-sectional Analysis in the Multicenter AIDS Cohort Study. *Am J Kidney Dis*. 2016 Oct;68(4):571–81.
- Sirich TL, Aronov PA, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Numerous protein-bound solutes are cleared by the kidney with high efficiency. *Kidney Int*. 2013 Sep;84(3):585–90.
- Suchy-Dacey AM, Laha T, Hoofnagle A, Newitt R, Sirich TL, Meyer TW, et al. Tubular Secretion in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Jul;27(7):2148–55.
- Garimella PS, Li K, Naviaux JC, Shlipak MG, Abdelmalek JA, Castro E, et al. Utility of Spot Urine Specimens to Assess Tubular Secretion. *Am J Kidney Dis*. 2017 May;69(5):709–11.
- Vallet M, Metzger M, Haymann JP, Flamant M, Gauci C, Thervet E, et al.; NephroTest Cohort Study group. Urinary ammonia and long-term outcomes in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2015 Jul;88(1):137–45.

7.3 Anexo 3 – Artigo “Early detection of acute kidney injury in the perioperative period of liver transplant with neutrophil gelatinase-associated lipocalin”

Lima *et al.* *BMC Nephrology* (2019) 20:367
<https://doi.org/10.1186/s12882-019-1566-9>

BMC Nephrology

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Early detection of acute kidney injury in the perioperative period of liver transplant with neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Camila Lima^{1,2*}, Luciana Bertocco de Paiva Haddad^{3,4}, Patrícia Donado Vaz de Melo⁵, Luiz Marcelo Malbouisson⁶, Lilian Pires Freitas do Carmo¹, Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque⁴ and Etienne Macedo^{1,7}

Abstract

Background: Acute kidney injury (AKI) is a common complication in patients undergoing liver transplant (LT) and is associated with high morbidity and mortality. We aim to evaluate the pattern of urine and plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) elevation during the perioperative period of LT and to assess it as a prognostic marker for AKI progression, need for dialysis and mortality.

Methods: We assessed NGAL levels before induction of anesthesia, after portal reperfusion and at 6, 18, 24, and 48 h after surgery. Patients were monitored daily during the first week after LT.

Results: Of 100 enrolled patients undergoing liver transplant, 59 developed severe AKI based on the KDIGO serum creatinine (sCr) criterion; 34 were dialysed, and 21 died within 60 days after LT. Applying a cut-off value of 136 ng/ml, UNGAL values 6 h after surgery was a good predictor of AKI development within 7 days after surgery, having a positive predictive value (PPV) of 80% with an AUC of 0.76 (95% CI 0.67–0.86). PNGAL at 18 h after LT was also a good predictor of AKI in the first week, having a PPV of 81% and AUC of 0.74 (95% CI 0.60–0.88). Based on PNGAL and UNGAL cut-off criteria levels, time to AKI diagnosis was 28 and 23 h earlier than by sCr, respectively. The best times to assess the need for dialysis were 18 h after LT by PNGAL and 06 h after LT by UNGAL.

Conclusion: In conclusion, the plasma and urine NGAL elevation pattern in the perioperative period of the liver transplant can predict AKI diagnosis earlier. UNGAL was an early independent predictor of AKI development and need for dialysis. Further studies are needed to assess whether the clinical use of biomarkers can improve patient outcomes.

Trial registration: Registered at Clinical Trials (clinicaltrials.gov) in March 24th, 2014 by title “Acute Kidney Injury Biomarkers: Diagnosis and Application in Pre-operative Period of Liver Transplantation (AKIB)” and identifier NCT02095431, retrospectively registered.

Keywords: Acute kidney injury, Biomarkers, Liver transplant, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, Renal dialysis

* Correspondence: camilaxlima@gmail.com

¹Department of Internal Medicine, Nephrology Division, University of São Paulo, Present Address: 419 Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, third floor – room 340, 05403-000, Cerqueira Cesar, São Paulo, Brazil

²Department of Medical Surgical Nursing, University of São Paulo Nursing School, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Continua.

Background

Acute kidney injury (AKI) is a common complication in patients undergoing liver transplant (LT) [1]. Recent studies have shown that even mild or transient post-LT AKI is associated with prolonged intensive care or hospital stay, decreased organ survival, and increased all-cause mortality [1–3].

The etiology of AKI after LT is multifactorial and includes recipient, graft, perioperative, and postoperative risk factors [4]. Pre-operative kidney dysfunction is often a reflection of the degree of liver dysfunction and an important risk factor for post-LT AKI [5, 6]. Perioperative intravascular depletion, severity of post-reperfusion syndrome, hemodynamic instability and nephrotoxic medications further increase the risk of AKI development [4, 7].

Despite improvements in organ preservation, surgery techniques, and immunosuppression protocols, the incidence of AKI after LT continues to be high, reaching 50% in some studies [8, 3]. In the first year after liver transplant, the development of AKI in the post-operative period is a major factor impacting organ survival [9, 10]. Several studies have shown reduced organ survival, especially when renal replacement therapy (RRT) is needed after transplant [11]. Development of chronic kidney disease (CKD) and/or accelerated progression to end-stage renal disease (ESRD) are also potential consequences of AKI after liver transplant [9, 12]. Progression to CKD occurs in 18.1% of patients after LT, and 4.8% of patients progress to ESRD in five years [13, 14].

Challenges in risk assessment and early management in patients developing AKI significantly contribute to worse prognoses in these patients. The limitations of serum creatinine (sCr) as a diagnostic marker for acute kidney injury are more evident in patients with liver disease due to malnutrition and decreased muscle mass [15–17]. Therefore, patients in the perioperative period of LT may benefit from more sensitive and specific biomarkers of kidney injury [18]. These biomarkers should be able to allow for early identification of AKI, ideally providing information about the etiology and helping to distinguish functional changes from structural damage.

Several biomarkers of early kidney injury have been identified and, although these novel AKI biomarkers have primarily been assessed in general intensive-care populations [19–21], they have also been applied in liver-transplant recipients [22–25]. NGAL is a small, secreted polypeptide that is upregulated in response to tubular injury and rapidly detectable in plasma and urine. Within 24 h after liver transplantation, plasma NGAL is a better predictor of AKI than serum creatinine [22–24, 26]. Additional studies with small numbers of patients have suggested that plasma NGAL can detect post-LT AKI as early as 1–2 h after reperfusion [22, 26]. Few studies have evaluated NGAL as a

predictor of need for RRT and mortality in the perioperative period of LT.

In this study, we aimed to determine whether the pattern of NGAL urinary and plasma elevation in the perioperative period of LT could be a prognostic tool for determining AKI severity, progression, need for RRT and mortality.

Methods

The University of Sao Paulo Ethics Committee approved the study under protocol number CAAE:06636513.4.0000.0068. All clinical and research activities being reported are consistent with the Principles of the Declaration of Istanbul and with the Declaration of Helsinki. The protocol is registered among the clinical trials available at <https://clinicaltrials.gov>, with identifier NCT02095431. Patients were enrolled into the study after written informed consent was obtained from all participants as per the guidelines of the Institution's Ethics Committee.

Patients

During a 24-month period from June 2013 to June 2015, a total of 189 liver transplants were performed and 139 recipients were eligible for our study (Fig. 1). During the study period, all recipients older than 18 years old were screened. Patients were enrolled after written voluntary informed consent was obtained as per the guidelines of the Institution's Ethics Committee. Exclusion criteria included pre-operative need for dialysis, combined transplant, chronic kidney disease stage 5, and previous kidney or liver transplant.

Patients were classified according to the etiology of end-stage liver disease (ESLD): hepatitis-B or -C cirrhosis, alcoholic cirrhosis, cryptogenic cirrhosis, acute hepatitis and miscellaneous causes. The miscellaneous group included patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH), autoimmune hepatitis, hemochromatosis, Budd–Chiari syndrome, biliary atresia, Wilson's disease, primary sclerosing cholangitis, polycystic disease, biliary cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.

The standard triple-drug immunosuppression regimen of tacrolimus with mycophenolate mofetil and steroids was used to prevent allograft rejection.

Data collection

We recorded baseline kidney function and comorbid history from electronic medical records (EMRs). The following perioperative variables were included: main patient characteristics, intra-operative data, clinical follow-up in the first week after LT, need-for-RRT data, and outcomes.

The functional Model for End-stage Liver Disease (MELD) was calculated on the basis of serum bilirubin,

Continua.

international normalised ratio (INR) and serum creatinine, by the following formula:

$$\begin{aligned} \text{MELD score} = & 0.957 \times \ln(\text{creatinine mg/dl}) \\ & + 0.378 \times \ln(\text{bilirubin mg/dl}) \\ & + 1.120 \times \ln(\text{INR}) + 0.643 \times 10 \end{aligned}$$

The liver transplant (LT) MELD was the sum of the functional MELD and the point score in special situations of transplant priority [27].

Blood and urine samples were collected simultaneously in the perioperative period of LT before induction of anesthesia, after portal reperfusion and at 6, 18, 24 and 48 h after surgery. We recorded vital signs, process of care, and lab results daily for 7 days after LT. Outcomes including maximum AKI severity stage, need for RRT and mortality were assessed in the intensive care

unit (ICU), on hospital discharge and 60 days after enrolment.

NGAL assessment

Blood samples were collected from central venous catheters or arterial lines, and urine through indwelling catheters. After collection, samples were immediately centrifuged – blood samples at 3000 rotations per minute (rpm) for 15 min and urine at 1000 rpm for 10 min – and stored at -80°C prior to analysis.

Quantitative NGAL levels were measured using particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for NGAL determination, according to the manufacturer's instructions. The test uses an immunoturbidimetric method, in which polystyrene particles are coated with anti-NGAL antibody and, upon contact with the analyte in the sample, this results in turbidity

Continua.

proportional to the concentration of NGAL. Tests were performed in Labmax 560 equipment. Perioperative serum creatinine from the same samples as the NGAL measurement was analysed by chemiluminescence. All other serum creatinine values recorded from medical records were analysed by Jaffe method in the hospital's central laboratory.

Clinical outcomes

The primary outcome was AKI development during the first week of LT. Baseline renal function was defined as the lowest value in the prior three months and was used to assess renal recovery. AKI diagnosis was based on Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) [28]. For the reference serum creatinine value, we used the lowest value within 7 days before liver transplantation, and this value was used to determine AKI diagnosis. AKI stage was defined, according to KDIGO, as follows: stage 1 (1.5–1.9 times reference sCr or an increase of ≥ 0.3 mg/dl within 48 h), stage 2 (2.0–2.9 times reference sCr), stage 3 (3.0 times reference sCr or an increase of > 4.0 mg/dl). Patients with no AKI or stage 1 AKI were categorized as the no-AKI/mild-AKI group, whereas patients meeting the criteria for stage 2 or 3 AKI seven days after LT were identified as severe AKI. Secondary outcomes included need for RRT and mortality, assessed in the intensive care unit (ICU), on hospital discharge and at 60 days after enrolment.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median (25th–75th percentiles) and were compared using one-way ANOVA or Kruskal–Wallis testing according to the Gaussian distribution. Categorical variables are presented as absolute numbers and percentages and were compared by the Chi-square test. *P* values were two tailed, and $P < 0.05$ was considered significant. Conventional receiver operating characteristic (ROC) curves were generated, and the area under the curve (AUC) was used to assess the ability of continuous variables to distinguish the categorical state: AKI development, need for dialysis and non-survival. The optimal cut-offs were determined by the best point of sensitivity versus specificity of the AUC (Youden index).

We compared time to AKI diagnosis based on biomarkers versus creatinine analyzed by chemiluminescence in the same sample collection. Time to diagnose based on sCr criterion was assessed by KDIGO stage 1 definition and biomarkers were determined by the cut-off value determined for plasma NGAL (PNGAL) and urine NGAL (UNGAL).

The perioperative covariates were tested in univariate analysis for their impact on AKI development, need for dialysis and non-survival. Factors associated with the

outcomes at $P < 0.01$ were used to construct a multivariable model, in which the impact of each comorbidity or covariate was adjusted. In each model, UNGAL or PNGAL was included as a covariate. The SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 20 (Chicago, Illinois) software was used for the statistical analysis.

Results

Patient characteristics

Of 189 adult patients undergoing LT within the study period, 138 were eligible, and 100 were enrolled in the study. Figure 1 shows reasons for non-enrolment. Patients' demographic and clinical characteristics are shown in Table 1. Baseline and reference serum creatinine values were similar in severe-AKI and no-AKI/mild-AKI groups. The estimated glomerular filtration rate (eGFR), based on the CKD Epidemiology Collaboration (EPI), corresponded to the baseline sCr, was similar within the groups. eGFR based on reference sCr was lower in the severe-AKI group.

AKI development

Based on the baseline ambulatory values, 34 patients were classified with acute kidney disease before surgery, of whom 23 (67.6%) were KDIGO stage 1. Based on the reference sCr, 85 patients developed AKI (stage 1/2/3). Patients developing no AKI or stage 1 AKI within the first 7 days of LT were summarized as the no-AKI/mild-AKI group 41 (41%), whereas patients meeting the criteria for stage 2 or 3 AKI group within the first 7 days of LT were summarized as the severe-AKI 59 (59%) (Fig. 1).

Risk factors for AKI

Patients developing severe AKI were younger, had a higher functional MELD before surgery and higher Sequential-Organ-Failure (SOFA) scores on ICU admission (Table 1). Duration of anesthesia, hepatectomy and warm ischemia time were significantly prolonged in severe-AKI patients. In the first day after LT, urine output was significantly lower in the severe-AKI group and the cumulative fluid balance was higher, with a difference of approximately 600 ml between groups ($P = 0.008$).

Performance of NGAL for diagnosis of AKI in the perioperative LT period

Six hours after LT, severe-AKI patients had 10.6-fold higher UNGAL levels than those in the no-AKI/mild-AKI group, followed by a sustained significant difference for 24 h after surgery (Fig. 2). UNGAL achieved the best performance for predicting severe AKI at six hours after LT, with an AUC of 0.76 (95% CI 0.67–0.86). The best cut-off value was 136 ng/ml, with a

Continua.

Table 1 Clinical characteristics and outcomes in patients with and without moderate to severe AKI progression

PATIENT CHARACTERISTICS AND OUTCOMES	Total	No AKI/mild AKI	Severe AKI	<i>p</i>
N	100 (100%)	41 (41%)	59 (59%)	< 0.0001
Baseline Characteristics				
Age	58 (12)	57 (12)	53 (12)	0.01
Gender (Male)	64 (64%)	27 (42%)	37 (58%)	0.75
BMI	26 (4)	26 (4)	26.5 (5)	0.65
Non caucasian	14 (14%)	05 (36%)	09 (64%)	0.11
MELD functional	15 (11–19)	14 (10–17)	16 (12–22)	0.01
MELD LT	29 (29–29)	29 (29–29)	29 (29–32)	0.96
Liver Disease				
hepatitis C	46 (46%)	17(37%)	29(63%)	0.44
Alcoholic cirrhosis	13 (13%)	06(46%)	07(54%)	0.68
Cryptogenic cirrhosis	12 (12%)	05(42%)	07(58%)	0.96
acute hepatitis	06 (06%)	03(50%)	03(50%)	0.64
hepatitis B	04 (04%)	02(50%)	02(50%)	0.70
Other	19 (19%)	08(42%)	11(57%)	0.91
Comorbidities				
Hypertension	33(33%)	12(36%)	21(64%)	0.43
Diabetes mellitus	28 (28%)	14 (50%)	14 (50%)	0.26
Kidney function				
baseline sCr	0.77 (0.63–0.99)	0.77 (0.62–0.98)	0.77 (0.65–1.00)	0.87
reference sCr	0.78 (0.62–1.02)	0.77 (0.64–1.02)	0.80 (0.61–1.00)	0.96
Estimated GFR (CKD-EPI) by Scr ref.	78.65 (52–99)	93.50 (64–105)	69.40 (45–98)	0.013
Estimated GFR (CKD-EPI) by Scr base	99.65 (74–110)	99.25 (75–108)	108.52 (69–117)	0.67
Urine output first day after LT	475 (45)	608 (79)	383 (49)	0.01
Fluid balance first day after LT	+ 1535 (+ 500–2315)	+ 1010 (+ 367–1782)	+ 1655 (+ 890–2447)	0.008
Severity score indices				
SAPS	64 (60–72)	64 (11)	69 (15)	0.68
SOFA	13 (11–15)	12 (10–13)	14 (12–16)	0.001
process of care				
Anesthesia time	09:56 (01:59)	09:08 (01:33)	10:32 (02:04)	< 0.0001
HEPATECTOMY TIME (HH:MM)	03:11 (00:54)	02:54 (00:46)	03:27 (00:57)	0.003
warm ischemia time (HH:MM)	00:42 (1:11)	00:41 (1:21)	00:43 (1:52)	> 0.0001
cold ischemia time (HH:MM)	06:04 (01:55)	05:49 (02:06)	06:14 (01:46)	0.73
Red blood cELLS (unit)	2.39 (2.8)	1.45 (2.57)	3 (2.9)	0.002
outcomes				
Time with vasoactive drugs (days)	2 (1.78)	1(1.18)	2 (2)	0.01
Days of Mechanical ventilation	2 (1.82)	1 (0.57)	3 (2)	< 0.0001
Lenght of ICU stay (days)	9.81 (13)	5.59 (6.3)	12.75 (2)	0.003
Lenght of hospital stay (days)	29 (28)	19.17 (14.6)	36 (4.2)	< 0.0001
Need for Retransplant	11 (11%)	01 (09%)	10 (91%)	0.02
Need for RRT	36 (36%)	04 (10.5%)	34 (89.5%)	< 0.0001
60 day Mortality	21 (21%)	03 (14.3%)	18 (85.7%)	0.004

Data are expressed as n (%), mean ($\pm$), median and percentile (25–75) according to their distribution. Time of anesthesia expressed as hours: minutes. BMI (body mass index), MELD (model for end-stage liver disease), LT (liver transplant), ICU (intensive unit care), SAPS (Simplified Acute Physiology Score), SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), RRT (renal replacement therapy), GFR (glomerular filtration rate), CKD- Epidemiology Collaboration

Continua.

sensitivity of 68%, specificity of 76%, and positive predictive value (PPV) of 80%.

Median PNGAL was higher in the severe-AKI versus no-AKI/mild-AKI group, reaching statistical significance six hours after LT; severe AKI 265 ng/ml vs. no-AKI/mild-AKI 138 ng/ml ($P = 0.01$). Eighteen hours after LT, PNGAL levels were approximately 2-fold higher in severe-AKI patients; median 326 ng/ml in AKI vs. 170 ng/ml in no-AKI /mild-AKI (Fig. 2). The best cut-off value for predicting AKI was 198 ng/ml, with a sensitivity of 87%, specificity 71% and PPV of 81% (Table 2).

Early diagnosis of AKI by biomarkers versus serum creatinine

We evaluated time to AKI diagnosis based on NGAL cut-off values and sCr KDIGO criterion in the first 48 h after transplant. For this analysis, we used sCr measured by chemiluminescence in the same samples as the

biomarkers. AKI diagnosis was reached in 72 patients by sCr, in 83 by PNGAL and in 65 by UNGAL levels. The median time based on PNGAL was 28 h earlier than sCr (Fig. 3), and UNGAL reached diagnosis 23 h earlier than sCr (Fig. 3).

Performance of NGAL in determining the need for RRT in the perioperative LT period

Thirty-eight patients were dialysed during hospitalization, 34 in the first week after LT. The best performance of PNGAL in predicting the need for RRT was at 18 h, with an AUC of 0.84 (95% CI 0.74–0.93), sensitivity of 87% and a specificity of 83%. Using the cut-off value of 286 ng/ml, UNGAL was able to predict the need for RRT with the best performance at 6 h after LT, a cut-off of 210 ng/ml determining an AUC 0.85 (95% CI 0.77–0.93), with a sensitivity of 86% and the specificity of 80% (Table 2, Fig. 2).

Continua.

Table 2 Progression of PNGAL and UNGAL in AKI, max KDIGO stage, need for RRT and mortality groups

PNGAL values						
	Pre-op. (100)	Intra-op. (95)	6 h (90)	18 h (87)	24 h (86)	48 h (74)
no AKI / mild AKI	172 (102–331)	196 (117–310)	138 (93–282)	170 (117–252)	156 (113–243)	116 (89–221)
severe AKI	185 (114–287)	232 (158–364)	265 (177–429)	326 (180–616)	356 (215–666)	369 (235–535)
P	0.82	0.50	0.047	0.004	< 0.0001	< 0.0001
no-RRT	166 (79–270)	192 (127–323)	183 (86–281)	168 (120–249)	173 (122–286)	134 (91–248)
need RRT	204 (115–465)	318 (204–407)	341 (242–510)	459 (306–749)	608 (333–749)	481 (292–689)
P	0.27	0.015	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
survivors	197.49 (117–326)	213.43 (129–337)	199.73 (110–343)	226.06 (129–335)	228.09 (134–368)	116.11 (117–326)
non-survivors	165 (98–249)	309 (105–389)	279.5 (183–529)	629.01 (256–759)	619.10 (301–689)	503.50 (281–697)
P	0.51	0.64	0.22	0.001	0.001	0.001
UNGAL values						
	Pre-op. (97)	Intra-op. (84)	6 h (87)	18 h (75)	24 h (71)	48 h (62)
no AKI / mild AKI	27 (17–244)	35 (16–402)	40 (18–143)	62 (32–380)	72 (26–248)	147 (44–338)
severe AKI	90 (23–254)	119 (26–1669)	424 (51–2802)	312 (55–1542)	329 (85–1290)	247 (50–1820)
P	0.90	0.008	< 0.0001	0.006	0.004	0.23
no-RRT	27(16–167)	26(15–98)	70(27–160)	78(35–262)	110(28–318)	70(18–317)
need RRT	179 (34–513)	602 (34–2912)	1361(603–2131)	855 (335–1979)	660 (195–3109)	667 (102–1650)
P	0.001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.001	0.002
survivors	33 (15–372)	47.10 (20–522)	113.10 (28–817)	131.20 (37–818)	147.80 (42–546)	214.80 (95–1608)
non-survivors	220.40 (49–549)	181.71 (42–3046)	1235.70 (77–3806)	309.69 (138–3718)	332.71 (109–3861)	3291 (340–3950)
P	0.02	0.11	0.005	0.06	0.09	0.0004

Data are expressed as median and percentile (interquartile range 25–75) as the nonparametric distribution UNGAL. The Shapiro-Wilk normality test was performed. AKI: acute kidney injury; RRT: renal replacement therapy

Variables associated with the need for RRT in the univariate analysis were included in the multivariable logistic model: duration of anesthesia, SOFA score at ICU admission, urine output and fluid balance within 24 h of surgery (Table 3). In the model including UNGAL, the biomarker was the most powerful predictor for RRT need.

Performance of NGAL to predict mortality in the perioperative LT period

The 60-day mortality rate was 21% (21); 03 (14.3%) in no-AKI/mild-AKI group and 18 (85.7%) in the severe-AKI group ($P = 0.005$). The main causes of death were septic shock 07 (33.3%), primary graft dysfunction 03 (14.3%) and hemorrhagic shock 03 (14.3%). The best

time point for using PNGAL levels to predict mortality was at 18 h after surgery, with an AUC of 0.76 (CI95% 0.60–0.92) for levels higher than 483 ng/ml. UNGAL was significantly higher in non-survivors even before surgery, in the pre-operative period. The median was 33 ng/dl in survivors versus 220 ng/dl in non-survivors ($P = 0.002$). Six hours after LT, a value higher than 242.06 ng/ml had an AUC of 0.81 (CI 0.65–0.97) for predicting mortality with sensitivity 86% and specificity 64% (Table 2 and Fig. 2). In the multivariable analysis, duration of anesthesia, SOFA on ICU admission and MELD were included in the model. The only independent predictor of mortality, in analyses including PNGAL or UNGAL, was the SOFA score (Table 3).

Continua.

Fig. 3 Median of the PNGAL and UNGAL in the perioperative liver transplant in no-AKI/ mild-AKI and severe-AKI groups

Discussion

Acute kidney injury in the post-operative period of LT is associated with several short- and long-term complications. The short-term effects of AKI includes disturbances in acid-base and electrolyte homeostasis, azotemia, volume overload, increasing duration of mechanical ventilation and ICU stay. The long-term effects are reflected in the higher rates of CKD development and decreased patient and graft survival.

The importance of early diagnosis of AKI is particularly significant in patients with chronic liver disease, for whom serum creatinine is known to be a worse marker of kidney function. Based on ambulatory values, 11% of our patients in the waiting list for liver transplant were CKD stage 3 or 4. It is likely that eGFR values in these patients are overestimating renal function, and an even higher proportion of patients had a severe degree of dysfunction. The complications of liver disease in these

Table 3 Multivariable logistic models with PNGAL and UNGAL for AKI, need for RRT and mortality

VARIABLES	model pngal OR (IC 95%)	P	model ungal OR (IC 95%)	p
AKI				
Age (years)	0.9 (0.92–1.02)	0.25	0.98 (0.93–1.02)	0.4
duration anesthesia (hours)	1.54 (1.08–2.20)	0.16	1.61 (1.14–2.27)	0.007
Urine output first day after LT (ml)	0.99 (0.99–1.00)	0.28	26.5 (5)	0.65
Fluid balance first day after LT (ml)	1.00 (1.00–1.00)	0.07	0.99 (0.99–1.00)	0.12
sofa	1.12 (0.91–1.38)	0.27	16 (12–22)	0.01
ngal (ng/ml)	4.72 (0.87–25.39)	0.07	7.87 (1.2–39.70)	0.02
need rrt				
duration anesthesia (hours)	1.11 (0.79–1.56)	0.52	1.11 (0.75–1.69)	0.58
Urine output first day after LT (ml)	0.99 (0.99–0.99)	< 0.001	0.99 (0.99–0.99)	0.001
Fluid balance first day after LT (ml)	1.00 (1.00–1.00)	0.22	1.00 (1.00–1.00)	0.36
sofa	1.48 (1.13–1.94)	0.004	1.49 (1.10–2.02)	0.009
ngal (ng/ml)	2.74 (1.35–5.52)	0.005	35.28 (2.8–444)	0.006
MORTALITY				
duration anesthesia (hours)	1.48 (1.08–2.09)	0.01	21 (64%)	0.43
MELD	1.00 (0.88–1.13)	0.95	14 (50%)	0.26
sofa	1.72 (1.23–2.42)	0.002	1.62 (1.16–2.26)	0.004
ngal (ng/ml)	2.20 (0.33–15)	0.41	6.10 (0.66–56)	0.11

AKI (acute kidney injury), OR (odds ratio), MELD (model for end-stage liver disease), SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), RRT (renal replacement therapy)

Continua.

patients predispose them to oscillations of serum creatinine, and frequent episodes of AKI. Before surgery, 34 patients in our cohort already had an elevation in sCr higher than 0.3 mg/dl from the baseline ambulatory values and were considered as having pre-operative AKI. In these patients, NGAL levels were considerably higher than in patients without pre-operative AKI and continued to increase during intra-operative assessment. The high levels of NGAL at the initial pre-operative assessment were associated with the degree of injury in the post-operative period.

The potential of early biomarkers of kidney injury, such as NGAL, to detect AKI earlier has been shown in previous studies [23, 24, 29]. Nieman et al. [22], found that a PNGAL level higher than 139 ng/ml after portal reperfusion was a good predictor of AKI development; AUC of 0.79. In our study, UNGAL values after portal reperfusion and 6 h after surgery were good predictors of AKI within 7 days, with AUC of 0.67 and 0.76. However, NGAL is not specifically related to kidney injury; it is produced in many different tissues. Consequently, marked elevation can also occur in acute as well as chronic systemic inflammation. As such, the cut-off for determining kidney injury in this specific population with a higher degree of inflammation may differ to that applied in critically ill patients. In the meta-analysis by Haase et al. [30], which included 19 studies and 2538 patients, 487 (19.2%) developed AKI and NGAL was a good predictor of AKI with an odds ratio (OR) of 18.6 and an AUC of 0.81. Analyzing different populations, the best cut-off value found in those studies varied within the 100–270 ng/ml range, and the authors proposed a value of 150 ng/ml for diagnosing AKI [30]. In our cohort, despite the high severity of illness, our cut-off levels for AKI at 198 ng/ml for PNGAL and 136 ng/ml for UNGAL were within the range proposed in the meta-analysis.

We found UNGAL to be a better predictor of AKI development than PNGAL. Similar findings were reported by Baron-Stefaniak et al. [31]. Although not adjusting for other covariates, the authors found UNGAL to be a better predictor of AKI severity than PNGAL. In our study, UNGAL was the most powerful independent predictor of AKI, with an OR of 7.87.

A few studies [32] have compared the timing of AKI diagnosis by early biomarkers in the perioperative of LT. In a prospective study of 92 liver transplant recipients, Wagener et al. [24] demonstrated that the urinary-NGAL/urinary-creatinine ratio 3 h after liver transplant was a reliable marker of post-LT AKI and provided a diagnostic benefit of approximately two days compared to serum creatinine. We evaluated the timing of AKI diagnosis by the gold standard, sCr, and our cut-off values for UNGAL and PNGAL. Despite the high

frequency of early AKI in our study, the presence of multiple risk factors in our population, including possibly ongoing kidney injury in the pre-operative period, NGAL was able to anticipate AKI detection and prediction of its severity by one day.

It is possible that NGAL levels, used in association with sCr, could contribute to the evaluation of the likelihood of early recovery, helping to distinguish functional from established structural damage. Our findings also showed UNGAL to be a good predictor of need for RRT and mortality. UNGAL was an independent predictor of need for dialysis, with a sensitivity of 86% and specificity of 80% (AUC 0.85). This finding suggests that early peak levels can be useful in deciding on early RRT initiation and influencing RRT method, e.g., continuous therapy in high-risk patients.

The high mortality rate in our cohort can be partially explained by the overall severity of patients, their older age and presence of comorbidities (hypertension, diabetes mellitus), higher MELD [22, 24, 33], and prolonged warm ischemia time. Several studies have shown an association between pre-LT MELD score and post-LT AKI [34–37]. Patients with high MELD scores are found to have a significantly increased risk of post-LT AKI and the development of CKD and ESRD [38]. Each minute of warm ischemia time is associated with an increase of 8–9% in the risk of non-recoverable renal function after LT [39, 40]. Bleeding and need for transfusion were frequent in our cohort and also associated with the increase in the mortality rate [41]. We found that UNGAL levels 6 h after liver transplant were a good predictor of mortality, with values higher than 483 ng/ml in 18 out of 21 of non-survivors (85%). Predicting patients with higher risk for mortality in early stages of liver transplant can help physicians to decide on appropriate management and possibly lead to improved outcomes.

Despite not being a multicentre study, this is the largest cohort for evaluating a biomarker perioperative of liver transplant. In this analysis, we used serum creatinine as a sole performance comparator for diagnosis of AKI, not applying urine output criteria. It is possible that some patients would have an earlier diagnosis based on urine volume and the delay in AKI diagnosis by KDIGO system decreased. Our incidence of AKI was high: 85% and 59 were AKI stage 2/3. Previous studies applying the RIFLE criteria have not considered 0.3 mg/dl serum creatinine criteria to define AKI [22, 24, 29, 32]. In our study, we applied the serum creatinine KDIGO definition as stated – 0.3 mg/dl within 48 h and 50% within 7 days – in contrast to most studies, which limited the time frame for diagnosis to 48 h [23, 31, 42]. Thus, in our analysis, similar to other analyses [8, 31], we have grouped no AKI with mild-AKI. Larger cohorts including less severely ill patients should be evaluated to

Continua.

confirm NGAL predictive ability to determine AKI severity, need for dialysis and mortality.

Conclusions

NGAL is a promising biomarker for predicting AKI severity in patients undergoing liver transplant. The pattern of plasma- and urinary-NGAL elevation in the period perioperative of liver transplant allows earlier AKI diagnosis than KIDGO criteria based on serum creatinine. UNGAL was an independent predictor of AKI development and need for dialysis. Future studies should evaluate whether the clinical use of these biomarkers could improve patient outcomes.

Abbreviations

AKI: Acute kidney injury; AUC: Area under the curve; CKD: Chronic kidney disease; eGFR: Estimated glomerular filtration rate; EMR: Electronic medical records; EPI: Epidemiology Collaboration; ESLD: End-stage liver disease; ESRD: End-stage renal disease; ICU: Intensive care unit; INR: International normalized ratio; KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes; LT: Liver transplant; MELD: Model for end-stage liver disease; NASH: Non-alcoholic steatohepatitis; NGAL: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PNGAL: Plasma NGAL; PPV: Positive predictive value; ROC: Receiver operating characteristic; rpm: Rotation per minute; RRT: Replacement therapy; sCr: Serum creatinine; SD: Standard deviation; SOFA: Sequential Organ Failure; SPSS: Statistical Package for Social Sciences; UNGAL: Urinary NGAL

Acknowledgements

The authors thank Fatima Liborio, data analyst at the Urology Division of HC-FMUSP, and Labtest for processing the samples and performing the research laboratory assays. Portions of this study have been presented in abstract form on posters at ASN Kidney Week 2014 and 2015.

Authors' contributions

Authors CL, LBPH and EM provided the conceptualization of ideas and the evolution of overarching research goals and aims. Authors CL and EM were responsible for data curation, management activities, maintaining research data, formal analysis, application of statistics, acquisition of financial support for the project leading to this publication, design of methodology, administrative management and coordinating the planning and execution of the research activity. All authors CL, LBPH, PDVM, LMM, LPFC, LACD'A and EM, conducted a research and investigation process; collection of data/evidence and resources; provision of study materials, reagents, patients, laboratory samples and other analytical tools and prepared, created and wrote the original draft and gave final approval of the version to be published. Author EM supervised and had leadership responsibility for the planning and execution of the research activity, including mentorship external to the core team.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) process number 2013/12710–2. The funds are part of a government incentive for research, and the money was used in the purchase and analysis of the biomarker NGAL. The first author received a scholarship from the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPQ) used to collection of samples, analysis and writing the manuscript.

Availability of data and materials

The anonymized dataset is held by the corresponding author and data may be made available in part for secondary analysis by third parties. Access will be granted upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All patients signed an informed consent according to the protocol approved by the Research Ethics Committee, Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo with number 266581 and Brazil platform CAAE

0663651340000068. The protocol is available on <https://clinicaltrials.gov> with identifier NCT02095431.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Author details

¹Department of Internal Medicine, Nephrology Division, University of São Paulo, Present Address: 419 Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, third floor – room 340, 05403-000, Cerqueira Cesar, São Paulo, Brazil. ²Department of Medical Surgical Nursing, University of São Paulo Nursing School, São Paulo, Brazil. ³Department of Gastrointestinal Surgery, Clinical Surgery Division, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁴Present Address: La Jolla, San Diego, USA. ⁵Department of Biology, Biochemistry Division, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ⁶Department of Anaesthesiology, Clinical Surgery Division, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁷Department of Medicine, Nephrology Division, University of California San Diego, San Diego, USA.

Received: 20 December 2018 Accepted: 26 September 2019
Published online: 15 October 2019

References

- Hilmi A, Damjan D, Al-Khafaji A, Planinsic R, Boucek C, Sakai T, et al. Acute kidney injury following orthotopic liver transplantation: incidence, risk factors, and effects on patient and graft outcomes. *Br J Anaesth*. 2015;101–8. <https://doi.org/10.1093/bja/aeu556>.
- Barri YM, Sanchez EQ, Jennings LW, Melton LB, Hays S, Levy MF, et al. Acute kidney injury following liver transplantation: definition and outcome. *Liver Transpl*. 2009;15:475–483. <https://doi.org/10.1002/lt.21682>. PMID: 19399734.
- Karapanagiotou A, Kydonia C, Dimitriadis C, Sgourou K, Giasnetsova T, Fouzas I, et al. Acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44:2727–9. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.09.096>.
- Feldkamp T, Bienholz A, Kribben A. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) for the detection of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:1456–8. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr146>.
- Tinti F, Umbro I, Mecule A, Rossi M, Merli M, Nofroni I, et al. RIFLE criteria and hepatic function in the assessment of acute renal failure in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2010;42:1233–6. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.03.128>.
- Park MH, Shim HS, Kim WH, Kim HJ, Kim DJ, Lee SH, et al. Clinical risk scoring models for prediction of acute kidney injury after living donor liver transplantation: a retrospective observational study. *PLoS One*. 2015;10:e0136230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136230>.
- Weber ML, Ibrahim HN, Lake JR. Renal dysfunction in liver transplant recipients: evaluation of the critical issues. *Liver Transpl*. 2012;18:1290–301. <https://doi.org/10.1002/lt.23522>.
- Barreto AG, Daher EF, Silva Junior GB, Garcia JH, Magalhães CB, et al. Risk factors for acute kidney injury and 30-day mortality after liver transplantation. *Ann Hepatol*. 2015;14:688–694. PMID: 26256897.
- Yalavarthy R, Edelstein CL, Teitelbaum L. Acute renal failure and chronic kidney disease following liver transplantation. *Hemodial Int*. 2007;11:7. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2007.00223.x>. PMID: 17897111.
- Afonso RC, Hidalgo R, Zurstrassen MPVC, Fonseca LEP, Pandullo L, Rezende MB, et al. Impact of renal failure on liver transplantation survival. *Transpl Proc*. 2008;40:808–10. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.02.062>.
- Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, et al. Renal replacement therapy and orthotopic liver transplantation: the role of continuous veno-venous hemodialysis. *Transplantation*. 2001;71:1424–1428. PMID: 11391230.
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11:1–8. <https://doi.org/10.1186/cc5713>.

Continua.

13. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003; 349:931–940. doi: <https://doi.org/10.1111/ajt.13314>. PMID: 12954741.
14. Goldberg DS, Ruebner RL, Abt PL. The risk of end-stage renal disease among living donor liver transplant recipients in the United States. *Am J Transplant* 2015;15:2732–2738. doi: <https://doi.org/10.1111/ajt.13314>. PMID: 25969133.
15. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* 2008;148:810–819. PMID: 18519927.
16. Slack A, Yeoman A, Wendon J. Renal dysfunction in chronic liver disease. *Crit Care* 2010;14(2):214.
17. Beben T, RifkiAdv DE. Chronic kidney dis. GFR estimating equations and liver disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2015;22(5):337–42. <https://doi.org/10.1053/jackd.2015.05.003>.
18. Malyszko J. Biomarker of acute kidney injury indifferent clinical settings a time to change the paradigm? *Kidney Blood Press Res* 2010;33:368–382. doi: <https://doi.org/10.1159/000319505>. PMID: 20924195.
19. Di Somma S, Magrini L, Berardinis B, Marino R, Ferri E, Moscatelli P, et al. Additive value of blood neutrophil gelatinase associated lipocalin to clinical judgement in acute kidney injury diagnosis and mortality prediction in patients hospitalized from the emergency department. *Crit Care* 2013; 17(29):1–13. doi: <https://doi.org/10.1186/cc12510>. PMID: 23402494.
20. Constantin JM, Futier E, Perbet S, Roszyk L, Lautrette A, Gillart T, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study. *J Crit Care* 2010 Mar;25(1):176.e1–176.e6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jccr.2009.05.010>. PMID: 19781900.
21. Zhou F, Luo Q, Wang L, Han L. Diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for early diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: a meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016;49(3):746–755. doi: <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezv199>. PMID: 26094017.
22. Niemann CU, Walla A, Waldman J, Davio M, Roberts JP, Hirose R, et al. Acute kidney injury during liver transplantation as determined by neutrophil GelatinaseAssociated Lipocalin. *Liver Transpl* 2009;15:1852–1860. doi: <https://doi.org/10.1002/lt.21938>. PMID: 19938135.
23. Portal AJ, McPhail MJW, Bruce M, Coltart I, Slack A, Sherwood R, et al. Neutrophil Gelatinase - associated Lipocalin predicts acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transplantation* 2010;16: 1257–1266. doi: <https://doi.org/10.1002/lt.22158>. PMID: 21031541.
24. Wagener G, Minhaz M, Mattis FA, Kim M, Emond JC, Lee HT. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1717–1723. doi: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq770>. PMID: 21257679.
25. Robertson FP, Yeung AC, Male V, Rahman S, Mallett S, Fuller BJ, Davidson BR. Urinary neutrophil Gelatinase associated Lipocalins (NGALs) predict acute kidney injury post liver transplant. *HPB* 2018;1–9. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2018.09.017>.
26. Cheng CW, Chen YC, Chang CH, Yu HP, Lin CC, Yang MW, et al. The ratio of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Transplant Proc* 2012 Apr; 44(3):776–779. doi: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.01.068>. PMID: 22483493.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n° 2.600, de 21 de Outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt26_00_21_10_2009.html Accessed in 2017 (Set 18).
28. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Inter. Suppl* 2012; 2: 1–138.
29. Sirota JC, Walcher A, Faubel S, Jani A, McFann K, Devarajan P, et al. Urine IL-18, NGAL, IL-8 and serum IL-8 are biomarkers of acute kidney injury following liver transplantation. *BMC Nephrol* 2013 Jan 17;14:17. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-17>. PMID: 23327592.
30. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. NGAL meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and metaanalysis. *Am J Kidney Dis* 2009;54:1012–1024. doi: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.07.020>. PMID: 19850388.
31. Baron-Stefaniak J, Schiefer J, Miller EJ, Berlakovich GA, BaronDM, Faybik P. comparison of macrophage migration inhibitory factor and neutrophil gelatinaseassociated lipocalin-2 to predict acute kidney injury after liver transplantation: an observational pilot study. *PLoS One* 2017 Aug 15;12(8):1–14. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183162>. PMID: 28813470.
32. Jeong T-D, Kim S, Lee W, Song G-W, Kim Y-K, Chun S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of acute kidney injury in liver transplantation. *Clin Transplant* 2012 Sep-Oct;26(5):775–781. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2012.01610.x>. PMID: 22404749.
33. Charlton MR. Improving long-term outcomes after liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2014 Aug;18(3):717–730. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2014.05.011>. PMID: 25017085.
34. Saxena V, Lal JC. Renal Failure and Liver Allocation: Current Practices and Potential Improvements. *Adv Chronic Kidney Dis* 2015;Sep;22(5):391–398. doi: <https://doi.org/10.1053/jackd.2015.05.002>. PMID: 26311601.
35. Schlegel A, Linecker M, Kron P, Gyorfi G, De Oliveira ML, Mullhaupt B, et al. Risk assessment in high- and low-MELD liver transplantation. *Am J Transpl* 2016 Apr;17(4):1050–1063. doi: <https://doi.org/10.1111/ajt.14065>. PMID: 27676319.
36. Schmitt TM, Kumer SC, Al-Osaimi A, Shah N, Argo CK, Berg C, et al. Combined liver-kidney and liver transplantation in patients with renal failure outcomes in the MELD era. *Transpl Int* 2009 Sep;22(9):876–883. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00887.x>. PMID: 19413580.
37. Parajuli S, Foley D, Djamali A, Mandelbrot D. Renal function and transplantation in liver disease transplantation. *Transplantation* 2015 Sep; 99(9):1756–1764. doi: <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000820>. PMID: 26308413.
38. Chang Y, Gallon L, Jay C, Shetty K, Bing-ho, Levitsky J, et al. comparative effectiveness of liver transplant strategies for end-stage liver disease patients on renal replacement therapy. *Liver Transpl* 2014 Sep;20(9):1034–1044. doi: <https://doi.org/10.1002/lt.23899>. PMID: 24777647.
39. Laskey HL, Schomaker N, Hung KW, Asrani SK, Jennings L, Nydam TL, et al. Predicting renal recovery after liver transplant with severe pretransplant subacute kidney injury: the impact of warm ischemic time. *Liver Transpl* 2016 Aug;22(8):1085–1091. doi: <https://doi.org/10.1002/lt.24488>. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27302834.
40. Maggi U, Fornoni G, Centonze L, Melada E, Conte G, Rossi G. Ischemia time and liver transplantation, today. *Transplant Proc* 2014 Sep;46(7):2295–2299. doi: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.07.040>. PMID: 25242773.
41. Reichert B, Kaltenborn A, Becker T, Schiffer M, Klempnauer J, Schrem H. Massive blood transfusion after the first cut in liver transplantation predicts renal outcome and survival. *Langenbeck's Arch Surg* 2014 Apr;399(4):429–440. doi: <https://doi.org/10.1007/s00423-014-1181-y>. PMID: 24682384.
42. Dedeoglu B, Geus HRH, Fortrie G, Betjes MGH. Novel biomarkers for the prediction of acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Biomarkers Med* 2013 Dec;7(6):947–957. doi: <https://doi.org/10.2217/bmm.13.91>. PMID: 24266830.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

Conclusão.

7.4 Anexo 4 – Artigo “Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel”

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

KIDNEY DISEASE

Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel

Kaice A. LaFavers¹, Etienne Macedo², Pranav S. Garimella², Camila Lima³, Shehnaz Khan¹, Jered Myslinski¹, Jeanette McClintick⁴, Frank A. Witzmann⁵, Seth Winfree^{1,5}, Carrie L. Phillips⁶, Takashi Hato¹, Pierre C. Dagher^{1,5,7}, Xue-Ru Wu⁸, Tarek M. El-Achkar^{1,5,7,9,*†}, Radmila Micanovic¹

Copyright © 2019
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim
to original U.S.
Government Works

High serum concentrations of kidney-derived protein uromodulin [Tamm-Horsfall protein (THP)] have recently been shown to be independently associated with low mortality in both older adults and cardiac patients, but the underlying mechanism remains unclear. Here, we show that THP inhibits the generation of reactive oxygen species (ROS) both in the kidney and systemically. Consistent with this experimental data, the concentration of circulating THP in patients with surgery-induced acute kidney injury (AKI) correlated with systemic oxidative damage. THP in the serum dropped after AKI and was associated with an increase in systemic ROS. The increase in oxidant injury correlated with postsurgical mortality and need for dialysis. Mechanistically, THP inhibited the activation of the transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) channel. Furthermore, inhibition of TRPM2 *in vivo* in a mouse model mitigated the systemic increase in ROS during AKI and THP deficiency. Our results suggest that THP is a key regulator of systemic oxidative stress by suppressing TRPM2 activity, and our findings might help explain how circulating THP deficiency is linked with poor outcomes and increased mortality.

INTRODUCTION

Uromodulin [also known as Tamm-Horsfall protein (THP)] is a glycoprotein uniquely expressed in the kidney by cells of the thick ascending limb (TAL) of the loop of Henle (1–3). THP is predominantly targeted to the apical surface of cells through a glycosylphosphatidylinositol anchor and secreted in the urine upon cleavage by a serine protease recently identified as hepsin (4). However, a smaller, but substantial, amount of THP is targeted toward the basolateral domain, making its way into the interstitium and the circulation (1, 5, 6). The mechanism by which THP is directed toward the basolateral side of the TAL is still unclear. This secretory pathway appears to be favored during stress states, such as during recovery from acute kidney injury (AKI) (6, 7). Several studies show that the concentration of circulating THP correlates with kidney function and may serve as an inverse biomarker to identify early stages of chronic kidney disease (8, 9).

More recently, THP has emerged as an independent predictor of survival in patients with and without kidney disease, whereby elevated concentrations of both urinary and serum THP were associated with decreased mortality (10–13). This association, particularly for circulating THP, remained valid even after controlling for kidney function [estimated glomerular filtration rate (eGFR)], suggesting that THP may play an independent physiological role, rather than

simply acting as a marker of nephron mass and renal activity. Although the mechanism underlying this relationship remains unclear, serum THP was inversely correlated with inflammatory markers (C-reactive protein) and markers of cardiovascular risk (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide) (13). It is possible that these systemic effects observed with low concentrations of THP are due to activation of inflammatory pathways within the kidney that extend systemically. We previously showed that THP deficiency activates the interleukin-23 (IL-23)/IL-17 axis by the kidney, resulting in stimulation of granulopoiesis and systemic neutrophilia (14). However, it is also possible that THP has direct effects outside the kidney, which could underlie the heretofore unexplained systemic outcomes associated with low-serum THP.

We previously demonstrated that, within the kidney, interstitial THP is an important regulator of the sensitivity of S3 proximal tubules to injury by inhibiting proinflammatory signaling within these tubular epithelial cells (5, 6, 14–16). We showed that basolaterally released THP can bind to the S3 segments, where its presence is essential to inhibit the production of cytokines and chemokines such as CXCL2 and IL-23 (5, 6). We believe that the cross-talk between THP and proximal tubule segments provides an ideal model for elucidating the cellular and molecular mechanisms triggered by THP. By uncovering this signaling within kidney cells, we could also identify an underlying mechanism for the protective effect of THP systemically.

Here, we used an unbiased combined “omics” methodology to identify the molecular signals regulated by THP by taking advantage of our ability to study signaling within specific kidney cells/structures, *in vivo* in mice, using fluorescence-based laser microdissection and tissue cytometry. Using this approach, we discovered that RAC1 and c-JUN N-terminal kinase (JNK) are activated in proximal tubules from THP^{-/-} kidneys. In addition, we determined that THP^{-/-} mice have increased oxidative stress not only within the kidney but also systemically in the serum and in the lung, which does not produce THP. The translatability of our findings to human disease and the correlation between THP and systemic reactive oxygen

¹Division of Nephrology, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA. ²Division of Nephrology-Hypertension, Department of Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA 92093, USA. ³Division of Nephrology, Department of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05403, Brazil. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA. ⁵Department of Cellular and Integrative Physiology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA. ⁶Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA. ⁷Richard L. Roudebush VA Medical Center, Indianapolis, IN 46202, USA. ⁸Departments of Urology and Pathology, New York University School of Medicine and Veterans Affairs, New York Harbor Healthcare System, Manhattan Campus, New York, NY 10010, USA. ⁹Department of Anatomy and Cell Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA. *Present address: Division of Nephrology, Indiana University School of Medicine, 950 W. Walnut, R2 202, Indianapolis, IN 46202, USA. †Corresponding author. Email: telachka@iu.edu

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

species (ROS) burden were demonstrated in a cohort of patients who developed AKI after liver transplant surgery. In this setting, AKI resulted in a drop in serum THP, which was associated with elevated postsurgery oxidative damage. High concentrations of oxidative damage were associated with systemic outcomes such as 60-day mortality. Last, we also identified the transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) as a key target for THP in inhibiting oxidative stress. Findings from this work might contribute to the understanding of the modulatory role of THP in the kidney and systemically during health and disease.

RESULTS

Concurrent transcriptomic and proteomic profiling uncovers THP-dependent signaling in kidney proximal tubules

To perform transcriptomic analysis with high precision on isolated S3 (pars recta) proximal epithelial tubular cells from THP^{-/-} and THP^{+/+} mouse kidneys, we performed fluorescence-based laser microdissection as described recently (fig. S1A) (17), followed by gene microarrays on the extracted RNA (Fig. 1A). Analysis of the data uncovered 956 genes that were up-regulated and 848 genes that were down-regulated in S3 cells from THP^{-/-} versus THP^{+/+} kidneys,

Fig. 1. THP inhibits activation of the RAC1/p-JNK signaling pathway.

(A) Transcriptomic analysis of laser microdissected S3 proximal tubules from THP^{-/-} and THP^{+/+} mouse kidney. KO, knockout; WT, wild type. (B) Canonical pathway analysis (Ingenuity) of differentially expressed transcripts and pathways with z score > 1.5 or < -1.5 are shown with their predicted activation state in the S3 tubules of THP^{-/-} mice. SAPK, stress-activated protein kinase; IRF, interferon regulatory factor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor. (C) Triplicate groups of HK-2 cells were treated with THP (1 μ M/ml) or vehicle for 6 hours. Protein extraction was followed by quantitative label-free proteomics. Differentially expressed proteins were identified (shown in heat map). (D) Canonical pathway analysis of the proteomic data from (C) was performed, and pathways with z score > 2 or < -2 are shown with their predicted activation state in the THP-stimulated HK-2 cells. ARP-WASP, actin-related protein-Wiskott-Aldrich syndrome protein; GTPases, guanosine triphosphatases. RMLP, N-formyl-Met-Leu-Phe. (E) Left: Immunofluorescence confocal microscopy shows shifting of RAC1 (red) in THP^{-/-} mice to the basolateral domain of S3 segments (right) compared to a cytoplasmic localization in THP^{+/+} (left). Insets show a higher magnification of the areas indicated by the arrowheads (the arrow points to basolateral RAC1). RAC1 shift is a surrogate for its activation. Right: THP^{-/-} mouse kidneys (n = 5 per group) are shown. n.s., not significant. (F) Left: Active RAC1 was immunoprecipitated from total kidney lysates of THP^{+/+} and THP^{-/-} kidneys (n = 5 to 6 per group; sample "a" of the THP^{-/-} group bridges the two immunoblots). Right: Quantification of the immunoprecipitation experiment. (G) Phosphorylated JNK was assayed from nuclear extracts of total kidney lysates by immunoblot (left) and quantitated (right) by band densitometry. (H) Immunoblot of H₂O₂-dependent JNK activation after treatment with THP (1 μ M/ml) in the left panel, quantitated in the right panel. Scatter plots are means $\pm$ SD. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001. MW, molecular weight; M-OS, medulla, outer stripe; CX, cortex.

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

respectively. Bioinformatic analysis using Ingenuity (QIAGEN) identified several canonical pathways predicted to be differentially regulated in THP^{-/-} versus THP^{+/+} S3 proximal epithelial cells (shown in Fig. 1B; $P < 0.05$). Among these identified pathways, JNK signaling had the highest z score for activation (z score, 3.3; Fig. 1B and fig. S1, B and C). Disease annotation analysis showed that the differential gene expression pattern caused by THP loss in S3 cells was associated with patterns observed in renal damage and injury pathways (fig. S1D).

Next, we adopted an orthogonal approach to discover the protein expression changes elicited by treatment of proximal tubular epithelial cells with THP using label-free quantitative mass spectrometry (LFQMS)-based proteomics (18, 19). We incubated human kidney-2 (HK-2) human proximal tubular cells with purified human THP or vehicle, after which we measured the changes in expression of 1881 proteins identified by LFQMS (Fig. 1C). At 6 hours, THP caused changes in the expression of 406 proteins. Using bioinformatic analysis on the differentially expressed proteins, most of the top canonical pathways affected by THP treatment were linked to the inhibition of RAC1 signaling (Fig. 1D). Because RAC1 activation occurs at the plasma membrane and can lead to downstream activation of JNK signaling (20), RAC1 itself could link THP to JNK activation (fig. S2). Therefore, together with the transcriptomic data, our findings suggest that THP might inhibit the RAC1/JNK signaling pathway in proximal tubules.

THP deficiency activates the RAC1/JNK/c-JUN signaling pathway in proximal epithelial cells

To validate and further link the transcriptomic and proteomic data, we next surveyed RAC1 activation in kidneys from THP^{-/-} and THP^{+/+} mice. Confocal microscopy showed that RAC1 shifted from a cytoplasmic localization to the basolateral domain of S3 tubular segments in the absence of THP in the outer stripe but not in the cortical S1/S2 proximal tubules (Fig. 1E and fig. S3). Because RAC1 is activated at the basolateral domain, its shift is a reliable surrogate for activation (21). Immunoprecipitation of activated RAC1 was performed on kidney lysates. RAC1 activation was significantly increased in the setting of THP deficiency ($P < 0.05$; Fig. 1F). Phosphorylated (activated) JNK in nuclear extracts from total kidney lysates was significantly increased ($P < 0.05$) in THP^{-/-} kidneys compared to THP^{+/+} kidneys (Fig. 1G). Consistent with the changes in JNK

activity observed in the THP^{-/-} kidney, we also observed that THP inhibits JNK activation in HK-2 proximal tubular cells (Fig. 1H).

Furthermore, active JNK leads to phosphorylation of c-JUN (p-c-JUN), which is a member of the activating protein 1 (AP-1) transcription factor and has been implicated in the transcription of a myriad of inflammatory cytokines, including IL-23 (22). We used three-dimensional (3D) quantitative imaging and analysis to quantify the number of p-c-JUN⁺ cells in THP^{-/-} and THP^{+/+} in sections from the outer medulla and cortex of the kidney (Fig. 2, A and B) using volumetric tissue exploration and analysis (VTEA) software (23). Because these kidney sections originated from naive mice, expression

Fig. 2. THP inhibits activation of p-c-JUN. (A to C) Sections from the outer medulla of kidneys from THP^{+/+} and THP^{-/-} mice were stained for phosphorylated (active) c-JUN (p-c-JUN) (A). VTEA was used to quantify the percentage of cells positive for p-c-JUN staining (B). In (C), 3D rendering of a representative p-c-JUN stained image is overlaid with the VTEA gating. Scatter plot error bars represent means $\pm$ SD. * $P < 0.05$.

Fig. 3. THP^{-/-} mice have increased oxidative stress and damage within the kidneys and systemically. (A) Live imaging with the ROS-sensitive dye H₂DCFDA in kidneys of THP^{+/+} and THP^{-/-} mice (inset: background fluorescence) in the left panel is quantitated in the right panel ($n = 3$ to 4 per group). (B) H₂O₂ concentrations in kidney lysates from THP^{+/+} and THP^{-/-} mice ($n = 5$ per group). Values were normalized to the amount of protein present in each lysate. (C) Heat map of oxidized phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) concentrations in the kidneys of THP^{+/+} and THP^{-/-} mice ($n = 3$ per group). (D to F) Concentration of 8OHdG, a marker of oxidative DNA damage, in the kidney ($n = 7$ to 15 per group (D)), serum ($n = 15$ to 17 per group (E)), and lungs ($n = 8$ per group (F)) of THP^{-/-} mice compared to THP^{+/+} mice. Scatter plot error bars represent means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ (statistical significance between the two groups).

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

Fig. 4. Serum THP decreases and oxidative DNA damage increases after ischemic AKI in THP^{+/+} mice. (A) Serum THP concentrations of THP^{+/+} mice before and 24 hours after IRI surgery ($n = 15$ mice). (B) Serum DNA damage concentrations of THP^{+/+} mice before and 24 hours after IRI surgery ($n = 15$ mice). (C) Serum concentrations of kidney injury markers cystatin C, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), and osteopontin in THP^{+/+} mice before and 24 hours after IRI surgery ($n = 15$ mice). Scatter plots are means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$.

of p-c-JUN in THP^{+/+} was negligible ($0.03 \pm 0.01\%$ in the outer medulla and $0.08 \pm 0.08\%$ in the cortex; Fig. 2B). In THP^{-/-} outer medulla and cortex sections, p-c-JUN expression was significantly increased compared to THP^{+/+} ($0.98 \pm 0.31\%$ and $1.0 \pm 0.74\%$, respectively; $P < 0.05$; Fig. 2B). A 3D rendering overlaying p-c-JUN staining of nuclei with p-c-JUN-positive cells gated by VTEA demonstrated the accuracy of the gating approach and confirmed that c-JUN activation was limited to proximal tubules (Fig. 2C). Cumulatively, these data show increased activation of RAC1/JNK/c-JUN in THP^{-/-} kidneys. For RAC1, this appears to be predominantly evident in S3 proximal tubules, whereas increased c-JUN activation occurs in most proximal tubules within the kidney. Together with the transcriptomic and proteomic analyses shown so far, we concluded that THP deficiency stimulates the activation of RAC1/JNK/c-JUN in the kidney in mice.

Proteomic analysis of S3 proximal cells reveals dysregulation of the free radical scavenging network in THP^{-/-} mice

To further characterize the changes elicited in S3 proximal epithelial tubular segments in the setting of THP deficiency, we performed targeted proteomic analysis on S3 proximal epithelial cells in mice. This was achieved by isolating S3 segments by laser microdissection

from THP^{+/+} and THP^{-/-} kidneys, followed by protein extraction and 2D differential gel electrophoresis (2D-DIGE), as described in a recent publication (fig. S4, A to C) (17). Differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry (fig. S4D). Bioinformatic analysis of the differentially expressed proteins identified the free radical scavenging network as the top network of proteins that was differentially regulated in THP^{-/-} mice (fig. S4E). This analysis predicted increased generation of ROS in S3 segments from THP^{-/-} compared to THP^{+/+} mice (fig. S4F).

The predicted redox imbalance within the THP^{-/-} S3 tubules was consistent with the observed activation of the RAC1/JNK/c-JUN signaling pathway in these mice. This connection between ROS and RAC1/JNK signaling was highlighted in the combined signaling/oxidative stress bioinformatics model (fig. S5).

THP deficiency leads to increased oxidative stress and damage within the kidney

Given the predicted redox imbalance of S3 segments within THP^{-/-} kidneys, we performed live imaging of kidneys from mice injected with a redox-sensitive dye, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). We found that THP^{-/-} mice have a higher burden of oxidative stress throughout the kidney cortex ($P < 0.05$; Fig. 3A). We extended these findings to the kidney medulla using another redox-sensitive dye (CellROX Deep Red), which helped localize a ROS signal to the S3 segments ($P < 0.05$; fig. S6, A and B). To further quantitate the differences in oxidative stress found in THP^{-/-} mice, we measured hydrogen peroxide (H₂O₂) directly using a colorimetric assay and found that its concentration was significantly increased in total kidney lysates from THP^{-/-} kidneys compared to THP^{+/+} ($P < 0.05$; Fig. 3B). Together, these results suggest that kidneys from THP^{-/-} mice have an increased ROS burden throughout the kidney, particularly within the S3 tubules.

To determine what types of damage might be occurring as a result of the increased oxidative stress burden within the THP^{-/-} kidneys, we first quantitated the oxidized forms of the major classes of phospholipids in kidney lysates using targeted lipidomics. A heat map showing the relative quantity of oxidized phospholipids in THP^{+/+} and THP^{-/-} is shown in Fig. 3C. Specifically, we found that THP^{-/-} kidneys have increased amounts of oxidized phosphatidylcholine (Fisher's exact test, $P < 0.0001$) and phosphatidylethanolamine (Fisher's exact test, $P < 0.0001$) lipids as compared to THP^{+/+} kidneys (Fig. 3C and data file S3). Because oxidative stress is known to cause organelle dysfunction, we investigated mitochondrial morphology in S3 proximal tubules using toluidine blue staining and electron microscopy studies. We observed increased mitochondrial swelling and deformation in S3 cells of THP^{-/-} compared to THP^{+/+} mouse kidneys [fig. S7, A to C;

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

Fig. 5. Plasma THP decreases and oxidative DNA damage increases in patients with AKI after transplant surgery. (A) Correlation of THP and 8OHdG concentrations from all time points for AKI cohort and control participants ($n = 43$). (B) Presurgery plasma THP concentrations compared to concentrations 18 hours after surgery (paired analysis, $n = 34$). (C) Presurgery plasma 8OHdG concentrations compared to concentrations 18 hours after surgery (paired analysis, $n = 34$). (D) Correlation of presurgery plasma concentrations of THP with plasma 8OHdG levels collected 18 hours after surgery ($n = 34$, $R^2 = 0.23$, and $P < 0.05$). Scatter plot error bars are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ and **** $P < 0.0001$.

two-way analysis of variance (ANOVA), $P < 0.0001$). Collectively, these data further establish that THP deficiency increases oxidative stress in the kidney, particularly in proximal tubular segments. Given our previous data that $THP^{-/-}$ kidneys have increased expression of IL-23 within the S3 tubules, we hypothesized that increased oxidative stress within the S3 tubular cells leads to increased IL-23 expression. We found that treatment of HK-2 cells with H_2O_2 leads to an increase in IL-23 mRNA expression (fig. S8), providing a potential link between these two observations.

THP deficiency leads to systemic oxidative damage

Given the role that THP deficiency plays in increasing oxidative stress and damage within the kidney, along with our previous data showing that the loss of THP can lead to systemic effects on inflammation (24) and neutrophil homeostasis (14), we hypothesized that the basolateral release of THP into the interstitium and circulation could mitigate the buildup of oxidative damage systemically. We measured oxidative DNA damage in the kidneys, serum, and lungs in $THP^{+/+}$ and $THP^{-/-}$ mice using an assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) (25), which provides a robust method to quantify oxidative damage that could be used in both tissue lysates and serum. As expected, $THP^{-/-}$ mice had higher DNA damage in the kidneys ($P < 0.05$; Fig. 3D), but we also observed higher concentrations in the serum ($P < 0.001$; Fig. 3E) and the lungs ($P < 0.05$; Fig. 3F). From this data, we conclude that the loss of THP leads to increased oxidative damage not only in the kidneys but also in the serum and in the lung, an organ that is not known to produce THP. These findings suggest that

circulating THP, through an effect distant from the kidney, might mitigate systemic oxidative damage.

To test the relevance of these findings in disease, we subjected $THP^{+/+}$ mice to AKI using the ischemia reperfusion injury (IRI) model. We found that serum THP decreased 24 hours after surgery (Fig. 4A), whereas oxidative DNA damage and kidney function/injury markers increased (Fig. 4, B and C). Therefore, these results extend the findings from the $THP^{-/-}$ mice to a disease model in $THP^{+/+}$ mice, where a decrease in systemic THP was observed in early AKI, concomitant with increased systemic oxidative stress.

Plasma THP concentrations drop during human AKI and are associated with increased systemic oxidative damage and outcomes

To test the translatability and relevance of these findings to human disease and validate the relationship of THP with oxidative stress, we measured changes in plasma THP and oxidative stress among 41 patients with liver diseases before and 18 hours after liver transplantation. Demographics and clinical variables for this cohort are shown in Table 1 and table S1. Baseline measurements were not different compared to a small number of control subjects who did not undergo liver transplantation (table S1), supporting that the liver disease burden in this cohort did not affect the baseline measurements. In patients who did not develop post-surgery AKI, presurgery baseline eGFR was higher (table S1), consistent with previous reports that presurgical kidney function is an important risk factor of postsurgery AKI (26, 27).

In 34 patients who developed AKI based on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) serum creatinine criterion (28), THP concentrations were inversely correlated with systemic DNA damage ($R^2 = 0.06$ and $P < 0.05$; Fig. 5A), which is consistent with the mouse data above. When compared to presurgery concentrations, plasma THP decreased significantly at 18 hours after surgery in patients with AKI (291 ± 258 ng/ml versus 102 ± 93.6 ng/ml, $P < 0.001$; Fig. 5B and Table 1). These findings confirm, in humans, that AKI results in a state of acute systemic THP deficiency. This decrease in THP was concomitant with a significant increase in oxidative DNA damage (11.8 ± 8.14 ng/ml versus 16.3 ± 11.8 ng/ml, $P < 0.05$; Fig. 5C and Table 1). Presurgery concentrations of THP in patients with AKI were inversely correlated with postsurgery DNA damage ($R^2 = 0.23$ and $P < 0.05$; Fig. 5D), demonstrating that higher baseline THP correlated with lower oxidative damage incurred after surgery. In patients who did not develop postsurgery AKI, there was no statistical difference between pre- and postsurgery THP, although concentrations were lower, on average, after surgery (fig. S9).

Although this human study was neither designed nor powered to detect a relationship between THP and/or oxidative stress concentrations with other end points such as mortality or need for dialysis,

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

Table 1. Characteristics of the AKI cohort. Demographic and clinical data for a cohort of liver transplant recipients who developed AKI after transplant surgery.

Sex	
Male	56%
Female	44%
Age (years)	53.5 ± 11.3
Race	
Caucasian	85%
African	3%
Hispanic	9%
Asian	3%
Body mass index (kg/m²)	27.5 ± 5.03
Presurgery plasma 8OHdG (ng/ml)	11.8 ± 8.14
Postsurgery plasma 8OHdG (ng/ml)	16.3 ± 11.8
Postsurgery plasma THP (ng/ml)	291 ± 258
Postsurgery plasma THP (ng/ml)	102 ± 93.6
Presurgery eGFR (ml/min per 1.73 m²)	67.8 ± 33.0
Presurgery plasma creatinine (mg/dl)	1.32 ± 0.807
Postsurgery plasma creatinine (mg/dl)	1.53 ± 0.689
AKI stage	
Stage 1	15%
Stage 2	29%
Stage 3	56%
Received dialysis	47%
Sixty-day survival	77%

we did find that the postsurgery oxidative DNA damage plasma concentrations were increased in nonsurvivors (14.0 ± 9.94 ng/ml in survivors versus 23.6 ± 14.7 ng/ml in nonsurvivors, $P < 0.05$; Fig. 6B). Presurgery concentrations of plasma oxidative DNA damage did not differ between survivors and nonsurvivors (Fig. 6A), suggesting that elevated oxidative damage in the plasma as early as 18 hours after surgery may be a predictor of mortality. However, plasma THP both before (Fig. 6C) and after (Fig. 6D) development of AKI was not different in nonsurvivors compared to survivors. Oxidative DNA damage before and after surgery was higher in patients who subsequently required dialysis (Fig. 6, E and F; $P < 0.05$). Together with the animal data presented above, these results suggest that high concentrations of circulating THP may be protective from increased oxidative stress.

THP inhibits systemic oxidative stress through TRPM2

Having established the signaling pathways activated during THP deficiency and the resultant oxidative damage, we set out to determine the molecular target linking THP with increased oxidative stress and activated RAC1/JNK signaling. We hypothesized that THP could target a RAC1 modulator. One of the candidate molecules is TRPM2. TRPM2 is a nonvoltage-activated, Ca^{2+} -permeable, nonselective cation channel that plays an important role in ROS-coupled diseases (29). Therefore, we hypothesized that THP inhibits TRPM2 and the downstream RAC1/oxidative stress/JNK signaling pathway. THP

was recently shown to regulate the activity of a related channel, TRPM6 (30). We first investigated whether THP can directly alter the function of TRPM2 using a human embryonic kidney (HEK) 293 recombinant cell line expressing an inducible copy of TRPM2 in which channel-specific activation can be monitored by measuring the kinetics of calcium influx after stimulation with H_2O_2 , which increases the open state of the channel (29). Using this approach, we showed that THP inhibited TRPM2 activity (Fig. 7A), leading to complete inhibition of TRPM2-mediated calcium influx. This effect was specific (Fig. 7B) to THP because similar inhibition was not shown with human serum albumin (HSA) and was dose dependent (Fig. 7C). The potency of this inhibition was also equivalent to *N*-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid (ACA), a known TRP channel blocker (31) (Fig. 7D). Therefore, our data demonstrate that THP specifically inhibits the activation of TRPM2. Consistent with this finding, inhibition of TRPM2 in HK-2 cells with ACA blocked JNK activation, as was previously demonstrated with THP (Fig. 1H and Fig. 8), suggesting that the inhibitory effect of THP on JNK activation is at least partially dependent on TRPM2.

TRPM2 is expressed at high concentrations in the brain and immune system and to a varying degree in other organs such as the heart, spleen, liver, pancreas, and kidney (32). Because of its broad expression profile in immune cells and the demonstrated inhibition by THP in vitro, we hypothesized that TRPM2 mediates the systemic oxidative damage observed in $\text{THP}^{-/-}$ mice. To test this hypothesis, we treated $\text{THP}^{-/-}$ mice with the TRPM2 inhibitor 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), previously used for in vivo studies (33), and found that 2-APB significantly lowered systemic oxidative DNA damage in these mice ($P < 0.05$; Fig. 7E). To extend these findings to AKI, where TRPM2 was shown to promote IRI (34), we subjected $\text{THP}^{+/+}$ and $\text{THP}^{-/-}$ mice to IRI after TRPM2 inhibition with 2-APB and measured oxidative damage in the serum 6 hours later. The vehicle-treated $\text{THP}^{-/-}$ mice showed increased oxidative damage as compared to vehicle-treated $\text{THP}^{+/+}$ mice, mirroring the results in uninjured animals ($P < 0.05$; Fig. 7F). Furthermore, pretreatment of both the $\text{THP}^{+/+}$ and $\text{THP}^{-/-}$ mice with 2-APB significantly reduced oxidative damage after IRI ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; Fig. 7F). The difference in oxidative damage seen between the $\text{THP}^{+/+}$ and $\text{THP}^{-/-}$ mice was lost upon treatment with 2-APB, implying that TRPM2 is a main target for the inhibitory effect of THP on systemic oxidative stress.

DISCUSSION

In this study, using a combination of experimental approaches and a small human cohort, we show a role for THP in maintaining redox balance not only in the kidney but also systemically. This protective effect of THP against systemic oxidative stress occurs by inhibiting TRPM2 channel activation. Because TRPM2 is expressed in many organs throughout the body, particularly in the immune system (32), uncovering the THP-TRPM2 link provides a potential mechanism by which the kidney affects other organs after the release of THP into the circulation. Nonspecific targeting of TRPM2 itself is likely to be risky because of its pleiotropic constitutive expression and tissue-specific effects (35). However, targeted interventions that modulate the concentration of systemic THP may hold a future therapeutic potential, especially in view of recent experimental data that support such interventions (36).

We found that there is increased oxidative stress in proximal tubules, both within the cortex (predominantly S1/S2 proximal

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

Fig. 6. Oxidative DNA damage is associated with mortality and need for dialysis in patients with AKI after transplant surgery. (A and B) Presurgery (A) and postsurgery (B) plasma concentrations of 8OHdG in patients who did or did not survive after transplant surgery and development of AKI ($n=34$). (C and D) Presurgery (C) and postsurgery (D) plasma concentrations of THP in patients who did or did not survive after transplant surgery and development of AKI ($n=34$). (E and F) Presurgery (E) and postsurgery (F) plasma concentrations of 8OHdG in patients who did or did not receive dialysis after transplant surgery and development of AKI ($n=34$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$ (statistical significance between the two groups).

tubules) and the outer medulla (predominantly S3 proximal tubules) in kidneys from THP^{-/-} mice. Oxidative stress results from an imbalance between generation of ROS such as superoxide and hydrogen peroxide and the reductive buffer system that quenches the excess of these toxic molecules (37). Within the cells, ROS at low levels are essential byproducts of oxidative phosphorylation and needed for signal transduction (37–40). However, excess ROS will damage the cell through multiple pathways, such as direct damage to organelles and macromolecules and impairment of normal functioning systems, leading eventually to cell death. ROS can directly stimulate inflammatory signaling, such as nuclear factor κ B and AP-1–dependent pathways, leading to the production of a myriad of proinflammatory cytokines (37, 38). Therefore, by inhibiting oxidative stress, THP can potentially regulate both cell fate of S3 segments and the production of inflammatory mediators, such as IL-23.

We also found that the RAC1/JNK/c-JUN pathway is activated in these tubules. Oxidative stress stimulates RAC1/JNK/c-JUN signaling (41) and links the proteomic analysis of S3 tubules to the transcriptomic analysis of S3 tubules. Many of the proteins dysregulated in the S3 tubules of THP^{-/-} mice—including ALBU, ALDH3, GPX3, and SODC—are also linked to RAC1/JNK signaling, either as upstream regulators or as targets (42–53). Our data suggested that the burden of oxidative stress may be accentuated in S3 segments, which is also supported by the differential shift of RAC1 to the basolateral membrane in outer medulla cells. This is expected, given the fact that the absence of THP may be more impactful in the outer medulla than the cortex because of a relatively higher frequency of TALs in this region, which are likely releasing higher amounts of THP into the interstitium sur-

rounding S3 tubules (6). JNK activation, as measured by phosphorylation of c-JUN, is present in both the cortex and the medulla, which may reflect the generalized presence of oxidative stress and the high sensitivity of the 3D imaging assay used.

Circulating THP has been shown to correlate with kidney function (8, 9), is inversely associated with chronic kidney disease (CKD), and predicts the risk of developing CKD (54). Risk variants in the uromodulin gene (UMOD) promoter region may be independent modifiers of CKD risk, and further studies are needed to investigate their interaction (55), especially how they may be associated with the concentrations of circulating THP. Our study does not specifically address how circulating THP is linked to the risk of CKD. It is possible that the decrease in THP production and systemic release observed in CKD (54) can lead to increased ROS within the kidney, thereby predisposing it to ongoing tubular injury and fibrosis (56). This hypothesis will need to be tested in models of CKD.

Downloaded from <http://stm.sciencemag.org/> by guest on March 25, 2021

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

Fig. 7. THP inhibits TRPM2 calcium influx in vitro, and TRPM2 inhibition in vivo reduces oxidative damage. (A to D) HEK293 cells expressing a tetracycline-inducible TRPM2 channel were treated with doxycycline or vehicle control (vehicle control and no TRPM2) for 24 hours before loading with the calcium indicator Fluo-4. Cells were pretreated with THP, HSA, or *N*-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid (ACA), respectively, before activation of the TRPM2 channel with H₂O₂. Calcium influx was measured after addition of extracellular calcium (CaCl₂). In (A), pretreatment with THP (1 μg/ml) is shown. In (B), pretreatment with THP (1 μg/ml) is compared to HSA (1 μg/ml). In (C), pretreatment with 0.01, 0.1, and 1 μg/ml THP are compared. In (D), treatment with THP (1 μg/ml) is compared to 25 μM ACA, a small-molecule inhibitor of TRPM2. Representative results are shown from a single experiment (*n* = 3 wells per treatment condition). (E) Concentration of oxidative DNA damage (8OHdG) in THP^{-/-} mice treated with the TRPM2 inhibitor 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (16 mg/kg) or vehicle (10% DMSO/90% sterile saline) for 3 days (*n* = 7 to 8 mice per group). (F) Concentration of oxidative DNA damage (8OHdG) in THP^{-/-} and THP^{+/+} mice treated with TRPM2 inhibitor 2-APB (16 mg/kg) or vehicle (10% DMSO/90% sterile saline) for 3 days before performing a 22-min bilateral clamping of the renal artery followed by 6-hour recovery. (*n* = 7 to 8 mice per group). Scatter plots are means ± SD. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.

TRPM2 is a multifunctional nonselective calcium ion channel. It is expressed in high levels not only in the brain but also in other organs such as the heart, spleen, liver, bone marrow, pancreas, and

kidney (32). Within organs, its expression is uneven with specific cells exhibiting a high level of expression (32). In the kidney, specifically, the link between TRPM2, RAC1-dependent signaling, and oxidative stress in epithelial cells has been recently demonstrated in the context of AKI (34). In our study, we extended these findings by showing that THP could be an important regulator of TRPM2, RAC1, and oxidative stress. We also showed that THP deficiency, whether genetic or due to AKI, was associated with elevated systemic oxidative damage. The increased systemic ROS burden was mitigated by treatment with a TRPM2 inhibitor, suggesting that it is at least partially TRPM2 dependent. The relationship between ROS and TRPM2 is complex because TRPM2 is both activated by ROS and can also amplify downstream oxidant damage (57). Our work may help clarify this relationship by identifying THP as an upstream mediator of TRPM2 and ROS.

Findings from this study provide a mechanism that could help explain how serum THP is linked with systemic outcomes such as all-cause mortality and may have a high clinical impact. When interpreted with other clinical data linking reduced serum THP to mortality (11, 13), our current findings suggest that regulation of systemic oxidative stress is a mechanism that helps explain this link. The increased susceptibility to oxidative stress has particular implications in diseases leading to acute THP deficiency, such as AKI, which is supported by our data exploring the relationship between THP and oxidative damage in human AKI. Our study also provides a rationale to explore the sensitivity of serum THP as a biomarker for early AKI in large studies, especially with a trend in decreased THP even observed in patients who did not develop AKI by standard clinical criteria. Last, our findings also raise the possibility of using THP and oxidative stress measurements to prognosticate and guide overall clinical management after AKI. These prospects will require validation in a large prospective study before they can be used in the clinic.

A major strength of our experimental design was the use of a multidisciplinary approach, combining complementary omics and imaging techniques that converged on a specific finding, which we were able to translate from experimental

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

Fig. 8. Inhibition of TRPM2 blocks JNK activation in HK-2 cells. (A) Immunoblot for TRPM2 in HK-2 cell lysate. (B) Immunoblot of H₂O₂-dependent JNK activation after treatment with 25 μM ACA in the left panel, quantitated in the right panel. Scatter plots are means ± SD. **P* < 0.05 and *****P* < 0.0001.

models to patients. Although this strategy could help overcome experimental limitations, it is important to note these limitations to facilitate interpretation. Although the exact subsegmental origin (S1-S2 or S3) of the HK-2 cells used for the proteomic studies of THP-treated cells is not well established, there is currently no suitable alternative because there are no available S3-specific pure human cells (58). In addition, HK-2 cells are among the most characterized and commonly used human tubular epithelial cells, which can facilitate the reproducibility of this work. The use of these human cells also allows the extension of the findings to human pathology. For the THP treatment cell studies, the monomeric THP used to mimic basolaterally released THP is cleaved differently than serum THP, which is a potential limitation of this work (36). In addition, the interpretation of these findings needs to be balanced by the fact that the dose of THP used in the HK-2 cell experiments is likely in the pharmacological range, compared to circulating concentrations. However, in the TRPM2 inhibition experiments, even physiological concentrations inhibit TRPM2-mediated calcium influx. For the human studies, the statistical power to establish relationships between THP, oxidative stress, and clinical variables is limited by the sample size, which also restricted our ability to make comparisons between patients who developed more or less severe kidney injury. Last, although the use of a transgenic cell line for the TRPM2 studies allowed us to show specific inhibition of the TRPM2 channel, we are unable to determine which TRPM2-expressing cells are the primary targets of THP inhibition in vivo, which will require additional studies to establish.

In conclusion, our study suggests that circulating THP is an important regulator of renal and systemic oxidative stress. Findings from this work could advance our understanding of the modulatory role of THP in the kidney and systemically during health and disease.

MATERIALS AND METHODS

Study design

In this study, we studied the S3 proximal tubules in THP^{-/-} mice to generate and, subsequently, test hypotheses about THP's function. We used laser microdissection to isolate S3 proximal tubules from THP^{+/+} and THP^{-/-} mice and performed transcriptomic and proteomic studies on the samples. In parallel, we treated a proximal tubular cell line with THP before proteomic analysis. Additional experiments were performed to validate, explore, and expand on these results, as described in the following sections. Sample sizes were established for different analyses as follows. For in vitro experiments,

all experiments were performed with three technical replicates and were repeated a minimum of one to two additional times to ensure reproducibility. For animal experiments in uninjured animals, a pilot experiment with three to five animals per group was first conducted to measure effect size and conduct power calculations to scale up the experiment accordingly. For animal experiments using the IRI model of AKI, experiments were conducted with 8 to 10 mice per group, on the basis of the number of mice required for significance in uninjured animals along with feasibility considerations. The subjects were not randomly assigned to experimental groups because of animal housing considerations. The study was not blinded. All data acquired is presented in the main figures and the Supplementary Materials. These criteria were established prospectively. Statistical outliers were defined using the Tukey's fences methods, unless otherwise described in the specific sections.

Mice

Animal experiments and protocols were approved by the Indianapolis VA Animal Care and Use Committee. Age matched 8- to 12-week-old THP knockout male mice (129/SvEv THP^{-/-}) and wild-type background strain were used as described previously (6, 7). For 2-APB dosing experiments, mice were dosed as described previously (34), with either 2-APB (16 mg/kg) in 90% saline/10% dimethyl sulfoxide (DMSO) or vehicle control (90% saline/10% DMSO), once daily for 3 days before collecting organ and serum samples. IRI was performed as described previously (16), after dosing with 2-APB or vehicle control for 3 days, as indicated for each experiment. The final dose of 2-APB or vehicle control was given before the beginning of IRI surgery. Mice were allowed to recover for 6 hours before collecting organ and serum samples.

Immunofluorescence confocal microscopy and 3D tissue cytometry

Immunofluorescence staining for RAC1 (Millipore, catalog no. 05-389), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, catalog no. D9542), p-c-JUNC-JUN (Cell Signaling Technology, catalog no. 3270S), and fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin (Molecular Probes, catalog nos. D1306 and F432) was performed on 50-μm vibratome sections of kidneys fixed with 4% paraformaldehyde as described previously (6). Briefly, immunostaining was done at room temperature overnight with primary antibody in phosphate-buffered saline (PBS) + 2% bovine serum albumin + 0.1% Triton X-100 and secondary antibody + FITC-phalloidin + DAPI in the same buffer. After mounting on glass slides, stained sections were viewed under Olympus

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

FluoView laser-scanning confocal microscope. Images were collected under $\times 20$ and $\times 60$ magnification. Quantitation of the cellular distribution of RAC1 fluorescence in proximal tubules (identified by Oregon Green 488 phalloidin staining of the brush borders) was performed on high-power fields (two fields per section, one section per mouse, and five mice per experimental group), using ImageJ. Basolateral membrane-associated RAC1 average intensity was measured along the basolateral border (outlined by F-actin staining) in a 4-pixel ($1.56\ \mu\text{m}$) spanning region of interest using a brush tool (fig. S3). Cellular RAC1 average intensity for each corresponding tubule was measured in the remaining area. The ratio of membrane-associated RAC1:cellular RAC1 was calculated for each tubule. 3D tissue cytometry was performed with VTEA (v. 0.5.2) (23). Briefly, cells were segmented by their nuclei. Identifying cell types or cell characteristics was accomplished by measuring the intensity of markers within either the putative nuclei or a small surrounding volume generated with a morphological dilation. These measurements are collated and plotted on an interactive scatter plot, which can be interrogated with gating approaches. Here, p-c-JUN intensity was assessed in the nuclei of segmented cells, and positive cells were gated and counted.

Electron microscopy

Upon harvesting, kidneys were perfused-fixed with 3% glutaraldehyde buffered with 0.15 M sodium cacodylate and subsequently embedded in Poly/Bed 812 embedding mixture resin. For light microscopy, $0.5\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections were cut using an ultramicrotome and stained with toluidine blue. For transmission electron microscopy, 70- to 90-nm sections were cut, collected on 200-mesh copper grids, viewed, and photographed on a Tecnai electron microscope. We quantified mitochondrial swelling by measuring the maximum length of the short axis for all mitochondria within five cells from the representative images shown for THP^{+/+} and THP^{-/-} mice.

Laser microdissection

Kidneys were extracted after euthanasia. Sections from each kidney were snap-frozen in OCT compound (Tissue-Tek, catalog no. 4583) on dry ice and kept at -80°C until use. They were subsequently cut using a cryotome at $10\text{-}\mu\text{m}$ sections and mounted on Leica PPS membrane slides (Leica, catalog no. 11505268). The protocol for staining S3 proximal tubules, described previously in detail (17), identifies these tubules by the intense brush border stain in the outer medulla. After rapid dehydration/rehydration steps, the samples were stained with FITC-phalloidin (1:20) + DAPI (Molecular Probes, 1:300) and washed with PBS, and the membranes were allowed to air dry. After staining, sections were immediately taken to a Leica LMD6000 laser microdissection microscope. Dissection was performed at $40\times$ magnification under fluorescence. There were 200 to 250 segments dissected in each 90-min session (average dissected area varies on type of tubules; for S3 segments, this ranges from $350,000$ to $500,000\ \mu\text{m}^2$). RNA extraction was performed using an Arcturus PicoPure RNA isolation kit (Applied Biosystems).

Microarrays

Total RNA was analyzed using the Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies) to assess the quality. Samples were processed in two batches with THP^{-/-} and THP^{+/+} samples in each batch. Two nanograms of total RNA for each sample was labeled using the standard protocol for the Affymetrix WT Pico Kit (Affymetrix). Individual

labeled samples were hybridized to the Mouse Gene 2.0 ST GeneChips for 17 hours and then washed, stained, and scanned with the standard protocol using Affymetrix GeneChip Command Console Software to generate data (CEL files). Arrays were visually scanned for abnormalities or defects; none were found.

CEL files were imported into Partek Genomics Suite 6.6 (Partek Inc.) for analysis. RMA [robust multichip average (59)] expression values were generated for all probe sets using the RMA background correction, quantile normalization, and summarization by median polish. Summarized signals for each probe set were $\log_2$ -transformed. These log-transformed signals were used for principal components analysis, hierarchical clustering, and signal histograms to determine whether there were any outlier arrays. No outliers were found. Data were analyzed using a two-way ANOVA with factors for genotype (THP^{-/-}/THP^{+/+}) and labeling batch. The contrast for THP^{-/-} versus THP^{+/+} was performed, and fold changes were calculated using the untransformed RMA signals. Probe sets with $\log_2$ expression values <3.0 were below background. Probe sets (transcripts) with average expression values <3.0 for all experimental groups (60) and Affymetrix control probe sets were removed. Hierarchical clustering of differentially expressed genes was done in Partek, using Euclidean distance for arrays and Pearson's dissimilarity for genes with average linkage.

Protein extraction, 2D-DIGE, and mass spectrometry

This experiment has been described in detail in an initial publication (17). Briefly, 2D-DIGE was performed on S3 segments isolated from wild-type (THP^{+/+}) and THP knockout (THP^{-/-}) mice using fluorescence-based-laser microdissection (performed by Applied Biomics). Briefly, an initial analytical gel was done by using $50\ \mu\text{g}$ of protein extract from each S3 sample (THP^{-/-} and THP^{+/+}). Each sample was labeled with Cy2 or Cy3, mixed, and separated on a 2D gel. In-gel data analyses for protein spots and comparison of the integrated volumetric ratios were done using the DeCyder software. Spots chosen by the DeCyder software were identified using mass spectrometry [matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI/TOF) then MALDI/TOF/TOF] on the basis of peptide fingerprint mass mapping and peptide fragmentation mapping. The Mascot search engine was used to identify proteins from primary sequence databases.

Measurement of oxidative stress in vivo

A hydrogen peroxide assay (Abcam, catalog no. 102500) was used to measure the concentration of H_2O_2 in kidney lysates from THP^{-/-} and THP^{+/+} mice, following the manufacturer's instructions. Concentrations were normalized to the amount of protein present in each sample.

Using intravital microscopy, oxidative stress was measured in the live animals with H_2DCFDA (Life Technologies). H_2DCFDA was administered intravenously as a bolus ($7\ \text{mg/kg}$) from a stock dissolved in ethanol and rediluted in PBS. Images were collected before injection and 20 min after H_2DCFDA administration, as we described previously (61). Fluorescence intensity was measured using ImageJ in three to four fields ($20\times$ objective) per animal; the values for each animal were expressed as a fold change over background intensity (image taken just before injection).

To localize the site of oxidative stress, we used an in vivo redox dye CellROX Deep Red (Life Technologies, catalog no. C10422). THP^{+/+} and THP^{-/-} mice were injected with Hoechst 33342 ($50\ \mu\text{g}$

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

per mouse; Molecular Probes, catalog no. H3570) and CellROX (50 μ l of 2.5 mM solution per mouse) intraperitoneally, and mice were euthanized 2 hours later and immediately sectioned for imaging using confocal microscopy. Another set of kidneys were fixed with 4% paraformaldehyde and imaged after costaining with FITC-phalloidin. Fluorescence intensity was measured using ImageJ in two to four fields (20 $\times$ objective) per animal, and the values for each animal were expressed as a fold change over the negative control (THP^{+/+} mouse injected with Hoechst 33342 only).

THP purification

THP was purified from normal human urine according to the method described by Tamm and Horsfall (62, 63). THP was subsequently treated with urea and resolved using gel filtration to recover a nonaggregated form in the range of 60 to 120 kDa, as we described recently (36). The purified THP was kept in a 5% dextrose water solution. In all *in vitro* experiments, the concentration of endotoxin was <0.02 endotoxin units/ml, measured using *Limulus* ameocyte lysate assay.

HK-2 cells

HK-2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (catalog no. CRL-2190) and grown in keratinocyte serum-free growth medium (Gibco, catalog no. 1074-019) according to the manufacturer's instructions. THP at a concentration of 1 μ g/ml or vehicle (5% dextrose) was added in the experimental wells. For RNA studies, cells were incubated for 1 and 4 hours, and RNA was extracted as described below. For proteomic studies, cells were harvested at 6 hours and processed for protein extraction as previously described (36). For the indicated experiments, hydrogen peroxide (1 mM) was added to HK-2 cells for 1 hour, and cells were allowed to recover in media for 1 hour before RNA extraction. All experiments were performed in triplicate. For the JNK activation experiments, cells were incubated with THP (1 μ g/ml), H₂O₂ (1 mM), or ACA (25 μ M) as indicated for 1 hour. In pretreatment experiments, cells were incubated with THP or ACA alone as indicated before adding H₂O₂ (1 mM) for an additional half an hour. All cells were allowed to recover in media for 1 hour before processing for protein extraction.

Real-time polymerase chain reaction

RNA extraction from whole kidneys and from HK-2 cells was done using TRI Reagent (Ambion, catalog no. AM9738), according to the manufacturer's protocol, and reverse transcribed as previously described (6). Real-time polymerase chain reaction was performed in an Applied Biosystems ViiA 7 system using TaqMan Gene Expression Assays, also from Applied Biosystems. The following primers were used for human cell studies: IL-23, Hs 00900828_g1 and 18S ribosomal RNA, Hs 99999901_s1. Cycling parameters were as follows: 50 °C for 2 min, then 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Expression values were normalized to endogenous controls and reported as fold change compared to control using the delta-delta CT method, according to the manufacturer's instructions.

RAC1 activation assay

RAC1 activation assay was performed using a kit from Millipore (catalog no. 17-283). Band densitometry was done using ImageJ (National Institutes of Health).

LFQMS proteomic studies

Triplicate protein extracts from HK-2 cells, treated with THP or vehicle, were analyzed using LFQMS as previously described (18, 19). Briefly, HK-2 proteins were digested with trypsin and peptides analyzed using a Thermo Finnigan linear ion-trap (LTQ) mass spectrometer coupled with a Surveyor autosampler and mass spectrometry high-performance liquid chromatography system (Thermo Finnigan). The data were collected in the "data-dependent MS/MS" mode with the ESI (electrospray ionization) interface and searched against the International Protein Index human database using SEQUEST (v. 28 rev. 12) algorithms in BioWorks (v. 3.3). The searched peptides and proteins were validated by PeptideProphet (64) and ProteinProphet (65) in the Trans-Proteomic Pipeline (v. 3.3.0) (<http://tools.proteomecenter.org/software.php>). Only proteins with probability ≥ 0.9000 and peptides with probability ≥ 0.8000 were used for quantitation.

Lipidomics and multiple reaction monitoring profiling

Lipid extraction from kidney tissue was performed according to the Bligh and Dyer protocol (66). The multiple reaction monitoring (MRM) profiling approach was applied to investigate the lipid profile of oxidized phospholipids. MRM uses direct sample injection and functional group profiling by using class-specific product ion (67). For the analysis of phospholipids, the LIPID MAPS database was used to pull the parent ions, and the specific lipid class-related product ion was added to obtain a list of transitions to be monitored by MRM scan. For the oxidized phospholipid profile methods, we added the expected mass/charge ratio value shift for one or two oxidation events to the parent mass of each lipid.

The lipid extracts were diluted in acetonitrile + methanol + 300 mM NH₄Ac at a ratio of 3:6.65:0.35 (v/v). Mass spectrometry was performed as described in detail in de Lima *et al.* (67). Briefly, for the mass spectrometry analysis, we used a capillary pump (Agilent Technologies, G1376A), operated with a flow of 20 μ l/min and a pressure of 200 bar, connected to a autosampler (1100 series, Agilent Technologies) to deliver 8 μ l of sample to the ESI source of an Agilent 6410 QQQ mass spectrometer (Agilent Technologies), operated at the source with capillary voltage of 3.5 to 5 kV and gas flow of 5.1 liters/min at 300 °C. Xcalibur data files (Agilent Technologies) were processed using an in-house script, and lists containing MRM transitions and the respective ion intensity values were exported to Microsoft Excel. Absolute ion intensity of all monitored transitions was compared to blank samples. Transitions that yielded a signal above the value seen in blank samples were used for comparative analysis. Subsequent statistical analyses were performed using MetaboAnalyst software (68). Samples were normalized by kidney weight. The Fisher's exact test was used to compare the relative fold changes of statistically different lipids by grouping increased or decreased fold changes together as a categorical variable.

Oxidative DNA damage assay

Oxidative DNA damage was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit against 8OHdG from Enzo Life Sciences (catalog no. ADI-EKS-350), according to the manufacturer's protocol. Samples from the lung and kidney were lysed in radio-immunoprecipitation assay lysis and extraction buffer (Thermo Fisher Scientific, catalog no. 89900) supplemented with Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (Thermo Fisher Scientific, catalog no. 78442) in the Precellys tissue homogenizer

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

(Bertin). Total protein concentration was measured using a modified Lowry assay from Bio-Rad (catalog no. 5000111). The concentration of 8OHdG in tissue lysates was normalized to total protein concentration. Oxidative DNA damage for the serum samples from IRI-injured mice was measured using an ELISA kit against 8OHdG from Cell Biolabs (catalog no. STA-320), according to the manufacturer's protocol.

Measurement of THP

THP concentrations in human plasma samples were measured using an ELISA kit from Sigma-Aldrich (catalog no. RAB0751), according to the manufacturer's protocol.

Clinical studies

During a 24-month period, from June 2013 to June 2015, all planned liver transplant recipients at the University of Sao Paulo, Brazil were screened before surgery for enrollment. Exclusion criteria were as follows: age less than 18 years, need for dialysis preoperatively, combined liver and kidney transplant, chronic kidney disease stage 5, and previous kidney or liver transplant. One hundred eligible patients were enrolled after voluntary informed consent was obtained as per the guidelines of the Institution Ethics Committee. The University of Sao Paulo Ethics Committee approved the study under the protocol number CAAE.06636513.4.0000.0068., following the Principles of the Declaration of Istanbul and the Declaration of Helsinki. Conforming to national guidelines, the protocol is registered in <https://clinicaltrials.gov> with the identifier NCT 02095431.

Of this cohort, we selected 41 patients, 7 with no AKI and 34 patients who developed at least stage 1 AKI, to include in our analysis. Baseline characteristics of these 34 patients were compared to nine control subjects enrolled in a study evaluating normal ranges of biomarkers of kidney injury in a healthy population. The control cohort included subjects between the ages of 18 and 90 with no known medical conditions enrolled after informed consent.

Baseline kidney function and pertinent clinical variables were extracted from electronic medical records. Blood samples were collected simultaneously in the perioperative period of liver transplant, before induction of anesthesia and at various points after surgery. Vital signs, process of care, and laboratory results were recorded daily for 7 days after liver transplant. We recorded past medical history and baseline information and collected blood (~10 ml) and urine (~250 ml) samples. Samples from these cohorts were stored at -70 °C in the O'Brien Center Core A Laboratory at the University of California San Diego. Outcomes including the development of AKI, severity stage using the KDIGO criteria (28), need for dialysis, and mortality were assessed in the intensive care unit, at hospital discharge, and 60 days after enrollment.

HEK293-TRPM2 calcium influx assay

TRPM2-HEK293 recombinant cell line was purchased from BPS Bioscience (catalog no. 90331). The cells were propagated in culture according to the manufacturer's instructions, and TRPM2 channel expression was induced with doxycycline (0.2 µg/ml) (Fisher Scientific, catalog no. ICN 19504401) 24 hours before Ca^{2+} influx experiment. Ca^{2+} influx was measured in a 96-well format in triplicates, using reagents provided in the Fluo-4 NW Calcium Assay Kit (Molecular Probes, catalog no. F36206). Cells in Ca^{2+} -free assay buffer were loaded with the reporter dye Fluo-4 and stimulated with 1.7 mM H_2O_2 . The fluorescence was monitored for ~10 min, before addition of 10 mM CaCl_2 , and the readings continued for another 10 min, at which

point the plateau was reached. In the inhibition experiments, TRP channel blocker ACA was used at 10 µM, whereas THP was used at 1 µg/ml, unless otherwise indicated. Cells were incubated with the THP or ACA in assay buffer for 20 min before stimulation with H_2O_2 . In addition to the triplicate format, most experiments were repeated a minimum of two additional times with consistent results.

Bioinformatic analysis

Bioinformatic analysis of differentially expressed proteins was performed using Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN). GENE-E (Broad Institute; <https://software.broadinstitute.org/GENE-E/>) and MetaboAnalyst 4.0 (68) were also used to perform statistical clustering and generate heat maps.

Statistical analysis

Values of each experimental group are reported as means ± SD unless otherwise indicated. All statistical tests were performed using GraphPad Prism software unless otherwise noted. A two-tailed *t* test was used to examine the difference in means for continuous data. A paired *t* test was used for samples from the same patient collected at different times. The Fisher's exact test was used to determine differences between categorical variables. Simple linear regressions were used to determine relationships between two continuous variables. Statistical significance was determined at *P* < 0.05.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

stm.sciencemag.org/cgi/content/full/11/512/eaaw3639/DC1

Fig. S1. Fluorescence-based laser microdissection and downstream transcriptomic and bioinformatic analyses.

Fig. S2. THP treatment of HK-2 cells results in inhibition of multiple RAC1-dependent pathways.

Fig. S3. Quantitation of membrane-associated and cellular RAC1 in kidney sections from THP^{+/+} and THP^{-/-} mice.

Fig. S4. Free radical scavenging proteins are down-regulated in the S3 tubules of THP^{-/-} mice.

Fig. S5. Molecules of the RAC1/JNK/c-JUN signaling network involved in free radical synthesis.

Fig. S6. ROS concentrations are increased within the S3 proximal tubules of THP^{-/-} mice.

Fig. S7. Electron microscopy studies of mitochondrial morphology in S3 segments.

Fig. S8. H_2O_2 activates IL-23 expression in HK-2 cells.

Fig. S9. THP plasma concentrations in liver transplant recipients who did not develop AKI.

Table S1. Demographic and baseline clinical data for liver transplant surgery group and healthy controls.

Data file S1. Gene arrays S3.

Data file S2. Proteomics HK-2 cell THP stimulation.

Data file S3. Oxidized phospholipidomics from kidneys.

REFERENCES AND NOTES

1. T. M. El-Achkar, X.-R. Wu, Uromodulin in kidney injury: An instigator, bystander, or protector? *Am. J. Kidney Dis.* **59**, 452–461 (2012).
2. L. Rampoldi, F. Scolari, A. Amoroso, G. Ghiggeri, O. Devuyst, The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): From tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int.* **80**, 338–347 (2011).
3. F. Serafini-Cessi, N. Malagolini, D. Cavallone, Tamm-Horsfall glycoprotein: Biology and clinical relevance. *Am. J. Kidney Dis.* **42**, 658–676 (2003).
4. M. Brunati, S. Perucca, L. Han, A. Cattaneo, F. Consolato, A. Andolfo, C. Schaeffer, E. Olinger, J. Peng, S. Santambrogio, R. Perrier, S. Li, M. Bokhove, A. Bachi, E. Hummler, O. Devuyst, Q. Wu, L. Jovine, L. Rampoldi, The serine protease hepsin mediates urinary secretion and polymerisation of Zona Pellucida domain protein uromodulin. *eLife* **4**, e08887 (2015).
5. T. M. El-Achkar, P. C. Dagher, Tubular cross talk in acute kidney injury: A story of sense and sensibility. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **308**, F1317–F1323 (2015).
6. T. M. El-Achkar, R. McCracken, Y. Liu, M. R. Heltmeier, S. Bourgeois, J. Ryser, X.-R. Wu, Tamm-Horsfall protein translocates to the basolateral domain of thick ascending limbs, interstitium, and circulation during recovery from acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304**, F1066–F1075 (2013).

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

7. T. M. El-Achkar, R. McCracken, M. Rauchman, M. R. Heitmeier, Z. Al-Aly, P. C. Dagher, X.-R. Wu, Tamm-Horsfall protein-deficient thick ascending limbs promote injury to neighboring S3 segments in an MIP-2-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **300**, F999–F1007 (2011).
8. D. Steubl, M. Block, V. Herbst, W. A. Nockher, W. Schlumberger, R. Satanovskij, S. Angermann, A. L. Hasenau, L. Stecher, U. Heemann, L. Renders, J. Scherberich, Plasma uromodulin correlates with kidney function and identifies early stages in chronic kidney disease patients. *Medicine* **95**, e3011 (2016).
9. C. Thornley, A. Dawney, W. R. Cattell, Human Tamm-Horsfall glycoprotein: Urinary and plasma levels in normal subjects and patients with renal disease determined by a fully validated radioimmunoassay. *Clin. Sci. (Lond.)* **68**, 529–535 (1985).
10. P. S. Garimella, M. L. Biggs, R. Katz, J. H. Ix, M. R. Bennett, P. Devarajan, B. R. Kestenbaum, D. S. Siscovick, M. K. Jensen, M. G. Shlipak, P. H. M. Chaves, M. J. Sarnak, Urinary uromodulin, kidney function, and cardiovascular disease in elderly adults. *Kidney Int.* **88**, 1126–1134 (2015).
11. G. E. Delgado, M. E. Kleber, H. Schrnagl, B. K. Krämer, W. März, J. E. Scherberich, Serum uromodulin and mortality risk in patients undergoing coronary angiography. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 2201–2210 (2017).
12. P. S. Garimella, R. Katz, J. Ix, L. Fried, S. Kritchevsky, P. Devarajan, M. Bennett, C. Parikh, M. Shlipak, T. M. El-Achkar, Tamm-Horsfall protein regulates granulopoiesis and systemic neutrophil homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 2172–2182 (2015).
13. A. Leherer, A. Muendlein, C. H. Saely, J. Ebner, E. M. Brandtner, P. Fraunberger, H. Drexel, Serum uromodulin is a predictive biomarker for cardiovascular events and overall mortality in coronary patients. *Int. J. Cardiol.* **231**, 6–12 (2017).
14. R. Micanovic, B. R. Chittett, P. C. Dagher, E. F. Srou, S. Khan, T. Hato, A. Lyle, Y. Tong, X.-R. Wu, T. M. El-Achkar, Tamm-Horsfall protein regulates granulopoiesis and systemic neutrophil homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 2172–2182 (2015).
15. T. Hato, T. M. El-Achkar, P. C. Dagher, Sisters in arms: Myeloid and tubular epithelial cells shape renal innate immunity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304**, F1243–F1251 (2013).
16. T. M. El-Achkar, X.-R. Wu, M. Rauchman, R. McCracken, S. Kiefer, P. C. Dagher, Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TR4 expression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F534–F544 (2008).
17. R. Micanovic, S. Khan, T. M. El-Achkar, Immunofluorescence laser micro-dissection of specific nephron segments in the mouse kidney allows targeted downstream proteomic analysis. *Physiol. Rep.* **3**, e12306 (2015).
18. X. Lai, L. Wang, H. Tang, F. A. Witzmann, A novel alignment method and multiple filters for exclusion of unqualified peptides to enhance label-free quantification using peptide intensity in LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **10**, 4799–4812 (2011).
19. X. Lai, L. Wang, F. A. Witzmann, Issues and applications in label-free quantitative mass spectrometry. *Int. J. Proteomics* **2013**, 756039 (2013).
20. A. Minden, A. Lin, F.-X. Claret, A. Abo, M. Karin, Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147–1157 (1995).
21. R. M. Prieto-Sánchez, X. R. Bustelo, Structural basis for the signaling specificity of RhoG and Rac1 GTPases. *J. Biol. Chem.* **278**, 37916–37925 (2003).
22. W. Liu, X. Ouyang, J. Yang, J. Liu, Q. Li, Y. Gu, M. Fukata, T. Lin, J. C. He, M. Abreu, J. C. Unkles, L. Mayer, H. Xiong, AP-1 activated by toll-like receptors regulates expression of IL-23 p19. *J. Biol. Chem.* **284**, 24006–24016 (2009).
23. S. Winfree, S. Khan, R. Micanovic, M. T. Eadon, K. J. Kelly, T. A. Sutton, C. L. Phillips, K. W. Dunn, T. M. El-Achkar, Quantitative three-dimensional tissue cytometry to study kidney tissue and resident immune cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 2108–2118 (2017).
24. Y. Liu, T. M. El-Achkar, X.-R. Wu, Tamm-Horsfall protein regulates circulating and renal cytokines by affecting glomerular filtration rate and acting as a urinary cytokine trap. *J. Biol. Chem.* **287**, 16365–16378 (2012).
25. L. J. Kroese, P. G. Scheffer, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: A systematic review. *Curr. Atheroscler. Rep.* **16**, 452 (2014).
26. K. Grynberg, K. R. Polkinghorne, S. Ford, F. Stenning, T. E. Lew, J. A. Barrett, S. A. Summers, Early serum creatinine accurately predicts acute kidney injury post cardiac surgery. *BMC Nephrol.* **18**, 93 (2017).
27. A. Saratzis, N. Melas, A. Mahmood, P. Sarafidis, Incidence of Acute Kidney Injury (AKI) after Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair (EVAR) and impact on outcome. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **49**, 534–540 (2015).
28. J. A. Kellum, N. Lameire, KDIGO AKI Guideline Work Group, Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: A KDIGO summary (Part 1). *Crit. Care* **17**, 204 (2013).
29. E. Fonfria, I. C. B. Marshall, C. D. Benham, I. Boyfield, J. D. Brown, K. Hill, J. P. Hughes, S. D. Skaper, S. McNulty, TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 186–192 (2004).
30. M. Nie, M. S. Bal, J. Liu, Z. Yang, C. Rivera, X.-R. Wu, J. G. J. Hoenderop, R. J. M. Bindels, D. K. Marciano, M. T. F. Wolf, Uromodulin regulates renal magnesium homeostasis through the ion channel transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6). *J. Biol. Chem.* **293**, 16488–16502 (2018).
31. R. Kraft, C. Grimm, H. Frenzel, C. Harteneck, Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid. *Br. J. Pharmacol.* **148**, 264–273 (2006).
32. M. Uhlén, L. Fagerberg, B. M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A.-K. Szegedy, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, J. Johansson, M. Zwaalen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Pontén, Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
33. K. Togashi, H. Inada, M. Tominaga, Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br. J. Pharmacol.* **153**, 1324–1330 (2008).
34. G. Gao, W. Wang, R. K. Tadagavadi, N. E. Briley, M. I. Love, B. A. Miller, W. B. Reeves, TRPM2 mediates ischemic kidney injury and oxidant stress through RAC1. *J. Clin. Invest.* **124**, 4989–5001 (2014).
35. J. Y. Cheung, B. A. Miller, Transient receptor potential-melastatin channel family member 2: Friend or foe. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **128**, 308–329 (2017).
36. R. Micanovic, S. Khan, D. Janosevic, M. E. Lee, T. Hato, E. F. Srou, S. Winfree, J. Ghosh, Y. Tong, S. E. Rice, P. C. Dagher, X. R. Wu, T. M. El-Achkar, Tamm-Horsfall protein regulates mononuclear phagocytes in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 841–856 (2018).
37. H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, F. Antunes, Hydrogen peroxide sensing, signalling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* **2**, 535–562 (2014).
38. H. Sies, Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **289**, 8735–8741 (2014).
39. D. R. Gough, T. G. Cotter, Hydrogen peroxide: A Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis.* **2**, e213 (2011).
40. M. Schrader, H. D. Fahimi, Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1755–1766 (2006).
41. H. Kaneto, T.-a. Matsuo, Y. Nakatani, D. Kawamori, T. Miyatsuka, M. Matsuhisa, Y. Yamashita, Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J. Mol. Med.* **83**, 429–439 (2005).
42. Y. Zhang, Y. He, L.-L. Lu, Z.-Y. Zhou, N.-B. Wan, G.-P. Li, X. He, H.-W. Deng, miRNA-192-5p impacts the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin via targeting peptidylprolyl isomerase A. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **35**, 17–23 (2019).
43. T. C. De Bessa, A. Pagano, A. L. S. Moretti, P. V. S. Oliveira, S. A. Mendonça, H. Kovacic, F. R. M. Laurindo, Subverted regulation of Nox1 NADPH oxidase-dependent oxidant generation by protein disulfide isomerase A1 in colon carcinoma cells with overactivated Kras. *Cell Death Dis.* **10**, 143 (2019).
44. Y. Zhang, X. Yu, Z. Wang, M. Yin, Z. Zhao, Y. Li, W. Li, Pokeweed antiviral protein attenuates liver fibrosis in mice through regulating Wnt/Jnk mediated glucose metabolism. *Saudi J. Gastroenterol.* **24**, 157–164 (2018).
45. Q. Li, M. Zhang, L. Xuan, Y. Liu, C. Chen, Anagliptin inhibits neointimal hyperplasia after balloon injury via endothelial cell-specific modulation of SOD-1/RhoA/JNK signaling in the arterial wall. *Free Radic. Biol. Med.* **121**, 105–116 (2018).
46. T. Kobayashi, A. Shiozaki, Y. Nako, D. Ichikawa, T. Kosuga, K. Shoda, T. Arita, H. Konishi, S. Komatsu, T. Kubota, H. Fujiwara, K. Okamoto, M. Kishimoto, E. Konishi, Y. Marunaka, E. Otsuji, Chloride intracellular channel 1 as a switch among tumor behaviors in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **9**, 23237–23252 (2018).
47. X. Qi, K. T.-P. Ng, Y. Shao, C. X. Li, W. Geng, C. C. Ling, Y. Y. Ma, X. B. Liu, J. Liu, W. H. Yeung, C. M. Lo, K. Man, The clinical significance and potential therapeutic role of GPx3 in tumor recurrence after liver transplantation. *Theranostics* **6**, 1934–1946 (2016).
48. S. Jang, L.-R. Yu, M. A. Abdelmegeed, Y. Gao, A. Banerjee, B. J. Song, Critical role of c-jun N-terminal protein kinase in promoting mitochondrial dysfunction and acute liver injury. *Redox Biol.* **6**, 552–564 (2015).
49. Y. Yu, P. F. Kang, H. H. Li, G. J. Zhang, F. F. Wang, H. W. Ye, Q. Gao, Effects of activation of ALDH2 by ethanol on the expression of JNK in kidney of diabetic rats. *Zhongguo Ying Yang Sheng Li Xue Za Zhi* **30**, 270–273 (2014).
50. A. Prakasham, S. Ghose, N. V. Oleinik, J. R. Bethard, Y. K. Peterson, N. I. Krupenko, S. A. Krupenko, JNK1/2 regulate Bid by direct phosphorylation at Thr59 in response to ALDH1L1. *Cell Death Dis.* **5**, e1358 (2014).
51. C. Xin, W. Yan-Fu, H. Ping, G. Jing, W. Jing-Jing, M. Chun-Li, L. Wei, C. Bei, Study of the insulin signaling pathways in the regulation of ACAT1 expression in cultured macrophages. *Cell Biol. Int.* **33**, 602–606 (2009).
52. A. T. Whaley-Connell, E. M. Morris, N. Rehmer, J. C. Yaghoubian, Y. Wei, M. R. Hayden, J. Habibi, C. S. Stump, J. R. Sowers, Albumin activation of NAD(P)H oxidase activity is mediated via Rac1 in proximal tubule cells. *Am. J. Nephrol.* **27**, 15–23 (2007).
53. M. Lee, I. Choi, K. Park, Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation. *J. Neurochem.* **82**, 867–873 (2002).

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

54. A. Leiberer, A. Muendlein, C. H. Saely, E. M. Brandtner, K. Geiger, P. Fraunberger, H. Drexel, The value of uromodulin as a new serum marker to predict decline in renal function. *J. Hypertens.* **36**, 110–118 (2018).
 55. M. Trudu, S. Janas, C. Lanzani, H. Debaix, C. Schaeffer, M. Ikehata, L. Citterio, S. Demaretz, F. Trevisani, G. Ristagno, B. Glaudemans, K. Laghmani, G. Dell'Antonio; SKIPOGH Team, J. Loffing, M. P. Rastaldi, P. Manunta, O. Devuyst, L. Rampoldi, Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression. *Nat. Med.* **19**, 1655–1660 (2013).
 56. J. C. Jha, C. Banal, B. S. M. Chow, M. E. Cooper, K. Jandeleit-Dahm, Diabetes and kidney disease: Role of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 657–684 (2016).
 57. S. Yamamoto, S. Shimizu, Targeting TRPM2 in ROS-coupled diseases. *Pharmaceuticals* **9**, 57 (2016).
 58. M. J. Ryan, G. Johnson, J. Kirk, S. M. Fuerstenberg, R. A. Zager, B. Torok-Storb, HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* **45**, 48–57 (1994).
 59. B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, M. Åstrand, T. P. Speed, A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185–193 (2003).
 60. J. N. McClintick, H. J. Edenberg, Effects of filtering by Present call on analysis of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* **7**, 49 (2006).
 61. T. Hato, S. Winfree, R. Kalakeche, S. Dube, R. Kumar, M. Yoshimoto, Z. Plotkin, P. C. Dagher, The macrophage mediates the renoprotective effects of endotoxin preconditioning. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 1347–1362 (2015).
 62. I. Tamm, F. L. Horsfall Jr., Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74**, 106–108 (1950).
 63. I. Tamm, F. L. Horsfall Jr., A mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps, and Newcastle disease viruses, and Newcastle disease viruses. *J. Exp. Med.* **95**, 71–97 (1952).
 64. A. Keller, A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–5392 (2002).
 65. A. I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–4658 (2003).
 66. E. G. Bligh, W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
 67. C. B. de Lima, C. R. Ferreira, M. P. Milazzotto, T. J. P. Sobreira, A. A. Vireque, R. G. Cooks, Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. *J. Mass Spectrom.* **53**, 1247–1252 (2018).
 68. J. Chong, O. Soufan, C. Li, I. Caraus, S. Li, G. Bourque, D. S. Wishart, J. Xia, MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, W486–W494 (2018).
- Acknowledgments:** We acknowledge the Susan G. Komen Tissue Bank for assistance with laser microdissection (<https://komentissuebank.iu.edu/>), the Multiplex Analysis Core at the IU Melvin and Bren Simon Cancer Center for providing support in sample analysis and data interpretation, and C. Ferreira of the Bindley Bioscience Center (Purdue University) for assistance in lipidomic analyses. **Funding:** This work was supported by The National Institute of Diabetes Digestive and Kidney Disease (NIDDK; 1R01DK111651 and P30DK079312 to T.M.E.-A. and K23DK114556 to P.S.G.), a Veterans Affairs Merit Award to T.M.E.-A., an American Society of Nephrology Ben J. Lipps award to K.A.L., and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (process number 2013/12710-2 to C.L.). We acknowledge support from the UAB-UCSD O'Brien Core Center for Acute Kidney Injury Research (supported by NIH P30-DK079337) for this project. **Author contributions:** K.A.L., R.M., and T.M.E.-A. designed, analyzed, and interpreted experiments and wrote the manuscript. T.H., P.C.D., and X.-R.W. analyzed data and edited the manuscript. Laser microdissection was performed by S.K. Transcriptomic and proteomic data acquisition and analysis was performed by Jeanette M., F.A.W., and C.L.P. Imaging experiments and analysis were performed by S.K., T.M.E.-A., T.H., S.W., and P.C.D. Protein biochemistry experiments were performed by K.A.L. and R.M. Experiments in the tissue culture models were performed by K.A.L., S.K., and R.M., with Jared M. assisting in interpretation and experimental design. Animal studies were conducted by K.A.L., S.K., T.M.E.-A., and R.M. Collection of human cohort data was performed by E.M., P.S.G., and C.L. **Competing interests:** T.M.E.-A. and R.M. have applied for a patent related to this work titled "Modified Tamm-Horsfall protein and related compositions and methods of use" (publication number US 2018/0305420 A1). **Data and materials availability:** All data associated with this study are available in the paper or the Supplementary Materials.
- Submitted 12 December 2018
Resubmitted 26 April 2019
Accepted 22 August 2019
Published 2 October 2019
10.1126/scitranslmed.aaw3639
- Citation:** K. A. LaFavers, E. Macedo, P. S. Garimella, C. Lima, S. Khan, J. Myslinski, J. McClintick, F. A. Witzmann, S. Winfree, C. L. Phillips, T. Hato, P. C. Dagher, X.-R. Wu, T. M. El-Achkar, R. Micanovic, Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw3639 (2019).

Downloaded from <http://stm.sciencemag.org/> by guest on March 25, 2021

Science Translational Medicine

Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel

Kaice A. LaFavers, Etienne Macedo, Pranav S. Garimella, Camila Lima, Shehnaz Khan, Jered Myslinski, Jeanette McClintick, Frank A. Witzmann, Seth Winfree, Carrie L. Phillips, Takashi Hato, Pierre C. Dagher, Xue-Ru Wu, Tarek M. El-Achkar and Radmila Micanovic

Sci Transl Med 11, eaaw3639.
DOI: 10.1126/scitranslmed.aaw3639

The oxidative hypothesis

Elevated plasma concentration of the kidney-derived protein uromodulin (THP) has been associated with better kidney function and decreased mortality in patients with and without kidney diseases. However, causal relationship and underlying mechanisms remain unclear. Now, LaFavers *et al.* used transgenic mice and showed that THP deletion resulted in systemic oxidative damage induced by activation of the transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) channel. In plasma samples from patients with kidney injury, THP was negatively correlated with ROS expression, and oxidative damage was associated with increased mortality. TRPM2 inhibition in a mouse model of kidney injury reduced the injury-mediated ROS increase.

ARTICLE TOOLS

<http://stm.sciencemag.org/content/11/512/eaaw3639>

SUPPLEMENTARY MATERIALS

<http://stm.sciencemag.org/content/suppl/2019/09/30/11.512.eaaw3639.DC1>

RELATED CONTENT

<http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/11/474/eaaw0532.full>
<http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/7/279/279a36.full>
<http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/10/441/eaan4886.full>
<http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/12/530/eaax1337.full>

REFERENCES

This article cites 68 articles, 13 of which you can access for free
<http://stm.sciencemag.org/content/11/512/eaaw3639#BIBL>

PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

Science Translational Medicine (ISSN 1946-6242) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Translational Medicine* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2019 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works

Downloaded from <http://stm.sciencemag.org> by guest on March 25, 2021

Conclusão.

7.5 Anexo 5 – Capítulo dde Livro “Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury”

Chapter

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury

Camila Lima, Maria de Fatima Vattimo and Etienne Macedo

Abstract

Acute kidney injury (AKI) is a common complication in several settings inside and outside hospitals. It affects millions of people around the world, and despite high levels of research funding, there is no specific treatment that changes the disease course. The basis for unfavorable outcomes related to this disease is the failure to provide early diagnosis. Currently, the diagnosis of AKI is based on serum creatinine and urine output, and both measures have several limitations, making early diagnosis difficult. In recent decades, several biomarkers of kidney injury have been proposed, with neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) being one of most studied and promising for use in early diagnosis. Despite there being several studies on NGAL, it has not yet been applied in clinical practice; thus, furthering the understanding of the development, interpretation, and limitations of NGAL in the diagnosis of AKI is the objective of this chapter.

Keywords: acute kidney injury, biomarkers, neutrophil gelatinase-associated lipocalin

1. Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a frequent complication in several clinical settings, including large surgeries [1], emergency departments [2, 3], and intensive care units (ICUs) [4]. The incidence of AKI has been increasing over the years, with about 2 million people being affected in 2010 [5], despite the efforts of researchers and organizations [6–8]. AKI is commonly followed by worse outcomes: prolonged length of ICU and hospital stay, need for dialysis, decreases in the glomerular filtration rate (GRF), development of chronic kidney disease (CKD), and increases in mortality [9–11].

In recent decades, therapeutic interventions aimed at reversing kidney dysfunction have had disappointing results in multiple settings; thus, the research focus has shifted from treatment to prevention and early detection by focusing on two main issues: diagnostic criteria and early diagnosis. In 2004, the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) sought a more uniform definition of AKI, and the most recent consensus definition was published in 2012 by Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) [8]. The diagnosis of AKI is based on changes in serum creatinine (Scr) and urine output (UO), but neither marker is kidney specific. Efforts have been made to identify novel biomarkers that have high sensitivity and specificity.

Inflammation

The standardization of the diagnosis of AKI allowed us to compare the diagnoses made in different settings. However, the issue of early diagnosis is still a challenge. First, there are limitations regarding the use of Scr and UO. Second, determining the need for renal replacement therapy is difficult due to a lack of information about whether the AKI is transient or persistent. Last, the research advances identifying early biomarkers have thus far been inaccessible in clinical practice [12].

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) [13] has been far and away the most promising biomarker to help fill this gap, and its diagnostic capabilities as a biomarker have been confirmed in a large number of clinical trials. This chapter aims to present information on the role of NGAL in the renal injury process, its expression in the kidney, confounding factors, the type of assay used, whether plasma or urine NGAL has better accuracy, the cutoff values in normal individuals, the accuracy of NGAL for diagnosing AKI, and the evaluation of other outcomes.

2. The role of NGAL

In 1993, Kjeldsen et al. [13] isolated lipocalin as a protease-resistant polypeptide covalently bound to neutrophil gelatinase, named neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), also known as siderocalin, lipocalin 2 or oncogene 24p [14].

NGAL is a 25 kilodalton (kDa) protein covalently bound to gelatinase in neutrophil-specific granules. NGAL is expressed at very low levels in various human tissues, including the kidneys, uterus, prostate, salivary gland, trachea, lungs, stomach, and adult and fetal colon [15, 16]. The anti-inflammatory function of NGAL is demonstrated by increased NGAL expression in proliferative epithelia, inflammatory areas, and intestinal malignancies [17].

In normal kidneys, the expression of NGAL is mainly released by the thick ascending limb and the intercalated cells of the thick collecting duct. Some NGAL expression is also present in the proximal tubular epithelium, once NGAL is filtered by the glomerulus and reabsorbed by the proximal tubule in a megalin-dependent manner [17, 18]. The physiological function of NGAL in the kidneys is unknown; however, the role of NGAL in renal morphogenesis is under consideration [19]. NGAL also has a predominant role in the regulation of cell proliferation, repair processes, and tubular reepithelization. NGAL expression corresponds to an additional iron transport pathway, which increases the transcription of hemoxygenase, an enzyme with proliferative and antiapoptotic effects that protects and preserves proximal tubular cells [20, 21].

Several biological functions for NGAL have been suggested; in the kidney, NGAL release is associated with ischemic or nephrotoxic insults. Additionally, a decrease in tubular reabsorption after AKI may lead to a further increase in urinary NGAL concentration, resulting in acquiring a status of the “troponin” of the kidneys [22–24].

KEY POINT: The role of NGAL remains unclear, but its release mainly from the distal tubule has been associated with an increase in kidney injury.

3. Confounding factors affecting NGAL

The conditions that can interfere with the performance, sensitivity, and specificity of NGAL, already identified as a biomarker, are sepsis, chronic obstructive pulmonary disease, and cardiac dysfunction, and the presence of these conditions may act as confounding factors for NGAL measurements. The predictive performance of NGAL seems to also be influenced by age (higher predictive value

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93650>

in children than in older patients), sex (higher predictive value in female patients than in male patients), urinary tract infection, and impaired renal function (higher predictive value in patients with chronic kidney disease) [25–27].

Sepsis will be more thoroughly addressed in the next chapter.

KEY POINT: Controlling for confounding factors in clinical trials is vital to maintain the internal validity of a study.

4. Types of NGAL assays

The commercialization of NGAL as the gold standard for the diagnosis of AKI is somewhat controversial [28]. There are many types of NGAL assays available on the market that use different nonautomated ELISA platforms, which makes it difficult for comparisons to be made among studies from around the world.

The first kit for the quantitative and automated determination of NGAL by the ELISA method was developed by Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA) for the urinary evaluation of NGAL, with a cutoff value of 141 $\mu\text{g/L}$ (95% CI 125–158 $\mu\text{g/L}$). An EDTA plasma blood test was created by the Triage Meter platform (Biosite-Inverness Medical, Waltham, USA) with a cutoff value of 163 μL (CI 109–221 μL) [29].

Bioporto (Bioporto Diagnostics A/S, Gentofte, Denmark) developed a new particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) that has the advantages of flexibility (adaptation for clinical use in different analyzers), automation (closer to clinical practice), and applicability in different biological matrices (urine and plasma) [30].

The chemiluminescence test is an alternative to assess NGAL, and it is commonly used to analyze studies with small animals since it is possible to do the analysis with few substrates [31].

Because there are three known molecular forms of NGAL, the assay of interest should differentiate the 25 kDa NGAL monomer produced by the monocyte tubular epithelial cells from other forms of NGAL: 45 kDa NGAL, from the homodimer predominantly secreted by neutrophils, and the 145 kDa NGAL/matrix metalloproteinase-9 (MMP9) covalently complexed heterodimer [32, 33].

According to Mårtensson et al. [34] and Cai et al. [33], the combination of two ELISAs, may improve the diagnostic accuracy of NGAL, one to determine the monomeric form and the other to determine the homodimeric form.

The confounding factor of sepsis is described herein and is dependent on the assay method, as well as whether the chosen kit is less sensitive to 25 kDa NGAL expressed by tubular epithelial cells. The test can also measure the 45 kDa homodimer predominantly secreted by neutrophils, which are common in sepsis, and the increase in neutrophils increases homodimeric NGAL expression and results in false positives.

KEY POINT: Choose a method closer to those used in clinical practice and a test more accurate for measuring the monomeric form of NGAL expressed by tubular epithelial cells after injury.

5. Plasma or urine NGAL measurement and normalization of urine values

The consensus is clear that NGAL measured in urine has better performance [35], because the release and increase in NGAL will occur first in urine. However, the collection of urine depends on the urine output, which is sometimes not available. Some benefits of plasma NGAL are that it is available at any time and is more accurate in anuric or oliguric patients.

Inflammation

The issue about the normalization of urinary NGAL by correction for the urinary creatinine level is debatable, but it has been used to correct for urine output in cases of oliguria or pollakiuria, avoiding inaccurate concentration or dilution measurements of the biomarkers. The fact is that the creatinine release time is different from the biomarker release time, and the normalized level will be affected by this difference and will not represent a real physiological value [36].

KEY POINT: Urinary NGAL is released earlier than plasma NGAL, and the accuracy of the normalization of urinary NGAL by creatinine is debatable.

6. Cutoff values of NGAL in normal individuals

The determination of normal NGAL levels in healthy adults has been inadequately described in the literature. However, some studies have been performed, such as that of Cullen et al. [26], which analyzed urine by the Abbot-Architect assay in 174 healthy people (100 men and 74 women aged between 19 and 88 years). The value of the immunoassay result was normalized by urinary creatinine, and the cut-off value was 107 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (13 $\mu\text{g}/\text{mmol}$). There was a higher concentration of creatinine-normalized urinary NGAL in women, in the elderly and in patients with leukocyturia.

The study reported by Stejkal et al. [37] analyzed BioVendor's NGAL assay using the serum of 136 healthy, nonobese individuals (53 men and 83 women). The authors reported median NGAL values (78.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ for men and 80 $\mu\text{g}/\text{L}$ for women). Pernemans et al. [27] analyzed the NGAL ELISA (RD System Europe, Abingdon, UK) and other urinary biomarkers in 338 healthy individuals (199 women and 139 men, aged 0 to 95 years). They reported that the NGAL reference range of the 21–95 years age group was 73.88–211.16 $\mu\text{g}/\text{L}$ in women and 149.26–182.58 $\mu\text{g}/\text{L}$ in men, and there was higher expression in elderly individuals.

An NGAL PETIA (Bioparto Diagnostics A/S, Gentofte, Denmark) [36] was evaluated for 200 healthy nonobese individuals (137 men and 63 women, with a mean age of 39 years (SD 11.2)). They proposed reference plasma concentrations from 38.7–157.6 ng/ml for women and 24.4–142.5 ng/ml for men and proposed reference urine concentrations of <9–54.5 ng/ml for both sexes. The authors reported that the mean values in men were higher than in women, 78.9 ng/ml vs. 73.8 ng/ml, respectively; there was a significant difference in NGAL in relation to age.

In addition to the variability of the chosen immunoassay, the unit of measurement in the interpretation of the NGAL studies should be considered—the most commonly found are ng/ml, $\mu\text{g}/\text{L}$, ng/dl, mg/ml and $\mu\text{g}/\text{mmol}$.

KEY POINT: The median cutoff value for urinary NGAL in healthy men was between 78.8 and 182.58 $\mu\text{g}/\text{L}$, and the median plasma value was between 24.4 and 142.5 ng/ml in men. The broad variability of the results difficult to interpret.

7. NGAL to predict AKI

NGAL is the most widely investigated AKI biomarker. Its performance for predicting AKI has been evaluated in various settings, such as in pediatric and adult cardiac surgery patients, in critically ill patients, and in patients in the emergency room, as well in kidney transplant and other settings [38, 39].

Numerous studies have demonstrated the ability of NGAL to diagnose AKI. For example, the study reported by Constantin et al. [40], that evaluated the plasma NGAL of 88 patients at ICU admission, found a sensitivity of 82%, specificity of 97% and AUC of 0.92 to cut-off value of 155 mmol/L to predictor of AKI.

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93650>

A multicenter study, reported by Di Somma et al. [41], with 665 patients admitted to the emergency department, assessed plasma NGAL in several points after admission. Serial evaluation of NGAL at times zero and six hours provided a high negative predictive value (NPV) (98%) to rule out the diagnosis of AKI within six hours of the arrival of patients to the emergency department. The NGAL value at admission could demonstrate a strong predictive value for in-hospital mortality of the patient, with a cut-off value of 400 ng/ml.

In the meta-analysis by Haase et al. [42]—with 19 studies, totaling 2538 patients, of whom 487 (19.2%) developed AKI—NGAL was demonstrated to have diagnostic and prognostic value for AKI, with an OR of 18.6 (95% CI 9–38.1) and AUC of 0.81 (95% CI 0.73–0.89). The cut-off value ranged from 100 to 270 ng/ml, but a value of 150 ng/dl was suggested for the diagnosis of AKI.

In another recent meta-analysis by Zhou et al. [39]—with 24 studies, a total of 4066 patients from 9 countries, including studies with serum and urinary NGAL—the sensitivity for the diagnosis of AKI was 0.68 (95% CI, 65–0.70), and the specificity was 0.79 (95% CI 0.77–0.80).

In the study by Singer et al. [38], urinary NGAL was useful for classifying and stratifying patients with established AKI: the level of NGAL >104 µg/L indicated intrinsic AKI (odds ratio of 5.97), while the level of NGAL <47 µg/L indicated unlikely intrinsic AKI (odds ratio of 0.2). In the logistic regression analysis, NGAL was able to predict the worsening of the RIFLE class, the need for RRT and in-hospital mortality. The performance of NGAL to evaluate other outcomes will be discussed in the next chapter.

KEY POINT: *Despite the good results of NGAL for predicting AKI, the variability of the cutoff value is still a challenge for applying NGAL in clinical practice.*

8. The early timing diagnosis by NGAL versus standard serum creatinine

The study by Bennett et al. [43] clearly indicated that urinary NGAL is a powerful early biomarker of AKI after cardiopulmonary bypass that preceded the increase in serum creatinine by 2–3 days. Studies have shown that elevation of NGAL is detectable after 3 hours and peaks approximately 6–12 hours after injury. The elevation can persist up to 5 days according to the severity of injury [44–46]. In addition to Bennett's study, other studies in general have failed to reach conclusions about the early timing diagnosis of NGAL, which is the main finding required to reach a therapeutic window and better evaluate future medication targets in AKI.

KEY POINT: *If you perform a study or analyze a biomarker, remember to compare the pattern of biomarker early timing diagnosis with serum creatinine.*

9. Evaluation of other outcomes by NGAL

Several studies have assessed the diagnostic value of NGAL to predict AKI, but only a few have analyzed the early diagnosis in hours/days and compared it with serum creatinine, as seen in the last chapter. Still fewer studies have evaluated the predictive performance of NGAL in other outcomes, such as the need for RRT, recovery of renal function, progression to end stage renal disease (ESRD) and mortality, which will be discussed in this chapter.

In the meta-analysis by Hall et al. [47], for 91 kidney transplant patients, the incidence of need for RRT was 4.3%, and NGAL, in this scenario, had an OR of 12.9 and AUC of 0.78. In the same study, NGAL and urinary IL18 were predictors of the need for RRT up to 1 week after transplantation. NGAL presented a good AUC of

Inflammation

0.81 (95% CI 0.70–0.92) 6 hours after transplantation and was also a predictor of graft recovery for up to 3 months.

In the study conducted by Constantin et al. [40], the cutoff value of NGAL to assess the need for RRT was 330 mmol/L. The value of urinary NGAL (Architect, Abbot Park, IL) was correlated with the need for dialysis (r : 0.48 P : 0.01), presenting an AUC of 0.86 2 hours after cardiopulmonary bypass in children [43].

A recent meta-analysis by Klein et al. analyzed 12 studies to predict the need for RRT and found an AUC of 0.70 (95% CI 0.63–0.80) for NGAL [48].

Bhavsar et al. [49] concluded that higher levels of NGAL (measured by the Luminex assay) were associated with stage 3 CKD incidence. Some researchers have discussed whether the association of NGAL level is not exclusively related to the increase in neutrophils already described by Tian et al. [50] and maintain that further studies would be needed to elucidate this issue.

In the meta-analysis by Haase et al. [42], the incidence of mortality was 5.4%, and NGAL, in this scenario, showed an OR of 8.8 and AUC of 0.70.

In the Ariza study [51], PNGAL and UNGAL were demonstrated to be strong predictors of prognosis, and UNGAL was significantly predictive of the MELD score using the 28-day mortality score AUC of 0.88 (0.83–0.92).

In the study by Bennett et al. [43], the value of urinary NGAL (Architect, Abbot Park, IL) was also correlated with mortality (r : 0.53 p 0.01), with an AUC of 0.91, 2 hours after cardiopulmonary bypass in children.

The study by Dent et al. [52], using PNGAL (Biosite Inc., San Diego, USA) in 120 children undergoing cardiopulmonary bypass (CBP) and a cut-off value of 150 ng/ml and AKI prediction, found an AUC of 0.96 2 hours after CBP. PNGAL was also strongly correlated with the duration of AKI (r = 0.57, p < 0.001) and hospital stay time (r = 0.44, p < 0.001), and PNGAL at 12 hours was correlated with mortality (r = 0.48, p : 0.004).

In the study by Daniels et al. [53], PNGAL (Alere Inc., Waltham, USA) was measured in 1393 adult patients with cardiovascular disease (CVD) who were followed for 11 years. Of these, 436 did not survive, and 169 died from CVD. PNGAL was a predictor of CVD mortality, with a risk ratio of 1.33% and a risk ratio of 1.19% for all causes of mortality.

KEY POINT: *Evaluating outcomes by NGAL beyond the limitation of only the diagnosis of AKI is important to know how more than one parameter evaluates the outcome and prognosis, and it could help physicians by indicating an early need for RRT, for example.*

10. Conclusion

This brief review, based on accumulated evidence, discussed the role and value of NGAL in the diagnosis and prognosis of AKI. Studies' findings suggest that induction of NGAL plays an important role in kidney function preservation, reducing apoptosis, and enhancing proliferative responses. In kidney injury, rapid and massive upregulated synthesis of NGAL occurs in the distal tubule, which quickly increases the concentration of NGAL in urine [54]. In addition, other important considerations have been provided as "key point" to help researchers move the NGAL analysis to clinical practice as soon as possible.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this chapter.

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93650>

IntechOpen

Author details

Camila Lima^{1,*†}, Maria de Fatima Vattimo^{2‡} and Etienne Macedo^{1,3§}

1 Internal Medicine Department, Nephrology Division, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

2 Medical Surgical Department, School of Nursing, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

3 Department of Medicine, Nephrology Division, University of California, San Diego, USA

*Address all correspondence to: camilaxlima@gmail.com

† Current Address: 455 Av. Arnaldo Dr, 01246-903, Cerqueira Cesar, Sao Paulo, Brazil.

‡ Current Address: 419 Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar, Cerqueira Cesar, Sao Paulo, Brazil.

§ Current Address: 9500 Gilman Dr, MC 0892, La Jolla, California, United States of America.

IntechOpen

© 2020 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Inflammation***References**

- [1] Zhou F, Luo Q, Wang L, Han L. Diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for early diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: A meta-analysis. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016;**49**(3):746-755. DOI: 10.1093/ejcts/ezv199
- [2] Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, 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*. 2008;**148**:810-819
- [3] Di Somma S, Magrini L, Berardinis B, Marino R, Ferri E, Moscatelli P, et al. Additive value of blood neutrophil gelatinase associated lipocalin to clinical judgement in acute kidney injury diagnosis and mortality prediction in patients hospitalized from the emergency department. *Critical Care*. 2013;**17**(29):1-13. DOI: 10.1186/cc12510
- [4] Constantin JM, Futier E, Perbet S, Roszyk L, Lautrette A, Gillart T, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: A prospective study. *Journal of Critical Care*. 2010;**25**(1):176.e1-176.e6. DOI: 10.1016/j.jcrc.2009.05.010
- [5] Ali T, Roderick P. *Epidemiology of Acute Kidney Injury*. Berlin Heidelberg: Springer; 2010
- [6] Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, et al. Acute kidney disease and renal recovery: Consensus report of the acute disease quality initiative (ADQI) 16 workgroup. *Nature Reviews. Nephrology*. 2017;**13**(4):241-257
- [7] Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, et al. Acute kidney injury network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care*. 2007;**11**(2):1-8
- [8] Kidney. Disease improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney International. Supplement*. 2012;**2**:1-138
- [9] Afonso RC, Hidalgo R, Zurstrassen MP, Fonseca LE, Pandullo FL, Rezende MB, et al. Impact of renal failure on liver transplantation survival. *Transplantation Proceedings*. 2008;**40**:808-810
- [10] Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005;**16**:3365-3370
- [11] Fabrizi F, Dixit V, Martin P, Messa P. Chronic kidney disease after liver transplantation: Recent evidence. *The International Journal of Artificial Organs*. 2010;**33**(11):803-811
- [12] Lima C, Macedo E. Urinary biochemistry in the diagnosis of acute kidney injury. *Disease Markers*. 2018;**2018**:4907024. DOI: 10.1155/2018/4907024
- [13] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993;**268**:10425-10432
- [14] Kashani K, Cheungpasitporn W, Ronco C. Biomarkers of acute kidney injury: The pathway from discovery to clinical adoption. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017;**55**(8):1074-1089. DOI: 10.1515/cclm-2016-0973

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93650>

- [15] Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*. 1997;45:17-23
- [16] Zappitelli M, Washburn KK, Arikan AA, Loftis L, Ma Q, Devarajan P, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: A prospective cohort study. *Critical Care (London, England)*. 2007;11:R84
- [17] Nielsen B, Borregaard N, Bundgaard J, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 1996;38:414-420
- [18] Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, et al. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters*. 2005;579:773-777
- [19] Schmidt-Ott KM, Chen X, Paragas N, Levinson RS, Mendelsohn CL, Barasch J. C-kit delineates a distinct domain of progenitors in the developing kidney. *Developmental Biology*. 2006;299(1):238-249
- [20] Kiyoshi M, Thomas HL, Dana R, Ian RD, Kirk F, Jun Y, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:610-621
- [21] Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Molecular Cell*. 2002;10:1045-1056
- [22] Schrezenmeier EV, Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury – Pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiologica*. 2017;219:556-574
- [23] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003;14:2534-2543
- [24] Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *American Journal of Nephrology*. 2004;24:307-315
- [25] Legrand M, Darmon M, Joannidis M. NGAL and AKI: The end of a myth? *Intensive Care Medicine*. 2013;39:1861-1863. DOI: 10.1007/s00134-013-3061-2
- [26] Cullen MR, Murray PT, Fitzgibbon MC. Establishment of a reference interval for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2012;49(2):190-193
- [27] Pennemans V, Rigo JM, Faes C, Reynders C, Penders J, Swennen Q. Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population: Are age and gender an issue? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013;51(9):1795-1802
- [28] Cervellin G, Di Somma S. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): The clinician's perspective. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2012;50(9):1489-1493. DOI: 10.1515/cclm-2012-0433
- [29] Cavalier E, Bekaert AC, Carlisi A, Legrand D, Krzesinski JM, Delanaye P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) determined in urine with the Abbott architect or in plasma with the biosite triage? The laboratory's point of view. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011;49:339-341

Inflammation

- [30] Bargnoux AS, Piéroni L, Cristol JP. Analytical study of a new turbidimetric assay for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) determination. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013;**51**(12):293-296
- [31] Krzeminska E, Wyczalkowska-Tomasik A, Korytowska N, Paczek L. Comparison of two methods for determination of NGAL levels in urine: ELISA and CMIA. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2016;**30**(6): 956-960. DOI: 10.1002/jcla.21962
- [32] ILippi G, Plebani M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): The laboratory perspective. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2012;**50**:1483-1487
- [33] Cai L, Rubin J, Han W, Venge P, Xu S. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;**5**(12):2229-2235
- [34] Mårtensson J, Xu S, Bell M, Martling CR, Venge P. Immunoassays distinguishing between HNL/NGAL released in urine from kidney epithelial cells and neutrophils. *Clinica Chimica Acta*. 2012;**413**(19-20):1661-1667
- [35] Lima C, de Paiva Haddad LB, de Melo PDV, Malbouisson LM, do Carmo LPF, D'Albuquerque LAC, et al. Early detection of acute kidney injury in the perioperative period of liver transplant with neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *BMC Nephrology*. 2019;**20**(1):367. DOI: 10.1186/s12882-019-1566-9
- [36] Makris K, Stefani D, Makri E, Panagou I, Lagiou M, Sarli A, et al. Evaluation of a particle enhanced turbidimetric assay for the measurement of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in plasma and urine on Architect-8000: Analytical performance and establishment of reference values. *Clinical Biochemistry*. 2015;**48**(18):1291-1297. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.08.003
- [37] Stejskal D, Karpíšek M, Humenanska V, Hanulova Z, Stejskal P, Kusnierova P, et al. Lipocalin-2: Development, analytical characterization, and clinical testing of a new ELISA. *Hormone and Metabolic Research*. 2008;**40**(6):381-385
- [38] Singer E, Elger A, Elitok S, Kettritz R, Nickolas T, Barasch J, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney International*. 2011;**80**:405-411. DOI: 10.1038/ki.2011.41
- [39] Zhou F, Luo Q, Wang L, Han L. Diagnostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for early diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: A meta-analysis. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016;**49**(3):746-755
- [40] Constantin JM, Futier E, Perbet S, Roszyk L, Lautrette A, Gillart T, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: A prospective study. *Journal of Critical Care*. 2010;**25**:176
- [41] Di Somma S, Magrini L, Berardinis B, Marino R, Ferri E, Moscatelli P, et al. Additive value of blood neutrophil gelatinase associated lipocalin to clinical judgement in acute kidney injury diagnosis and mortality prediction in patients hospitalized from the emergency department. *Critical Care*. 2013;**17**(29):1-13
- [42] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. NGAL meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93650>

- kidney injury: A systematic review and metaanalysis. *American Journal of Kidney Diseases*. 2009;**54**(6): 1012-1024. DOI: 10.1053/j.ajkd.2009.07.020
- [43] Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: A prospective study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;**3**:665-673. DOI: 10.2215/CJN.04010907
- [44] Devarajan P. Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin - A troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton, Vic.)*. 2010;**15**:419-428
- [45] Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *The Lancet*. 2005;**365**:1231-1238
- [46] Parikh CR, Coca SG, Thiessen-Philbrook H, Shlipak MG, Koynier JL, Wang Z, et al. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;**22**:1748-1757
- [47] Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG, Wang Z, Doshi M, Devarajan P, et al. IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;**21**:189-197
- [48] Klein SJ, Brandtner AK, Lehner GF, Ulmer H, Bagshaw SM, Wiedermann CJ, et al. Biomarkers for prediction of renal replacement therapy in acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Medicine*. 2018;**44**:323-336. DOI: 10.1007/s00134-018-5126-8
- [49] Bhavsar NA, Köttgen A, Coresh J, Astor BC. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM-1) as predictors of incident CKD stage 3: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012;**60**(2):865-867
- [50] Tian N, Penman AD, Manning RD Jr, Flessner MF, Mawson AR. Association between circulating specific leukocyte types and incident chronic kidney disease: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2012;**6**(2):100-108
- [51] Ariza X, Graupera I, Coll M, Solà E, Barreto R, García E, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a biomarker of acute-on-chronic liver failure and prognosis in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2016;**65**(1):57-65. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.03.002
- [52] Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Bennett M, Mitsnefes MM, Barasch J, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: A prospective uncontrolled cohort study. *Critical Care*. 2007;**11**(6):1-8. DOI: 10.1186/cc6192
- [53] Daniels LB, Barrett-Connor E, Clopton P, Laughlin GA, Ix JH, Maisel AS. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is independently associated with cardiovascular disease and mortality in community-dwelling older adults. The rancho Bernardo study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;**59**:1101-1109
- [54] Misha J, Mori K, Ma Q. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;**15**:3073-3082

7.6 Anexo 6 – Certificado de participação e finalista para o Prêmio Jovem Pesquisador

Para validar, acesse <http://www.cmccongresses.com.br/validacao/?cod=40533318>

XXX CONGRESSO
BRASILEIRO DE NEFROLOGIA
XII CONGRESSO
LUSO-BRASILEIRO DE NEFROLOGIA
XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE
ENFERMAGEM EM NEFROLOGIA
15 - 17 OUTUBRO | EVENTO ONLINE

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

PROENCEFALINA PROMISSOR BIOMARCADOR DE FILTRAÇÃO RENAL NO TRANSPLANTE HEPÁTICO

dos autores: CAMILA LIMA; ETIENNE MACEDO, foi apresentado na modalidade Apresentação Oral Síncrona - Finalista Jovem Pesquisador, no evento XXX Congresso Brasileiro de Nefrologia, XII Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia e XVIII Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia ocorrido de 15 a 17 de outubro de 2020 na modalidade ONLINE.

17 de outubro de 2020

Marcelo Mazza do Nascimento
Presidente da Sociedade Brasileira de Nefrologia

Elizabeth de Francesco Daher
Presidente do XXX Congresso Brasileiro de Nefrologia

Luciano Alvarenga dos Santos
Presidente da Comissão Científica do XVI II Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia

Para validar, acesse <http://www.cmccongresses.com.br/validacao/?cod=40533318>

XXX CONGRESSO
BRASILEIRO DE NEFROLOGIA
XII CONGRESSO
LUSO-BRASILEIRO DE NEFROLOGIA
XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE
ENFERMAGEM EM NEFROLOGIA
15 - 17 OUTUBRO | EVENTO ONLINE

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

PROENCEFALINA PROMISSOR BIOMARCADOR DE FILTRAÇÃO RENAL NO TRANSPLANTE HEPÁTICO

foi apresentado na modalidade Apresentação Oral Síncrona - Finalista Jovem Pesquisador, por Camila Lima, no evento XXX Congresso Brasileiro de Nefrologia, XII Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia e XVIII Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia ocorrido de 15 a 17 de outubro de 2020 na modalidade ONLINE.

17 de outubro de 2020

Marcelo Mazza do Nascimento
Presidente da Sociedade Brasileira de Nefrologia

Elizabeth de Francesco Daher
Presidente do XXX Congresso Brasileiro de Nefrologia

Luciano Alvarenga dos Santos
Presidente da Comissão Científica do XVI II Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia

7.7 Anexo 7 – Certificado de participação como Congressista no 1º Encontro da Pós-Graduação do Vídeo “Elas Fazem Ciência”

ELASFAZEMCIÊNCIA

PROGRAMAÇÃO

16/11/20 09:00 - Abertura	17/11/20 16:00 - As mulheres cientistas na pós-graduação
16/11/20 09:30 - Desafios Globais, Regionais e Locais para a promoção da igualdade entre homens e mulheres	17/11/20 17:00 - A história do patinho feio
16/11/20 11:00 - A participação das mulheres no enfrentamento à Covid-19	18/11/20 09:00 - A política de gênero na USP: reconhecimentos e propostas de futuro
16/11/20 14:00 - A participação das mulheres na ciência	18/11/20 10:00 - Da pré à pós-graduação: as trajetórias das meninas às mulheres nas ciências
16/11/20 15:00 - Sessão de e-Posteres	18/11/20 14:00 - Cerimônia de premiação Prêmio Tese Destaque USP
16/11/20 15:00 - Sessão de e-Posteres	18/11/20 15:10 - Cerimônia de premiação Prêmio Vídeo Pós-Graduação USP - TV Cultura 2020
16/11/20 15:00 - Sessão de e-Posteres	18/11/20 15:30 - Encerramento
16/11/20 15:00 - Sessão de e-Posteres	
17/11/20 09:00 - Uma prêmio Nobel no Rio de Janeiro - Contradições contemporâneas	
17/11/20 09:58 - 2nd Print Week: Internacionalização na USP	
17/11/20 11:00 - Universidades parceiras Print USP	
17/11/20 11:00 - Munster e Surrey	
17/11/20 11:00 - Macquarie e Sydney	
17/11/20 11:00 - Copenhagen e Twente	
17/11/20 12:00 - Tubingen e Porto	
17/11/20 12:00 - McGill - North Carolina State	
17/11/20 12:00 - Rutgers e Ohio State	
17/11/20 12:00 - Bologna - Lyon	
17/11/20 12:00 - Groningen - King's College	
17/11/20 14:00 - "Lugar de Mulher"	
17/11/20 14:00 - Liderança Feminina no Empreendedorismo	

7.8 Anexo 8 – Aprovação da Comissão de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diagnóstico e aplicação dos biomarcadores de Injúria Renal Aguda no perioperatório de transplante hepático

Pesquisador: Etienne Maria Vasconcellos de Macedo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06636513.4.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 266.581

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto:

trabalho relevante, com aplicabilidade clínica imediata, prático com informes de marcadores de injúria renal em pacientes submetidos a tx hepático.

Objetivo da Pesquisa:

diagnóstico e aplicação de biomarcadores de injúria renal no peritoperatório de pacientes submetidos a transplante hepático

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefício: pesquisa e aplicabilidade de biomarcadores de simples obtenção e de obtenção mais sofisticada para diagnóstico precoce de injúria renal por transplante hepático.

O risco é mínimo pois o material a ser coletado o será feito através de catéteres passados para o procedimento cirúrgico e pós operatório em UTI. O volume a ser retirado é pequeno e predominante de urina. Não haverá maior invasão do paciente clinicamente ou por espoliação para o estudo além do que é necessário para o procedimento cirúrgico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O desenho da pesquisa é cientificamente bem estruturado, e claramente e objetivamente apresentado. A equipe possui material humano, técnico e econômico para a execução do estudo,

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 266.581

finalização e publicação do mesmo além de aplicá-lo na área assistencial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos éticamente necessários foram adequadamente apresentados e assinados

Recomendações:

Solicito acrescentarem ao projeto o número do projeto FAPESP que subsidiará o estudo e checar o valor do auxílio FAPESP (no PB relatório conta custo em torno de 188 mil reais; no cadastro consta orçamento FAPESP de cem mil reais).

Peço acrescentar o nome da pesquisadora senior no TCLE como responsável juntamente com a executora do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 08 de Maio de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Continua.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 266.581

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Página 03 de 03

Conclusão.

7.9 Anexo 9 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1

ANEXO 1**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: **Nº:** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE:**
CEP: **TELEFONE:** DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: **Nº:**
APTO:
BAIRRO: **CIDADE:**
CEP: **TELEFONE:** DDD
(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

**Diagnóstico e aplicação dos biomarcadores de Injúria Renal Aguda no
perioperatório de transplante hepático**

PESQUISADOR: Camila Lima

CARGO/FUNÇÃO: Enfermeira **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº** 182069

UNIDADE DO HCFMUSP: ICHC - Nefrologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ **RISCO MÉDIO** ☐
RISCO BAIXO x **RISCO MAIOR** ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 18 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Continua.

O (a) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo clínico para avaliar uma doença que afeta os rins, chamada Injúria Renal Aguda. Esse problema ocorre frequentemente no pós-operatório de transplante hepático.

Antes de concordar em participar, é importante que o (a) senhor (a) leia e entenda todas as explicações que estão a seguir sobre os procedimentos, os benefícios potenciais e os riscos envolvidos na participação na pesquisa. Por favor, peça para qualquer pessoa da equipe do estudo que explique qualquer palavra ou informação que não seja entendida de maneira bem clara. Não assine este termo de consentimento a não ser que o (a) senhor (a) tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e de receber respostas que esclareçam todas as suas dúvidas. Se escolher assinar e participar, você assinará duas cópias deste documento e uma delas será entregue a você.

Este projeto tem como objetivo estudar a Injúria Renal Aguda nos pacientes submetidos ao transplante hepático. Iremos avaliar apenas exame de sangue e urina que será capaz de detectar uma lesão ao rim mais precocemente.

Caso o (a) senhor (a) ou o representante legal concorde em participar do estudo, dados da sua história clínica e alguns resultados de exames laboratoriais serão coletados do prontuário médico. Durante o perioperatório serão colhidas seis amostras de sangue e urina 20ml igual a duas colheres de sopa. Os resultados destas análises não serão avaliados durante a sua estadia no hospital e não afetarão o cuidado médico no período da internação. Esses resultados serão analisados posteriormente para avaliar se é possível detectar lesão ao rim mais cedo com o uso desses exames.

A coleta de sangue será por meio de cateter venoso central e urina por meio de cateter vesical de demora, ambos dispositivos rotineiros do transplante hepático, ou seja, não ocorrerão punções venosas e desconforto adicional para o (a) senhor (a).

Não há benefício direto para o participante do estudo. O (a) senhor (a) estará contribuindo para a pesquisa e para melhor entendimento de uma doença grave como a Injúria Renal Aguda.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Continua.

3

Não há despesas pessoais para o (a) senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. E o (a) senhor (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas. O pesquisador e sua equipe estão comprometidos a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Após a coleta e processamento do material (sangue e urina) será armazenado em 4 microtubos por coleta, são seis coletas, totalizando 48 microtubos, o armazenamento precisará de refrigeração à menos 80°C, até a análise. O Biorepositório trata-se de um local para guarda do material até sua utilização.

O (a) senhor (a) ou o representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, poderá retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo (a) senhor (a) ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

O armazenamento do material biológico humano no Biorrepositório será de no máximo 18 meses.

Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado no Biorrepositório poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação da CAPPesq, ou deverá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Continua.

4

Rubrica do pesquisador _____

O (a) senhor (a) ou seu representante legal será informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório.

Não será solicitado patenteamento e não haverá utilização comercial do material biológico humano armazenado no Biorrepositório.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Enfermeira Camila Lima que pode ser encontrada no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 455 – Pinheiros, São Paulo-SP. CEP 05.403-000. Telefone(s): (11) 97626-4778.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Tel: (11) 2661-6442 ramais 16, 17 ou 18 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo "Detecção da Injúria Renal Aguda pelos novos biomarcadores urinários em pacientes no perioperatório de transplante hepático". Eu discuti com a Enfermeira Camila Lima sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha
(pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de
deficiência auditiva ou visual)

Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Continua.

5

Rubrica do pesquisador _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ____/____/____
Assinatura do responsável pelo estudo.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Conclusão.

7.10 Anexo 10 – Clinical Trials

ClinicalTrials.gov
[Try our beta test site](#)

Example: "Heart attack" AND "Los Angeles"
Search for studies: [Search](#)
[Advanced Search](#) | [Help](#) | [Studies by Topic](#) | [Glossary](#)

IMPORTANT: Listing of a study on this site does not reflect endorsement by the National Institutes of Health. Talk with a trusted healthcare professional before volunteering for a study. [Read more...](#)

[Find Studies](#) ▾ | [About Clinical Studies](#) ▾ | [Submit Studies](#) ▾ | [Resources](#) ▾ | [About This Site](#) ▾

[Home](#) > [Find Studies](#) > [Study Record Detail](#) Text Size ▾

Acute Kidney Injury Biomarkers: Diagnosis and Application in Pre-operative Period of Liver Transplantation (AKIB)

This study is ongoing, but not recruiting participants.
Sponsor:
University of Sao Paulo
Collaborator:
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Information provided by (Responsible Party):
Etienne Macedo, University of Sao Paulo

ClinicalTrials.gov Identifier:
NCT02095431
First received: February 7, 2014
Last updated: May 15, 2016
Last verified: May 2016
[History of Changes](#)

[Full Text View](#) | [Tabular View](#) | [No Study Results Posted](#) | [Disclaimer](#) | [How to Read a Study Record](#)

Purpose
Acute kidney injury (AKI), is a common complication of patients undergoing liver transplantation. Timing and definition of AKI, usually based on serum creatinine, have been inaccurate and inconsistent.
We hypothesized that the pattern of novel biomarkers elevation could be a prognostic tool to provide information on the risk of progression of AKI, the need for RRT and mortality.

Condition
Acute Kidney Injury

Study Type: Observational
Study Design: Observational Model: Cohort
Time Perspective: Prospective
Official Title: Acute Kidney Injury Biomarkers: Diagnosis and Application in Pre-operative Period of Liver Transplantation

Resource links provided by NLM:
[MedlinePlus](#) related topics: [Liver Transplantation](#)
[U.S. FDA Resources](#)

Further study details as provided by University of Sao Paulo:
Primary Outcome Measures:

- Development of Acute Kidney Injury based on novel biomarkers [Time Frame: within 7 days]
Compare the timing for diagnosis of AKI comparing novel biomarkers and serum creatinine defined by Kidney Disease Improving Global Outcomes. In addition, we aim to evaluate if the pattern of elevation of the novel biomarkers provide information on progression and severity of AKI.

Secondary Outcome Measures:

- Short and long term renal outcomes [Time Frame: 1 year]
renal function and need for RRT
- Association of urine chemistry and microscopy to predict acute kidney injury [Time Frame: within 7 days of liver transplantation]
Association of urine chemistry and microscopy with novel biomarkers to predict AKI diagnosis and progression

Continua.

Biospecimen Retention: Samples Without DNA
blood plasma and urine

Estimated Enrollment: 122
Study Start Date: June 2013
Estimated Study Completion Date: August 2016
Primary Completion Date: June 2015 (Final data collection date for primary outcome measure)

Groups/Cohorts

with AKI and without AKI
development of AKI by sCr and by novel biomarkers

► Eligibility

Ages Eligible for Study: 18 Years to 80 Years (Adult, Senior)
Sexes Eligible for Study: All
Accepts Healthy Volunteers: No
Sampling Method: Non-Probability Sample

Study Population

Patients submitted to liver transplantation .

Criteria

Inclusion Criteria:

- Older than 18 years
- Reception liver transplantation

Exclusion Criteria:

- CKD stage 4 / 5
- Combined organ transplants
- Patients receiving dialysis before liver transplant operation

► Contacts and Locations

Choosing to participate in a study is an important personal decision. Talk with your doctor and family members or friends about deciding to join a study. To learn more about this study, you or your doctor may contact the study research staff using the Contacts provided below. For general information, see [Learn About Clinical Studies](#).

Please refer to this study by its ClinicalTrials.gov identifier: NCT02095431

Locations

Brazil

University of Sao Paulo
Sao Paulo, SP, Brazil, 05320000

Sponsors and Collaborators

University of Sao Paulo
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Investigators

Principal Investigator: Etienne Macedo, MD, PhD Faculty of Medicine, University of São paulo

► More Information

Additional Information:

seen on August 05, 2014 [Edit](#)

Publications:

[Barri YM, Sanchez EQ, Jennings LW, Melton LB, Hays S, Levy MF, Klintmalm GB. Acute kidney injury following liver transplantation: definition and outcome. Liver Transpl. 2009 May;15\(5\):475-83. doi: 10.1002/lt.21682.](#)

[Feldkamp T, Bienholz A, Kribben A. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin \(NGAL\) for the detection of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. Nephrol Dial Transplant. 2011 May;26\(5\):1456-8. doi: 10.1093/ndt/gfr146. Epub 2011 Apr 12.](#)

[White LE, Hassoun HT. Inflammatory Mechanisms of Organ Crosstalk during Ischemic Acute Kidney Injury. Int J Nephrol. 2012;2012:505197. doi: 10.4061/2012/505197. Epub 2011 Jun 9.](#)

[Tsagalis G. Update of acute kidney injury: intensive care nephrology. Hippokratia. 2011 Jan;15\(Suppl 1\):53-68.](#)

Continua.

Macedo E, Mehta RL. Prerenal failure: from old concepts to new paradigms. *Curr Opin Crit Care*. 2009 Dec;15(6):467-73. doi: 10.1097/MCC.0b013e328332f6e3.

Nejat M, Pickering JW, Devarajan P, Bonventre JV, Edelstein CL, Walker RJ, Endre ZH. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. *Kidney Int*. 2012 Jun;81(12):1254-62. doi: 10.1038/ki.2012.23. Epub 2012 Mar 14.

Sirota JC, Klawitter J, Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *J Toxicol*. 2011;2011:328120. doi: 10.1155/2011/328120. Epub 2011 Oct 29.

Xu X, Ling Q, Wei Q, Wu J, Gao F, He ZL, Zhou L, Zheng SS. An effective model for predicting acute kidney injury after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2010 Jun;9(3):259-63.

Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A; Acute Kidney Injury Network.. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.

Responsible Party: Etienne Macedo, MD, PhD, University of Sao Paulo

ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT02095431](#) [History of Changes](#)

Other Study ID Numbers: 10393

2013/12710-2 (Other Grant/Funding Number: FAPESP)

Study First Received: February 7, 2014

Last Updated: May 15, 2016

Keywords provided by University of Sao Paulo:
patients undergoing the liver transplantation
acute kidney injury

Additional relevant MeSH terms:

Wounds and Injuries

Acute Kidney Injury

Renal Insufficiency

Kidney Diseases

Urologic Diseases

ClinicalTrials.gov processed this record on April 13, 2017

[^ TO TOP](#)

[For Patients and Families](#)

[For Researchers](#)

[For Study Record Managers](#)

[HOME](#)

[RSS FEEDS](#)

[SITE MAP](#)

[TERMS AND CONDITIONS](#)

[DISCLAIMER](#)

[CUSTOMER SUPPORT](#)

[Copyright](#) | [Privacy](#) | [Accessibility](#) | [Viewers and Players](#) | [Freedom of Information Act](#) | [USA.gov](#)
[U.S. National Library of Medicine](#) | [U.S. National Institutes of Health](#) | [U.S. Department of Health and Human Services](#)

Conclusão.

7.11 Anexo 11 – Formulário de coleta de dados - Red Cap

Confidential

Biomarkers in liver transplantation Part One 1
Page 1 of 1

Baseline Characteristics

Number of Study _____
Inclusion Date _____

Patient Information

First Name _____
Middle Initial _____
Last Name _____
Date of birth _____
Age (years) _____
Gender ☐ Female
☐ Male
Race ☐ White
☐ Black
☐ Oriental
Height (cm) _____
Weight (kilograms) _____
BMI _____

Hospital Information

Hospitalization date _____
At home ☐ Yes
☐ No
ICU admission date _____
Intubation date _____
Procedency of the Patient ☐ Hospital ward
☐ Emergency department
☐ Operative room
☐ Others
Is this an emergency or planned ICU admission ? ☐ Planned admission
☐ Emergency admission
Kind of patient ☐ Clinical
☐ Surgical

Confidential

Biomarkers in liver transplantation Part One 1
Page 1 of 1

Comorbidities

Number of Study

Number of Study

Clinical Characteristics

	No	Yes
Diabetes Mellitus	☐	☐
Smoking	☐	☐
Ex-Smoking	☐	☐
Alcoholism	☐	☐
Ex-Alcoholism	☐	☐
Hypothyroidism	☐	☐
Arterial Hypertension	☐	☐
Coronary Heart Disease	☐	☐
Left Ventricuke Ejection Fraction	☐	☐
Chronic Obstrutive Pulmonary Disease	☐	☐
Actual Corticoesteroid Use	☐	☐
Atrial Fibrilation	☐	☐
Dyalitic Therapy	☐	☐
Congestive Heart Failure	☐ No CHF ☐ CHF NYHA I ☐ CHF NYHA II ☐ CHF NYHA III ☐ CHF NYHA IV	
Renal Failure	☐ No ☐ Acute ☐ Chronic	
Functional Status	☐ Non dependent ☐ Partially dependent ☐ Completely dependent	
ASA Classification	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 5e	
Other Comorbidities		

Confidential

Biomarkers in liver transplantation Part One 1
Page 1 of 4

Intra-operative data

Number of Study

Number of Study

Date OLT

Donor

☐ Deceased

☐ Living donor

Kind of graft

☐ Full graft

☐ Right Lobe with medium veine

☐ Right Lobe without medium veine

☐ Left Lobe

Kind of surgery

☐ convencional

☐ piggy back sem clamp cava

☐ piggy back com clamp de cava

Graft weight (g)

Native Liver weight (g)

Time Anesthesia

(HH:MM)

Time Surgery

(HH:MM)

Hepatectomy

Time Portal Clamp

ICV Clamp

Vasopressor

☐ None

☐ Nora

☐ Vasopress

☐ Dobuta

☐ Dopa

Dosis

(mcg/kg/min)

Confidential

Page 2 of 4

antibiotics_1

- ☐ No
- ☐ Vancomycin
- ☐ Teicoplanin
- ☐ Oxacillin
- ☐ Ampicillin
- ☐ Cefazoline
- ☐ Cefepime
- ☐ Cefuroxime
- ☐ Ceftriaxone
- ☐ Cefotaxime
- ☐ Ceftazidime
- ☐ Imipenem
- ☐ Meropenem
- ☐ Amoxicillin/Clavulanic Ac.
- ☐ Piperacillin/Tazobactam
- ☐ Ampicillin/Sulbactam
- ☐ Metronidazol
- ☐ Fluconazol
- ☐ Amphotericin Deoxyxolate
- ☐ Liposomal Amphotericin
- ☐ Amikacin
- ☐ Gentamicin
- ☐ Myc fungin
- ☐ Caspofungin
- ☐ Anidulafungin

Dosis

(gramas)

Antibiotics_2

- ☐ No
- ☐ Vancomycin
- ☐ Teicoplanin
- ☐ Oxacillin
- ☐ Ampicillin
- ☐ Cefazoline
- ☐ Cefepime
- ☐ Cefuroxime
- ☐ Ceftriaxone
- ☐ Cefotaxime
- ☐ Ceftazidime
- ☐ Imipenem
- ☐ Meropenem
- ☐ Amoxicillin/Clavulanic Ac.
- ☐ Piperacillin/Tazobactam
- ☐ Ampicillin/Sulbactam
- ☐ Metronidazol
- ☐ Fluconazol
- ☐ Amphotericin Deoxyxolate
- ☐ Liposomal Amphotericin
- ☐ Amikacin
- ☐ Gentamicin
- ☐ Myc fungin
- ☐ Caspofungin
- ☐ Anidulafungin

Dosis_2

(gramas)

immunosuppressive

- ☐ None
- ☐ methylprednisolone
- ☐ tacrolimus
- ☐ FK
- ☐ prednisone
- ☐ mycophenolate mofetil

Dosis

Confidential

Page 3 of 4

Diuresis

(Operating Room)

Diuretics

- ☐ No
- ☐ Loop diuretic
- ☐ thiazide diuretic
- ☐ Potassium-sparing diuretic
- ☐ Carbonic anhydrase inhibitors
- ☐ Osmotic diuretic

Water Balance

- ☐ Negative
- ☐ Positive

Value Water Balance

Use of Terlepressin

- ☐ Yes
- ☐ No

Blood Components 1

- ☐ Plasma
- ☐ Platelets
- ☐ Cryoprecipitated
- ☐ Red Blood Cells

Number of Blood Components 1

Blood Components 2

- ☐ Plasma
- ☐ Platelets
- ☐ Cryoprecipitated
- ☐ Red Blood Cells

Number of Blood Components 2

Blood Components 3

- ☐ Plasma
- ☐ Platelets
- ☐ Cryoprecipitated
- ☐ Red Blood Cells

Number of Blood Components 3

Blood Components 4

- ☐ Plasma
- ☐ Platelets
- ☐ Cryoprecipitated
- ☐ Red Blood Cells

Number of Blood Components 4

Use of Cell saver

- ☐ Yes
- ☐ No

If affirmative, How many?

(ml)

Use of Albumin

- ☐ Yes
- ☐ No

If affirmative, How many ?

Use of HBiG

- ☐ Yes
- ☐ No

SBP>

SBP

DPB >

DBP

Confidential

Page 4 of 4

BPA>	
BPA	
IC>	
IC	
DC>	
DC	
PVC>	
PVC	
O2 saturation >	
O2 saturation	
ETCO2 >	
ETCO2	
TIF - Cold Ischemia Time	
TIQ - Warm ischemia time	
TIT - Total Ischemia Time	

Confidential

Page 2 of 5

Vassopressor 2	<div>☐ None</div> <div>☐ Nora</div> <div>☐ Vasopress</div> <div>☐ Dobuta</div> <div>☐ Dopa</div> <div>☐ Azul de Metileno</div>
Dosis	<div></div>
Vassopressor 3	<div>☐ None</div> <div>☐ Nora</div> <div>☐ Vasopress</div> <div>☐ Dobuta</div> <div>☐ Dopa</div> <div>☐ Azul de Metileno</div>
Dosis	<div></div>
Diuresis	<div></div>
Diutetics	<div>☐ No</div> <div>☐ Loop diuretic</div> <div>☐ thiazide diuretic</div> <div>☐ Potassium-sparing diuretic</div> <div>☐ Carbonic anhydrase inhibitors</div> <div>☐ Osmotic diuretic</div>
Water Balance	<div>☐ Negative</div> <div>☐ Positive</div>
Value Water Balance	<div></div>
Edema	<div>☐ Yes</div> <div>☐ No</div>
Diet	<div>☐ fasting</div> <div>☐ SNG open</div> <div>☐ Diet Branda</div> <div>☐ General Diet</div> <div>☐ PND (SNE)</div>
Evacuation	<div>☐ evacuation</div> <div>☐ present</div> <div>☐ absent</div> <div>☐ diarrhea</div>
CBG- Capilar Blood Glucose >	<div></div>
CBG- Capilar Blood Glucose	<div></div>
Maximal Temperature (Â°C)	<div></div>
Minimal Temperature (Â°C)	<div></div>

Confidential

Page 3 of 5

Antibiotics 1

- ☐ No
- ☐ Vancomycin
- ☐ Teicoplanin
- ☐ Oxacillin
- ☐ Ampicillin
- ☐ Cefazoline
- ☐ Cefepime
- ☐ Cefuroxime
- ☐ Ceftriaxone
- ☐ Cefotaxime
- ☐ Ceftazidime
- ☐ Imipenem
- ☐ Meropenem
- ☐ Amoxicillin/Clavulanic Ac.
- ☐ Piperacillin/Tazobactam
- ☐ Ampicillin/Sulbactam
- ☐ Metronidazol
- ☐ Fluconazol
- ☐ Amphotericin Deoxyxolate
- ☐ Liposomal Amphotericin
- ☐ Amikacin
- ☐ Gentamicin
- ☐ Myc fungin
- ☐ Caspofungin
- ☐ Anidulafungin

Daily Antibiotic 1 Dosis

(Total Daily Dosis)

Antibiotics 2

- ☐ No
- ☐ Vancomycin
- ☐ Teicoplanin
- ☐ Oxacillin
- ☐ Ampicillin
- ☐ Cefazoline
- ☐ Cefepime
- ☐ Cefuroxime
- ☐ Ceftriaxone
- ☐ Cefotaxime
- ☐ Ceftazidime
- ☐ Imipenem
- ☐ Meropenem
- ☐ Amoxicillin/Clavulanic Ac.
- ☐ Piperacillin/Tazobactam
- ☐ Ampicillin/Sulbactam
- ☐ Metronidazol
- ☐ Fluconazol
- ☐ Amphotericin Deoxyxolate
- ☐ Liposomal Amphotericin
- ☐ Amikacin
- ☐ Gentamicin
- ☐ Myc fungin
- ☐ Caspofungin
- ☐ Anidulafungin

Daily Antibiotic 2 Dosis

(Total Daily Dosis)

Confidential

Page 4 of 5

Antibiotics 3

- ☐ No
- ☐ Vancomycin
- ☐ Teicoplanin
- ☐ Oxacillin
- ☐ Ampicillin
- ☐ Cefazoline
- ☐ Cefepime
- ☐ Cefuroxime
- ☐ Ceftriaxone
- ☐ Cefotaxime
- ☐ Ceftazidime
- ☐ Imipenem
- ☐ Meropenem
- ☐ Amoxicillin/Clavulanic Ac.
- ☐ Piperacillin/Tazobactam
- ☐ Ampicillin/Sulbactam
- ☐ Metronidazol
- ☐ Fluconazol
- ☐ Amphotericin Deoxyxolate
- ☐ Liposomal Amphotericin
- ☐ Amikacin
- ☐ Gentamicin
- ☐ Myc fungin
- ☐ Caspofungin
- ☐ Anidulafungin

Daily Antibiotic 3 Dosis

(Total Daily Dosis)

Antibiotics 4

- ☐ No
- ☐ Vancomycin
- ☐ Teicoplanin
- ☐ Oxacillin
- ☐ Ampicillin
- ☐ Cefazoline
- ☐ Cefepime
- ☐ Cefuroxime
- ☐ Ceftriaxone
- ☐ Cefotaxime
- ☐ Ceftazidime
- ☐ Imipenem
- ☐ Meropenem
- ☐ Amoxicillin/Clavulanic Ac.
- ☐ Piperacillin/Tazobactam
- ☐ Ampicillin/Sulbactam
- ☐ Metronidazol
- ☐ Fluconazol
- ☐ Amphotericin Deoxyxolate
- ☐ Liposomal Amphotericin
- ☐ Amikacin
- ☐ Gentamicin
- ☐ Myc fungin
- ☐ Caspofungin
- ☐ Anidulafungin

Daily Antibiotic 4 Dosis

(Total Daily Dosis)

Immunosuppressive 1

- ☐ None
- ☐ methylprednisolone
- ☐ tacrolimus
- ☐ FK
- ☐ prednisone
- ☐ mycophenolate mofetil

Dosis

(mg)

*Confidential**Biomarkers in liver transplantation Part 2
Page 1 of 5*

Clinical Followup

Number of Study	<input type="text"/>
Number of Study	<input type="text"/>
Date	<input type="text"/>
Mode of Ventilation	☐ Spontaneous ☐ BIPAP ☐ PSV ☐ CMV - PCV ☐ CMV - VCV
Tidal Volume (mL)	<input type="text"/>
Minimal PEEP (cmH2O)	<input type="text"/>
Inspired Fraction of Oxygen (FiO2 - %)	<input type="text"/>
PaO2 (mmHg)	<input type="text"/>
Chest X-ray Pulmonary Image description	☐ Congestion ☐ Consolidation ☐ Interstitial Infiltrate ☐ Pneumothorax ☐ Pleural Effusion
Pulmonary Image Location	☐ Right Lower Quadrant ☐ Left Lower Quadrant ☐ Right Upper Quadrant ☐ Left Upper Quadrant (Can be more than 1 region)
Chest X-Ray of the day	
SBP>	<input type="text"/>
SBP	<input type="text"/>
DBP>	<input type="text"/>
DBP	<input type="text"/>
BPA>	<input type="text"/>
BPA	<input type="text"/>
FC>	<input type="text"/>
FC	<input type="text"/>
Vasopressor 1	☐ None ☐ Nora ☐ Vasopress ☐ Dobuta ☐ Dopa ☐ Azul de Metileno
Dosis	<input type="text"/>

Confidential

Page 5 of 5

Immunosuppressive_2	<div>☐ None</div> <div>☐ methylprednisolone</div> <div>☐ tacrolimus</div> <div>☐ FK</div> <div>☐ prednisone</div> <div>☐ mycophenolate mofetil</div>
Dosis_2	<div></div> <div>(mg)</div>
Immunosuppressive 3	<div>☐ None</div> <div>☐ methylprednisolone</div> <div>☐ tacrolimus</div> <div>☐ FK</div> <div>☐ prednisone</div> <div>☐ mycophenolate mofetil</div>
Dosis_3	<div></div> <div>(mg)</div>
immunosuppressive_4	<div>☐ None</div> <div>☐ methylprednisolone</div> <div>☐ tacrolimus</div> <div>☐ FK</div> <div>☐ prednisone</div> <div>☐ mycophenolate mofetil</div>
Dosis 4	<div></div> <div>(mg)</div>
Blood Components	<div>☐ Plasma</div> <div>☐ Platelets</div> <div>☐ Cryoprecipitated</div> <div>☐ Red Blood Cells</div>
Number of Blood Components	<div></div>
Blood Components 2	<div>☐ Plasma</div> <div>☐ Platelets</div> <div>☐ Cryoprecipitated</div> <div>☐ Red Blood Cells</div>
Number of Blood Components 2	<div></div>
Albumin	<div>☐ Yes</div> <div>☐ No</div>
If, affirmative, How many?	<div></div>
Use of HBiG	<div>☐ Yes</div> <div>☐ No</div>

*Confidential**Biomarkers in liver transplantation Part 2
Page 1 of 2***RRT**

Number of Study	<hr/>
Number of Study	<hr/>
Diagnosis	☐ IRA ☐ DRC ☐ NDA
Type of AKI	☐ Clinica ☐ Obstructive ☐ Ischemic ☐ Other
Etiology of AKI	☐ Hepatorenal ☐ Sepsis ☐ Nephrotoxic ☐ Other
Reasons to start/pursue RRT:	☐ Hyperkalemia ☐ Acidemia ☐ Electrolyte Disturbance ☐ Progressive Azotemia ☐ Uremic Manifestations ☐ Oliguria (< 400 ml/24h) ☐ Fluid Overload ☐ Volume Status Unable to Accomodate Demands for Fluid ☐ Compromised Cardiac, Respiratory or Liver Status ☐ Intoxication ☐ Non-recovery of Renal Function ☐ Other
Start of nephrologist monitoring	<hr/>
RRT Start Date/Time:	<hr/>
Creatinine Value First Dialysis	<hr/>
Type of RRT procedure first:	☐ IHD ☐ SLED ☐ CVVH ☐ UF Only ☐ CVVHD ☐ PD ☐ CVVHDF (first)
RRT Stop Date/Time:	<hr/>
Creatinine Value Last Dialysis	<hr/>
Last of nephrologist monitoring	<hr/>
Dialisis Pre	☐ Yes ☐ No
Number of Dialysis Transplantation Pre	<hr/>
Dialisis Pos	☐ Yes ☐ No
Number of Dialysis Transplantation Post	<hr/>
Total Number of Dialysis	<hr/>

Confidential

Page 2 of 2

Type of RRT procedure last:

- ☐ IHD
- ☐ SLED
- ☐ CVVH
- ☐ UF Only
- ☐ CVVHD
- ☐ PD
- ☐ CVVHDF (last)

Type of Anticoagulation

- ☐ SF 0,9 %
- ☐ ACD
- ☐ HEP

Reasons for RRT discontinuation:

- ☐ Renal recovery
- ☐ Death
- ☐ Withdrawal of treatment
- ☐ Other

Death in Dialysis

- ☐ Yes
- ☐ No

Value of Creatinine in Death

Confidential

Biomarkers in liver transplantation Part 2
Page 1 of 1

Outcomes

Number of Study	<input type="text"/>
Number of Study	<input type="text"/>
Date of Admission	<input type="text"/>
Date Admission UTI	<input type="text"/>
Date Alta UTI	<input type="text"/>
Hospital Discharge Date	<input type="text"/>
Readmission to ICU	☐ Yes ☐ No
Death Date	<input type="text"/>
Cause of Death	<input type="text"/>
Diagnosis 1	<input type="text"/> (This Hospitalization)
Diagnosis 2	<input type="text"/> (This Hospitalization)
Diagnosis 3	<input type="text"/> (This Hospitalization)
Diagnoses that increase the length of hospital stay 1	<input type="text"/>
Diagnoses that increase the length of hospital stay 2	<input type="text"/>
Diagnoses that increase the length of hospital stay 3	<input type="text"/>
Need to re-transplantation	☐ Yes ☐ No
If, affirmative. How many days ?	<input type="text"/>
Reason for re transplantation	<input type="text"/>

7.12 Anexo 12 – Manual do Procedimento Operacional Padrão

Diagnóstico e Aplicação dos Biomarcadores Precoce de Injúria Renal Aguda no perioperatório de Transplante Hepático

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Esta manual de Procedimento Operacional Padrão (POP) tem o objetivo de esclarecer a todos os participantes do estudo as principais etapas do processo para execução deste protocolo.

Continua.

Diagnóstico e Aplicação dos Biomarcadores Precoce de Injúria Renal Aguda no perioperatório de Transplante Hepático

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

1º Coleta do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Para a coleta do TCLE é necessário saber os critérios de inclusão e exclusão do protocolo.

Critérios de Inclusão: pacientes maiores de 18 anos, ativos na lista de espera de transplante de hepático do HCFMUSP.

Critérios de exclusão: pacientes com Transplante combinados, Paciente com Insuficiência Renal Crônica Dialítica, anúricos, em tratamento dialítico no pré transplante hepático, anemia (hemoglobina <7g/dl ou hematócrito <21%)

Local da Coleta: Ambulatório do Transplante do Fígado, localizado no 4ª do PAMB. Todas as quintas feiras às 14horas exceto feriados. Para saber os pacientes em lista para passar em consulta na data, solicite a Enfermeira da Coordenação do Transplante (Adriana, Valdeci, Vanessa ou Juliana).

Abordagem do paciente: Explica-se principalmente o objetivo do estudo, desconforto que o estudo pode proporcionar ao paciente, riscos e os benefícios.

RESUMO :

Introdução: A injúria renal aguda (IRA); é uma complicação comum dos pacientes submetidos ao transplante hepático, com uma incidência alta de IRA que varia de 17 a 95% no pós-operatório de transplante hepático. Apesar desta assertiva a temporização e definição de IRA têm sido imprecisa e inconsistente, usualmente baseado na creatinina.

O objetivo principal do estudo é comprovar que o diagnóstico da IRA pelo biomarcador é mais precoce comparado à creatinina e avaliar se o padrão de elevação da informação sobre o prognóstico da IRA e desfechos.

Continua.

3º Coleta de Material Biológico e Armazenamento

As coletas são realizadas respeitando os horários:

- 1º - no pré-operatório: antes da indução anestésica;
- 2º - no intra-operatório: após a reperfusão portal;
- 3º - no pós-operatório: 03 horas após a cirurgia;
- 4º - no pós-operatório: 18 horas após a cirurgia;
- 5º - no pós-operatório: 24 horas após a cirurgia;
- 6º - no pós-operatório: 48 horas após a cirurgia;

Sendo por coleta: 16 ml de sangue (4 tubos roxos) e 30ml de urina (3 frascos falcon). Três frascos falcon são encaminhados ao Laboratório Central no 2 andar do PAMB, no pedido é solicitado bioquímica (Na, K, P, Cl), padrão microscópico (Urina 1) e osmolaridade urinária o pedido deve conter o carimbo em vermelho identificando o protocolo PR 982. A coleta de sangue é realizado por dispositivos venosos como Pai, ou CVC, respeitando normas de antisepsia e isolamentos de contato dos pacientes. A urina coletado pelo CVD deverá ser de uma urina recente, recomenda-se que despreze a urina do frasco e aguarde uma nova urina para a coleta.

As amostras de sangue e urina serão centrifugadas no Laboratório da Nefrologia (5° andar PAMB). O sangue é centrifugado a uma velocidade de 3000 rpm por 15 minutos. A urina a uma velocidade de 1000 rpm por 10 minutos. Caso esteja fechado procurar a chave com a enfermagem no lado da sala (é uma que têm um chaveiro de carrinho verde, a chave também é verde). Antes de centrifugar os tubos devem ser pesado em pares, e na centrifuga dispostos paralelamente e do lado inverso;(figura abaixo) o primeiro botão se gira até o número seis (corresponde a 15 minutos) e no segundo botão fica entre a letra A e o S (corresponde a velocidade de 1500 rpm).

Os ependorf são identificados para cada coleta de sangue e urina é necessário 4 ependorff respectivamente. A identificação é realizada por fita adesiva deve conter no mínimo: nome e sobrenome, tipo de material (plasma ou urina), número da coleta (1 à 6), a etiqueta deve ser envolvida totalmente por uma fita adesiva transparente, para evitar que se perda a identificação devido o congelamento e presença de água posteriormente.

HORÁRIO :

- 1° - no pré-operatório:
antes da indução
anestésica;
- 2° - no intra-operatório:
após a reperusão portal;
- 3° - no pós-operatório:
03 horas após a cirurgia;
- 4° - no pós-operatório:
18 horas após a cirurgia;
- 5° - no pós-operatório:
24 horas após a cirurgia;
- 6° - no pós-operatório:
48 horas após a cirurgia;

Continua.

Após a centrifugação o material sobrenadante é aspirado com uma pipeta pequena, deve se atentar para não misturar o plasma com o sangue assim como não aspirar os detritos celulares da urina, portanto aspire apenas o início do material centrifugado, caso ocorra a mistura acidentalmente o material deverá ser centrifugado novamente. Disponha o material aspirado nos ependorf identificados e tampe-os.

O material nos ependorf é encaminhado ao refrigerador -80C do 7 andar na sala do Transplante Renal, existe uma cópia da chave caso esteja fechado na Enfermaria do Transplante Renal, as caixas são dispostas na terceira prateleira no meio externamente as caixas são identificadas pelo número da caixa, tipo de material e responsável. Na parte interna horizontalmente são divididas de 1 ao 10, e verticalmente de A ao K, contendo 100 colméias para guardar os ependorf. O local de guardar cada material na caixa deve ser anotado como uma batalha naval. Exemplo: Nome: Felipe de Souza, RH454334, Tipo de Coleta: Plasma, Caixa: 3, Número da coleta: Plasma 5, Posição 1D.

O material ficará armazenado em um prazo máximo de 6 meses até a análise dos biomarcadores.

IDENTIFICAÇÃO EPENDORF :

Nome; Tipo de amostra e número da coleta. Exemplo:

Cristina da Silva

PLASMA 3 º

Conclusão.

7.13 Anexo 13 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sobre o transporte do material

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da Função Tubular e Correlação com Filtração Glomerular e Injúria Renal Aguda no perioperatório de transplante hepático

Pesquisador: Etienne Maria Vasconcellos de Macedo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06636513.4.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.294.109

Apresentação do Projeto:

adequada. O estudo pretende avaliar novos marcadores para prevenir a injúria renal aguda (IRA) que é uma complicação comum em pacientes submetidos a transplante hepático, e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo 1. Avaliar se a expressão dos biomarcadores de função glomerular, tubular e renal, no perioperatório do transplante hepático – (pré-operatório, antes da indução anestésica (1), após a reperfusão portal (2), 6 horas após a cirurgia (3), 18 horas após a cirurgia (4), e 24 (5) e 48 horas(6) após o transplante de fígado) –, pode prever diagnóstico da IRA. Objetivo Secundário: Objetivo 1. Avaliar a precocidade no diagnóstico da IRA pelo biomarcador padrão Scr e os biomarcadores estudados. Objetivo 2. Avaliar se a expressão dos biomarcadores de função glomerular, tubular e renal, no perioperatório do transplante hepático – (pré-operatório, antes da indução anestésica (1), após a reperfusão portal (2), 6 horas após a cirurgia (3), 18 horas após a cirurgia (4), e 24 (5) e 48 horas (6) após o transplante de fígado) –, pode prever a gravidade da IRA, a necessidade de TRS e a mortalidade. Objetivo 3. Construir um painel ideal de biomarcador para avaliar/ determinar o local da lesão, tipo e estadiamento da IRA.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.294.109

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

os riscos são os esperados para uma coleta de rotina para através de dispositivos comuns para a monitorização hemodinâmica destes pacientes, cito: o sangue através de cateter venoso central (CVC) e ou pressão arterial invasiva (Pai), e a urina através do cateter vesical de demora (CVD), ambos procedimentos rotineiros para o transplante de fígado.

Não haverá benefícios diretos para os pacientes no momento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que poderá futuramente obter um marcador consistente para diminuir complicações pós transplante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. O pesquisador apresenta uma emenda, que compõe o projeto de doutorado da aluna Camila Lima para ampliar a busca de marcadores, uma vez que os dados mostram que a mortalidade nesses casos tem números alarmantes.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aceita.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_563342_E1.pdf	08/08/2017 13:47:57		Aceito
Outros	PROJETO_PESQUISA_EMENDA.doc	08/08/2017 13:42:52	Etienne Maria Vasconcellos de Macedo	Aceito
Outros	SOLICITACAO_DE_AVALIACAO_ANTE_CIPADA_PAGINA_02.jpg	08/08/2017 13:39:27	Etienne Maria Vasconcellos de Macedo	Aceito
Outros	SOLICITACAO_DE_AVALIACAO_ANTE_CIPADA_PAGINA_01.jpg	08/08/2017 13:38:12	Etienne Maria Vasconcellos de Macedo	Aceito
Outros	CARTA_JUSTIFICATIVA_EMENDA.pdf	08/08/2017 13:35:37	Etienne Maria Vasconcellos de Macedo	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Página 02 de 04

Continua.

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.294.109

Outros	FOLHA_DE_ROSTO_PAGINA_02.jpg	08/08/2017 13:34:57	Etienne Maria Vasconcellos de Macedo	Aceito
Outros	FOLHA_DE_ROSTO_PAGINA_01.jpg	08/08/2017 13:33:20	Etienne Maria Vasconcellos de Macedo	Aceito
Outros	cadastro_pesquisa.pdf	23/04/2013 09:11:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2013 - ANEXO 1_TCLE Contato atualizado.doc	22/04/2013 16:24:12		Aceito
Outros	2013 - ANEXO 3 Folha de Registro[1][1].doc	22/04/2013 14:51:41		Aceito
Outros	2013 ANEXO 2 - Regulamento de Biorepositorio[1].doc	22/04/2013 14:50:07		Aceito
Outros	CADASTRO_CAPPESQ_FOLHA3bio.jpg	22/04/2013 14:46:23		Aceito
Outros	CADASTRO_CAPPESQ_FOLHA5.jpg	22/04/2013 14:15:05		Aceito
Outros	CADASTRO_CAPPESQ_FOLHA4.jpg	22/04/2013 14:13:58		Aceito
Outros	CADASTRO_CAPPESQ_FOLHA2.jpg	22/04/2013 14:12:59		Aceito
Outros	CADASTRO_CAPPESQ_FOLHA1.jpg	22/04/2013 14:09:26		Aceito
Outros	FOLHADEROSTO_PLATAFORMABRA SIL_VERSO.jpg	22/04/2013 14:08:05		Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO_PLATAFORMABRA SIL_FRENTE.jpg	22/04/2013 14:06:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2013 - Projeto_Mestrado_em_Nefrologia_.doc	22/04/2013 11:37:02		Aceito
Outros	CARTA_CIENCIA_BIOMARCADOR_UTI.jpg	22/04/2013 11:29:37		Aceito
Outros	CARTA_CIENCIA_BIOMARCADOR_CC.jpg	22/04/2013 11:29:02		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.294.109

SAO PAULO, 25 de Setembro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 04 de 04

Conclusão.

7.14 Anexo 14 - Aprovação da Importação do material biológico pelo Centro de Controle de Doenças do EUA

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE

Centers for Disease Control and Prevention
Office of Health and Safety, MS A-46
Atlanta, Georgia 30333
TEL: 404-718-2077; FAX: 404-718-2093; Email: importpermit@cdc.gov

SAFER • HEALTHIER • PEOPLE

Permit to Import Infectious Biological Agents, Infectious Substances, and Vectors

In accordance with 42 CFR Section 71.54 of the Public Health Service Foreign Quarantine Regulations, cited on the bottom of this permit, permission is granted the permittee to import into any port under control of the United States, or to receive by transfer within the United States, the material described in Item 1 below.

PHS PERMIT NO.	2018-03-009	
DATES	ISSUED: Thursday, March 08, 2018	EXPIRES: Friday, March 08, 2019
1. DESCRIPTION OF MATERIAL	HUMAN BLOOD, BLOOD PRODUCTS OR OTHER BODY FLUIDS WHICH MAY CONTAIN HEPATITIS C VIRUS.	
2. PERMITTEE (NAME, ORGANIZATION, ADDRESS AND CONTACT INFORMATION)	RAVINDRA MEHTA UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO (MEDICAL CENTER DRIVE) 9452 MEDICAL CENTER DRIVE LA JOLLA, CA 92037 TEL: 858-246-2134 FAX: 858-246-2088	
2a. OTHER AUTHORIZED PERMIT USERS	SUCHETA VAINGANKAR UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO 9452 MEDICAL CENTER DRIVE LA JOLLA, CA 92037 TEL: 619-543-7298 FAX: 619-543-7769	
3. SOURCE OF MATERIAL (NAME, ORGANIZATION, ADDRESS, COUNTRY)	CAMILA LIMA UNIVERSIDADE DE SAO PAULO AV DR ENEAS DE CARVALHO AGUIAR 255 SALA 11F 7ºANDAR SAO PAULO BRAZIL 05403-000	
4. TYPE OF PERMIT AND INSTRUCTIONS FOR USE	<p>As the permittee, your facility will be subject to inspection at some time in the future to confirm that the importer's biosafety measures are commensurate with the hazard posed by the items to be imported and the level of risk given its intended use.</p> <p> ☐ Single Importation into the U.S. ☐ Single Transfer Within the U.S. ☒ Multiple Importation into the U.S. ☐ Multiple Transfer Within the U.S. </p> <p>A. Record of each importation shall be maintained on permanent file by permittee. B. Enclosed label(s) must be forwarded to the shipper(s). C. One label shall be affixed to shipping container. Enclosed labels may be photocopied.</p>	
5. CONDITIONS OF ISSUANCE ITEMS APPLICABLE WHEN CHECKED	<p>☐ A. Subsequent distribution, within the U.S., of the material described in this permit is prohibited without prior authorization by the Public Health Service.</p> <p>☒ B. All material is for laboratory use only - Not for use in the production of biologics for humans or animals.</p> <p>☒ C. All material is free of tissues, serum and plasma of domestic and wild ruminants, swine and equines.</p> <p>☐ D. Additional Requirements: ☐ IATA Packaged to preclude escape. ☐ USDA permit may be required (Telephone: 301-851-3300).</p> <p>☒ E. Work with the agent(s) described shall be restricted to areas and conditions meeting requirements in the CDC/NIH publication "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories."</p> <p>☒ F. Packaging must conform to 49 CFR Sections 171-180.</p>	
6. Signature of Issuing officer Samuel S. Edwin, Ph.D. Director, Division of Select Agents and Toxins		

CDC 0728 (F 13.40) REV. 4-13

42 CFR 71.54. Permit to Import Biological Agents, Infections Substances, and Vectors

A person may not import into the United States any infectious biological agent, infectious substance, or vector unless: It is accompanied by a permit issued by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The possession of a permit issued by the CDC does not satisfy permitting requirements placed on materials by the U.S. Department of Agriculture that may pose hazards to agriculture or agricultural production in addition to hazards to human health.

Continua.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

Public Health Service
Centers for Disease Control
and Prevention (CDC)
Atlanta, GA 30329-4027

To: Importer, Public Health Service Import Permit

Subject: Approval to import infectious biological agents, infectious substances or vectors

Attached, find your Public Health Service (PHS) import permit. The PHS import permit is valid only for the material(s), locations and conditions described in your application. The issuance and expiration dates located on the import permit pertain only to the dates that the importer is allowed to import into the United States the infectious biological agents, infectious substances, and vectors listed on the import permit. These dates do not relate to the conditions of continued possession associated with the permit. The conditions of continued possession listed on the permit remain in effect until the importer is no longer in possession of the imported material. The possession of a permit issued by the CDC does not satisfy permitting requirements placed on materials by the U.S. Department of Agriculture that may pose hazards

The permittee must ensure that:

1. The enclosed import permit and labels are forwarded to the shipper(s). The enclosed permit and labels may be photocopied if more are needed.
2. The shipper includes the PHS import permit with the shipping documents and the enclosed label (or copy of label) should be affixed to the outer shipping container.
3. A record of each importation (including permits and shipping documents) is maintained.
4. The shipment of infectious biological agents, infectious substance or vectors must be packaged, labeled, and shipped in accordance with all applicable federal and international regulations. Please note that the issuance of an import permit is not an authorization to hand carry the material.

Other permits may be required for the importation of infectious biological agents, infectious substances or vectors. If you have questions regarding this correspondence, contact CDC Import Permit Program at (404) 718-2077 or visit our website at <http://www.cdc.gov/od/eaipp/>.

A handwritten signature in blue ink that reads "Glen DeGruy".

Glen DeGruy
Team Lead, Import Permit Program
Division of Select Agents and Toxins
Office of Public Health Preparedness and Response
Centers for Disease Control and Prevention

This document is intended for the exclusive use of the recipient(s) named above. It may contain sensitive information that is protected, privileged, or confidential, and it should not be disseminated, distributed, or copied to persons not authorized to receive such information. If you are not the intended recipient(s), any dissemination, distribution, or copying is strictly prohibited. If you think you have received this document in error, please notify the sender immediately and destroy the original. Thank you.

Conclusão.

8. REFERÊNCIAS

1. Barri YM, Sanchez EQ, Jennings LW, Melton LB, Hays S, Levy MF, et al. Acute kidney injury following liver transplantation: definition and outcome. *Liver Transpl*. 2009;15(5):475–83.
 2. Agbim U, Asrani SK. The path chosen matters for patients with cirrhosis and the acute kidney injury to chronic kidney disease continuum. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(11):2182–4.
 3. Abelha FJ, Botelho M, Fernandes V, Barros H. Determinants of postoperative acute kidney injury. *Crit Care*. 2009;13(3):R79
 4. Yalavarthy R, Edelstein CL, Teitelbaum I. Acute renal failure and chronic kidney disease following liver transplantation. *Hemodial Int*. 2007;11 Suppl 3(s3):S7-12.
 5. Afonso RC, Hidalgo R, Zurstrassen MPVC, Fonseca LEP, Pandullo FL, Rezende MB, et al. Impact of renal failure on liver transplantation survival. *Transplant Proc*. 2008;40(3):808–10.
 6. Kellum JA, Lameire N, KDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care*. 2013;17(1):204.
 7. Angeli P, Ginès P, Wong F, Bernardi M, Boyer TD, Gerbes A, et al. Diagnosis and management of acute kidney injury in patients with cirrhosis: revised consensus recommendations of the International Club of Ascites. *J Hepatol*. 2015;62(4):968–74.
 8. Khatua CR, Sahu SK, Barik RK, Pradhan S, Panigrahi S, Mishra D, et al. Validation of International Club of Ascites subclassification of stage 1 acute kidney injury in chronic liver disease: Validation of subclassification of stage 1 acute kidney injury. *JGH Open*. 2019;3(4):290–4.
 9. Huelin P, Piano S, Solà E, Stanco M, Solé C, Moreira R, et al. Validation of a staging system for acute kidney injury in patients with cirrhosis and association with acute-on-chronic liver failure. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(3):438-445.e5.
 10. Kamath PS, Kim WR, Advanced Liver Disease Study Group. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007;45(3):797–805.
 11. Nair S, Verma S, Thuluvath PJ. Pretransplant renal function predicts survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation: Pretransplant renal function predicts survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 2002;35(5):1179–85.
 12. Cholongitas E, Marelli L, Kerry A, Senzolo M, Goodier DW, Nair D, et al. Different methods of creatinine measurement significantly affect MELD scores. *Liver Transpl*. 2007;13(4):523–9.
 13. Karapanagiotou A, Kydona C, Dimitriadis C, Sgourou K, Giasnetsova T, Fouzas I, et al. Acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44(9):2727–9.
 14. Feldkamp T, Bienholz A, Kribben A. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) for the detection of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(5):1456–8.
 15. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.
-

16. Schmitt TM, Kumer SC, Al-Osaimi A, Shah N, Argo CK, Berg C, et al. Combined liver-kidney and liver transplantation in patients with renal failure outcomes in the MELD era. *Transpl Int.* 2009;22(9):876–83.
 17. Nacif LS, Andraus W, Martino RB, Santos VR, Pinheiro RS, Haddad LB, et al. Adoption of MELD score increases the number of liver transplant. *Arq Bras Cir Dig.* 2014;27(3):201–3.
 18. Brown RS Jr, Lombardero M, Lake JR. Outcome of patients with renal insufficiency undergoing liver or liver-kidney transplantation^{1,2}. *Transplantation.* 1996;62(12):1788–93.
 19. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3365–70.
 20. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, et al. Renal replacement therapy and orthotopic liver transplantation: the role of continuous veno-venous hemodialysis. *Transplantation.* 2001;71(10):1424–8.
 21. Fabrizi F, Dixit V, Martin P, Messa P. Chronic kidney disease after liver transplantation: Recent evidence. *Int J Artif Organs.* 2010;33(11):803–11.
 22. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007;11(2):R31.
 23. Belcher JM, Sanyal AJ, Peixoto AJ, Perazella MA, Lim J, Thiessen-Philbrook H, et al. Kidney biomarkers and differential diagnosis of patients with cirrhosis and acute kidney injury: BELCHER ET AL. *Hepatology.* 2014;60(2):622–32.
 24. Kanbay M, Kasapoglu B, Perazella MA. Acute tubular necrosis and pre-renal acute kidney injury: utility of urine microscopy in their evaluation- a systematic review. *Int Urol Nephrol.* 2010;42(2):425–33.
 25. Sirota JC, Klawitter J, Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *J Toxicol.* 2011;2011:328120.
 26. Nejat M, Pickering JW, Devarajan P, Bonventre JV, Edelstein CL, Walker RJ, et al. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. *Kidney Int.* 2012;81(12):1254–62.
 27. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney inter., Suppl.* 2012; 2: 1-138.
 28. Yong K, Dogra G, Boudville N, Pinder M, Lim W. Acute kidney injury: controversies revisited. *Int J Nephrol.* 2011;2011:762634.
 29. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med.* 2008;148(11):810–9.
 30. Malyszko J. Biomarkers of acute kidney injury in different clinical settings: a time to change the paradigm? *Kidney Blood Press Res.* 2010;33(5):368–82.
 31. Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med Diagn.* 2008;2(4):387–98.
 32. Briggs JP. The hunt for the perfect biomarker for acute kidney injury: back to gamma-trace? *Kidney Int.* 2008;74(8):987–9.
-

33. Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med*. 2008;36(4 Suppl):S159-65.
 34. Xu X, Ling Q, Wei Q, Wu J, Gao F, He Z-L, et al. An effective model for predicting acute kidney injury after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2010;9(3):259-63.
 35. Kundakci A, Pirat A, Komurcu O, Torgay A, Karakayalı H, Arslan G, et al. Rife criteria for acute kidney dysfunction following liver transplantation: incidence and risk factors. *Transplant Proc*. 2010;42(10):4171-4.
 36. Soni SS, Pophale R, Ronco C. New biomarkers for acute renal injury. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(8):1257-63.
 37. Koyner JL, Vaidya VS, Bennett MR, Ma Q, Worcester E, Akhter SA, et al. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(12):2154-65.
 38. de Geus HRH, Betjes MG, Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J*. 2012;5(2):102-8.
 39. Ostermann M, Zarbock A, Goldstein S, Kashani K, Macedo E, Murugan R, et al. Recommendations on acute kidney injury biomarkers from the Acute Disease Quality Initiative consensus conference: A consensus statement: A consensus statement. *JAMA Netw Open*. 2020;3(10):e2019209.
 40. Oh D-J. A long journey for acute kidney injury biomarkers. *Ren Fail*. 2020;42(1):154-65.
 41. Wen Y, Parikh CR. Current concepts and advances in biomarkers of acute kidney injury. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2021;1-24.
 42. Kane-Gill SL, Meersch M, Bell M. Biomarker-guided management of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2020;26(6):556-62.
 43. Lima C, Macedo E. Urinary biochemistry in the diagnosis of acute kidney injury. *Dis Markers*. 2018;2018:4907024.
 44. Macedo E, Lima C. Comprehensive assessment of kidney health in acute kidney injury: Can it be achieved? *Nephron*. 2019;143(3):188-92.
 45. Lima C, de Paiva Haddad LB, de Melo PDV, Malbouisson LM, do Carmo LPF, D'Albuquerque LAC, et al. Early detection of acute kidney injury in the perioperative period of liver transplant with neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):367.
 46. LaFavers KA, Macedo E, Garimella PS, Lima C, Khan S, Myslinski J, et al. Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel. *Sci Transl Med*. 2019;11(512):eaaw3639.
 47. Lima C, Vattimo MF, Macedo E. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Promising Biomarker in Acute Kidney Injury [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.93650. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/neutrophil-gelatinase-associated-lipocalin-as-a-promising-biomarker-in-acute-kidney-injury>.
 48. Lima C, Macedo E. Proencefalina promissor biomarcador de filtração renal no transplante hepático. *Braz. J. Nephrol. (J. Bras. Nefrol)* 2020; 42(3 supl. 1): 23.
 49. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Vigilância Sanitária sobre o transporte de material biológico humano para fins de diagnóstico clínico, 2015.
-

50. Lemon SC, Roy J, Clark MA, Friedmann PD, Rakowski W. Classification and regression tree analysis in public health: Methodological review and comparison with logistic regression. *Ann Behav Med*. 2003;26(3):172–81.
 51. Niemann CU, Walia A, Waldman J, Davio M, Roberts JP, Hirose R, et al. Acute kidney injury during liver transplantation as determined by neutrophil gelatinase-associated lipocalin: Perioperative Acute Kidney Injury. *Liver Transpl*. 2009;15(12):1852–60.
 52. Portal AJ, McPhail MJW, Bruce M, Coltart I, Slack A, Sherwood R, et al. Neutrophil gelatinase--associated lipocalin predicts acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl*. 2010;16(11):1257–66.
 53. Wagener G, Minhaz M, Mattis FA, Kim M, Emond JC, Lee HT. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(5):1717–23.
 54. Sirota JC, Walcher A, Faubel S, Jani A, McFann K, Devarajan P, et al. Urine IL-18, NGAL, IL-8 and serum IL-8 are biomarkers of acute kidney injury following liver transplantation. *BMC Nephrol*. 2013;14:17.
 55. Jeong T-D, Kim S, Lee W, Song G-W, Kim Y-K, Chun S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of acute kidney injury in liver transplantation. *Clin Transplant*. 2012;26(5):775–81.
 56. Dedeoglu B, de Geus HRH, Fortrie G, Betjes MGH. Novel biomarkers for the prediction of acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Biomark Med*. 2013;7(6):947–57.
 57. Tsuchimoto A, Shinke H, Uesugi M, Kikuchi M, Hashimoto E, Sato T, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a useful biomarker for tacrolimus-induced acute kidney injury in liver transplant patients. *PLoS One*. 2014;9(10):e110527.
 58. Baron-Stefaniak J, Schiefer J, Miller EJ, Berlakovich GA, Baron DM, Faybik P. Comparison of macrophage migration inhibitory factor and neutrophil gelatinase-associated lipocalin-2 to predict acute kidney injury after liver transplantation: An observational pilot study. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183162.
 59. Gayat E, Touchard C, Hollinger A, Vieillard-Baron A, Mebazaa A, Legrand M, et al. Back-to-back comparison of penKID with NephroCheck® to predict acute kidney injury at admission in intensive care unit: a brief report. *Crit Care*. 2018;22(1):24.
 60. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care*. 2013;17(1):R25.
 61. Barreto AGC, Daher EF, Silva Junior GB, Garcia JHP, Magalhães CBA, Lima JMC, et al. Risk factors for acute kidney injury and 30-day mortality after liver transplantation. *Ann Hepatol*. 2015;14(5):688–94.
 62. Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem*. 2000;37 (Pt 1)(1):49–59.
 63. Nasser-Moghaddam S, Ganji M-R, Kochari M-R, Tofangchiha S. Serum cystatin-C is not superior to serum creatinine in predicting glomerular filtration rate in cirrhotic patients. *Middle East J Dig Dis*. 2013;5(4):209–16.
-

64. Oddoze C, Morange S, Portugal H, Berland Y, Dussol B. Cystatin C is not more sensitive than creatinine for detecting early renal impairment in patients with diabetes. *Am J Kidney Dis*. 2001;38(2):310–6.
 65. Schüick O, Teplan V, Jabor A, Stollova M, Skibova J. Glomerular filtration rate estimation in patients with advanced chronic renal insufficiency based on serum cystatin C levels. *Nephron Clin Pract*. 2003;93(4):c146-51.
 66. Delanaye P, Nellessen E, Cavalier E, Depas G, Grosch S, Defraigne J-O, et al. Is cystatin C useful for the detection and the estimation of low glomerular filtration rate in heart transplant patients? *Transplantation*. 2007;83(5):641–4.
 67. Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber AR. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem*. 2001;47(11):2055–9.
 68. Bökenkamp A, van Wijk JAE, Lentze MJ, Stoffel-Wagner B. Effect of corticosteroid therapy on serum cystatin C and beta2-microglobulin concentrations. *Clin Chem*. 2002;48(7):1123–6.
 69. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. Serum cystatin C, a potent inhibitor of cysteine proteinases, is elevated in asthmatic patients. *Clin Chim Acta*. 2000;300(1–2):83–95.
 70. Fricker M, Wiesli P, Brändle M, Schwegler B, Schmid C. Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney Int*. 2003;63(5):1944–7.
 71. den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, Berghout A. Is cystatin C a marker of glomerular filtration rate in thyroid dysfunction? *Clin Chem*. 2003;49(9):1558–9.
 72. Manetti L, Pardini E, Genovesi M, Campomori A, Grasso L, Morselli LL, et al. Thyroid function differently affects serum cystatin C and creatinine concentrations. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(4):346–9.
 73. Denning GM, Ackermann LW, Barna TJ, Armstrong JG, Stoll LL, Weintraub NL, et al. Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides*. 2008;29(1):83–92.
 74. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Brozyna AA, Granese J, Pisarchik A, et al. Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):613–22.
 75. Marino R, Struck J, Hartmann O, Maisel AS, Rehfeldt M, Magrini L, et al. Diagnostic and short-term prognostic utility of plasma pro-enkephalin (pro-ENK) for acute kidney injury in patients admitted with sepsis in the emergency department. *J Nephrol*. 2015;28(6):717–24.
 76. Kim H, Hur M, Lee S, Marino R, Magrini L, Cardelli P, et al. Proenkephalin, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and estimated glomerular filtration rates in patients with sepsis. *Ann Lab Med*. 2017;37(5):388–97.
 77. Hollinger A, Wittebole X, François B, Pickkers P, Antonelli M, Gayat E, et al. Proenkephalin A 119-159 (penkid) is an early biomarker of septic acute kidney injury: The kidney in sepsis and Septic Shock (Kid-SSS) study. *Kidney Int Rep*. 2018;3(6):1424–33.
 78. Caironi P, Latini R, Struck J, Hartmann O, Bergmann A, Bellato V, et al. Circulating proenkephalin, acute kidney injury, and its improvement in patients with severe sepsis or shock. *Clin Chem*. 2018;64(9):1361–9.
-

79. Fuhrman DY, Kellum JA, Joyce EL, Miyashita Y, Mazariegos GV, Ganoza A, et al. The use of urinary biomarkers to predict acute kidney injury in children after liver transplant. *Pediatr Transplant*. 2020;24(1):e13608.
 80. Khosravi MB, Milani S, Kakaei F. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin versus serum creatinine for the prediction of acute kidney injury after liver transplantation. *Int J Organ Transplant Med*. 2013;4(3):102–9.
 81. Yeung ACY, Morozov A, Robertson FP, Fuller BJ, Davidson BR. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in predicting acute kidney injury following orthotopic liver transplantation: A systematic review. *Int J Surg*. 2018;59:48–54.
 82. Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3):665–73.
 83. Klein SJ, Brandtner AK, Lehner GF, Ulmer H, Bagshaw SM, Wiedermann CJ, et al. Biomarkers for prediction of renal replacement therapy in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2018;44(3):323–36.
 84. Bocedi A, Noce A, Marrone G, Noce G, Cattani G, Gambardella G, et al. Glutathione transferase P1-1 an enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and in environmental pollution. *Nutrients*. 2019;11(8):1741.
 85. Shu K-H, Wang C-H, Wu C-H, Huang T-M, Wu P-C, Lai C-H, et al. Urinary π -glutathione S-transferase predicts advanced acute kidney injury following cardiovascular surgery. *Sci Rep*. 2016;6(1):26335.
 86. Seabra VF, Perianayagam MC, Tighiouart H, Liangos O, dos Santos OFP, Jaber BL. Urinary α -GST and π -GST for prediction of dialysis requirement or in-hospital death in established acute kidney injury. *Biomarkers*. 2011;16(8):709–17.
 87. Galli F, Rovidati S, Benedetti S, Buoncristiani U, Covarelli C, Floridi A, et al. Overexpression of erythrocyte glutathione S-transferase in uremia and dialysis. *Clin Chem*. 1999;45(10):1781–8.
 88. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, et al. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(11):2894–902.
 89. Siew ED, Ware LB, Bian A, Shintani A, Eden SK, Wickersham N, et al. Distinct injury markers for the early detection and prognosis of incident acute kidney injury in critically ill adults with preserved kidney function. *Kidney Int*. 2013;84(4):786–94.
 90. Jotwani V, Scherzer R, Estrella MM, Jacobson LP, Witt MD, Palella FJ Jr, et al. HIV infection, tenofovir, and urine α 1-microglobulin: A cross-sectional analysis in the multicenter AIDS cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2016;68(4):571–81.
 91. Garimella PS, Lee AK, Ambrosius WT, Bhatt U, Cheung AK, Chonchol M, et al. Markers of kidney tubule function and risk of cardiovascular disease events and mortality in the SPRINT trial. *Eur Heart J*. 2019;40(42):3486–93.
 92. Garimella PS, Li K, Naviaux JC, Shlipak MG, Abdelmalek JA, Castro E, et al. Utility of spot urine specimens to assess tubular secretion. *Am J Kidney Dis*. 2017;69(5):709–11.
-

93. Wang K, Kestenbaum B. Proximal tubular secretory clearance: A neglected partner of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(8):1291–6.
 94. Suchy-Dicey AM, Laha T, Hoofnagle A, Newitt R, Sirich TL, Meyer TW, et al. Tubular secretion in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(7):2148–55.
 95. Espinel CH. The FeNa test: Use in the differential diagnosis of acute renal failure. *JAMA*. 1976;236(6):579.
 96. Lee MJ, Chang TI, Lee J, Kim YH, Oh K-H, Lee SW, et al. Urine osmolality and renal outcome in patients with chronic kidney disease: Results from the KNOW-CKD. *Kidney Blood Press Res*. 2019;44(5):1089–100.
 97. El-Achkar TM, Wu X-R. Uromodulin in kidney injury: an instigator, bystander, or protector? *Am J Kidney Dis*. 2012;59(3):452–61.
 98. Bennett MR, Pyles O, Ma Q, Devarajan P. Preoperative levels of urinary uromodulin predict acute kidney injury after pediatric cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Nephrol*. 2018;33(3):521–6.
 99. Chojeła D, Koziół MM, Targońska S, Smarz-Widelska I. Association of uromodulin with acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*. 2020;17(3):160–4.
 100. Patidar KR, Garimella PS, Macedo E, Slaven JE, Ghabril MS, Weber RE, et al. Admission plasma uromodulin and the risk of acute kidney injury in hospitalized patients with cirrhosis: a pilot study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019;317(4):G447–52.
 101. Romero MC, Zanaro N, González L, Trigo P, Inventarza O, Nesse A. Tamm-Horsfall protein excretion to predict the onset of renal insufficiency. *Clin Biochem*. 2002;35(1):65–8.
 102. Bojic S, Kotur-Stevuljevic J, Kalezic N, Stevanovic P, Jelic-Ivanovic Z, Bilanovic D, et al. Diagnostic value of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in sepsis-associated acute kidney injury. *Tohoku J Exp Med*. 2015;237(2):103–9.
 103. Wang M, Zhang Q, Zhao X, Dong G, Li C. Diagnostic and prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 for sepsis in the Emergency Department: an observational study. *Crit Care*. 2014;18(6):634.
 104. Bieniaś B, Sikora P. Selected metal matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases as potential biomarkers for tubulointerstitial fibrosis in children with unilateral hydronephrosis. *Dis Markers*. 2020;2020:9520309.
 105. Beker BM, Corleto MG, Fieiras C, Musso CG. Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(4):705–13.
 106. Moledina DG, Isguven S, McArthur E, Thiessen-Philbrook H, Garg AX, Shlipak M, et al. Plasma monocyte chemotactic protein-1 is associated with acute kidney injury and death after cardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 2017;104(2):613–20.
-