BEATRIZ HELENA CERMARIA SOARES DA SILVA

**Caracterização da função dos peptídeos antimicrobianos em
dois modelos experimentais de lesão renal aguda**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos
Imunes e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro
da Silva

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Beatriz Helena Cermaria Soares da
Caracterização da função dos peptídeos
antimicrobianos em dois modelos experimentais de
lesão renal aguda / Beatriz Helena Cermaria Soares
da Silva. -- São Paulo, 2021.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infeciosos.
Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.Peptídeos catiônicos
antimicrobianos 2.Catelicidinas 3.Defensinas
4.Lipocalina-2 5.Imunidade inata 6.Inflamação
7.Lesão renal aguda 8.Sepse 9.Rabdomiólise

USP/FM/DBD-201/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

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

*Para minha mãe, **Rita**, por tudo.*

*Para minha irmã, **Ana Cláudia**, com quem tanto aprendo.*

*Para **Leandro**, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.*

*Para meu sobrinho **Miguel**, nossa renovação de esperança no futuro.*

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. **Fabiano Pinheiro da Silva**, por esta oportunidade, e por todos os ensinamentos, incentivos e cobranças.

Ao Prof. **Marcel Cerqueira César Machado**, pelas contribuições tão importantes, em nossas reuniões.

Minha profunda gratidão à **Suely Kunimi Kubo Ariga**, pela atenção, supervisão, e pela disponibilidade em me orientar nos procedimentos com os animais de experimentação. Cheguei ao laboratório sem experiência em pesquisa básica, e precisei aprender muito – em todos os sentidos.

À **Denise Frediani Barbeiro** e ao **Hermes Vieira Barbeiro**, por toda a orientação, visão crítica, e pela disponibilidade em orientar no processamento das amostras. Agradeço imensamente ao Hermes pelas primeiras análises estatísticas, e pela habilidade em explicar e esclarecer minhas dúvidas quanto aos métodos.

À **Thaís Lima** e à **Marcia Koike** pelas valiosas contribuições, na execução da pesquisa, e no dia-a-dia no laboratório.

Ao Sr. **Geraldo** e à Sra. **Kelli Gouvea**, muito obrigada por todo o suporte, fundamental para a realização dos trabalhos de todos nós, alunos do LIM-51.

Aos **funcionários do Biotério da FMUSP**, especialmente ao Sr. **Antonio**, pelas orientações e auxílio no cuidado com os animais.

À **Caroline S. Faria**, do LIM-03, pela contribuição com as dosagens laboratoriais, essenciais para o prosseguimento dos experimentos.

Ao Dr. **Rildo Volpini**, pela contribuição com as análises histológicas no presente estudo.

Ao **LEAC LAB** e ao **Laboratório Histocell**, que foram fundamentais para a execução de partes essenciais do projeto.

Aos colegas do grupo de pesquisa: **Alana, Ewerton, Luci, Ismael** e **Lucas**. Ao **Rafael Abadessa**, pelo compartilhamento de dúvidas, angústias, apoio e solidariedade na execução dos nossos projetos – essenciais para prosseguirmos, inclusive, em meio à nossa atuação na linha de frente!

Meu agradecimento especial à **Marta Lúcia de Almeida**, pela atenção e paciência em me ensinar as rotinas do laboratório, especialmente nos cuidados com a gaiola metabólica. Você se tornou a minha primeira referência, por meio da qual consegui me situar e começar a me organizar.

Às queridas **Neusa** e **Rosângela Pimentel**, meu muito obrigada pelas conversas, desabafos e incentivos!

Às brilhantes **Juliana Nascimento** e **Mariana Serra**, meu agradecimento pela divisão das bancadas e colaboração no dia-a-dia – e meu pedido de desculpas, por muitas vezes não ter me organizado à altura das vossas organizações! A disciplina de vocês é um exemplo para mim.

À Dra. **Letícia Sandre Vendrame Saes**, que me recebeu muito ternamente quando cheguei em São Paulo, no ano de 2010, e por todas as

oportunidades que daí vieram. À Dra. **Salete Aparecida da Ponte Nacif**, que foi essencial para a minha permanência em São Paulo, naquele ano. Recebi todo o apoio e compreensão necessárias para prosseguir – e devo muito (muito!) da minha carreira ao vosso auxílio.

À **Conceição Ap. Tomazini**, minha eterna gratidão, em todos os momentos. Não tenho palavras para expressar o quanto a Sra. foi essencial em tantos aspectos – e continua sendo. Obrigada por sempre acreditar, incentivar e compreender. Se cheguei até aqui, foi graças a toda a ajuda da Sra., em momentos muito difíceis.

Às Dras. **Liliane Haddad**, **Alessandra Balaban** e **Natália Rufino**, meu imenso reconhecimento pelo vosso profissionalismo, pela atenção e dedicação, com os quais pude me estruturar melhor para prosseguir, no âmbito pessoal e profissional.

Agradeço à minha **família**, por todo o suporte necessário, e pela compreensão quanto aos momentos de ausência. Sempre me preocupei em ser um motivo de orgulho, e este trabalho também é, de certa forma, de vocês. À minha mãe, **Rita Consuelo**, obrigada pelo rigor, disciplina, e pelo exemplo ético – mas não apenas por isso: especialmente pela sua força, fé e compaixão, imensamente maiores que as minhas. À minha irmã, **Ana Cláudia**, pela sabedoria e lucidez, sempre (nem parece que eu que sou a irmã mais velha!) Ao meu cunhado, **João Paulo**, por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação em sua área. Ao **Miguel**, nosso pequeno cientista, com quem tanto me encanto ao vê-lo descobrir o mundo. Ao meu esposo, **Leandro Massahiro**, pelo

companheirismo, pelos projetos que temos conseguido realizar, e sonhos que ainda alcançaremos.

Especialmente, a todos os profissionais atuantes na linha de frente da pandemia de Covid-19 – meu respeito e minha gratidão. Concluir o Doutorado em meio à pandemia, é uma forma de resistência: que a Ciência impere contra o obscurantismo.

"Não podemos pensar em construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos, e o nosso dever particular é ajudar aqueles para os quais podemos ser úteis"

Marie Curie

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 Introdução

1.1 Lesão renal aguda	
1.1.1 Definição e Epidemiologia.....	1
1.1.2 Critérios diagnósticos – biomarcadores.....	4
1.1.3 Etiologia – Inflamação e LRA.....	6
1.2 Sepses	
1.2.1 Definição e Epidemiologia.....	9
1.2.2 Diagnóstico e tratamento.....	13
1.2.3 LRA associada à sepses.....	15
1.2.4 Sepses e Inflamação.....	19
1.3 Rabdomiólise	
1.3.1 Definição e Epidemiologia.....	20
1.3.2 Diagnóstico e LRA associada à rabdomiólise.....	21
1.3.3 Metabolismo do heme.....	22
1.4 Modelos experimentais de lesão renal aguda.....	26
1.5 Modelo de LRA associada à sepses.....	28
1.6 Modelo de LRA associada à rabdomiólise.....	29
1.7 Peptídeos antimicrobianos.....	31
1.8 NGAL.....	39

2 Hipótese do estudo..... 41

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal.....	42
3.2 Objetivos secundários.....	42

4 Materiais e Métodos

4.1 Local de experimentação.....	44
4.2 Aspectos éticos.....	44
4.3 Animais de experimentação.....	45
4.4 Gaiola metabólica.....	46
4.5 Modelo de rabdomiólise.....	47
4.6 Modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP).....	47
4.7 Grupo controle.....	49
4.8 Eutanásia e coleta dos tecidos.....	50
4.9 Separação do soro.....	51
4.10 Dosagem sérica dos marcadores de lesão renal.....	51

4.11	Purificação de proteínas.....	52
4.12	Dosagem de peptídeos antimicrobianos e citocinas nos tecidos (ELISA).....	54
4.13	Dosagem de citocinas no soro (Milliplex®).....	56
4.14	Histologia.....	57
4.15	Curva de mortalidade.....	58
4.16	Descarte das carcaças.....	58
4.17	Análise estatística.....	58
5	Resultados	
5.1	Primeiros experimentos - gaiola metabólica.....	60
5.2	Segunda fase de experimentos.....	61
5.3	Comparação entre os animais submetidos ao modelo de LRA por rabdomiólise e os controles saudáveis.....	62
5.3.1	Curva de mortalidade.....	62
5.3.2	Valores de CPK, creatinina, ureia, ácido úrico, potássio, cálcio ionizado e fósforo.....	63
5.3.3	Valores de citocinas pelo método Milliplex®.....	66
5.3.4	Valores de citocinas no tecido renal, nos grupos selvagem e rabdomiólise, pelo método ELISA.....	69
5.3.5	Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA.....	71
5.3.6	Valores de β -defensinas 1 e 3 nos tecidos renal e pulmonar, pelo método ELISA.....	72
5.3.7	Valores de α -defensina 5 no íleo, pelo método ELISA.....	74
5.3.8	Avaliação da lesão tecidual renal à histologia, pelo Escore de Lesão Tubular	74
5.4	Avaliação comparativa da lesão renal associada à sepse e à rabdomiólise, com os controles saudáveis.....	75
5.4.1	Valores de CPK, creatinina, ureia, ácido úrico, potássio, cálcio ionizado e fósforo.....	76
5.4.2	Valores de citocinas pelo método Milliplex®.....	79
5.4.3	Valores de citocinas no tecido renal, pelo método ELISA.....	81
5.4.4	Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA.....	83
5.4.5	Valores de β -defensinas 1 e 3 no tecido renal e pulmonar, pelo método ELISA.....	84
5.4.6	Valores de α -defensina 5 no íleo, pelo método ELISA.....	86
5.4.7	Avaliação da lesão tecidual renal à histologia, pelo Escore de Lesão Tubular.....	86
6	Discussão	
6.1	Resultados.....	88
6.2	Limitações do estudo.....	92
6.3	Dificuldades à execução e seguimento do cronograma inicialmente proposto.....	94

7	Conclusões.....	95
8	Anexos.....	97
9	Referências.....	99

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

%	porcentagem
<	menor
>	maior
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
®	marca registrada
°C	graus Celsius
µg	micrograma
ALA	ácido aminolevulínico
AMP	<i>antimicrobial peptide</i> (peptídeo antimicrobiano)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APACHE II	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
BUN	<i>blood urea nitrogen</i> (nitrogênio ureico no sangue)
CAMP	<i>cathelicidin antimicrobial peptide</i> (peptídeo antimicrobiano catelicidina)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CID-10	Classificação Internacional de Doenças – 10ª Edição
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i> (ligadura e punção cecal)
cm	centímetro
CO	monóxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPK	creatinofosfoquinase
CRAMP	<i>cathelicidin related antimicrobial peptide</i> (peptídeo antimicrobiano relacionado à catelicidina)
CXCR	<i>chemokine receptor</i> (receptor de quimiocinas)

DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i> (padrão molecular associado ao dano)
dL	decilitro
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
DRC	doença renal crônica
EGF	<i>epithelial growth factor</i> (fator de crescimento epitelial)
ENA-78	<i>epithelial neutrophil-activating protein 78</i> (peptídeo epitelial ativador de neutrófilos)
EUA	Estados Unidos da América
Fe	ferro
FPRL1	<i>formyl peptide receptor-like 1</i> (receptor de formil peptídeo 1)
FR	frequência respiratória
g	grama
G	aceleração gravitacional
GCPR	<i>G-protein-coupled receptor</i> (receptor acoplado à proteína G)
hCAP18	<i>human cationic antimicrobial peptide</i> (peptídeo catiônico antimicrobiano humano) - sinônimo de LL-37
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i> (fator induzido por hipóxia)
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> (molécula de adesão intercelular-1)
IGFBP7	<i>insulin-like growth factor-binding protein 7</i> (proteína carreadora de IGF7)
IL	interleucina
ipm	inspirações por minuto
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcome</i>
kg	quilograma
KIM-1	<i>kidney injury molecule-1</i> (molécula de injúria renal 1)
KO	<i>knockout</i>
LPS	lipopolissacarídeos
LRA	lesão renal aguda
MAP quinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógenos)

MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> (proteína quimiotática de monócitos-1)
mg	miligrama
mm	milímetro
mmHg	milímetro de mercúrio
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina)
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa beta</i> (fator nuclear kappa beta)
ng	nanograma
NGAL	<i>neutrophil gelatinase associated lipocalin</i> (lipocalina associada à gelatinase neutrofílica)
NLRP3	<i>nod-like receptor family pyrin domain containing 3</i> (família de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3)
NOD-like	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i> (receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo)
P2X7	<i>purinoceptor 7</i> (receptor purinérgico do tipo 7)
PaCO ₂	pressão arterial parcial de CO ₂
PAM	pressão arterial média
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
pg	picograma
PGRSS	Programa de Gerenciamento dos Resíduos dos Serviços de Saúde
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> (receptores de reconhecimento de padrão)
qSOFA	<i>quick SOFA</i> (avaliação abreviada do escore SOFA)
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i> (regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAPS3	<i>Simplified Acute Physiology Score 3</i>
Sepsis-3	nova definição de sepse (2016)

SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SSC	<i>Surviving Sepsis Campaign</i>
TFG	taxa de filtração glomerular
TIMP-2	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases-2</i> (inibidor tecidual de metaloproteinase 2)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (receptor do tipo Toll)
TNF- α	<i>tumor necrosis fator alpha</i> (fator de necrose tumoral alfa)
TRS	terapia renal substitutiva
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	ultravioleta
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão vascular 1)
WT	<i>wild-type</i> (selvagem)
α	alfa
β	beta

Lista de Tabelas

Tabela 1	Classificação da LRA segundo os critérios do KDIGO.....	3
Tabela 2	Crítérios de SIRS.....	10
Tabela 3	Crítérios do escore SOFA.....	11
Tabela 4	Crítérios do qSOFA.....	12
Tabela 5	Dosagens e processos realizados em cada um dos materiais coletados.....	54

Lista de Figuras

Figura 1	Biomarcadores de lesão renal e local de origem no néfron. Os marcadores ressaltados em azul são dosados na urina, enquanto os marcadores ressaltados em verde são dosados no soro.....	6
Figura 2	Fatores de risco, modificadores da doença e desfechos associados à LRA e à DRC.....	8
Figura 3	Relação entre pressão arterial e perfusão tecidual. A curva relacionada à inflamação é um modelo teórico.....	14
Figura 4	Interação fisiopatológica entre sepse e LRA, na LRA associada à sepse.....	18
Figura 5	Processo fisiológico e fisiopatológico de metabolização do heme.....	24
Figura 6	Modelo de inserção de peptídeos antimicrobianos na membrana celular de bactérias	35
Figura 7	Sequência dos procedimentos realizados para cada grupo do estudo.....	49
Figura 8	Curva de mortalidade dos animais submetidos à rabdomiólise.....	63
Figura 9	Valores de CPK, creatinina e ureia séricas, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	64
Figura 10	Valores de potássio, fósforo e cálcio iônico séricos, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	65
Figura 11	Valores de ácido úrico sérico, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	66
Figura 12	Dosagens de citocinas anti e pró-inflamatórias, no soro, pelo método Milliplex®, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	68

Figura 13	Valores de citocinas no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	70
Figura 14	Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	71
Figura 15	Valores de β -defensina 1 e 3 nos tecidos renal e pulmonar, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	73
Figura 16	Valores de α -defensina 5 no tecido ileal, pelo método ELISA na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	74
Figura 17	Escore de lesão tubular, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise.....	75
Figura 18	Valores de CPK, creatinina e ureia sérica, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	77
Figura 19	Valores de potássio, fósforo e cálcio iônico séricos, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	78
Figura 20	Valores de ácido úrico sérico, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	79
Figura 21	Valores de citocinas anti e pró-inflamatórias, no soro, pelo método Milliplex®, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	80
Figura 22	Valores de citocinas no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	82
Figura 23	Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	83
Figura 24	Valores de β -defensina 1 e 3 nos tecidos renal e pulmonar, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	85

Figura 25	Valores de α -defensina 5 no tecido ileal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	86
Figura 26	Escore de lesão tubular na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.....	87

Resumo

Silva BHCS. *Caracterização da função dos peptídeos antimicrobianos em dois modelos experimentais de lesão renal aguda* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: A lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome presente em vários contextos clínicos, e está associada a alta morbidade e mortalidade. A creatinina sérica é o biomarcador mais utilizado, mas apresenta limitações, uma vez que demonstra elevação apenas quando a lesão renal já está instituída. O processo inflamatório renal é um componente importante na fisiopatologia da LRA, não somente quando decorrente de sepse, mas também na lesão renal de origem não-infecciosa. A LRA séptica é uma disfunção orgânica, causada por resposta imune desregulada, após a exposição a um patógeno. A resposta imune inicial desencadeia uma resposta inflamatória secundária complexa, que leva à lesão renal. A rabdomiólise, por sua vez, é uma síndrome desencadeada por lesão extensa do tecido muscular, ocorrendo em diversas condições como no trauma, em intoxicações e como efeito adverso a medicamentos. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são um grupo de proteínas ancestrais, componentes do sistema imune inato, que além de atuarem na lise direta de patógenos, apresentam funções importantes na modulação da resposta imune, ainda não totalmente esclarecidas. Os AMPs mais estudados são as catelicidinas e as defensinas. Utilizando dois modelos experimentais distintos (sepse e rabdomiólise), induzimos LRA em camundongos *knockout* para o gene da catelicidina (CRAMP KO) e seus controles selvagens (C57BL/6), a fim de investigar potenciais diferenças na resposta imune entre esses diferentes modelos. **Metodologia:** Camundongos *knockout* para o gene da catelicidina e controles selvagens C57BL/6 foram submetidos a rabdomiólise por meio de injeção intramuscular de glicerol, após restrição hídrica. Um outro grupo foi submetido à sepse, pelo modelo de ligadura e punção cecal (CLP). Um terceiro grupo não foi submetido a nenhum modelo experimental (controles saudáveis). Foi realizada a dosagem de citocinas e de peptídeos antimicrobianos pelos métodos ELISA e Milliplex®, em material coletado desses animais. A lesão renal também foi avaliada por histologia, utilizando-se um escore de lesão tubular. **Resultados:** Os animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise apresentaram maior mortalidade do que os correspondentes selvagens, o que foi atribuído à maior inflamação tecidual renal, comprovada pela maior dosagem de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido renal. Não houve diferença significativa nos níveis das mesmas citocinas no soro. O modelo de rabdomiólise induziu maior expressão de NGAL e β -defensina 3 no tecido renal dos animais CRAMP KO. A maior

inflamação no grupo rabdomiólise também foi confirmada por histologia. Em comparação à sepse, o modelo de rabdomiólise induziu maiores valores de creatinina e ureia, embora não tenha havido diferença estatística significativa.

Discussão: Estudos prévios demonstraram que os camundongos CRAMP KO são mais resistentes à sepse. No modelo de rabdomiólise, os animais CRAMP KO apresentaram maior mortalidade, associada a maior inflamação renal local, sem repercussão sistêmica ou lesão de órgãos à distância. O modelo de sepse induziu maior expressão de β -defensina 1 e 3 no tecido renal em ambos os grupos, mas não houve diferença estatisticamente significativa. Na sepse, a análise dos valores de NGAL e do escore de lesão tubular não mostrou diferença entre os grupos. **Conclusão:** Camundongos CRAMP KO são mais suscetíveis à lesão renal induzida pelo modelo de rabdomiólise e apresentam maior inflamação tecidual. Entretanto, quando submetidos a um modelo de sepse, são mais resistentes. As catelicidinas, portanto, podem induzir respostas inflamatórias distintas, até mesmo contraditórias, dependendo do contexto celular e patológico subjacentes.

Descritores: Peptídeos catiônicos antimicrobianos; Catelicidinas; Defensinas; Lipocalina-2; Imunidade inata; Inflamação; Lesão renal aguda; Sepse; Rabdomiólise.

Summary

Silva BHCS. *Functional characterization of antimicrobial peptides in two experimental models of acute kidney injury* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Introduction: Acute kidney injury (AKI) is a syndrome related to various clinical situations, and is associated with high morbidity and mortality. Even though creatinine is the most frequently used biomarker, it has limitations, since it increases only when kidney injury is already established. Inflammation plays a major role in AKI pathophysiology, not only when it is associated with sepsis, but also in non-infectious diseases. Septic AKI is a frequent organ dysfunction in sepsis, a situation where deregulation of the immune response occurs in consequence of exposure to pathogens. The initial immune response leads to a complex secondary inflammatory response, which triggers renal injury. Rhabdomyolysis is a syndrome caused by extensive muscular damage, which occurs in various conditions, such as trauma, intoxication and adverse drug reactions. Antimicrobial peptides (AMPs) constitute a group of ancestral proteins, which integrate the innate immune system. Beyond their capacity to directly kill pathogens, they are also able to modulate the immune response, through mechanisms not yet fully explained. The most studied AMPs are the cathelicidins and the defensins. Using two experimental models (sepsis and rhabdomyolysis) we induced AKI in mice, to evaluate potential differences in the immune response. **Methodology:** Wild-type (WT) and cathelicidin-deficient mice (CRAMP KO) were subjected to rhabdomyolysis by intramuscular glycerol injection, after water deprivation. Another group was submitted to sepsis by the cecal ligation and puncture (CLP) model. A third group was not subjected to any experimental procedure (healthy controls). Several cytokines and antimicrobial peptides were measured by ELISA and Milliplex® methods, in samples collected from these animals. Histological evaluation of the kidney tissue was also performed, utilizing a tubular injury score. **Results:** CRAMP KO mice subjected to rhabdomyolysis had higher mortality than WT animals. This was attributed to a higher renal tissue inflammation, as inferred by the higher local levels of IL-1 β , IL-6 e TNF- α . The same cytokines showed no statistically significant difference in plasma among the study groups. The rhabdomyolysis model induced higher NGAL and β -defensin 3 levels in the kidneys of CRAMP KO mice. The histological analysis also showed higher inflammation. Compared to sepsis, the rhabdomyolysis model induced higher creatinine and urea levels, but there was no statistically significant difference. NGAL measures and the tubular injury score also showed no difference in septic animals. **Discussion:** Previous studies

showed that CRAMP KO mice are more resistant to sepsis. In the rhabdomyolysis model, CRAMP KO mice had higher mortality associated to a higher local kidney inflammation, with no systemic repercussion or distant organ dysfunction. The sepsis model induced higher expression of β -defensin 1 and 3 in the renal tissue of both groups, but there was no significant difference in the NGAL levels or in tubular injury scores. **Conclusion:** CRAMP KO mice are more susceptible to AKI induced by rhabdomyolysis and have more tissue inflammation. However, they are more resistant to the sepsis model. Cathelicidins can induce distinct inflammatory responses, even contradictory, depending on the cellular and pathological contexts.

Descriptors: Antimicrobial cationic peptides; Cathelicidins; Defensins; Lipocalin-2; Immunity, innate; Inflammation; Acute kidney injury; Sepsis; Rhabdomyolysis.

1 Introdução

1.1 Lesão Renal Aguda

1.1.1 Definição e Epidemiologia

A lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome associada à alta morbidade e mortalidade, presente em vários contextos clínicos, como nos casos de sepse, pós-operatório, efeito de medicamentos ou toxinas, vasculites, doenças renais primárias, e nos diferentes tipos de choque, em que frequentemente está associada à disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. É um fator de risco para doença renal crônica (DRC), e que prolonga a duração de internações por diferentes doenças e condições clínicas. (1–6)

Pacientes com LRA têm maior risco de progredir para DRC terminal, a qual reduz a qualidade de vida dos pacientes, e implica em um risco elevado de complicações cardiovasculares e diminuição da expectativa de vida. A longo prazo, a LRA e suas complicações trazem elevado impacto no sistema público de saúde. (4,7–9)

A incidência anual da LRA é de 2100 casos por milhão de indivíduos. Considerando somente a população dos países desenvolvidos (EUA, Europa Ocidental, Austrália e Canadá), de aproximadamente 1 bilhão de habitantes, a estimativa é de que ocorram 2 milhões de casos de LRA a cada ano, com uma expectativa de que 1 milhão e meio de indivíduos sobrevivam à enfermidade

aguda. Desses, 15 a 20% evoluem em dois meses para DRC avançada, sendo aproximadamente 300 mil casos de DRC em estágio terminal por ano. (10,11)

Nos países subdesenvolvidos, o menor acesso ao sistema de saúde implica em atrasos no diagnóstico e na instituição de tratamento adequado, e esse impacto pode ser ainda maior. (12–18) Além disso, o envelhecimento da população, associado ao aumento da prevalência de fatores de risco, tais como diabetes mellitus, hipertensão arterial e obesidade, deve levar ao aumento desses números. (6,10,14,19)

A LRA antigamente recebia a denominação de insuficiência renal aguda. Os critérios de LRA e DRC foram recentemente revistos pelas diretrizes do KDIGO (*Kidney Diagnosis Improving Global Outcomes*), dando-se maior visibilidade ao problema (20,21). De acordo com as diretrizes, o principal critério diagnóstico para LRA é um aumento de 0,3 mg/dL na creatinina sérica basal, dentro de 48 horas. (20,22)

Os critérios do KDIGO para classificação da LRA em estágios estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da LRA segundo os critérios do KDIGO. (20)

Estágio	Creatinina sérica	Débito urinário
1	1,5 a 1,9 vezes o valor basal OU aumento $\geq 0,3$ mg/dL	$< 0,5$ mL/kg/h por 6 a 12 horas
2	2,0 a 2,9 vezes o valor basal	$< 0,5$ mL/kg/h por ≥ 12 horas
3	3 vezes o valor basal OU aumento na creatinina sérica ≥ 4 mg/dL OU início de terapia renal substitutiva OU em pacientes <18 anos, queda na TFG para abaixo de 35 mL/min/1,73 m ³	$< 0,3$ mL/kg/h por ≥ 24 horas OU anúria por ≥ 12 horas

TFG: taxa de filtração glomerular

Nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), a incidência de lesão renal aguda em pacientes adultos varia entre 16 e 67%. Essa ampla variação é explicada não somente por populações distintas avaliadas em cada estudo, mas também, por uma heterogeneidade nas definições de LRA utilizadas como critério para recrutamento. A LRA impacta a morbidade na internação em UTI em diferentes aspectos: aumenta o tempo de internação, a duração da ventilação mecânica, a incidência de infecções secundárias, e a própria mortalidade. (6,23)

1.1.2 Critérios diagnósticos – biomarcadores

A despeito dos avanços na Medicina nas últimas décadas, especialmente quanto ao aprimoramento das técnicas de diálise, houve pouco progresso na redução da mortalidade da LRA e da DRC. A LRA agrava o curso clínico dos pacientes acometidos, por causar uremia, sobrecarga volêmica e distúrbios eletrolíticos e do equilíbrio ácido-base. Além disso, os métodos existentes não são adequados para o diagnóstico precoce. (2)

Atualmente, a creatinina sérica é o biomarcador mais utilizado para identificação dos casos e para recrutamento em estudos de intervenção. Entretanto, ela é considerada inadequada, pois sua elevação ocorre quando a lesão renal já está estabelecida. A redução no débito urinário é um marcador funcional potencialmente útil, porém, menos utilizado. (24–28)

Nos pacientes críticos, a oligúria pode resultar apenas de uma resposta fisiológica temporária, mas também, ser resultante da hipoperfusão tecidual, ou da disfunção renal propriamente dita. Um estudo observacional multicêntrico sugeriu que a duração da oligúria tem impacto no desfecho. Pacientes com oligúria transitória, como durante a admissão no setor de Emergência, apresentaram uma evolução mais favorável, ao passo que os pacientes com oligúria persistente apresentaram maior mortalidade na UTI e hospitalar. A duração da oligúria esteve diretamente relacionada à necessidade de terapia renal substitutiva (TRS), mas ainda são necessários mais estudos para avaliar essa relação. (29)

Pesquisas têm sido realizadas em busca de um biomarcador mais apropriado que a creatinina sérica. (24,25,30–32) O biomarcador renal ideal deve ter sensibilidade e especificidade altas, ser capaz de detectar rapidamente a lesão – antes mesmo da elevação da creatinina – e apresentar-se em concentrações proporcionais à gravidade da lesão. Outras características desejadas são: habilidade de identificar o local da lesão, acompanhar a progressão ou recuperação, e permitir avaliar o prognóstico. Deve ser facilmente quantificável em fluidos biológicos (urina e/ou sangue), com resultados confiáveis e reprodutíveis em qualquer tipo de injúria, além de ser comparável aos biomarcadores já existentes. (12,25)

Alguns marcadores vêm sendo avaliados, tais como KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*) e NGAL (*Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin*), em dosagem sérica e urinária, e mais recentemente, proteínas de parada do ciclo celular, como TIMP-2 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2*) e IGFBP7 (*Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 7*), urinárias. No entanto, possuem limitações e ainda são pouco acessíveis, e, a médio prazo, a creatinina sérica deve permanecer como o exame de preferência para o diagnóstico e o recrutamento em estudos. (6,27,33,34)

Diferentes regiões do néfron estão associadas a biomarcadores distintos. A Figura 1 mostra alguns dos marcadores de lesão em estudo, e os locais de origem correspondentes na estrutura do néfron.

Figura 1 – Biomarcadores de lesão renal e local de origem no néfron. Os marcadores ressaltados em azul são dosados na urina, enquanto os marcadores ressaltados em verde são dosados no soro. Adaptado de Koyner e Parikh. (35)

1.1.3 Etiologia – Inflamação e LRA

As principais causas de LRA são: agentes nefrotóxicos, infecções levando à sepse, e lesão pelo mecanismo de isquemia-reperfusão. Os mecanismos fisiopatológicos que levam à lesão renal muitas vezes se superpõem: no modelo de nefrotoxicidade pela cisplatina, por exemplo, muitas características da LRA por isquemia-reperfusão estão presentes. (2)

A resposta inflamatória tem um papel importante no dano renal, na LRA. Células do sistema imune inato e adaptativo, como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e linfócitos, estão envolvidas no mecanismo de lesão,

tanto na LRA por isquemia-reperfusão, como na lesão renal por nefrotoxicidade. Algumas dessas subpopulações também participam do processo de reparo. (36)

A LRA associada ao mecanismo de isquemia-reperfusão é um modelo clássico na compreensão da fisiopatologia. Caracteriza-se por uma perda aguda da função renal, geralmente transitória, envolvendo a morte das células tubulares, proliferação e inflamação. Duas fases de morte das células tubulares ocorrem, sendo a primeira caracterizada por apoptose, necrose e necroptose, em que há o dano propriamente dito, e a segunda, em que a apoptose contribui para a regeneração e o remodelamento da estrutura tubular renal.(36)

Fatores pró-inflamatórios levam à ativação e recrutamento de células do sistema imune nos rins lesados. Padrões moleculares associados a dano (DAMPs), fatores induzidos por hipóxia (HIF), moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas e receptores *Toll-like* estão envolvidos na disfunção do endotélio vascular renal. (2,37)

O epitélio tubular não é um alvo passivo da lesão; suas células contribuem ativamente para a inflamação: produzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como TNF- α , MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 β , TGF- β , RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) e ENA-78 (*epithelial neutrophil-activating protein 78*), que ativam as células inflamatórias. As células tubulares também expressam receptores *Toll-like*, fatores do complemento e seus receptores, e moléculas que regulam a atividade dos linfócitos T. (38,39)

As células tubulares sobreviventes promovem a proliferação do epitélio tubular, dependente de fatores de crescimento. A lesão tubular promove a

liberação de fatores inflamatórios que levam à fibrose e amplificam a resposta inflamatória, o que pode favorecer o sentido da fibrose irreversível, em vez da recuperação completa. A recuperação incompleta da lesão renal aguda é mais comum quando já se trata de um paciente com DRC, ou quando a LRA é reincidente ou grave. (36)

Baseado nesse conhecimento fisiopatológico e nos fatores epidemiológicos, acredita-se que a LRA e a DRC sejam apresentações de uma mesma doença. Ambas possuem fatores de risco em comum, e uma aumenta o risco de ocorrência da outra. (40,41)

A Figura 2 mostra como LRA e DRC estão relacionadas, compartilhando fatores de risco e desfechos em comum.

Figura 2 – Fatores de risco, modificadores da doença e desfechos associados à LRA e à DRC. Adaptado de Chawla *et al.* (40)

Até o momento, não existe uma terapia farmacológica capaz de evitar ou curar a LRA. O tratamento envolve a estabilização hemodinâmica, evitar drogas e substâncias nefrotóxicas, e manejar as complicações. (42) A terapia renal substitutiva (TRS) segue como objeto de debates, quanto à técnica, dose e duração das sessões de diálise, e quanto ao momento adequado para o seu início, uma vez que não é isenta de riscos, dentre os quais: trombose, arritmias, eventos cardiovasculares, infecções e complicações da anticoagulação. (43–48)

Medidas de prevenção e métodos para o diagnóstico precoce constituem a melhor forma de reduzir o impacto dos danos causados pela LRA, e por isso, são um importante foco de pesquisas. Alguns autores têm proposto uma abordagem guiada por metas, em pacotes ou *bundles*, como é feito atualmente no tratamento da sepse, para aumentar a atenção dos profissionais de saúde e intensificar os cuidados. (42,49)

1.2 Sepse

1.2.1 Definição e Epidemiologia

Sepse é uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Choque séptico ocorre em pacientes com sepse que apresentam disfunção circulatória e do metabolismo celular, levando à maior mortalidade. (50)

O primeiro consenso do ACCP/SCCM (*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*) sobre a sepse foi realizado em 1991. A percepção de que a sepse era uma causa crescente de mortalidade fez com que os especialistas realizassem um consenso para unificar as terminologias e aumentar a atenção ao tema. A sepse era definida como um quadro de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS), desencadeado por uma infecção confirmada. (51)

Os critérios de SIRS estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Critérios de SIRS. Adaptado de Bone *et al.* (51)

Temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$

Frequência cardíaca acima de 90 bpm

Hiperventilação, evidenciada por uma frequência respiratória acima de 20 ipm ou PaCO_2 abaixo de 32 mmHg

Leucocitose acima de 12000 células/L ou leucopenia abaixo de 4000 células/L, ou presença de $>10\%$ neutrófilos jovens

bpm: batimentos por minuto; ipm: inspirações por minuto; PaCO_2 pressão arterial parcial de gás carbônico

Uma estratificação em sepse, sepse grave e choque séptico era realizada, de acordo com a gravidade do quadro. Sepse grave era a denominação utilizada para um quadro de sepse associado à disfunção orgânica, hipoperfusão e hipotensão arterial. Choque séptico era definido como um subgrupo da sepse grave, em que a hipoperfusão persistia, a despeito da ressuscitação volêmica, demandando o uso de vasopressores. (51)

Em 2016, foi publicado o último consenso referente ao tema, o Sepsis-3. Segundo o Sepsis-3, o diagnóstico da sepse passou a ser realizado pelo aumento de dois ou mais pontos no escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*). (52) A classificação em sepse grave caiu em desuso, sendo considerada como supérflua, e não se utilizam mais os sinais de SIRS para o diagnóstico, por serem considerados dúbios. Essa nova classificação tem sido amplamente criticada, devido ao pouco conhecimento do escore SOFA fora do ambiente de UTI. Para facilitar o diagnóstico, o qSOFA foi proposto como uma abordagem simplificada, baseando-se em três quesitos: nível de consciência, frequência respiratória e função renal. (52–54)

A Tabela 3 mostra os critérios do SOFA, enquanto a Tabela 4 demonstra os critérios do qSOFA.

Tabela 3 – Critérios do escore SOFA. Adaptado de Singer *et al.* (52)

	0	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂	≥ 400	300 a 399	200 a 299	100 a 199	≤ 100
Plaquetas (x10 ³ /μL)	≥ 150	100 a 149	50 a 99	20 a 49	≤ 20
Bilirrubinas (mg/dL)	< 1,2	1,2 a 1,9	2 a 5,9	6 a 11,9	≥ 12
Pressão arterial	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopa ¹ ≤ 5 <i>ou</i> dobutamina	Dopa ¹ 5,1 a 15 <i>ou</i> Nora ² ≤ 0,1	Dopa ¹ > 15 <i>ou</i> Nora ² > 0,1
Glasgow	15	13 ou 14	10 a 12	6 a 9	< 6
Creatinina (mg/dL)	Cr < 1,2	Cr 1,2 a 1,9	Cr 2 a 3,4	Cr 3,5 a 4,9 <i>ou</i> Diurese < 500	Cr > 5 <i>ou</i> Diurese < 200
<i>e/ou</i> diurese (mL/dia)					

1: Dopamina em mcg/kg/min

2: Noradrenalina em mcg/kg/min

Tabela 4 – Critérios do qSOFA. Adaptado de Singer *et al.* (52)

Frequência respiratória ≥ 22 ipm	1
Alteração no estado mental	1
Pressão arterial sistólica ≤ 100 mmHg	1

ipm: inspirações por minuto

A despeito do debate sobre a definição ideal, sepse e choque séptico constituem um dos principais problemas de saúde mundiais, acometendo milhões de indivíduos a cada ano. Sepse é uma das principais causas de doença crítica, e sua incidência vem aumentando. Um grande estudo, baseado em registros de internação e óbito em diferentes países, estimou a incidência mundial de sepse em 48,9 milhões de indivíduos em 2017, com um número de 11 milhões de óbitos atribuíveis à sepse naquele mesmo ano. Em alguns locais, a mortalidade pela sepse decresceu, estando entre 18 e 25%, mas ainda é mais elevada que a taxa de mortalidade global nas UTIs. (55)

Em geral, os estudos mostram uma mortalidade média de 25 a 33%, sendo maior em localidades com escassez de recursos. Esses números podem estar subestimados devido à inexistência de um código único na CID-10 para a sepse, além da heterogeneidade nos registros de óbito em diferentes localidades, com provável subnotificação. (55–57)

No Brasil, os levantamentos têm mostrado um aumento progressivo nos casos de sepse nas UTIs, passando de 19,4% do total de internações, em 2010, para 25,2%, em 2016. Além disso, a mortalidade é elevada. Dados nacionais obtidos entre 2001 e 2003 demonstraram taxas de mortalidade de pacientes com

sepse grave entre 34,4 e 37,7%, chegando a valores entre 52,2 e 65,3%, em pacientes com choque séptico. Nas últimas décadas, observou-se uma queda na mortalidade média, passando de 39%, em 2010, para 30% em 2016. Contudo, ainda há uma grande heterogeneidade entre as regiões do Brasil, e entre os sistemas público e privado. Foi evidenciada uma redução significativa de mortalidade nos hospitais privados (47,6% para 27,2%); todavia, isso não foi observado nos hospitais públicos (61,3% para 54,5%). (58–60)

1.2.2 Diagnóstico e tratamento

Sepse é uma emergência médica, uma vez que o prognóstico dos pacientes depende do diagnóstico precoce e do manejo adequado nas primeiras horas da manifestação do quadro. (61,62)

A medida prioritária nos casos de sepse é a expansão volêmica, devendo ser iniciada com a infusão de ao menos 30 mL/kg de cristalóide nas primeiras 3 horas, seguida de novas infusões de fluidos, de acordo com o status hemodinâmico. Objetiva-se, primariamente, atingir uma pressão arterial média (PAM) de 65 mmHg. Vasopressores podem ser necessários para atingir essa meta pressórica, uma vez que períodos de hipotensão são extremamente deletérios. Atualmente, há evidências de que não se deve esperar o término da expansão volêmica para iniciar o vasopressor, se o paciente mantiver hipotensão sustentada. (52,63)

O vasopressor de escolha é a noradrenalina. Estudos mais recentes têm considerado a necessidade de individualizar os alvos pressóricos, uma vez que

pacientes previamente hipertensos dependem de uma pressão arterial mais elevada para manutenção da perfusão, em decorrência de uma regulação tecidual alterada. (64,65)

A pressão arterial média assegura a perfusão tecidual. Órgãos críticos, como o cérebro ou os rins, possuem um certo grau de proteção quanto à hipotensão sistêmica, devido à autorregulação da perfusão regional. Contudo, abaixo de um valor limite de PAM, a perfusão passa a ser linearmente dependente da pressão arterial. A representação gráfica encontra-se na Figura 3. (64)

Figura 3 – Relação entre pressão arterial e perfusão tecidual. A curva relacionada à inflamação é um modelo teórico. Adaptado de Kato e Pinsky. (64)

O diagnóstico da sepse se inicia pela suspeita clínica. Programas de reconhecimento e atenção aos sinais de alarme parecem melhorar o

prognóstico, uma vez que o rastreamento está associado ao início precoce do tratamento. A falta do reconhecimento precoce atrasa a instituição de terapia no tempo adequado. (61,62)

Culturas dos focos possíveis, incluindo um par de hemoculturas, aeróbicas e anaeróbicas, devem ser coletadas antes do início da terapia antimicrobiana. Urina, secreção traqueal, líquido, líquido peritoneal e outros fluidos biológicos devem ser coletados conforme a história e o quadro clínico do paciente. A obtenção das culturas antes do início do tratamento aumenta as chances de recuperação do agente infeccioso, uma vez que elas podem se tornar estéreis dentro de minutos a horas da primeira dose do antimicrobiano adequado. (50,52,66)

1.2.3 LRA associada à sepse

A sepse é um dos principais fatores de risco para LRA. Em países desenvolvidos, é a principal causa de lesão renal aguda, sendo responsável por 26 a 50% de todos os casos de LRA, anualmente, em adultos e crianças. A título de comparação, doenças renais primárias são responsáveis por 7 a 10% dos casos. (67)

A LRA associada à sepse é a principal causa de hemodiálise nos pacientes críticos, e sua incidência aumenta proporcionalmente à gravidade do quadro de sepse. (23,68) A sepse implica em um custo elevado ao sistema de saúde, o qual pode ser agravado pela ocorrência de LRA, tanto pelas terapias necessárias para o seu manejo, quanto pelo tempo maior de internação em UTI,

incidência de re-hospitalização e ventilação mecânica. (67,69) A porcentagem média de pacientes críticos com LRA associada à sepse que necessitam de diálise é de 15 a 20%. (68)

Embora a fisiopatologia da LRA associada à sepse ainda não seja totalmente compreendida, sabe-se que representa uma classe distinta de LRA, com mecanismos hemodinâmicos, inflamatórios e imunológicos específicos. (23)

Assim como não há uma terapia única efetiva para a sepse, também não há uma medida única que modifique a história natural da LRA a ela associada, e nem tampouco uma droga eficaz para sua prevenção ou tratamento. O tratamento consiste em um conjunto de medidas que compreende: identificação dos fatores de risco, diagnóstico precoce e instituição da antibioticoterapia em tempo hábil, otimização hemodinâmica e volêmica e vigilância das possíveis consequências a longo prazo, além da terapia dialítica quando indicada. (69)

Os protocolos defendem que o tratamento da sepse seja guiado por metas. Pacotes ou *bundles* ajudam na orientação das etapas a serem seguidas. (50,52,66)

O início de antibioticoterapia precoce é uma dessas metas. (50,66) Além da maior mortalidade, o atraso na administração de antibióticos é um fator independente para o desenvolvimento de LRA. Quanto mais tardio o início da antibioticoterapia, maior o risco de LRA, especialmente após o desenvolvimento de hipotensão arterial. (23)

As populações sob maior risco de LRA associada à sepse são idosos, mulheres, e portadores de comorbidades, como DRC, diabetes mellitus,

insuficiência cardíaca, neoplasias e doença hepática. Algumas infecções também conferem maior risco de LRA, como infecções de corrente sanguínea, endocardite infecciosa e infecções abdominais e do trato urinário. (23)

Quando comparada à LRA não séptica, a LRA associada à sepse apresenta uma maior gravidade de doença (maiores scores de SOFA e APACHE II nos estudos), mais anormalidade nos marcadores inflamatórios, mais oligúria e maior elevação da creatinina em comparação ao valor basal. (67) Há maior necessidade de infusão de fluidos, mas também maior balanço hídrico positivo acumulado, que é um marcador de gravidade. O balanço hídrico excessivamente positivo leva não somente à sobrecarga do sistema cardiovascular, mas também à maior dificuldade de cicatrização de feridas, disfunção do trato gastrointestinal, e maior incidência de edema pulmonar com necessidade de ventilação mecânica. (70–72)

A LRA associada à sepse tem prognóstico pior que a LRA não séptica. Além disso, quanto maior a gravidade do quadro séptico, maior a incidência de diálise. Em pacientes internados por sepse, a incidência de diálise é de 24%, enquanto, nos casos de choque séptico, a incidência é de 89%. (68)

A ocorrência da LRA associada à sepse geralmente se dá no início da doença crítica, dentro de 24 horas da admissão na UTI. Em muitos casos, ela já se mostra presente dentro das primeiras seis horas. Por outro lado, a recuperação da função renal dentro de 24 horas se associa com melhor prognóstico, incluindo maior sobrevida. (73)

A Figura 4 mostra a interrelação fisiopatológica entre sepse e LRA, na LRA associada à sepse, demonstrando que há fatores em comum ao seu desenvolvimento, e que propagam as complicações.

Figura 4 - Interação fisiopatológica entre sepse e LRA, na LRA associada à sepse. Adaptado de Romanovsky. (74)

O conhecimento incompleto sobre a fisiopatologia da LRA associada à sepse pode contribuir para a mortalidade elevada. Inicialmente, a LRA séptica era atribuída à hipotensão sistêmica, vasoconstrição renal e lesão pelo mecanismo de isquemia-reperfusão. Atualmente, sabe-se que a LRA induzida pela sepse ocorre no contexto de disfunção microvascular, com liberação de citocinas, inflamação, e adaptação do consumo energético dos órgãos ao estresse celular. Em vez de hipoperfusão renal, ocorre alteração importante na distribuição do fluxo sanguíneo na microvasculatura, uma vez que

parece haver LRA mesmo no contexto de vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo renal. (75)

1.2.4 Seps e Inflamação

A lesão celular na seps é mediada por fatores inflamatórios derivados de patógenos (PAMPs ou *Pathogen Associated Molecular Patterns*) e células imunológicas ativadas (DAMPs ou *Damage Associated Molecular Patterns*). DAMPs e PAMPs presentes nos tecidos são reconhecidos pelas células do sistema imunológico e também pelas células epiteliais e parenquimatosas, por meio de receptores transmembrana ou intracitoplasmáticos, chamados de *Pathogen Recognition Receptors*, ou PRRs.

Os PRRs compõem uma família que pode ser dividida em receptores de localização subcelular, incluindo os receptores Toll-like (TLRs), receptores transmembrana, agentes protetores do citoplasma e receptores NOD-like. Promovem a ativação de células imunes, produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1- β e IL-6), quimiocinas, metabólitos do ácido araquidônico, ativação de células T, e da cascata extrínseca de coagulação.

Em quadros favoráveis, a resposta imune é controlada pelos próprios PRRs, levando à inibição da sinalização intracelular relacionada aos TLRs, neutralização de citocinas pró-inflamatórias e produção de citocinas anti-inflamatórias, além de silenciamento dos genes pró-inflamatórios. (75)

A resposta desbalanceada que ocorre em alguns pacientes faz com que a resposta inflamatória se torne excessiva e danosa. Isso leva à ativação da via extrínseca da coagulação e formação de trombina ativada, ampliando a resposta trombótica pela ativação da via intrínseca da coagulação. Ocorre também uma redução nos inibidores da coagulação, como a proteína C ativada, havendo aumento do consumo e dano endotelial, e inibição da fibrinólise levando à formação de microtrombos, culminando na disfunção multiorgânica. (75)

1.3 Rabdomiólise

1.3.1 Definição e Epidemiologia

Rabdomiólise é uma síndrome causada por dano muscular e liberação de mioglobina no sangue. Várias condições clínicas podem causar rabdomiólise, como trauma, queimaduras, exercício extenuante, hipertermia, intoxicações, acidentes com animais peçonhentos, crise convulsiva, isquemia de membros, alterações metabólicas e medicamentos. (76) Outras causas menos comuns incluem endocrinopatias e deficiência de enzimas musculares. (77)

A gravidade das manifestações é ampla, havendo desde casos assintomáticos, até a disfunção múltipla de órgãos e coagulação intravascular disseminada. A lesão renal é uma complicação grave da rabdomiólise, e pode gerar outras consequências clínicas. No entanto, é passível de prevenção. (77)

Estudos mostram que a incidência de LRA em pacientes com rabdomiólise varia de 10 a 50%, e a rabdomiólise é responsável por 5 a 25% de

todos os casos de LRA. A mortalidade desses pacientes pode variar de 7 a 80%, sendo mais elevada naqueles com disfunção multiorgânica. Pacientes que evoluem com LRA têm uma mortalidade aproximada de 20%. (77,78)

Vítimas de trauma correspondem à maioria dos casos; cerca de 85% dos pacientes com lesões traumáticas evoluem com algum grau de rabdomiólise. (77)

1.3.2 Diagnóstico e LRA associada à rabdomiólise

Para a prevenção adequada, é necessário reconhecer os fatores de risco e as possíveis complicações. Alguns estudos avaliaram o valor da CPK como um fator prognóstico na gravidade da lesão renal aguda. Uma metanálise publicada em 2016 mostrou que há correlação entre o valor de CPK e a ocorrência de LRA, embora a heterogeneidade dos estudos não permitisse determinar o nível de CPK adequado como limiar. (79) A CPK tende a ser mais elevada em vítimas de trauma por esmagamento, e alguns estudos mostram que pacientes com CPK acima de 15000 apresentam risco mais elevado de evoluírem com LRA. (80)

Ainda é controverso se a dosagem sérica de mioglobina pode ser um potencial preditor de LRA por rabdomiólise, e a dosagem de CPK continua sendo o exame mais acessível. Como a triagem baseada apenas nos valores de CPK pode ser falha, sugere-se que seja realizada em conjunto com outras medidas, como nível sérico de ácido úrico e potássio. (79)

O metabolismo do heme tem grande importância na fisiopatologia da lesão renal aguda associada à rabdomiólise. O heme é um grupo prostético constituído por um átomo de ferro envolvido por um anel tetrapirrólico, e é essencial na constituição de diversas proteínas envolvidas na função e metabolismo celulares. (81)

A fisiologia e fisiopatologia do heme estão associadas ao metabolismo do ferro e à lesão renal em diversos aspectos. O heme livre pode levar à lesão renal. O heme presente no citocromo P450 é uma fonte de ferro, que leva à lesão oxidativa nos insultos hipóxicos e nefrotóxicos. (81)

1.3.3 Metabolismo do heme

A molécula do heme tem capacidade de carrear oxigênio, óxido nítrico e monóxido de carbono, e de transferir elétrons. Em sua forma livre, o grupo heme é insolúvel e potencialmente tóxico devido à sua biorreatividade e efeitos pró-oxidantes.

O heme está presente na mioglobina e na hemoglobina, nas enzimas dos citocromos mitocondriais (promovendo transferência de elétrons e gerando gradiente de prótons), em enzimas como a óxido nítrico sintase, guanilato ciclase e prostaglandina sintase, e nas enzimas do citocromo P450, envolvidas na metabolização de substâncias tóxicas endógenas e exógenas. Também está presente em enzimas antioxidantes como a catalase e peroxidases, enzimas oxidantes como NADPH oxidase, em alguns reguladores de transcrição e

tradução, e nas fosfodiesterases, que regulam os níveis de nucleotídeos cíclicos, com consequente envolvimento na sinalização celular. (81)

O processo de síntese do heme ocorre em todas as células nucleadas, tendo início e fim na mitocôndria. Glicina e succinil coenzima A se condensam para formar o ácido aminolevulínico (ALA), sob ação da enzima mitocondrial ALA-sintase. No citosol, o ALA é o substrato inicial para várias reações, que geram sequencialmente o porfobilinogênio, hidroximetilbilano, uroporfirinogênio III e coproporfirinogênio III. O coproporfirinogênio III é descarboxilado na mitocôndria, gerando protoporfirina IX, na qual o ferro é inserido, resultando na formação do heme. O heme exerce *feedback* negativo na ALA-sintase, que é a enzima limitante na formação do heme.

O córtex renal, especialmente no túbulo proximal, possui grande capacidade de síntese do heme, comparado à medula, o que está relacionado à atividade do citocromo P450. A ALA-sintase no rim, comparada ao fígado, é menos modificável por estímulos externos, o que faz com que a produção do heme no rim seja praticamente inalterada por substâncias excretadas ou detoxificadas por ele, garantindo um aporte para a incorporação das proteínas ligadas ao heme, incluindo as relacionadas ao citocromo P450.

Em processos patológicos, o nível de heme no rim pode estar aumentado. Lesões isquêmicas ou nefrotóxicas desestabilizam as proteínas intracelulares que contêm o heme, aumentando seu conteúdo intracelular. Esse aumento do conteúdo do heme no rim também pode derivar de proteínas extrínsecas ao órgão, como no caso da mioglobina liberada em lesões musculares, ou da hemoglobina de hemácias lisadas. Essas proteínas são recebidas e

incorporadas pelo rim através dos receptores megalina/cubulina, sendo oxidadas e desestabilizadas, liberando o heme, que passa a ser acumulado nas células. A característica lipofílica do heme faz com que ele se permeie pelas membranas celulares e permite a sua distribuição pelo sistema canalicular intracelular. (81)

A inibição da proteólise aumenta os níveis de mioglobina nas células renais, e a inibição da degradação do heme compromete a função renal. (82)

A Figura 5 ilustra o processo fisiológico e fisiopatológico da metabolização do heme, que têm implicações na gênese da LRA associada à rabdomiólise.

Figura 5 – Processo fisiológico e fisiopatológico de metabolização do heme. Adaptado de Tracz *et al.* (81)

Diferentes mecanismos estão envolvidos na gênese da lesão renal aguda pelos componentes liberados pela lesão muscular:

- vasoconstrição e hipoperfusão devidas à ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumento no nível de vasopressina circulante e aumento da atividade simpática, bem como formação de microtrombos glomerulares e diminuição da síntese intrarrenal de prostaglandinas vasodilatadoras, além de sequestro de fluidos nos tecidos lesados
- acúmulo de mioglobina e derivados do heme, que levam à obstrução dos túbulos, vasoconstrição, inflamação e lesão tubular em resposta ao estresse oxidativo (83–85)

Um componente isquêmico da lesão está representado pela hipoperfusão renal, enquanto a mioglobina liberada promove nefrotoxicidade, por meio do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e necrose tubular. O ferro liberado a partir do heme promove a produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica, e o aumento da produção renal e sistêmica da angiotensina II, endotelina e TGF- β pode dificultar a sua recuperação completa. O fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e MAP quinases podem ser ativados pelo estresse oxidativo, e induzir a síntese de substâncias inflamatórias que promovem e intensificam a lesão renal.

A heme oxigenase-1 é uma enzima induzível, cuja expressão é habitualmente baixa nos túbulos renais, sendo ativada por estressores como hipóxia ou hiperóxia, isquemia, inflamação, estresse oxidativo e metais pesados. A heme oxigenase-2 é uma enzima constitutiva, e é expressa principalmente na rede vascular pré-glomerulares e no néfron distal. (82)

Efeitos protetores da heme oxigenase-1 estão bem descritos em modelos animais de LRA, por meio da modulação do estresse oxidativo, inflamação, autofagia e controle da progressão do ciclo celular. Parte desses mecanismos está relacionada aos subprodutos da reação da heme-oxigenase: ferro, pigmentos biliares e monóxido de carbono. Estudos têm avaliado a indução da heme oxigenase-1 na LRA como um possível alvo terapêutico. (86)

1.4 Modelos experimentais de lesão renal aguda

Modelos experimentais de lesão renal aguda permitem o estudo dos mecanismos fisiopatológicos e imunológicos envolvidos, podendo auxiliar no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e alvos terapêuticos. (2,87,88)

A maior parte desses modelos experimentais é realizada em camundongos e ratos, que compartilham 99% dos genes com os seres humanos. (89)

Os modelos clássicos de lesão renal aguda compreendem:

- o modelo de isquemia-reperfusão, em que uma lesão pré-renal é desencadeada por redução do fluxo sanguíneo, a qual leva a uma lesão parenquimatosa subsequente;
- os modelos de nefrotoxicidade, em que se utilizam toxinas exógenas ou endógenas;
- os modelos de LRA associada à sepse;

- os modelos de obstrução do trato urinário, em que uma obstrução ao fluxo urinário (lesão pós-renal) leva a uma lesão parenquimatosa. (11,88)

Modelos experimentais são úteis para identificar os mecanismos moleculares de lesão renal, mas são falhos em simular os demais componentes da LRA nos seres humanos, devido a fatores complexos como idade, presença de DRC e outras comorbidades preexistentes. O desenvolvimento de modelos animais em contextos específicos para o esclarecimento da LRA em humanos é necessário, levando em consideração condições clínicas como diabetes, envelhecimento, obesidade, câncer e DRC. (11)

A grande maioria dos estudos recentes bem sucedidos consistiu em avaliar a efetividade de um método de profilaxia de lesão renal, com o uso de um agente protetor antes de um evento isquêmico, séptico ou nefrotóxico. (27) Poucos modelos experimentais incluem também insultos pós-exposição. A principal deficiência desses modelos experimentais de LRA é de que eles não incluem um componente tardio de prevenção secundária ou tratamento. (11)

Na prática clínica, muitas vezes, a LRA não é identificada antes de um ou mais dias após o insulto. Existem poucos casos em que a causa da LRA é um insulto único programado e previsível, como no caso da lesão renal induzida por contraste, ou após cirurgia cardiovascular. (46,90,91) A maioria dos casos de LRA é desencadeada por insultos múltiplos: isquemia, inflamação, nefrotoxicidade, ocorrendo frequentemente em pacientes que já apresentam comorbidades que os predisõem à doença renal. (10,11)

Ainda assim, os modelos são importantes na compreensão da fisiopatologia.

1.5 Modelo de LRA associada à sepse

Modelos de LRA séptica e não-séptica têm características fisiopatológicas distintas. A LRA séptica é uma manifestação sistêmica da sepse após a exposição a antígenos exógenos como os pertencentes a bactérias ou vírus. A resposta imune inicial desencadeia uma resposta inflamatória secundária complexa, que leva à lesão renal. (2)

Os modelos animais de LRA associada à sepse envolvem o procedimento de ligadura e punção cecal (CLP, *cecal ligation and puncture*), ou o uso de injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), sendo mais frequentemente utilizados em camundongos ou ratos. Tratam-se de modelos que reproduzem melhor a lesão renal aguda, com animais servindo para estudo dentro de 72 a 96h, e, portanto, sendo de uso limitado quanto ao estudo sobre a progressão de LRA para DRC. (22)

A interação do hospedeiro com bactérias é um fenômeno comum, mas a ocorrência de infecção e complicações sistêmicas não é a regra, por haver um equilíbrio entre os fatores de defesa do hospedeiro e os fatores de virulência dos agentes infecciosos. Situações de desequilíbrio desses fatores, como dentro do ambiente hospitalar, especialmente nas UTIs, além de doenças crônicas e do uso de antimicrobianos, podem propiciar um quadro infeccioso.

Os mecanismos adaptativos da resposta do hospedeiro na sepse são de natureza complexa, e a resposta imune e inflamatória medeia as alterações funcionais, fornecendo a base fisiopatológica para as manifestações clínicas da doença. Apesar de ainda estarmos distantes de uma boa compreensão da doença, importante progresso em relação à compreensão da fisiopatologia da sepse vem sendo realizado, destacando-se o mecanismo de reconhecimento de antígenos bacterianos e uma compreensão melhor das vias de sinalização celular.

A ligação do LPS à proteína ligante de LPS (LBP) e ao CD14 nas células do túbulo proximal desencadeia uma resposta celular local via complexos receptor Toll-like 4 (TLR-4)-MD-2, que juntamente com as respostas semelhantes desencadeadas nas células extrarrenais, promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 e IL-6, que levam ao dano celular renal. A produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e a liberação de óxido nítrico levam a alterações hemodinâmicas que contribuem para a LRA. Até o momento, nenhuma intervenção realizada nos modelos murinos de LRA por LPS mostrou ser efetiva em humanos. (22)

1.6 Modelo de LRA associada à rabdomiólise

A síndrome da rabdomiólise pode ser induzida pela injeção intramuscular de glicerol, que leva a um aumento da mioglobina circulante. Diversos mecanismos estão associados, incluindo vasoconstrição renal, acidose e

acidúria, obstrução tubular e toxicidade direta da mioglobina sobre a célula tubular. (83)

Rabdomiólise é uma síndrome em que a lesão do músculo esquelético leva à liberação de proteínas e compostos tóxicos na circulação. A LRA é uma complicação comum, sendo relacionada à elevada mortalidade. Sabe-se que a inflamação e o dano oxidativo são as duas maiores causas da LRA induzida por rabdomiólise. (78,92)

Para simular o quadro apresentado em humanos, camundongos ou ratos são privados de água por 24h, e após, recebem uma injeção intramuscular de solução de glicerol a 50%, em soro fisiológico (NaCl a 0,9%) na dose de 8 a 10 mL/kg.(88)

O glicerol aumenta o nível sérico dos metabólitos do heme e o conteúdo total do heme no fígado e nos rins. Além disso, reduz o conteúdo de glutathione reduzida e atividade da catalase. Após a injeção do glicerol, a atividade da heme oxigenase aumenta no fígado após 2 horas, e nos rins, após 6 horas. (76)

Após a injeção intramuscular da solução de glicerol no modelo animal experimental, observa-se uma rápida redução no fluxo sanguíneo renal. A lesão traumática do músculo leva ao sequestro de fluidos no tecido, com redução do volume plasmático circulante e promovendo uma hipovolemia relativa. (93)

Em resposta, ativam-se os mecanismos homeostáticos para manutenção do volume circulante, com ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A reposição volêmica precoce é a medida mais

importante para prevenção da lesão renal aguda, corrigindo a hipovolemia, e promovendo a excreção da mioglobina. (93)

No entanto, outros mediadores vasoativos também estão envolvidos na redução do fluxo sanguíneo renal e na gênese da lesão. As caspases são uma família de cistinoproteases, que são ativadas no processo patológico relacionado à LRA. Estão relacionadas à inflamação, apoptose, e ao controle do ciclo celular. A necroptose, uma modalidade de necrose relacionada à fosforilação da proteína MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*) é o padrão predominante de morte da célula tubular. Na LRA experimental induzida pelo glicerol, o aumento na concentração de TNF- α desencadeia a indução da necroptose. Além do papel central dos macrófagos, linfócitos T e células dendríticas, foi demonstrado o envolvimento de inflamassomos. (94,95)

A ativação do inflamassomo em resposta aos sinais de dano compreende um processo de dupla sinalização. O sinal 1 se inicia com o reconhecimento de LPS ou outro PAMP, por meio de PRRs como *Toll-like*, e induz a expressão de pró-IL-1 β e pró-IL-18. O sinal 2 corresponde à fase de ativação, levando à oligomerização do complexo do inflamassomo, ativação da caspase-1 e à liberação das citocinas IL-1 β e IL-18. (95)

1.7 Peptídeos antimicrobianos

Os seres humanos e outros animais estão em constante contato com microrganismos, e têm suas superfícies mucosas colonizadas por uma microbiota complexa (96–99). Essa íntima relação com os microrganismos os

torna vulneráveis a invasões e infecções, e evolutivamente, fatores locais de defesa foram essenciais para a sobrevivência, protegendo a superfície das mucosas.

Os mecanismos de defesa contra infecção em mamíferos abrangem o sistema imune inato e adaptativo, além de barreiras cutâneas e fatores físicos, tais como pH das mucosas, composição iônica, fluxo urinário. (97,98)

O sistema imune inato é essencial para a sobrevivência da espécie humana, uma vez que microrganismos potencialmente patogênicos têm rápido potencial de proliferação, e o sistema imune adaptativo possui um tempo de resposta tardio. (100)

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são proteínas constituintes do sistema imune inato. A produção dessas moléculas vem ocorrendo em coevolução com os microrganismos ao longo de milhões de anos. Constituem um grande grupo de compostos produzidos por organismos multicelulares e estão presentes nos seis reinos. Estes peptídeos formam um componente da resposta imune inata, primitivo e conservado geneticamente, ao longo da evolução das espécies. Proporcionam proteção contra patógenos ambientais, agindo frente a um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Além disso, também foram descritos AMPs com propriedade antitumoral. (100–103)

Até o momento, há 3257 peptídeos antimicrobianos distintos registrados na *Antimicrobial Peptide Database* (APD), pertencentes aos 6 reinos. (103,104)

Nos invertebrados, os AMPs são a única forma de defesa imune presente. A primeira descrição dos AMPs se deu na década de 80, com a descoberta das

magaininas em anfíbios e das cecropinas em insetos, e posteriormente em mamíferos. (105–108)

A produção de AMPs é um dos principais componentes da imunidade inata contra a infecção. A sua produção pode ser constitutiva ou induzida, de acordo com uma grande variedade de características, como organismo, tipo de célula e de peptídeos considerados. Os AMPs apresentam diferentes sequências de aminoácidos e estruturas; são geralmente anfifílicos, pequenos (de 12 a 50 aminoácidos), e têm pelo menos duas cargas positivas (resíduos de arginina e lisina, por exemplo), sendo, portanto, catiônicos. Estas propriedades químicas permitem sua inserção nas paredes celulares e membranas de microrganismos, essencialmente formadas por fosfolipídios aniônicos, resultando em lise e morte do microrganismo. (101)

Atualmente, sabe-se que o papel dos AMPs vai além de sua ação como antibióticos geneticamente codificados. Os AMPs são moléculas multifuncionais, com papel central na inflamação e infecção. Em mamíferos, alguns AMPs alteram as propriedades de membrana ou interagem com receptores, influenciando diversos processos celulares como liberação de citocinas, quimiotaxia, apresentação de antígenos, angiogênese e cicatrização. Tais funções complementam sua ação antimicrobiana e favorecem a resolução da infecção e o reparo do epitélio danificado. (101)

O domínio catelina, uma região N-terminal altamente conservada, é quem confere o nome à classe das catelicidinas. A proteína contém duas pontes dissulfeto, entre os resíduos de cisteína C85-C96, e C107-C124, e é capaz de inibir a protease catepsina-L. As catelicidinas são consideradas uma família

genética devido à conservação dessa região do gene, que codifica uma proteína que age como um inibidor de cisteína-protease, e também possui certa atividade antimicrobiana. Os peptídeos gerados pelos genes da catelicidina têm em comum, entre si, apenas a proteína precursora, que é composta principalmente pelo domínio catelina, e por isso são considerados uma família. Porém, os AMPs diferem nas demais porções de sua estrutura, dentro de uma mesma espécie e entre espécies diferentes. (101)

Os AMPs mais expressos em mamíferos são as α e β -defensinas, mas vários AMPs lineares que formam α -hélices, pertencentes à família das catelicidinas, também são produzidos. Mais de 100 peptídeos antimicrobianos foram identificados em tecidos humanos. (100)

Em humanos, há um único gene relacionado à catelicidina (CAMP), o qual codifica uma proteína precursora com massa aproximada de 18 KDa, denominada hCAP18. Está localizado no cromossomo 3p210l.3 e foi isolado primeiramente na medula óssea. (109–111) A catelicidina humana LL-37 é um dos AMPs mais estudados, e está presente na saliva, esperma, na pele, e nos tratos respiratório, urinário e gastrointestinal. (100,101,112)

As catelicidinas são sintetizadas como pré-proteínas, com um domínio N-terminal altamente preservado, e um domínio C-terminal com propriedades antimicrobianas altamente variável. A porção N-terminal possui 94-114 aminoácidos. LL-37 tem sua expressão regulada por estímulos inflamatórios. É armazenada como pró-peptídeo nos neutrófilos, sendo processada por serinoproteases de queratinócitos, como calicreínas, e outras proteases, como a proteinase-3. (112,113)

A forma de inserção dos peptídeos na membrana celular de bactérias está demonstrada na Figura 6.

Figura 6– Modelo de inserção de peptídeos antimicrobianos na membrana celular de bactérias. Modificado de Mallapragada. (114)

Diversos tecidos produzem peptídeos antimicrobianos, sendo que alguns, de forma constitutiva, e outros, de forma induzida. Na mucosa intestinal de mamíferos, peptídeos antimicrobianos são produzidos pelas células de Paneth. O principal deles é a alfa-defensina-5. (115–117) Em processos infecciosos na cavidade oral, IL-22 e IL-17 induzem e regulam a produção de β -defensina 3. (118)

Nas vias aéreas e no tecido pulmonar, as células epiteliais também produzem peptídeos antimicrobianos, dentre os quais, LL-37 e β -defensinas, que são secretados para o fluido superficial. Estudos identificaram LL-37 em

sobrenadante de culturas de células epiteliais e no lavado broncoalveolar de pacientes. (119,120)

A β -defensina 1 parece ter relação com o desenvolvimento de doenças respiratórias crônicas, como asma e DPOC, e também foi estudada em pacientes com síndrome respiratória aguda. (121,122)

No trato gastrointestinal, as células epiteliais produzem catelicidinas e também um bloqueador de sua síntese, dado que a produção é limitada nas primeiras semanas após o nascimento, permitindo a colonização bacteriana, importante para o equilíbrio da mucosa. (123) Pele, glândulas mamárias e epidídimo também o expressam.

Com relação ao trato urinário, estudos demonstraram a relação do sistema imune inato e da catelicidina na fisiopatologia da infecção do trato urinário e da síndrome hemolítico-urêmica. (124) No tecido renal, CRAMP é principalmente expresso no epitélio tubular e nos leucócitos infiltrados, incluindo neutrófilos e monócitos, e parece ser um fator importante na manutenção da homeostase do epitélio e imunidade da mucosa no rim. Sua expressão parece ser induzida por nutrientes e vitaminas nas células epiteliais, como a vitamina D, e metabólitos da microbiota intestinal, como ácidos graxos de cadeia curta. (125)

Os camundongos CRAMP KO apresentam um padrão genético *knockout* para o gene *Camp*. O gene *Camp* é análogo ao gene humano CAMP, que codifica o precursor do peptídeo antimicrobiano LL-37 (CRAMP nos camundongos). (126) Apresentam maior susceptibilidade a infecções bacterianas, sendo utilizados em estudos que avaliam a resposta imune inata,

regulação da resposta imune, processos de cicatrização e angiogênese e desenvolvimento de tumores. Esses animais foram produzidos a partir de remodelamento genético em um estudo publicado em 2001. (127)

As propriedades imunomoduladoras do CRAMP têm sido descritas em diferentes contextos patológicos. Um estudo avaliou seu papel nos mecanismos da LRA, avaliando camundongos submetidos à LRA experimental induzida por isquemia-reperfusão, e em pacientes com LRA. Após a indução de LRA por isquemia-reperfusão, foi avaliado o efeito terapêutico do CRAMP com a injeção intraperitoneal de CRAMP exógeno, na dose de 5 mg/kg. Os camundongos KO apresentaram LRA mais intensa, além de resposta inflamatória mais exacerbada e apoptose.

A lesão renal por isquemia-reperfusão esteve relacionada, nos camundongos KO, à hiperativação do inflamassomo NLRP3. O tratamento com CRAMP exógeno nitidamente atenuou a disfunção renal a resposta inflamatória e a apoptose, correlacionando-se com a modulação da infiltração de células imunes e o fenótipo. A expressão da catelicidina se mostrou inversamente proporcional aos sinais clínicos. A administração do CRAMP exógeno suprimiu a ativação do inflamassomo e seus efeitos renoprotetivos foram mimetizados por um inibidor específico do NLRP3, o CY-09. Para esse efeito, foi necessário o receptor EGF. (125)

AMPs são também produzidos por células presentes na corrente sanguínea, como monócitos, neutrófilos e mastócitos. São geralmente expressos como pró-peptídeos, sendo que alguns são expressos constitutivamente, enquanto outros são induzíveis por inflamação ou lesão. (113)

Vários mecanismos são propostos para a sinalização celular induzida pelos AMPs, tais como ligação direta aos receptores P2X7 e CXCR2. LL-37 age através de FPRL1, induzindo migração monocitária; em queratinócitos, utiliza EGF e outros GCPR. (128–132) Níveis elevados de CRAMP exógeno podem ser citotóxicos, mas, em doses mais baixas, possuem efeito ativador, possivelmente associado à formação de pequenos poros na membrana celular, que não afetam a sobrevivência da célula, mas permitem o fluxo de íons necessários para ativação de TLRs e formação do inflamassomo. Outro mecanismo similar está relacionado à ligação a receptores P2X7, levando à abertura de canais iônicos. (133–136)

A expressão das catelicidinas tem relação com a disponibilidade tecidual da 1,25-dihidroxitamina D, a forma ativa da vitamina D. Esta induz diretamente a transcrição gênica de LL-37 no DNA humano. (136,137)

O CRAMP parece agir como um novo mediador imunomodulatório na LRA, e a modulação do CRAMP pode ser uma estratégia terapêutica potencial. Esse estudo foi realizado com o intuito de avaliar o papel do peptídeo antimicrobiano CRAMP na insuficiência renal aguda, utilizando modelos de camundongos sépticos e de lesão renal aguda induzida por rabdomiólise. A rabdomiólise foi escolhida por se tratar de uma doença inflamatória não associada à infecção. Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo a avaliar os AMPs na rabdomiólise.

1.8 NGAL

A família das lipocalinas atua como transportadora de moléculas hidrofóbicas pequenas, tais como hormônios esteroides, vitaminas e produtos do metabolismo. A lipocalina-2 também é conhecida como *Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin* (NGAL), e, assim como a siderocalina e 24p3, foi inicialmente identificada como componente dos grânulos neutrofílicos. Possui aproximadamente 200 aminoácidos e atua como transportador de ferro e sequestrador de íons catalíticos. Na inflamação, sua síntese é induzida nos macrófagos, células gliais e epiteliais, além de estar relacionada à apoptose, e participa da imunidade inata, com limitação do crescimento bacteriano. (75,138,139)

Além de um biomarcador de inflamação, a NGAL tem sido investigada como um marcador sensível e específico de lesão renal, pois apresenta uma cinética mais interessante que a creatinina. Ela é rapidamente transcrita após a lesão, e com a retirada do insulto, seus níveis caem rapidamente. A dosagem parece ser dose-dependente de acordo com o dano, aparecendo no plasma e na urina. (140,141)

Tem sido avaliada na lesão renal aguda associada a diferentes condições clínicas, tais como cirurgia cardiovascular, insuficiência cardíaca, sepse, intoxicações e queimaduras.(142–147) Além dos mecanismos de LRA, NGAL também pode estar associada à DRC. (141,148,149)

A NGAL não é capaz de medir o status funcional do rim, diferentemente da creatinina, o que constitui uma desvantagem. Além disso, também está aumentada em outras condições, como na inflamação. (75)

2 Hipótese do Estudo

Estudos prévios demonstraram que os animais CRAMP KO são mais resistentes à sepse induzida por CLP. Considerando que os papéis de sinalização dos peptídeos antimicrobianos podem ser distintos, de acordo com o contexto clínico subjacente, decidimos comparar dois modelos de lesão renal aguda, sendo um deles associado à infecção (sepse) e o outro associado à inflamação, mas sem infecção (rabdomiólise).

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Comparar dois modelos distintos de lesão renal aguda, em animais CRAMP KO e correspondentes selvagens (C57), sendo um modelo associado a um processo infeccioso (sepsis), e o outro, de processo inflamatório na ausência de infecção (rabdomiólise).

Avaliar a resposta imunoinflamatória no soro de camundongos CRAMP KO e selvagens, submetidos à lesão renal aguda.

Avaliar a resposta imunoinflamatória no tecido renal desses mesmos animais.

3.2 Objetivos secundários

Avaliar a curva de mortalidade dos animais CRAMP KO e selvagens, submetidos à rabdomiólise.

Avaliar a resposta imunoinflamatória no tecido pulmonar e no íleo terminal, a fim de compreender a lesão de órgãos à distância, nos dois modelos de LRA.

Avaliar a dosagem de NGAL na urina e soro destes animais, considerando seu potencial como biomarcador na lesão renal aguda.

4 Materiais e Métodos

4.1 Local de experimentação

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no período de novembro de 2017 a junho de 2020.

4.2 Aspectos éticos

Os procedimentos foram iniciados após submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (PP 943/17). Os termos de aprovação encontram-se nos Anexos A e B.

Foram seguidos os preceitos do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. National Research Council, 2011. National Academy Press, Washington, D.C. e as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.3 Animais de experimentação

Camundongos machos e fêmeas com *background* genético C57BL/6 e com padrão genético *knockout* (KO) para o gene CAMP foram adquiridos previamente do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA), sendo mantidos para reprodução no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, em um ambiente livre de patógenos específicos (*specific-pathogen-free*, *SPF*).

Para o presente estudo, camundongos CRAMP KO e seus correspondentes selvagens, do sexo masculino, foram obtidos do Biotério Central com 7 semanas de vida, e passaram a ser mantidos no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia, no Departamento de Clínica Médica. Os animais eram mantidos em gaiolas convencionais, sob condições controladas de temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclos claro/escuro de 12:12 horas, com livre acesso à água filtrada e ração (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes, LTDA).

Os experimentos foram realizados na idade de 8 a 10 semanas de vida, correspondendo à fase final reprodutiva.

A massa corporal variou entre 17,5 e 26,6 gramas, e os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos:

- C57BL/6 controle
- CRAMP KO controle
- C57BL/6 submetidos à rabdomiólise

- CRAMP KO submetidos à rabdomiólise
- C57BL/6 submetidos à sepse
- CRAMP KO submetidos à sepse.

4.4 Gaiola metabólica

A proposta inicial do projeto incluía a coleta de urina, antes e após a indução de rabdomiólise, por meio do uso de gaiolas metabólicas. (150)

Entre setembro e novembro de 2018, foram realizados experimentos com um total de 26 animais, sendo distribuídos nos seguintes grupos:

- 6 animais C57BL/6 controle,
- 6 animais C57BL/6 submetidos à rabdomiólise,
- 7 animais CRAMP KO controle
- 7 animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise.

Os animais foram colocados em gaiola metabólica (Tecniplast, West Chester, PA, EUA), na véspera do procedimento, sendo que os animais do grupo rabdomiólise permaneciam em restrição hídrica por 12 horas antes da indução da rabdomiólise. Ração pulverizada foi fornecida, *ad libitum*. Os animais do grupo controle eram colocados na gaiola metabólica ao mesmo tempo que os animais do grupo rabdomiólise, e recebiam água e ração pulverizada à vontade.

Após serem submetidos à rabdomiólise, os animais evoluíram com anúria, não sendo possível realizar a coleta de urina para as dosagens. A gaiola metabólica deixou de ser utilizada e passamos a manter os animais nas gaiolas convencionais. Esses 26 primeiros animais foram submetidos à coleta de sangue e tecidos, porém, houve problemas com a reprodução do modelo de rabdomiólise, e seus dados não foram incluídos na análise final dos resultados.

4.5 Modelo de rabdomiólise

Na segunda etapa de experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas convencionais, sendo colocados em restrição hídrica por 24 horas antes do procedimento, recebendo alimentação *ad libitum*.

No dia do procedimento, os animais eram pesados, e recebiam injeção intramuscular de 8 mL/kg de uma solução de glicerol a 50%, diluído em NaCl 0,9%. A injeção foi realizada na pata traseira direita do animal. (151,152)

A seguir, os animais eram devolvidos às respectivas caixas, recebendo ração e água *ad libitum*, e permaneciam no Biotério por 24 horas, até a coleta dos tecidos.

4.6 Modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP)

Sepse foi induzida nos grupos de animais CRAMP KO e controles selvagens, pelo método de ligadura e punção cecal (CLP) (153). Os animais

permaneciam no Biotério de Experimentação da Reumatologia antes do procedimento, sem restrições hídricas ou alimentares. As etapas do processo estão listadas a seguir:

- 1- Anestesia intraperitoneal com solução de cloridrato de cetamina a 5% (Cristália, São Paulo, Brasil), na dose de 120 mg/kg, e cloridrato de xilazina a 2% (Cristália, São Paulo, Brasil), na dose de 20 mg/kg de peso do animal.
- 2- Laparotomia, com incisão de aproximadamente 2 cm em linha mediana, suficientes para a exteriorização do ceco.
- 3- Compressão manual das alças intestinais, de modo a impelir as fezes do cólon ascendente para o ceco, enchendo esta cavidade ao máximo, seguida de ligadura cecal firme, com fio de algodão 3.0, sem causar obstrução intestinal.
- 4- Distalmente à ligadura, realizadas duas punções no ceco, com agulha 21G. A seguir, realizada compressão local para testar a patência das punções.
- 5- Devolução do ceco para a cavidade abdominal.
- 6- Sutura da parede abdominal por planos.

Após o procedimento, os camundongos foram mantidos nas gaiolas convencionais, recebendo água e ração *ad libitum*. Sinais clínicos de infecção, tais como eriçamento de pelos, prostração, vasoconstrição, extremidades mal perfundidas e tendência a se agruparem, eram observados a partir de 6 a 12

horas após o procedimento. Os animais permaneciam no Biotério por 24 horas, até a coleta dos tecidos.

4.7 Grupo controle

Foi realizado um grupo controle basal, composto por animais que não foram submetidos a qualquer intervenção. Esses animais eram colocados nas gaiolas simultaneamente aos grupos das demais intervenções, e as etapas de eutanásia e coleta de tecidos foram realizadas em paralelo com os animais dos grupos submetidos à sepse e à rabdomiólise. Não houve grupo *sham*.

A Figura 7 representa a sequência de etapas realizadas para cada grupo.

CLP: ligadura e punção cecal

Figura 7– Sequência dos procedimentos realizados para cada grupo do estudo

4.8 Eutanásia e coleta dos tecidos

Os animais dos grupos sepse e rabdomiólise foram eutanasiados 24 horas após as intervenções, e os animais do grupo controle foram eutanasiados simultaneamente.

A eutanásia foi realizada com a administração de uma solução de cloridrato de cetamina a 5% (Cristália, São Paulo, Brasil), na dose de 240 mg/kg, e cloridrato de xilazina a 2% (Cristália, São Paulo, Brasil), na dose de 30 mg/kg de peso do animal.

Para retirada dos tecidos, foi realizada uma incisão tóraco-abdominal, inicialmente se procedendo à coleta de sangue total do animal por meio da aspiração da veia cava inferior, em seringa heparinizada, para posterior centrifugação e obtenção do soro. As amostras de sangue eram colocadas em um tubo tipo *Eppendorf* heparinizado, sendo mantidas em gelo.

A seguir, realizada a extração dos órgãos: rins direito e esquerdo, pulmão direito e esquerdo, fígado, íleo e amostra de músculo da pata traseira esquerda (correspondendo ao membro contralateral ao da injeção de glicerol, nos animais submetidos à rabdomiólise). Os tecidos foram colocados separadamente em tubos com tampa de rosca, e imersos em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram transferidos para o freezer a -80°C, onde ficaram armazenados para processamento conjunto de todas as amostras, ao término do experimento.

4.9 Separação do soro

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rpm, durante 15 minutos, à temperatura de 4°C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Realizada aspiração do sobrenadante com pipeta, obtendo-se cerca de 300 a 350 µL de soro por amostra. Foi separada uma microamostra de 200 µL para dosagem de escórias renais, eletrólitos e CPK. O restante do soro foi armazenado em tubos com tampa de rosca, sendo imersos em nitrogênio líquido, e posteriormente transferidos ao freezer, onde foram mantidos à temperatura de -80°C.

4.10 Dosagem sérica dos marcadores de lesão renal

Amostras de soro foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Especiais (LIM-03) da FMUSP, para dosagem de CPK, ureia, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, fósforo e cálcio iônico. As dosagens tinham por objetivo comprovar a ocorrência da rabdomiólise e da lesão renal aguda, para validação do modelo. Os animais do grupo controle e do grupo sepse foram submetidos às mesmas dosagens, inclusive CPK.

As dosagens de cálcio iônico e potássio foram realizadas no equipamento ABL 800 FLEX (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca), com a metodologia eletrodos de íon seletivo.

As demais dosagens foram realizadas no equipamento Cobas c111 (Roche, Indianápolis, EUA), utilizando-se os kits do mesmo fabricante. A metodologia usada para os exames está listada a seguir:

- Fósforo: molibdato UV.
- CPK: teste UV.
- Ácido úrico: enzimático colorimétrico.
- Ureia/BUN (*blood urea nitrogen*): cinético UV, por ação da urease.
- Creatinina: enzimático colorimétrico, baseado no método Jaffé.

4.11 Purificação de proteínas

As amostras de pulmão direito e esquerdo, rim direito e íleo foram retiradas do freezer a -80°C e mantidas em nitrogênio líquido, sendo extraídas dos tubos uma a uma, e pulverizadas. O material foi novamente armazenado à temperatura de -80°C, para extração simultânea de todas as amostras.

Um tampão de lise foi preparado com 2,7 mL de uma solução de NaCl 5 M, 2 mL de TRIS a 1 M (pH 8,0), 10 mL de glicerol puro, 1 mL de Tergitol a 100%, adicionando-se volume de água destilada suficiente para completar 100 mL de solução. A solução era mantida em geladeira, e no momento do uso, eram acrescentados 4 µL de PMSF (inibidor de serinoprotease), a 250 mM, para cada mL da solução de extração.

As amostras de tecidos pulverizados foram retiradas do freezer, sendo mantidas em gelo, para descongelamento gradual. A solução de lise era adicionada na proporção de 1 mL do tampão, para cada 100 mg de tecido. As amostras eram mantidas em gelo, sendo agitadas em gangorra por 30 minutos. A seguir, realizada centrifugação das amostras a 10000 rpm, por 30 minutos, à temperatura de 4°C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Realizada aspiração do sobrenadante com pipeta, sendo as amostras colocadas uma a uma em tubo de tampa de rosca, preservadas em nitrogênio líquido, e posteriormente em freezer a -80°C.

Foram preparadas placas para ELISA, com alíquotas das amostras de proteínas extraídas, as quais permaneceram armazenadas no freezer a -80°C, até o momento do uso.

A Tabela 5 mostra as dosagens e processos realizados em cada um dos materiais coletados.

Tabela 5 – Dosagens e processos realizados em cada um dos materiais coletados

Soro	Rins	Pulmão	Intestino
Citocinas	Citocinas		
Ureia	β -defensina 1	β -defensina 1	α -defensina 5
Creatinina	β -defensina 3	β -defensina 3	
Ácido úrico	NGAL		
Potássio			
Fósforo	Histologia		
Cálcio iônico			
CPK			

4.12 Dosagem de peptídeos antimicrobianos e citocinas nos tecidos (ELISA)

As placas com alíquotas das amostras foram retiradas do *freezer* e mantidas em gelo, para descongelamento gradual. Inicialmente, procedeu-se à dosagem das proteínas totais, pelo método Bradford.

Procedemos às seguintes dosagens, pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*):

- Rim: TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1- β , β -defensina 1, β -defensina 3, NGAL
- Pulmão: β -defensina 1, β -defensina 3
- Íleo: α -defensina 5

O método ELISA consiste no uso de uma placa com poços revestidos com um anticorpo monoclonal específico para cada analito testado. Ao contato com a amostra, o anticorpo liga-se a seu antígeno. São realizadas lavagens sucessivas, para retirada do material não ligado. A seguir, adiciona-se uma enzima com ligação específica para o anticorpo, a qual é marcada. São realizadas novas lavagens sucessivas, fazendo com que apenas o complexo anticorpo-antígeno-enzima reste nos poços. A etapa seguinte consiste na incubação com uma solução de substrato da enzima, e após, uma solução de parada. Realiza-se a leitura da placa em um leitor de microplacas, correlacionando-se a absorbância obtida com a concentração da variável na amostra. A densidade ótica (OD) de cada poço foi lida com um leitor de microplacas, configurado para um comprimento de onda de 450 nm.

Os *kits* utilizados foram da marca R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, EUA).

- β -defensina 1 (DEFB1)
- β -defensina 3 (DEFB3)
- α -defensina 5 (DEFA5):
- NGAL: foram utilizados 2 *kits*. As dosagens realizadas com o primeiro *kit* ultrapassaram o limite superior de detecção, sendo então adquirido um novo *kit*.
- IL-1- β
- IL-6

- IL-10
- TNF α

4.13 Dosagem de citocinas no soro (Milliplex)

Amostras de soro foram submetidas ao método Milliplex® (Merck Millipore Co., Alemanha) para dosagem de TNF- α , IL-6, IL-10 IL-1 β e MCP-1. Os procedimentos foram realizados no laboratório da empresa LEAC LAB (São Paulo, SP), uma vez que o equipamento do LIM-51 não estava funcionando.

No método Milliplex®, microesferas de polietileno (*beads*) são coradas internamente com dois corantes fluorescentes. Diferentes conjuntos de esferas coloridas podem ser produzidos, sendo cada um deles revestido com um anticorpo de captura específico. Durante o período de incubação, o analito da amostra é capturado pelas esferas, ocorrendo a ligação do anticorpo biotinizado. A seguir, realizada incubação com o conjugado estreptoavidina-ficoeritrina, uma molécula que emite um sinal fluorescente (molécula repórter). Um laser excita os corantes internos das microesferas, seguido por um segundo laser, que excita o corante da molécula repórter.

Processadores digitais de sinais de alta velocidade identificam o código de cor específico para cada analito. A leitura é realizada em leitor de microplacas com um programa específico de análise, o Luminex™ 100/200 System (Luminex, Texas, EUA).

4.14 Histologia

Amostras de rim esquerdo de 47 animais foram seccionadas no sentido longitudinal, sendo colocadas em anteparo com a parte interna (central) do rim, demonstrando medular e cortical. O material foi preservado em formol e encaminhado para o laboratório Histocell (São Paulo, SP), para imersão em parafina e confecção das lâminas.

Cortes histológicos, com 4 mm de espessura, foram corados com hematoxilina-eosina, e avaliados à microscopia ótica. Para cada amostra, foram avaliados de 40 a 60 campos, medindo 0,245 mm², sob magnificação de 400x, e pontuados de acordo com os seguintes critérios:

- (0), menos de 5% do campo mostrando edema do epitélio tubular, degeneração vacuolar, necrose e descamação;
- (1), 5-25% do campo apresentando tais lesões;
- (2), 25-50% de acometimento do campo;
- (3), 50-75% de acometimento do campo;
- (4), mais de 75% de acometimento do campo pelas lesões. (154–156)

Foi calculado o escore médio para cada animal, e a seguir, para cada um dos seis grupos de animais. A avaliação foi realizada por um patologista experiente, que não tinha conhecimento do grupo de onde a amostra era proveniente.

4.15 Curva de mortalidade

Um grupo adicional de animais C57BL/6 e CRAMP KO foi submetido ao modelo de rabdomiólise, para avaliar a curva de mortalidade. Cada grupo continha 15 animais, os quais foram observados até o óbito, ou eutanasiados no 15º dia.

4.16 Descarte das carcaças

O descarte das carcaças dos animais seguiu as legislações vigentes, de acordo com a resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), e a resolução nº 358, de 29 de abril de 2005, do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), de acordo com o Programa de Gerenciamento de Resíduos do Serviço de Saúde (PGRSS) da FMUSP, para resíduos infectantes do subgrupo A2.

4.17 Análise Estatística

O tamanho das amostras foi calculado com base em trabalhos semelhantes, previamente publicados.

Os dados foram avaliados com o programa GraphPad Prism®, versão 9.1.1 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EUA) para Windows™.

A análise descritiva foi realizada por meio de gráficos, com representação da mediana, intervalos interquartis, e dos valores máximos e mínimos para as variáveis.

As amostras foram avaliadas inicialmente quanto à normalidade e à homogeneidade das variâncias. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados com significância estatística. As amostras foram também avaliadas quanto à presença de *outliers*.

Os resultados foram avaliados por métodos paramétricos e não-paramétricos. A comparação entre três ou mais grupos foi realizada com o teste paramétrico ANOVA de uma via, nos casos de grupos com distribuição normal e homogeneidade das variâncias. Para comparação entre grupos com diferença estatística significativa, foi utilizado o teste de Tukey para comparações múltiplas.

Nos casos de comparação entre três ou mais grupos que não apresentavam distribuição normal, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. A análise *post-hoc* para comparações múltiplas entre dois grupos foi realizada com o teste de Dunn.

A análise de mortalidade foi realizada com os métodos *log-rank* e Kaplan-Meier.

5 Resultados

5.1 Primeiros experimentos - gaiola metabólica

Entre setembro e novembro de 2018, foram realizados experimentos com um total de 26 animais, distribuídos nos seguintes grupos:

- 6 animais C57BL/6 controle,
- 6 animais C57BL/6 submetidos à rabdomiólise,
- 7 animais CRAMP KO controle
- 7 animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise.

Constatou-se que os animais submetidos à rabdomiólise evoluíram com anúria, impossibilitando a coleta da urina.

Os animais foram eutanasiados e submetidos à coleta de tecidos e soro. Amostras de soro foram enviadas para a dosagem de CPK, para confirmar a ocorrência de rabdomiólise. Foi observado, no entanto, que os valores foram heterogêneos, discordantes dos valores esperados, com valores de CPK elevados mesmo nos animais que não haviam sido submetidos à injeção intramuscular de glicerol.

Consideramos que esses valores elevados de CPK nos animais controle se deveram à dificuldade inicial no manuseio dos animais para coleta e centrifugação do sangue, por inexperiência da autora.

5.2 Segunda fase de experimentos

Novos procedimentos foram realizados a partir do primeiro semestre de 2019, com melhor controle do manuseio dos animais, a fim de validarmos o modelo de rabdomiólise.

Foram realizados experimentos iniciais com 15 animais, sendo divididos nos seguintes grupos:

- 3 animais C57BL/6 controle,
- 5 animais C57BL/6 submetidos à rabdomiólise,
- 3 animais CRAMP KO controle
- 4 animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise.

Para validação do modelo, foram realizadas as dosagens séricas de ureia, creatinina, potássio, cálcio, CPK e ácido úrico. Com a validação de que os animais passaram a apresentar elevação de CPK somente no grupo rabdomiólise, prosseguimos com a realização dos procedimentos para completar as amostras (8 a 13 animais por grupo).

Prosseguimos também com a realização do procedimento de CLP, nos animais pertencentes ao grupo sepse.

Os resultados são apresentados nos gráficos a seguir.

5.3 Comparação entre os animais submetidos ao modelo de LRA por rabdomiólise e os controles saudáveis

Considerando a ausência de registros de estudos prévios com o modelo de rabdomiólise em animais CRAMP KO, procedemos inicialmente à avaliação dos resultados do grupo rabdomiólise, em comparação com o grupo controle.

Posteriormente, serão apresentadas as análises comparativas entre os grupos rabdomiólise, sepse e controle.

5.3.1 Curva de mortalidade

Os animais CRAMP KO mostraram-se mais suscetíveis à lesão renal aguda por rabdomiólise que os animais selvagens ($p < 0,01$), conforme demonstrado na curva de mortalidade, representada na Figura 8.

Figura 8 - Curva de mortalidade dos animais submetidos à rabdomiólise

5.3.2 Valores de CPK, creatinina, ureia, ácido úrico, potássio, cálcio ionizado e fósforo

O modelo de rabdomiólise foi capaz de desencadear lesão renal nos animais, constatada pela observação clínica de anúria, e pela elevação de ureia e creatinina. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores séricos de CPK entre os grupos.

Os valores de ureia e creatinina foram significativamente mais elevados nos animais submetidos à rabdomiólise, em ambos os grupos, na comparação com os controles saudáveis. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos selvagem e CRAMP KO.

Os valores de CPK, creatinina e ureia estão representados na Figura 9.

Figura 9 – Valores de CPK, creatinina e ureia séricas, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rbdomiólise

Os valores de potássio e fósforo séricos não mostraram elevação estatisticamente significativa após a indução de rbdomiólise. Observou-se que os animais selvagens (C57), do grupo controle saudável, apresentaram valores de cálcio iônico mais elevados que seus correspondentes submetidos à rbdomiólise.

Os valores de potássio, fósforo e cálcio iônico séricos estão representados na Figura 10.

Figura 10 – Valores de potássio, fósforo e cálcio iônico séricos, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

Os animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise apresentaram elevação estatisticamente significativa nos valores de ácido úrico ($p = 0,0079$), em comparação aos animais selvagens (C57). Os dados estão demonstrados na Figura 11.

Figura 11 – Valores de ácido úrico sérico, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

5.3.3 Valores de citocinas pelo método Milliplex®

As citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1, e a citocina anti-inflamatória IL-10, foram dosadas no soro dos animais, pelo método Milliplex®.

Foi observado que o procedimento de rabdomiólise induziu a expressão de IL-6 e MCP-1, tanto nos animais selvagens (C57), como nos animais CRAMP KO, em comparação aos seus controles saudáveis. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos CRAMP KO e selvagem.

Não foi observada diferença significativa nos valores de IL-1 β , TNF- α e IL-10, entre os grupos.

Os resultados das dosagens das citocinas estão demonstrados na Figura 12.

Figura 12 – Dosagens de citocinas anti e pró-inflamatórias, no soro, pelo método Milliplex®, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

5.3.4 Valores de citocinas no tecido renal, nos grupos selvagem e rabdomiólise, pelo método ELISA

A dosagem de citocinas no tecido renal mostrou que os animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise apresentaram valores significativamente mais elevados de TNF- α ($p = 0,0199$), IL-1 β ($p = 0,0022$) e IL-6 ($p = 0,0334$), com significância estatística. Não houve diferença nos valores de IL-10. Essas informações estão representadas na Figura 13.

Figura 13 – Valores de citocinas no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

5.3.5 Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA

O modelo de rabdomiólise promoveu um aumento na expressão de NGAL no tecido renal dos camundongos selvagens e nos animais CRAMP KO. No entanto, os animais CRAMP KO apresentaram valores de NGAL significativamente maiores ($p = 0,0032$).

Essas informações estão representadas na Figura 14.

Figura 14 – Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

5.3.6 Valores de β -defensinas 1 e 3 nos tecidos renal e pulmonar, pelo método ELISA

O modelo de rabdomiólise não induziu a produção de β -defensina 1, tanto local, no tecido renal, como à distância, no tecido pulmonar. Foi observada elevação de β -defensina 3, com valores estatisticamente significativos, no tecido renal de animais CRAMP KO ($p = 0,0416$), em comparação aos animais selvagens (C57). Não houve elevação de β -defensina 3 à distância, no tecido pulmonar.

Os dados estão demonstrados na Figura 15.

Figura 15 – Valores de β -defensina 1 e 3 nos tecidos renal e pulmonar, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

5.3.7 Valores de α -defensina 5 no íleo, pelo método ELISA

O modelo de rabdomiólise não induziu aumento na expressão de α -defensina 5 ileal. Os valores estão demonstrados na Figura 16.

Figura 16 – Valores de α -defensina 5 no tecido ileal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

5.3.8 Avaliação da lesão tecidual renal à histologia, pelo Escore de Lesão Tubular

Os animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise apresentaram pontuações maiores no escore de lesão tubular, em comparação ao grupo selvagem (C57), com diferença estatística significativa ($p = 0,0349$).

A Figura 17 traz os valores pontuados no escore, e a representação de um exemplo de lâminas pertencentes a cada grupo, demonstrando a avaliação histológica.

Figura 17 – Escore de lesão tubular, na comparação entre controles saudáveis e animais submetidos à rabdomiólise

5.4 Avaliação comparativa da lesão renal associada à sepse e à rabdomiólise, com os controles saudáveis

Considerando a proposta de comparação entre dois modelos distintos de lesão renal aguda, prosseguiremos à análise comparativa entre os grupos rabdomiólise, sepse e controles saudáveis.

5.4.1 Valores de CPK, creatinina, ureia, ácido úrico, potássio, cálcio ionizado e fósforo

À comparação com o modelo de sepse, observou-se que o modelo de rabdomiólise desencadeou maiores elevações de creatinina e ureia, embora não tenha havido diferença estatística significativa entre os grupos CRAMP KO e controle.

Tanto os animais CRAMP KO, quanto os animais selvagens (C57), apresentaram elevação significativa dos valores de creatinina em comparação aos controles saudáveis, quando submetidos à rabdomiólise. Já o modelo de sepse não levou à elevação da creatinina, em comparação aos controles, em nenhum dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos CRAMP KO e C57.

Os animais selvagens apresentaram maior elevação de CPK no modelo de sepse, mas não houve diferença significativa na análise comparativa com o grupo CRAMP KO. A rabdomiólise induziu elevação significativa de CPK em comparação com os controles saudáveis, somente nos animais CRAMP KO.

Os valores de CPK, creatinina e ureia estão representados na Figura 18.

Figura 18 – Valores de CPK, creatinina e ureia sérica, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

Os animais CRAMP KO apresentaram valores de potássio sérico mais elevados no grupo rabdomiólise, em comparação à sepse ($p = 0,0151$). Não houve diferença significativa entre os grupos CRAMP KO e C57.

Não houve diferença estatística quanto aos valores de fósforo sérico.

Observou-se que os animais selvagens do grupo controle saudável apresentaram valores de cálcio iônico mais elevados que seus correspondentes submetidos à rabdomiólise e à sepse.

Os valores de potássio, fósforo e cálcio iônico séricos estão representados na Figura 19.

Figura 19 – Valores de potássio, fósforo e cálcio iônico séricos, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

A comparação entre os três grupos demonstrou valores mais elevados de ácido úrico sérico nos animais submetidos ao modelo de sepse, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Os valores de ácido úrico se encontram representados na Figura 20.

Figura 20 – Valores de ácido úrico sérico, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

5.4.2 Valores de citocinas pelo método Milliplex®

As citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1, e a citocina anti-inflamatória IL-10, mostraram elevação significativa nos animais submetidos ao modelo de sepse, tanto nos animais CRAMP KO, como nos animais selvagens, em comparação aos controles basais saudáveis.

No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa à comparação entre os grupos CRAMP KO e C57.

Os resultados das dosagens das citocinas estão demonstrados na Figura 21.

Figura 21 – Valores de citocinas anti e pró-inflamatórias, no soro, pelo método Milliplex®, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

5.4.3 Valores de citocinas no tecido renal, pelo método ELISA

Na análise comparativa entre os seis grupos, continua sendo observada a diferença significativa entre IL-1 β renal entre os animais CRAMP KO e C57, submetidos à rabdomiólise ($p = 0,331$). A comparação entre as outras citocinas não mostrou diferença estatisticamente significativa.

Essas informações estão representadas na Figura 22.

Figura 22 – Valores de citocinas no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse.

5.4.4 Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA

Na análise comparativa entre os seis grupos, continua sendo observada diferença significativa entre os grupos C57 e CRAMP KO, submetidos à rabdomiólise ($p = 0,0115$). Os animais submetidos à sepse apresentaram valores de NGAL menores que os dos animais submetidos à rabdomiólise, porém, sem diferença estatisticamente significativa. A Figura 23 demonstra os valores de NGAL no tecido renal.

Figura 23 – Valores de NGAL no tecido renal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

5.4.5 Valores de β -defensinas 1 e 3 no tecido renal e pulmonar, pelo método

ELISA

O modelo de sepse levou à expressão de β -defensina 1 e β -defensina 3 no tecido renal, sem diferença estatística entre os grupos CRAMP KO e C57. Nota-se a diferença nos valores de β -defensina 1 obtidos nos animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise, em que não houve expressão, e os submetidos à sepse ($p < 0,0001$).

Foi observada elevação de β -defensina 1 pulmonar nos animais submetidos à sepse, sem diferença estatística entre os grupos CRAMP KO e C57. Somente os animais selvagens (C57) submetidos à sepse apresentaram elevação de β -defensina 3 à distância, no tecido pulmonar.

Os dados estão demonstrados na Figura 24.

Figura 24 – Valores de β -defensina 1 e 3 nos tecidos renal e pulmonar, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

5.4.6 Valores de α -defensina 5 no íleo, pelo método ELISA

O modelo de sepse levou à elevação de α -defensina 5 no íleo, tanto dos animais C57, como nos animais CRAMP KO. Os animais selvagens apresentaram valores mais elevados, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0129$).

Os valores de α -defensina 5 estão demonstrados na Figura 25.

Figura 25 – Valores de α -defensina 5 no tecido ileal, pelo método ELISA, na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

5.4.7 Avaliação da lesão tecidual renal à histologia, pelo Escore de Lesão Tubular

Na análise comparativa entre os seis grupos, observou-se que o modelo de rabdomiólise levou aos maiores escores de lesão tubular, sendo que a lesão foi

mais grave nos animais CRAMP KO do que nos animais selvagens, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0317$).

Não houve diferença no escore de lesão tubular à comparação entre os animais submetidos à sepse e os controles saudáveis.

A Figura 26 traz a representação de um exemplo de lâminas pertencentes a cada grupo, demonstrando a avaliação histológica, e a pontuação no escore de lesão tubular.

Figura 26 – Escore de lesão tubular na comparação entre controles saudáveis, animais submetidos à rabdomiólise, e à sepse

6 Discussão

6.1 Resultados

Este é o primeiro estudo, até onde temos conhecimento, que descreve o comportamento dos peptídeos antimicrobianos em um modelo murino de rabdomiólise.

O modelo de rabdomiólise foi capaz de induzir lesão muscular e lesão renal aguda, de acordo com os valores obtidos para CPK, ureia e creatinina, tanto nos animais CRAMP KO, como nos animais selvagens (C57). Apenas a dosagem de ácido úrico mostrou diferença significativa entre os grupos, sendo mais elevada nos animais CRAMP KO, o que pode representar um reflexo da maior lesão tecidual que esses animais apresentam.

Em um primeiro momento, essa lesão tecidual não pôde ser mensurada pela dosagem sérica de creatinina e ureia, corroborando o conceito de que a creatinina é um biomarcador inadequado para o diagnóstico da LRA, por mostrar elevação tardia. (24–27) No entanto, a maior gravidade da lesão renal foi posteriormente demonstrada com as dosagens de citocinas renais, NGAL e pelo escore de lesão tubular.

O ácido úrico não é apenas um marcador da LRA associada à rabdomiólise, mas um fator importante na sua fisiopatologia, além da mioglobina. Há duas formas de ácido úrico presentes no organismo: solúvel e insolúvel (esta

última, representada pelos cristais de ácido úrico e de urato monossódico). Os cristais de ácido úrico se precipitam em um meio ácido, como o que é observado no lúmen tubular, na lesão renal aguda. A deposição desses cristais leva à obstrução tubular e à morte celular pelo mecanismo de necrose, que culmina na liberação de mais ácido úrico das células renais. Tanto as formas solúveis, como as formas insolúveis, atuam como DAMPs, desencadeando processo inflamatório local, inclusive no interstício tubular. (95,157,158)

A dosagem de citocinas no soro mostrou que tanto os animais CRAMP KO, quanto os animais selvagens (C57), apresentaram níveis mais elevados de MCP-1 e IL-6 quando submetidos à rabdomiólise, em comparação aos controles saudáveis. Não houve diferença significativa entre os valores de MCP-1 e IL-6 entre os animais selvagens e CRAMP KO. No entanto, os animais CRAMP KO se mostraram mais suscetíveis à rabdomiólise, sem sinais de uma maior inflamação sistêmica aparente.

No tecido renal, entretanto, observou-se que os animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise apresentaram valores mais elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6, todos com diferença estatisticamente significativa, em comparação aos animais selvagens (C57). O fato de não ter havido diferença na elevação de citocinas no soro, mas somente no tecido renal, permite inferir que a rabdomiólise induziu principalmente inflamação tecidual local nesses animais, sem importante repercussão sistêmica.

Um estudo prévio realizado pelo nosso grupo mostrou que os camundongos CRAMP KO foram protegidos da sepse induzida pelo modelo de CLP, em comparação aos animais selvagens. (159) Os animais foram

submetidos à coleta de tecidos após 8 horas da indução da sepse, e a análise das citocinas pelo método Milliplex® mostrou que os animais CRAMP KO tiveram valores mais elevados de IL-1 β , IL-6 e MCP-1, todos com significância estatística. Apesar dos valores mais elevados de citocinas no soro, inferindo uma inflamação sistêmica mais intensa, a mortalidade dos animais CRAMP KO foi significativamente menor. Nesse estudo de 2017 não foi realizada dosagem de citocinas no tecido renal.

No presente experimento, a mortalidade dos animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise foi significativamente maior, o que esteve relacionado com valores mais elevados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido renal.

Entretanto, ao avaliarmos as dosagens de citocinas no soro dos animais submetidos à sepse no presente estudo, submetidos à coleta dos tecidos após 24 horas do modelo de CLP, observamos que os valores de IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL-10 foram todos mais baixos nos animais CRAMP KO, em comparação aos animais selvagens (C57).

A princípio, essa observação parece contrapor os resultados obtidos nos diferentes estudos, dado que os animais CRAMP KO apresentaram valores maiores de citocinas pró-inflamatórias com 8 horas após CLP, à comparação com os animais C57, ao passo que, após 24 horas da CLP, os animais CRAMP KO tiveram valores de citocinas mais baixos. Porém, se considerarmos que os animais CRAMP KO submetidos à sepse, no estudo de 2017, tiveram menor mortalidade que os animais selvagens (C57) – ou seja, tiveram maior sobrevida após as horas iniciais da sepse – é possível supor que, com o passar das horas,

o nível sérico dessas citocinas se reduziria, com consequente redução da inflamação sistêmica, e um maior efeito protetor.

Cabe ressaltar, contudo, que os estudos foram realizados em momentos diferentes, por pesquisadores diferentes, havendo limitações à comparação entre os animais de ambos os estudos.

O mecanismo dos efeitos protetores das catelicidinas ainda não é totalmente esclarecido, e ainda são necessários mais estudos para avaliar o seu papel em doenças não infecciosas, onde atuariam principalmente na sinalização celular. Em condições fisiológicas, a LL-37 tem efeito bactericida limitado, mas parece ter ação no controle da infecção por meio da modulação da resposta macrofágica e quimioatração de leucócitos. Um estudo com macrófagos humanos THP-1, tratados com LL-37 sintética, mostrou um aumento na secreção da MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*, proteína quimioatrativa de monócitos). (160)

MCP-1 é uma quimiocina sintetizada por diferentes tipos celulares, incluindo células inflamatórias (como monócitos), células renais residentes (como as células mesangiais e do epitélio tubular), e células de músculo liso vascular. Atua no recrutamento de monócitos e também parece induzir células não leucocitárias a produzir citocinas e moléculas de adesão. MCP-1 está relacionada à patogênese da lesão glomerular e túbulo-intersticial em doenças humanas e modelos animais de lesão renal. A inflamação túbulo-intersticial está presente em diferentes etiologias de lesão renal e contribui para a progressão para doença renal terminal. As células do epitélio tubular produzem citocinas

(IL-6 e TNF- α), quimiocinas (IL-8 e MCP-1) e moléculas de adesão (ICAM1, VCAM-1). (161)

Na rabdomiólise, a mioglobina liberada na circulação é endocitada pelas células tubulares, levando à indução de lesão oxidativa direta, e indireta pelos seus subprodutos (heme livre e ferro lábil). A produção desregulada de radicais livres no meio intracelular compromete a integridade do túbulo, ativando os mecanismos patológicos de sinalização inflamatória e necrose celular. O heme livre é capaz de induzir a secreção de TNF- α pelos macrófagos, de forma independente, além de ser um indutor do inflamassomo, dependente de espécies reativas de oxigênio, levando também à produção macrofágica de IL-1 β . (95)

A avaliação da expressão dos AMPs e das citocinas, em diferentes momentos após a indução da rabdomiólise, poderia sugerir mais informações quanto ao seu efeito neste modelo de inflamação sem infecção, no qual foi observado um efeito mais deletério.

6.2 Limitações do estudo

Considerando-se a necessidade de investigação de potenciais biomarcadores para lesão renal, foi proposta a coleta de NGAL para dosagem urinária, a fim de compararmos à dosagem tecidual e/ou sérica. No entanto, os animais submetidos evoluíram com anúria, e não foi possível realizar a coleta de urina com a gaiola metabólica. Esse fato já foi previamente relatado como uma limitação em estudos com camundongos em modelos de lesão renal. (149,162)

Técnicas de punção vesical poderiam ser consideradas no momento da eutanásia, porém, considerando o valor ínfimo que poderia ser obtido, além do risco de contaminação da urina com sangue, optamos por não realizar este processo.

As catelicidinas podem desencadear um repertório variado e muitas vezes contraditório, a depender da doença e contexto celular subjacente. A avaliação da expressão genética (quantificação do RNA) poderia ter sido realizada, fornecendo um componente adicional quanto à expressão dos peptídeos antimicrobianos. As amostras obtidas, uma vez que foram provenientes de camundongos, foi exígua para os processos realizados no projeto, e seriam necessários mais animais para a obtenção de novas amostras.

Outras técnicas histológicas poderiam ter sido utilizadas para avaliação da lesão renal associada à rabdomiólise, como imuno-histoquímica para mioglobina, ou avaliação das lâminas à luz polarizada, com o intuito de avaliar a presença de cristais birrefringentes de ácido úrico. (95)

O CRAMP parece agir como um novo mediador imunomodulatório na LRA, e sua modulação pode ser uma estratégia potencial. (125) A avaliação do CRAMP em outros modelos de lesão renal aguda, tais como isquemia-reperfusão, ou outro modelo de nefrotoxicidade, poderia acrescentar novas informações. Sabendo-se da susceptibilidade dos animais CRAMP KO ao envelhecimento, modelos de transição de LRA para DRC também poderiam ser avaliados, uma vez que o comportamento dos AMPs no envelhecimento ainda não é totalmente esclarecido. (118,163–165)

6.3 Dificuldades à execução e seguimento do cronograma inicialmente proposto

Inicialmente, houve dificuldade para obtenção dos animais CRAMP KO por problemas com o fornecimento da espécie pelo Biotério, relacionados ao controle da reprodução das linhagens em ambiente SPF, atrasando o início dos procedimentos. Além disso, houve dificuldades na padronização do modelo de rabdomiólise, conforme relatado, o que provavelmente se deveu à inexperiência da autora em experimentos de bancada, requerendo uma curva de treinamento e supervisão maiores.

Houve dificuldade também relacionada ao não funcionamento do equipamento para realização do Milliplex® em nosso laboratório, sendo necessário o processamento das amostras em laboratório externo.

Outra dificuldade esteve associada ao *kit* para dosagem de NGAL, uma vez que o primeiro *kit* excedeu o limite superior das dosagens, sendo necessária a compra de um segundo, gerando atrasos devido aos prazos de importação.

A necessidade de fechamento do laboratório devido à pandemia pelo Covid-19 também impactou os prazos para realização dos experimentos.

7 Conclusões

Camundongos CRAMP KO são mais susceptíveis à lesão renal aguda por rabdomiólise, que seus correspondentes selvagens.

Os valores de CPK, ureia e creatinina foram semelhantes entre os animais CRAMP KO e C57, porém, os animais CRAMP KO apresentaram valores de ácido úrico significativamente maiores.

A dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro não mostrou diferença significativa. Contudo, os animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise apresentaram valores de TNF- α , IL-1 β e IL-6 significativamente maiores no tecido renal, demonstrando uma reação inflamatória intensa local, mas sem repercussão à distância.

NGAL e β -defensina 3 foram significativamente mais elevadas no tecido renal dos animais CRAMP KO submetidos à rabdomiólise. Em conjunto com as dosagens de citocinas pró-inflamatórias no tecido renal, e maior evidência de lesão tecidual ao escore de lesão tubular, consideramos que a maior mortalidade dos animais CRAMP KO se deveu à própria lesão renal, uma vez que o perfil de citocinas no soro, e a dosagem das defensinas no pulmão e íleo não mostrou sinais de repercussão sistêmica ou lesão de órgãos à distância.

Animais CRAMP KO apresentaram maior mortalidade pelo modelo de rabdomiólise, mas, quando submetidos a um modelo de sepse, são mais

resistentes. As catelicidinas, portanto, podem induzir respostas inflamatórias distintas, até mesmo contraditórias, dependendo do contexto celular e patológico subjacentes.

8 Anexos

Anexo A – Termo de autorização CEUA - FMUSP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO RENAL AGUDA**”, registrada com o nº **943/2017**, sob a responsabilidade de **Fabiano Pinheiro da Silva** e **Beatriz Helena Cermaria Soares da Silva**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 08.11.2017

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 18-01-2018 Término: 18-01-2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6 e camundongo CRAMP Knockout
Nº de animais	96 (48 C57Bl/6 e 48 CRAMP)
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 08 de Novembro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B – Termo de prorrogação do prazo junto à CEUA – FMUSP

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 28.05.19, **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **943/2017** intitulado “**CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO RENAL AGUDA**” apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

- Inclusão de **30** camundongos C57Bl/6 - machos de 7 semanas e **30** camundongos Knockout Cramp - machos de 7 semanas
- Prorrogação de prazo do projeto para julho/2021

Pesquisador Responsável: **Fabiano Pinheiro da Silva**

CEUA-FMUSP, 28 de Maio de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9 Referências

1. Hill N, Fatoba S, Oke J, Hirst J, O'Callaghan C, Lasserson D, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS One*. 2016;11(7):1–18.
2. Jang HR, Rabb H. Immune cells in experimental acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2015;11(2):88–101.
3. Jurawan N, Pankhurst T, Ferro C, Nightingale P, Coleman J, Rosser D, et al. Hospital acquired Acute Kidney Injury is associated with increased mortality but not increased readmission rates in a UK acute hospital. *BMC Nephrology*. 2017;18(1):1–11.
4. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Kidney International*. 2012;81(5):442–8.
5. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney International*. 2011;79(12):1361–9.
6. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2018;14(10):607–25.
7. Turin TC, Tonelli M, Manns BJ, Ravani P, Ahmed SB, Hemmelgarn BR. Chronic kidney disease and life expectancy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27(8):3182–6.
8. Neild GH. Life expectancy with chronic kidney disease: an educational review. *Pediatric Nephrology*. 2017;32(2):243–8.
9. Wan EYF, Chin WY, Yu EYT, Wong ICK, Chan EWY, Li SX, et al. The impact of cardiovascular disease and chronic kidney disease on life expectancy and direct medical cost in a 10-year diabetes cohort study. *Diabetes Care*. 2020;43(8):1750–8.
10. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: An integrated clinical syndrome. *Kidney International*. 2012;82(5):516–24.
11. Agarwal A, Dong Z, Harris R, Murray P, Parikh SM, Rosner MH, et al. Cellular and molecular mechanisms of AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016;27(5):1288–99.
12. Mohamed F, Endre ZH, Buckley NA. Role of biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury in deliberate poisoning and envenomation in less developed countries. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2015;80(1):3–19.
13. Nugent RA, Fathima SF, Feigl AB, Chyung D. The burden of chronic kidney disease on developing nations: A 21st century challenge in global health. *Nephron - Clinical Practice*. 2011;118(3):269–77.
14. Stanifer JW, Muir A, Jafar TH, Patel UD. Chronic kidney disease in low- and middle-income countries. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2016;31(6):868–74.

15. Macedo E, Mehta RL. Regional differences in Acute Kidney Injury incidence and mortality in developing countries: recent trends. *Braz J Nephrol.* 2020;42(3):268–70.
16. George C, Mogueo A, Okpechi I, Echouffo-Tcheugui JB, Kengne AP. Chronic kidney disease in low-income to middle-income countries: The case for increased screening. *BMJ Global Health.* 2017;2(2):1–10.
17. Kher V. End-stage renal disease in developing countries. *Kidney International.* 2002;62(1):350–62.
18. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet.* 2020;395(10225):709–33.
19. Luyckx VA, Stanifer JW, Tonelli M. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bulletin of the World Health Organization.* 2018;(March):414–22.
20. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements.* 2012;2(1):1–138.
21. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements.* 2013;3(1):1–150.
22. Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Garcia-Bermejo L, Moreno JA, et al. Translational value of animal models of kidney failure. *European Journal of Pharmacology.* 2015;759:205–20.
23. Alobaidi R, Basu RK, Goldstein SL, Bagshaw SM. Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. *Seminars in Nephrology.* 2015;35(1):2–11.
24. Bonventre JV, Vaidya VS, Schmolander R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nature Biotechnology.* 2010;28(5):436–40.
25. Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ. Clearance and beyond: The complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2011;301(4):F697–707.
26. Prowle JR, Liu YL, Licari E, Bagshaw SM, Egi M, Haase M, et al. Oliguria as predictive biomarker of acute kidney injury in critically ill patients. *Critical Care.* 2011;15(4):R172.
27. Palevsky PM, Molitoris BA, Okusa MD, Levin A, Waikar SS, Wald R, et al. Design of clinical trials in acute kidney injury: Report from an NIDDK workshop on trial methodology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2012;7(5):844–50.
28. Vaara S, Parviainen I, Pettilä V, Nisula S, Inkinen O, Uusaro A, et al. Association of oliguria with the development of acute kidney injury in the critically ill. *Kidney International.* 2016;89(1):200–8.
29. Vincent JL, Ferguson A, Pickkers P, Jakob SM, Jaschinski U, Almekhlafi GA, et al. The clinical relevance of oliguria in the critically ill patient: Analysis of a large observational database. *Critical Care.* 2020;24(1):1–14.

30. 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. *Critical Care*. 2013;17(1):R25.
31. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomarkers in Medicine*. 2010;4(2):265–80.
32. Kashani KB, Schneider AG, Ricci Z. Biomarker of persistent acute kidney injury: another gemstone in the jewelry box. *Intensive Care Medicine*. 2020;46(5):1036–8.
33. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clinica Chimica Acta*. 2015;438(1):350–7.
34. Cuartero M, Ballús J, Sabater J, Pérez X, Nin N, Ordonez-Llanos J, et al. Cell-cycle arrest biomarkers in urine to predict acute kidney injury in septic and non-septic critically ill patients. *Annals of Intensive Care*. 2017;7(1):92.
35. Koyner JL, Parikh CR. Clinical utility of biomarkers of AKI in cardiac surgery and critical illness. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;8(6):1034–42.
36. Zheng L, Gao W, Hu C, Yang C, Rong R. Immune Cells in Ischemic Acute Kidney Injury. *Current Protein & Peptide Science*. 2019;20(8):770–6.
37. Vázquez-Carballo C, Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Rayego-Mateos S, Opazo-Ríos L, Morgado-Pascual JL, et al. Toll-like receptors in acute kidney injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):1–27.
38. Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2000;11(1):152–76.
39. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(11):4210–21.
40. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(1):58–66.
41. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED, Bagshaw SM, 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):241–57.
42. Gameiro J, Fonseca JA, Outerelo C, Lopes JA. Acute Kidney Injury: From Diagnosis to Prevention and Treatment Strategies. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(6):1704.
43. Fayad AI, Buamscha DG, Ciapponi A. Intensity of continuous renal replacement therapy for acute kidney injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;(10).
44. Wierstra BT, Kadri S, Alomar S, Burbano X, Barrisford GW, Kao RLC. The impact of “early” versus “late” initiation of renal replacement therapy in critical care patients with acute kidney injury: A systematic review and evidence synthesis. *Critical Care*. 2016;20(1).
45. Fayad AI, Buamscha DG, Ciapponi A. Timing of renal replacement therapy initiation for acute kidney injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;(12).

46. Feng Y, Yang Y, Han X, Zhang F, Wan D, Guo R. The effect of early versus late initiation of renal replacement therapy in patients with acute kidney injury: A meta-analysis with trial sequential analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE*. 2017;12(3):e0174158.
47. Pan HC, Chen YY, Tsai IJ, Shiao CC, Huang TM, Chan CK, et al. Accelerated versus standard initiation of renal replacement therapy for critically ill patients with acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis of RCT studies. *Critical Care*. 2021;25(5):1–15.
48. Bagshaw SM, Berthiaume LR, Delaney A, Bellomo R. Continuous versus intermittent renal replacement therapy for critically ill patients with acute kidney injury: A meta-analysis. *Critical Care Medicine*. 2008;36(2):610–7.
49. Kellum JA, Bellomo R, Ronco C. Progress in prevention and treatment of acute kidney injury: Moving beyond kidney attack. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2018;320(5):437–8.
50. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Vol. 45, *Critical Care Medicine*. 2017. 486–552.
51. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992;101(6):1644–55.
52. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2016;315(8):801–10.
53. Carneiro AH, Póvoa P, Gomes JA. Dear Sepsis-3, we are sorry to say that we don't like you. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2017;29(1):4–8.
54. Sartelli M, Kluger Y, Ansaloni L, Hardcastle TC, Rello J, Watkins RR, et al. Raising concerns about the Sepsis-3 definitions. *World Journal of Emergency Surgery*. 2018;13(1):1–9.
55. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 2020;395(10219):200–11.
56. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two Decades of Mortality Trends Among Patients With Severe Sepsis: A Comparative Meta-analysis. *Critical Care Medicine*. 2014;42(3):625–31.
57. Rhee C, Klompas M. Sepsis trends: Increasing incidence and decreasing mortality, or changing denominator? *Journal of Thoracic Disease*. 2020;2(Suppl 1):S89–100.
58. Silva E, Pedro M de A, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CL de O, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical Care*. 2004;8(4):251–60.
59. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro C, et al. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2006;18(1):9–17.

60. Lobo SM, Rezende E, Mendes CL, de Oliveira MC. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: The Brazilian ICUs project. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2019;31(1):1–4.
61. Levy MM, Pronovost PJ, Dellinger RP, Townsend S, Resar RK, Clemmer TP, et al. Sepsis change bundles: Converting guidelines into meaningful change in behavior and clinical outcome. *Critical Care Medicine*. 2004;32(11 SUPPL.):595–7.
62. Hayden GE, Tuuri RE, Scott R, Losek JD, Blackshaw AM, Schoenling AJ, et al. Triage Sepsis Alert and Sepsis Protocol Lower Times to Fluids and Antibiotics in the Emergency Department. *Am J Emerg Med*. 2016;34(1):1–9.
63. LeDoux D, Astiz ME, Carpati CM, Rackow EC. Effects of perfusion pressure on tissue perfusion in septic shock. *Critical Care Medicine*. 2000;28(8):2729–32.
64. Kato R, Pinsky MR. Personalizing blood pressure management in septic shock. *Annals of Intensive Care*. 2015;5(1):1–10.
65. Leone M, Asfar P, Radermacher P, Vincent JL, Martin C. Optimizing mean arterial pressure in septic shock: A critical reappraisal of the literature. *Critical Care*. 2015;19(1):1–7.
66. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update. *Critical Care Medicine*. 2018;46(6):997–1000.
67. Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: Clinical characteristics and outcomes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;2(3):431–9.
68. Prowle JR. Sepsis-Associated AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13:339–42.
69. Honore PM, Jacobs R, Hendrickx I, Bagshaw SM, Joannes-Boyau O, Boer W, et al. Prevention and treatment of sepsis-induced acute kidney injury: an update. *Annals of Intensive Care*. 2015;5(1):1–10.
70. Rimmelé T, Kellum JA. Oliguria and Fluid Overload. *Contrib Nephrol*. 2010;164:39–45.
71. Koc V, Benito LD, de With E, Christiaan Boerma E. The effect of fluid overload on attributable morbidity after cardiac surgery: A retrospective study. *Critical Care Research and Practice*. 2020;Dec4;(2020):4836862.
72. Wang M, Zhu B, Jiang L, Wen Y, Du B, Li W, et al. Dose-response association between fluid overload and in-hospital mortality in critically ill patients: A multicentre, prospective, observational cohort study. *BMJ Open*. 2020;10(12):1–9.
73. Sood MM, Shafer LA, Ho J, Reslerova M, Martinka G, Keenan S, et al. Early reversible acute kidney injury is associated with improved survival in septic shock. *Journal of Critical Care*. 2014;29(5):711–7.
74. Romanovsky A, Morgan C, Bagshaw SM. Pathophysiology and management of septic acute kidney injury. *Pediatric Nephrology*. 2014;29(1):1–12.
75. Umbro I, Gentile G, Tinti F, Muiesan P, Mitterhofer AP. Recent advances in pathophysiology and biomarkers of sepsis-induced acute kidney injury. *Journal of Infection*. 2016;72(2):131–42.

76. Kaliman PA, Strel'chenko E v., Nikitchenko I v., Filimonenko VP. Heme oxygenase activity and some indices of antioxidant protection in rat liver and kidney in glycerol model of rhabdomyolysis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2003;135(1):45–8.
77. Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis - An overview for clinicians. *Critical Care*. 2005;9(2):158–69.
78. Stewart IJ, Faulk TI, Sosnov JA, Clemens MS, Elterman J, Ross JD, et al. Rhabdomyolysis among critically ill combat casualties: Associations with acute kidney injury and mortality. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2016;80(3):492–8.
79. Safari S, Yousefifard M, Hashemi B, Baratloo A, Forouzanfar MM, Rahmati F, et al. The value of serum creatine kinase in predicting the risk of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2016;20(2):153–61.
80. Iraj N, Saeed S, Mostafa H, Houshang S, Ali S, Farin RF, et al. Prophylactic fluid therapy in crushed victims of Bam earthquake. *American Journal of Emergency Medicine*. 2011;29(7):738–42.
81. Tracz MJ, Alam J, Nath KA. Physiology and Pathophysiology of Heme: Implications for Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(2):414–20.
82. Zorova LD, Pevzner IB, Chupyrkina AA, Zorov SD, Silachev DN, Plotnikov EY, et al. The role of myoglobin degradation in nephrotoxicity after rhabdomyolysis. *Chemico-Biological Interactions*. 2016;256:64–70.
83. Ferraboli R, Abdulkader RCR de M, Malheiro PS, Burdmann EA. Insuficiência renal aguda por rhabdomiólise de causa infecciosa: relato de dois casos e revisão de literatura. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 1995;17(2):122–6.
84. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *The New England Journal of Medicine*. 2009;361:62–72.
85. Panizo N, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Egido J, Moreno JA. Molecular mechanisms and novel therapeutic approaches to rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2015;40(5):520–32.
86. Bolisetty S, Zarjou A, Agarwal A. Heme Oxygenase 1 as a Therapeutic Target in Acute Kidney Injury. *American Journal of Kidney Diseases*. 2017;69(4):531–45.
87. Singh AP, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacological Reports*. 2012;64(1):31–44.
88. Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zoological research*. 2018;39(2):72–86.
89. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Martín-Cleary C, Ortiz A, Ramos AM. Progress in the development of animal models of acute kidney injury and its impact on drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2013;8(7):879–95.

90. Liu ZZ, Viegas VU, Perlewitz A, Lai EY, Persson PB, Patzak A, et al. Iodinated contrast media differentially affect afferent and efferent arteriolar tone and reactivity in mice: A possible explanation for reduced glomerular filtration rate. *Radiology*. 2012;265(3):762–71.
91. Helgason D, Long TE, Helgadottir S, Palsson R, Sigurdsson GH, Gudbjartsson T, et al. Acute kidney injury following coronary angiography: a nationwide study of incidence, risk factors and long-term outcomes. *Journal of Nephrology*. 2018;31(5):721–30.
92. Elterman J, Zonies D, Stewart I, Fang R, Schreiber M. Rhabdomyolysis and acute kidney injury in the injured war fighter. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2015;79(4):S171–4.
93. Holt S, Moore K. Pathogenesis of Renal Failure in Rhabdomyolysis: The Role of Myoglobin. *Nephron Experimental Nephrology*. 2000;8(2):72–6.
94. Homsí E, Janino P, de Faria JBL. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney International*. 2006;69(8):1385–92.
95. Grivei A, Giuliani KTK, Wang X, Ungerer J, Francis L, Hepburn K, et al. Oxidative stress and inflammasome activation in human rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020;160(September):690–5.
96. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Roy R, Bircher JS, et al. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*. 2008;320(5883):1647–51.
97. Chromek M. The role of the antimicrobial peptide cathelicidin in renal diseases. *Pediatric Nephrology*. 2015;30(8):1225–32.
98. Ching C, Schwartz L, Spencer JD, Becknell B. Innate immunity and urinary tract infection. *Pediatric Nephrology*. 2020;35:1183–92.
99. Hill DA, Artis D. Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 2010;28:623–67.
100. Wang G, Narayana JL, Mishra B, Zhang Y, Wang F, Wang C, et al. Design of antimicrobial peptides: Progress made with human cathelicidin LL-37. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1117:215–40.
101. Lai Y, Gallo RL. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*. 2009;30(3):131–41.
102. Koehbach J, Craik DJ. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2019;40(7):517–28.
103. Wang Z, Wang G. APD: The antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(DATABASE ISS.):590–2.
104. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(D1):D1087–93.
105. Lee JY, Boman A, Chuanxin S, Andersson M, Jornvall H, Mutt V, et al. Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(23):9159–62.

106. Bevins CL, Zasloff M. Peptides from frog skin. *Annual Review of Biochemistry*. 1990;59(1):395–414.
107. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*. 1995;13:61–92.
108. Gottler LM, Ramamoorthy A. Structure, Membrane Orientation, Mechanism, and Function of Pexiganan - A Highly Potent Antimicrobial Peptide Designed From Magainin. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(8):1680–6.
109. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:195–9.
110. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Letters*. 1995;368(1):173–6.
111. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1996;238(2):325–32.
112. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(24):15258–63.
113. Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology: Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;110(6):823–31.
114. Mallapragada S, Wadhwa A, Agrawal P. Antimicrobial peptides: The miraculous biological molecules. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2017;21(6):434–8.
115. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002;59(1):156–70.
116. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18129–34.
117. Ouellette AJ. Paneth cells and innate mucosal immunity. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2010;26(6):547–53.
118. Castañeda-Delgado JE, Frausto-Lujan I, González-Curiel I, Montoya-Rosales A, Serrano CJ, Torres-Juarez F, et al. Differences in Cytokine Production during Aging and Its Relationship with Antimicrobial Peptides Production. *Immunological Investigations*. 2017;46(1):48–58.
119. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, et al. Human β -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(5):874–80.

120. Agerberth B, Grunewald J, Castaños-Velez E, Olsson B, Jörnvall H, Wigzell H, et al. Antibacterial Components in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Healthy Individuals and Sarcoidosis Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;160:283–90.
121. Almutairi M, Almutairi B, Almutairi M, Parine NR, Alrefaei A, Alanazi M, et al. Human beta-defensin-1 rs2738047 polymorphism is associated with shisha smoking risk among Saudi population. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;7:1–18.
122. Feng Q, Liu N, Song S, Ma Y. Relationship between b-defensin-1 gene polymorphism and susceptibility and prognosis of acute respiratory distress syndrome. *Medicine*. 2019;98(5):1–7.
123. Ménard S, Förster V, Lotz M, Gütle D, Duerr CU, Gallo RL, et al. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(1):183–93.
124. Chou HC, Chen CM. Cathelicidin attenuates hyperoxia-induced kidney injury in newborn rats. *Renal Failure*. 2019;41(1):733–41.
125. Pan LL, Liang W, Ren Z, Li C, Chen Y, Niu W, et al. Cathelicidin-related antimicrobial peptide protects against ischaemia reperfusion-induced acute kidney injury in mice. *British Journal of Pharmacology*. 2020;177(12):2726–42.
126. Kurosaka K, Chen Q, Yarovinsky F, Oppenheim JJ, Yang D. Mouse Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Chemoattracts Leukocytes Using Formyl Peptide Receptor-Like 1/Mouse Formyl Peptide Receptor-Like 2 as the Receptor and Acts as an Immune Adjuvant. *The Journal of Immunology*. 2005;174(10):6257–65.
127. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*. 2001;414(6862):454–7.
128. Braff MH, Hawkins MA, Nardo A di, Lopez-Garcia B, Howell MD, Wong C, et al. Structure-Function Relationships among Human Cathelicidin Peptides: Dissociation of Antimicrobial Properties from Host Immunostimulatory Activities. *The Journal of Immunology*. 2005;174(7):4271–8.
129. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, et al. Induction of Keratinocyte Migration via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor by the Antimicrobial Peptide LL-37. *The Journal of Immunology*. 2005;175(7):4662–8.
130. Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):3044–52.
131. Tomasinsig L, Pizzirani C, Skerlavaj B, Pellegatti P, Gulinelli S, Tossi A, et al. The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X 7 receptor in a structure-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(45):30471–81.

132. Zhang Z, Cherryholmes G, Chang F, Rose DM, Schraufstatter I, Shively JE. Evidence that Cathelicidin Peptide LL-37 May Act as a Functional Ligand for CXCR2 on Human Neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2009;39(11):3181–94.
133. Scheel O, Papavlassopoulos M, Blunck R, Gebert A, Hartung T, Zähringer U, et al. Cell activation by ligands of the toll-like receptor and interleukin-1 receptor family depends on the function of the large-conductance potassium channel MaxiK in human macrophages. *Infection and Immunity*. 2006;74(7):4354–6.
134. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation*. 2007;14(9):1583–9.
135. Pinheiro da Silva F, Gallo RL, Nizet V. Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling. *Immunology Cell Biology*. 2009;87(6):496–500.
136. Arlehamn CSL, Pétrilli V, Gross O, Tschopp J, Evans TJ. The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(14):10508–18.
137. Schaubert J, Dorschner RA, Yamasaki K, Brouha B, Gallo RL. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology*. 2006;118(4):509–19.
138. Miethke M, Skerra A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expresses antimicrobial activity by interfering with L-norepinephrine-mediated bacterial iron acquisition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(4):1580–9.
139. Pawar RD, Pitashny M, Gindea S, Tieng AT, Levine B, Goilav B, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody-mediated nephritis in mice. *Arthritis and Rheumatism*. 2012;64(5):1620–31.
140. Antonucci E, Lippi G, Ticinesi A, Pigna F, Guida L, Morelli I, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A promising biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury (AKI). *Acta Biomedica*. 2014;85(3):289–94.
141. Moriya H, Mochida Y, Ishioka K, Oka M, Maesato K, Hidaka S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an indicator of interstitial damage and a predictor of kidney function worsening of chronic kidney disease in the early stage: a pilot study. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2017;21(6):1053–9.
142. Cruz DN, Ronco C, Katz N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A promising biomarker for detecting cardiac surgery-associated acute kidney injury. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2010;139(5):1101–6.
143. Ronco C, Cruz D, Noland BW. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Curve and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Extended-Range Assay: A New Biomarker Approach in the Early Diagnosis of Acute Kidney Injury and Cardio-Renal Syndrome. *Seminars in Nephrology*. 2012;32(1):121–8.

144. Yavuz S, Anarat A, Acartürk S, Dalay AC, Kesiktaş E, Yavuz M, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin as an indicator of acute kidney injury and inflammation in burned children. *Burns*. 2014;40(4):648–54.
145. 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):746–55.
146. Ahn JY, Lee MJ, Seo JS, Choi D, Park JB. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictive biomarker for the detection of acute kidney injury in adult poisoning. *Clinical Toxicology*. 2016;54(2):127–33.
147. Tajima S, Yamamoto N, Masuda S. Clinical prospects of biomarkers for the early detection and/or prediction of organ injury associated with pharmacotherapy. *Biochemical Pharmacology*. 2019;170:113664.
148. Guo L, Zhao Y, Yong Z, Zhao W. Evaluation value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for the renal dysfunction of patients with chronic kidney disease: A meta-analysis. *Aging Medicine*. 2018;1(2):185–96.
149. Wang W, Li Z, Chen Y, Wu H, Zhang S, Chen X. Prediction value of serum NGAL in the diagnosis and prognosis of experimental acute and chronic kidney injuries. *Biomolecules*. 2020;10(7):1–14.
150. Kennedy BW. Metabolic caging for animal research. *Lab Animal*. 2012;41(6):171–6.
151. Wilson DR, Thiel G, Arce ML, Oken DE. Glycerol Induced Hemoglobinuric Acute Renal Failure in the Rat. *Nephron*. 1967;4(6):337–55.
152. Wu J, Pan X, Fu H, Zheng Y, Dai Y, Yin Y, et al. Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–11.
153. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*. 1980;29(2):189–201.
154. Ferreira D, de Bragança AC, Volpini RA, Shimizu MHM, Gois PHF, Girardi ACC, et al. Vitamin D deficiency is a potential risk factor for lipid Amphotericin B nephrotoxicity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(7):1–16.
155. de Bragança AC, Volpini RA, Canale D, Gonçalves JG, Heloisa M, Shimizu M, et al. Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats. *Physiological Reports*. 2015;3(3):1–13.
156. Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A. Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2001;12(5):900–8.
157. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237–41.
158. Gersch MS, Johnson RJ. Uric acid and the immune response. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006;21(11):3046–7.

159. Severino P, Ariga SK, Barbeiro HV, de Lima TM, de Paula Silva E, Barbeiro DF, et al. Cathelicidin-deficient mice exhibit increased survival and upregulation of key inflammatory response genes following cecal ligation and puncture. *Journal of Molecular Medicine*. 2017;95(9):995–1003.
160. Boucher E, Brown L, Lahiri P, Cobo ER. Peritoneal macrophages are impaired in cathelicidin-deficient mice systemically challenged with *Escherichia coli*. *Cell and Tissue Research*. 2021;383(3):1203–8.
161. Viedt C, Dechend R, Fei J, Hänsch GM, Kreuzer J, Orth SR. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: Involvement of the transcription factors, nuclear factor- κ B and activating protein-1. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13(6):1534–47.
162. Gyurászová M, Kovalčíková AG, Renczés E, Kmeťová K, Celec P, Bábíčková J, et al. Oxidative Stress in Animal Models of Acute and Chronic Renal Failure. *Disease Markers*. 2019;2019:8690805.
163. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, Amado JA, Cacho PM, Martinez-Taboada VM. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91(5):829–38.
164. Castañeda-Delgado JE, Miranda-Castro NY, González-Amaro R, González-Curiel I, Montoya-Rosales A, Rivas-Calderon B, et al. Production of antimicrobial peptides is preserved in aging. *Clinical Immunology*. 2013;148(2):198–205.
165. Kobayashi T, Nagao K. “Deepening” Insight on Skin Aging and Anti-microbial Immunity. *Cell Metabolism*. 2019;29(3):515–7.

Valores de creatinina sérica, em mg/dL

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	0,45	0,46*	0,27	1,34	0,177	0,121
2	0,12	0,09	1,76	0,61	0,099	0,159
3	0,15	0,13	0,58	1,47	0,078	0,202
4	0,20	0,04	2,57	0,49	0,124	0,152
5	0,07	0,12	1,27	0,28	0,5*	0,108
6	0,03	0,12	1,48	1,135	0,667*	0,154
7	0,066	0,02	0,07	0,871	0,088	0,099
8		0,152	0,303	0,707	0,117	1,31*
9		0,042	1,462	0,238		0,932*
10		0,071	0,576	1,949		0,856*
11		0,084		0,866		

*outliers

Valores de ureia sérica, em mg/dL

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	49,44	47,20	100,57	411,96	144,83	72,72
2	87,82	80,66	417,76	384,16	126,6	87,2
3	74,31	88,39	407,35	611,13	53,34	70,08
4	86,49	98,63	925,68	315,55	43,33	58,87
5	79,29	88,47	522,67	587,44	233,88	93,74
6	64,10	98,90	722,57	729	224,96	64,78
7	77,67	98,31	79,74	455,69	79,92	201,24*
8		94,46	282,09	143,37	114,61	69,41
9		92,53	455,36	267,68		101,89
10		70,5	148,8	429,83		204,09*
11		69,9		404,4		

*outliers

Valores de potássio sérico, em mEq/L

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 seps	KO seps
1	4,40	3,60	4,00	8,40	6	4,7
2	3,90	4,50	9,60	10,40	5,2	3
3	3,80	4,00	4,30	5,80	5,3	4,6
4	5,00	4,40	7,30	4,50	5	3,12
5	4,50	4,30	4,90	4,80	7,2	3,1
6	3,50	4,30	8,20	6,5	5,2	3,4
7	3,6	3,80	3,2	5,3	4,8	3,3
8		4,2	4,2	3,9	3,2	3,3
9		3,2	4,5	3,6		2,7
10		3,5	2,7	6		3,6
11		2,4		3		

Valores de cálcio ionizado sérico, em mg/dL

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 seps	KO seps
1	3,24	1,10	1,05	1,02	1,7	1,87
2	5,56	2,80	2,04	4,28	1,45	2,88
3	3,37	2,59	2,42	2,15	1,88	1,49
4	3,09	2,40	2,02	2,74	1,75	2,57
5	2,62	2,21	1,53	2,43	1,2	2,09
6	2,48	2,53	1,63	1,25	1,98	2,63
7	2,65	2,08	2,76	1,18	2,28	2,6
8		2,56	2,55	3,6	2,55	2,6
9		2,8	1,8	3,2		2,6
10		1,9	2,5	1,2		1,8
11		2,8		2,9		

Valores de fósforo sérico, em mg/dL

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	9,60	10,28	8,80	59,36*	9,28	6,45
2	4,49	4,19	34,28	22,60	6,02	5,98
3	3,02	3,59	4,49	21,01	4,06	6,84
4	7,90	10,40	23,58	6,18	3,85	7,58
5	8,13	10,36	20,34	9,96	6,18	8,55
6	11,13	8,65	32,41	5,72	7,24	7,06
7	6,01	9,91	5,24	6,12	6,07	11,41
8		8,33	6,21	6,65	6,88	13,3*
9		7,52	6,19	7,03		6,03
10		6,31	7,15	12,51		7,18
11		5,22		8,9		

*outliers

Valores de ácido úrico sérico, em mg/dL

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	0,80	0,80	0,40	0,80	1,9	3,7
2	0,60	0,30	0,10	6,40*	3,7	0,5
3	0,50	0,40	0,60	1,70	4,6	2,1
4	0,40	0,20	0,30	0,80	2,4	3,6
5	0,30	0,10	0,30	0,60	6,9	2,8
6	0,20	0,30	1,60*	3,4*	2	4,9
7	0,2	0,10	0,4	0,9	4,3	0,7
8		0,5	0,2	0,4	0,4	3,3
9		0,3	1,9*	0,7		0,8
10		0,6	0,6	1		1,2
11		0,3		0,4		

*outliers

Valores de CPK sérica, em U/L

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	50,40	34,00	41,20	18368,00*	739	67,2
2	14,30	41,90	15637,00*	819,20	147	34,6
3	61,80	53,00	84,50	747,30	70,2	70,63
4	38,50	5,30	2302,90*	70,90	46,2	48,8
5	31,10	48,60	234,80	72,10	1214,2	48,6
6	13,30	37,30	1037,20	790,2	606,6	42,7
7	24	22,40	20	98,3	53,5	40,8
8		30,7	26,8	40,9	38,3	1747,9*
9		25,6	328,9	5,9		21,4
10		419,8*	224,3	5461,1*		40
11		457,4*		353		

*outliers

Valores de proteína tecidual renal, pelo método Bradford

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepse	KO sepse
1	8,95	8,85	9	7,24	9,3	9,04
2	8,95	9,25	9,46	2,84	7,12	7,13
3	7,89	9,36	9,54	7,82	9,12	9,74
4	9,15	9,67	9,42	9,31	7	9,74
5	8,08	9,88	9,87	8,38	9,26	8,8
6	6,53	9,21	9,24	6,67	9,29	9,21
7	8,76	8,7	9,44	7,72	9,5	8,95
8	9,54	6,32	8,37	8,03	8,44	9,49
9		5,89	7,87	9,79	5,74	9,13
10		6,4	8,11	5,97	6,25	7,92
11		7,4	5,24	7,84	7,25	6,08
12					7,84	
13					6,33	

Valores de TNF- α no tecido renal, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	12,88	13,9591	5,152	7,675829	7,113118	11,12489
2	7,24324	9,851027	5,896723	14,40246	9,322191	11,39734
3	6,673638	9,037393	5,049161	6,865985	7,375329	9,683881
4	10,55257	7,609928	5,049469	7,392911	9,166714	9,506571
5	15,59047	8,272874	4,047416	9,923508	6,138013	14,96648
6	12,04885	9,055049	5,765801	7,433733	6,978149	9,10684
7	6,780137	10,30552	4,661123	8,085233	6,916842	11,09598
8	8,518134	13,80269	5,233572	5,577335	8,637678	10,04341
9		13,71681	4,670394	10,50552	12,38362	11,26495
10		15,00906	5,865105	12,05863	13,5344	16,49066
11		10,50608	8,509351	7,878316	13,07807	
12					10,97309	
13					13,40111	

Valores de IL-1- β renal, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	13,5524	10,97356	21,79322	10,83301	42,05387	27,66692
2	4,382123	6,102703	0,8963	19,8007	9,930618	26,59509
3	1,778454	5,776603	9,409853	21,87583	15,98289	26,70524
4	6,70918	6,941468	10,52516	29,85972	24,43843	31,2462
5	8,438119	9,355162	11,98501	12,07339	32,05302	36,69977
6	4,877182	8,222258	0,416775		34,8747	34,3532
7	6,910274	9,443563	9,812818	16,22915	14,02726	24,32369
8	6,702935	10,11804	8,221266	17,78219	80,22666*	30,22961
9			18,89898	18,44157	19,66481	34,07152
10		4,97625	10,53736	15,34523	30,71872	35,55871
11		7,686757	10,19408	20,93852	20,35131	4,576974*
12					22,92781	
13						

*outliers

Valores de IL-6 no tecido renal, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	3,854972	5,403277	2,894	7,059392	22,20366*	3,004535
2	1,94581	2,869405	2,426533	4,838028	6,308287	3,879102
3	2,440811	2,123184	2,018658	4,140921	2,422259	4,017659
4	2,954973	2,207963	3,649363	3,907197	2,277571	4,572587
5	5,996411*	2,849595	3,748936	6,949045	13,31749	6,994886
6	2,516692	2,787731	2,470996	2,298501	38,33477*	3,936048
7	2,030137	3,836667	3,522669	4,533938	2,286421	9,784469*
8	2,406184	4,238924	4,735125	5,232877	20,43424*	4,149842
9		4,56944	6,365438	6,496834	3,290767	3,874699
10		3,992344	2,238224	5,61206	4,62384	6,645581
11		3,218919	2,575382	5,455867	3,763448	3,532072
12					3,322194	
13					5,924645	

*outliers

Valores de IL-10 renal, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	12,61698	28,45831	9,240147	10,08923	7,159462	10,29613
2	**	12,90692	9,292144	7,734507	7,957865	9,793689
3	7,01052	8,886111	1,015704	6,726471	6,359759	13,27094
4	13,81104	5,928749	8,388203	19,68539	**	12,49743
5	22,94926	8,796761	10,95222	**	9,318683	24,33386
6	8,882236	17,0443	4,439068	2,172864	10,99957	5,488599
7	5,455594	**	**	9,128756	10,81979	**
8	15,63512	**	**	2,735492	10,37109	12,45711
9	**	10,6365	**	14,19724	7,224739	9,790581
10	**	10,80969	**	13,61692	19,94128	17,18965
11		15,33959	**	12,95714	18,62055	**
12					4,271301	
13					**	

** dosagens com erro

Valores de NGAL no tecido renal, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	841,4972	1176,716	82429,31	165127,4	67495,29	64008,59
2	1017,743	853,2043	70666,89	416746,8*	106637,7	93395,11
3	1049,229	766,0684	67580,48	158196	70440,96	83034,07
4	1291,977	978,1427	78872,22	84842,66	88032,21	72250,98
5	1126,677	1210,181	82292,89	67111,78	60357,24	86587,82
6	1102,34	1873,005	94707,62	109688,7	59850,49	74062,18
7	929,411	856,0115	65151,66	102075,4	70677,7	36948,45
8	880,2327	1397,392	103427	116783,1	82686,67	74492,8
9		1889,126	107346,3	73837,64	127839,1	79388,72
10		1864,339	65928,14	158230,6	107355,9	97575,76
11		1166,345	112879,8	157792,4	80723,38	128496,3
12					70651,86	
13					16636,57	

*outlier

Valores de β -defensina 1 no tecido renal, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	86,07	103,03	61,92	5,99	86,59	124,83
2	24,82	68,11	1,59	2,07	50,72	160,25
3	19,95	23,64	32,09	4,75	64,36	145,50
4	97,15	17,93	2,55	68,45*	56,18	149,20
5	127,44	32,49	12,31	55,15*	60,07	157,62
6	42,64	39,61	3,16	1,93	61,10	140,57
7	26,63	41,11	48,73	10,01	45,96	71,44
8			7,47		79,21	

*outliers

Valores de β -defensina 3 no tecido renal, ajustado pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	4,44	4,90	4,67	5,60	45,22	42,615
2	4,36	4,18	4,48	14,00*	46,128	41,524
3	4,93	4,30	4,44	5,16	42,857	47,219
4	4,51	4,22	4,29	5,42	46,007	46,734
5	5,59	2,84	4,48	5,33	45,644	44,432
6	6,47	3,19	4,51	6,47	45,402	44,372
7	5,04	3,33	4,52	5,24	45,099	55,034
8			4,97		47,885	

*outlier

Valores de β -defensina 1 pulmonar, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	0,50	0,55	0,75	0,72	18,20	4,91
2	0,42	0,46	0,50	0,80	6,51	7,33
3	0,48	0,52	0,55	0,71	9,93	8,25
4	0,48	0,45	0,51	0,56	6,34	3,17
5	0,54	0,75	0,56	0,76	10,55	8,70
6	0,46	1,05	0,81	0,36	12,24	9,58
7	0,62	1,41	0,75	0,70	5,46	14,69
8			0,64		16,93	

Valores de β -defensina 3 pulmonar, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	5,59	5,72	7,38	6,38	55,276	5,46
2	5,95	5,48	5,29	8,04	52,611	7,13
3	6,54	8,39	4,64	5,53	40,01	6,98
4	6,27	6,14	5,09	5,11	50,066	6,26
5	4,52	5,34	6,31	4,81	47,219	6,98
6	6,59	5,57	7,56	5,41	44,432	7,02
7	6,07	6,55	7,14	5,01	37,829	7,56
8			6,00		54,428	

Valores de α -defensina 5 ileal, ajustados pela proteína total, pelo método ELISA

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsse	KO sepsse
1	47,11	32,44	37,81	5,09	61,09	43,38
2	31,04	40,61	4,95	27,46	73,38	88,87
3	26,81	47,63	33,71	40,65	98,58	44,42
4	32,66	62,26	40,11	54,06	107,57	62,73
5	20,37	38,46	55,26	55,21	97,31	91,80
6	39,76	33,59	12,11	71,41	176,73	31,97
7	37,56	33,04	69,15	37,32	155,99	49,88
8	33,26	56,43	88,39	48,38	109,04	57,15
9		85,46	45,70	53,65	53,67	61,56
10		60,66	48,02	48,59	57,93	80,58
11		36,02	31,13	44,17	78,38	74,33
12					70,11	
13					99,27	

Valores de IL-1- β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α séricos, pelo método Milliplex®

		IL-1- β	IL-6	IL-10	MCP-1	TNF- α
C57 controle	1	1,04	0,21	0,58	0,38	0,17
	2	1,11	0,15	0,5	2,12	0,62
	3	1,06	0,81	1,07	6,97	0,49
	4	0,96	0,37	0,68	17,91	1,97
	5	0,78	0,37	0,36	1,53	0,58
	6	0,96	0,09	0,68	17,13	0,84
	7	1,2	0,42	1,92	21,19	1,89
	8	0,87	0,32	1,13	22,04	2,64
KO controle	1	1,2	0,75	2,31	29,92	4,89
	2	1,11	0,77	4,07	15,62	4,04
	3	1,01	0,73	1,74	15,62	2,02
	4	1,06	0,32	0,58	18,71	2,47
	5	1,06	5,8*	0,78	68,23	2,17
	6	0,96	10,71*	0,68	84,48	3,03
	7	0,87	0,6	1,42	72,42	4,89
	8	0,92	0,12	2,31	65,19	5,81
	9	1,06	0,66	0,88	22,04	3,27
	10	1,01	0,6	1	21,19	2,72
	11	1,25	0,24	0,78	23,8	2,47
C57 rabdo	1	1,01	52,33	0,52	121	0,26
	2	1,16	29,25	26,47*	38,86	8,94
	3	0,96	53,13	1,74	22,04	0,58
	4	1,01	65,87	6,35	68,65	6,22
	5	1,06	126	2,01	61,13	3,27
	6	0,92	59,82	0,58	42,26	2,58
	7	0,96	103	2,31	42,26	3,15
	8	0,96	120	12,98*	64,74	7,86
	9	1,16	39,33	1,92	29,43	0,97
	10	1,6*	88,77	1,66	32,44	2,58
KO rabdo	1	1,25	318	71,45	111	13,8
	2	1,18	99,98	4,07	53,21	2,89
	3	1,25	103	23,15	79,38	6,6
	4	1,11	125	1,27	44,6	2,17
	5	0,96	54,43	0,78	44,6	0,78
	6	1,93*	13,77	23,89	91,57	9,19
	7	0,96	125	5,64	74,45	3,33
	8	1,08	26,41	0,83	75,65	6,69
	9	1,37	63,56	1,2	24,7	2
	10	1,06	58,74	142*	132	11,52
	11	1,06	158	24,5	76,05	4,31
C57 sepsse	1	199*	4928	6363	10056*	127
	2	7,28	2729	4042	3405	74,27
	3	1,84	526	766	597	15,11
	4	1,25	152	130	401	8,92

		IL-1- β	IL-6	IL-10	MCP-1	TNF- α
	5	90,67*	5069	6202	2319	149
	6	2,71	1527	2503	1640	22,23
	7	4,02	4741	3142	6305*	81,49
	8	1,25	215	26,21	398	5,98
	9	0,96	157	19,87	488	3,64
	10	1,06	331	258	463	5,19
	11	1,25	198	70,83	1601	8,05
	12	1,06	7,73	0,36	9,19	0,2
KO sepsse	1	1,65	356	22,65	569	10,17
	2	1,3	398	1604*	725	21,72
	3	1,35	420	127	538	14,72
	4	1,25	587	21,81	392	8,72
	5	1,5	923	447	315	16,23
	6	1,16	410	409	738	13,56
	7	3,02*	4783*	4626*	1792*	37,81*
	8	1,35	183	247	367	10,94
	9	1,25	418	309	379	10,03
	10	1,45	334	384	1830*	8,72
	11	1,65	436	4535*	748	37,51*

*outliers

Escore de lesão tubular

	C57 controle	KO controle	C57 rabdo	KO rabdo	C57 sepsc	KO sepsc
1	1,35	1,52	2,35	2,93	0,8	0,52
2	0,82	1,13	2,55	2,33	1,14	0,8
3	0,73	1,29	2,12	3,05	0,95	0,73
4	1,28	0,6	1,67	2,64	0,83	0,7
5	1,04	0,73	2,23	3,2	0,5	1,1
6	0,73	0,38	2,56	2,33	0,4	0,9
7	0,56	1,13	2,3	3,12	1,09	0,89
8		1,47	2,61	2,8	0,95	1,25