Rafael Oliveira Ximenes

Biomarcador urinário NGAL em pacientes com cirrose: acurácia diagnóstica para prever desenvolvimento ou progressão da lesão renal aguda e resposta ao tratamento da síndrome hepatorenal

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias

São Paulo

2017

Rafael Oliveira Ximenes

Biomarcador urinário NGAL em pacientes com cirrose: acurácia diagnóstica para prever desenvolvimento ou progressão da lesão renal aguda e resposta ao tratamento da síndrome hepatorenal

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ximenes, Rafael Oliveira

Biomarcador urinário NGAL em pacientes com cirrose : acurácia diagnóstica para prever desenvolvimento ou progressão da lesão renal aguda e resposta ao tratamento da síndrome hepatorenal / Rafael Oliveira Ximenes. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Alberto Queiroz Farias.

Descritores: 1.Cirrose 2.Ascite 3.Lesão renal aguda 4.Infecções bacterianas
5.Síndrome hepatorenal 6.Proteína de lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos humanos

USP/FM/DBD-015/17

Dedicatória

Dedico esta tese à minha esposa, Flávia, por todo o apoio recebido durante a longa jornada que foi este projeto de pesquisa. Agradeço por sempre compreender meus períodos de ausência e os momentos em que precisei concentrar toda a minha atenção no doutorado.

Ao meu pai, Prof. Me. José Ximenes, por ter sido meu primeiro exemplo de médico e de professor. Apesar de nunca ter me pedido para seguir sua carreira, seu comprometimento com os pacientes, o hospital e a universidade foram para mim grandes motivações.

À minha mãe, Margareth, pelo carinho dispensado desde sempre. Agradeço pela educação e pelo exemplo de alegria, caráter e dedicação à família. Sua presença e incentivo foram essenciais para esta e tantas outras conquistas.

Por fim, dedico esta tese ao meu filho, Davi, cujo nascimento previsto para as próximas semanas irá tornar este momento ainda mais completo e inesquecível.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a alegria de concluir com êxito uma etapa tão desafiadora da minha vida acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Farias, por ter acreditado neste projeto desde o momento em que ele era apenas a ideia de mais um de seus residentes. Ao longo destes anos, minha ideia original foi aprimorada por seu conhecimento e experiência, tomando dimensões maiores do que eu esperava. Porém, mais importante do que as conquistas e premiações que contemplaram nosso projeto, foram o aprendizado recebido, que foi muito além da Hepatologia, e o laço de amizade que construímos.

À Prof. Dra. Guadalupe Garcia-Tsao, da Universidade Yale, pelas sugestões transmitidas durante a sua estadia em São Paulo como professora visitante da USP. Agradeço pela dedicação e disponibilidade em ajudar na continuidade deste projeto e por ter aberto as portas para me receber no pós-doutorado em Yale.

Aos participantes do projeto, professores e médicos do Hospital das Clínicas Flair José Carrilho, Luiz Augusto Carneiro d'Albuquerque, Claudia Helou, Heraldo Possolo, Denise Barbeiro, Daniel Mazo, Herlon Martins, Rodrigo Brandão e Roger Daglius e das demais instituições participantes do projeto Liliana Mendes, Mariana Gouveia, Mário Reis, Ana Martinelli, Fernanda Fernandes e Roberta Araújo, pelo empenho e dedicação ao projeto.

Às enfermeiras Danusa Ramos e Patrícia Momoyo e técnicas de enfermagem Eliane Carvalho e Beatriz Migita que me ajudaram em todas as etapas do trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização do projeto.

Por fim, agradeço a todos os pacientes que participaram deste estudo. É por eles e por todos aqueles que enfrentam as dificuldades de conviver e tentar superar as graves complicações da cirrose que este projeto foi desenvolvido e executado. E sem a confiança deles, não teríamos conseguido chegar até aqui.

“Ciência é conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada”.

(Immanuel Kant)

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lesão renal aguda no paciente com cirrose.....	2
1.2 Alterações hemodinâmicas no paciente com cirrose e sua relação com LRA.....	2
1.3 Diagnóstico da LRA em cirrose – do conceito tradicional às novas classificações.....	4
1.4 Creatinina como marcador de LRA e suas limitações.....	8
1.5 Progressão da LRA e sua importância prognóstica.....	9
1.6 Síndrome hepatorenal, seus diagnósticos diferenciais e tratamento.....	10
1.7 Biomarcadores de LRA.....	14
1.8 <i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i> (NGAL) em cirrose.....	14
Racional e hipóteses do estudo.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	23
3.1 Pacientes.....	24
3.2 Métodos.....	25
3.2.1 Desenho do estudo.....	25

3.2.2 Braço 1- Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.....	26
3.2.3 Braço 2 - Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR.....	27
3.2.4 Avaliações.....	27
3.2.5 Coleta e processamento de amostras.....	29
3.2.6 Seguimento.....	30
3.3 Cálculo amostral.....	30
3.4 Análise estatística.....	31
3.5 Aspecto éticos.....	31
3.6 Período e locais do estudo.....	32
3.7 Financiamento.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Braço 1- Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.....	34
4.2 Braço 2 - Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR.....	42
4.3 Análise de sobrevida.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1 Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.....	51
5.2 Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR.....	52
5.3 Análise de sobrevida.....	55

5.4 Direções futuras.....	57
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

Lista de abreviaturas e siglas

AKIN	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
Cr	Creatinina
FENa	Fração de excreção de sódio
FEUr	Fração de excreção de ureia
ICA-AKI	<i>International Club of Ascites – Acute Kidney Injury</i>
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
LRA	Lesão renal aguda
MELD	<i>Model of End- stage Liver Disease</i>
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NTA	Necrose tubular aguda
RIFLE	<i>Risk Injury Failure Loss of kidney function and End-Stage kidney disease</i>
RVN	Razão de verossimilhança negativa
RVP	Razão de verossimilhança positiva
Se	Sensibilidade
SHR	Síndrome hepatorenal
Sp	Especificidade
TFG	Taxa de filtração glomerular
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

Lista de figuras

Figura 1. Relação entre TFG (depuração de inulina) e creatinina sérica em pacientes com cirrose e ascite.....	8
Figura 2. Fluxograma de tratamento da LRA na cirrose de acordo com o novo consenso internacional (ICA-AKI).....	12
Figura 3. Valores individuais de NGAL urinário nas diferentes causas de LRA na cirrose.....	16
Figura 4. Evolução temporal dos níveis de creatinina sérica e NGAL urinário em pacientes com cirrose e infecção bacteriana que desenvolveram LRA.....	17
Figura 5. Fluxograma de inclusões e exclusões.....	34
Figura 6. Etiologia da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.....	35
Figura 7. Fluxograma dos pacientes avaliados para inclusão no estudo de desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.....	38
Figura 8. Comparação dos valores de NGAL urinário entre os pacientes com desenvolvimento ou progressão da LRA e aqueles sem desenvolvimento ou progressão.....	39
Figura 9. Comparação dos valores das demais variáveis entre os pacientes com desenvolvimento ou progressão da LRA e aqueles sem desenvolvimento ou progressão.....	40
Figura 10. Comparação dos valores de NGAL urinário entre os pacientes com progressão da LRA e aqueles sem progressão.....	41
Figura 11. Valores de NGAL urinário entre os pacientes com SHR que responderam ou não ao tratamento com albumina e terlipressina.....	45
Figura 12. Valores das demais variáveis associadas à resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina.....	45
Figura 13. Fluxograma para determinação da probabilidade de resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina combinando MELD e NGAL urinário.....	47

Lista de tabelas

Tabela 1. Critérios de LRA na população geral e em pacientes com cirrose.....	5
Tabela 2. Mortalidade de pacientes com cirrose e LRA conforme evolução ao longo da internação.....	10
Tabela 3. Critérios diagnósticos da SHR (<i>International Club of Ascites</i>).....	12
Tabela 4. NGAL urinário em pacientes com cirrose e LRA de diferentes etiologias.....	15
Tabela 5. Dados clínicos basais dos pacientes com cirrose e infecção bacteriana.....	36
Tabela 6. Exames laboratoriais basais dos pacientes com cirrose e infecção bacteriana.....	37
Tabela 7. Variáveis associadas a desenvolvimento ou progressão da LRA.....	38
Tabela 8. Análise de curva ROC das variáveis associadas à progressão da LRA.....	42
Tabela 9. Dados clínicos basais dos pacientes com diagnóstico de SHR.....	43
Tabela 10. Exames laboratoriais basais dos pacientes com diagnóstico de SHR.....	44
Tabela 11. Análise de curva ROC das variáveis associadas à resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina.....	46
Tabela 12. Mortalidade intra-hospitalar, em 30 dias e 90 dias conforme o conceito tradicional de LRA em cirrose e a classificação ICA-AKI.....	48
Tabela 13. Mortalidade intra-hospitalar nos pacientes com LRA conforme estágio da classificação ICA-AKI, progressão e NGAL urinário.....	49

RESUMO

Ximenes RO. Biomarcador urinário NGAL em pacientes com cirrose: acurácia diagnóstica para prever desenvolvimento ou progressão da lesão renal aguda e resposta ao tratamento da síndrome hepatorenal [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Lesão renal aguda (LRA) é uma complicação comum da cirrose frequentemente desencadeada por infecções bacterianas. A mortalidade de pacientes com cirrose e LRA varia de 10 a 100% a depender do estágio da cirrose, etiologia e progressão da LRA e tratamento recebido. Pacientes com LRA que progride possuem mortalidade intra-hospitalar consideravelmente maior do que aqueles que não progridem. Os critérios diagnósticos da LRA baseiam-se na creatinina sérica. Porém, esse biomarcador tem acurácia diagnóstica limitada, já que demora até 48 horas para se alterar e não distingue a etiologia da LRA. Essa última limitação é particularmente importante em pacientes com suspeita de síndrome hepatorenal (SHR), já que o seu tratamento envolve o uso de medicações de alto custo (albumina e terlipressina) e eficácia limitada. O NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) é um biomarcador de necrose dos túbulos renais e sua dosagem tem sido proposta como marcador diagnóstico mais acurado da LRA na cirrose, pois se altera mais precocemente e seus níveis urinários variam conforme a etiologia e gravidade da LRA. **OBJETIVOS:** Os objetivos primários do trabalho foram avaliar a acurácia do NGAL urinário para prever: a) desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana; b) resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico estabelecido de SHR. Os objetivos secundários foram: a) acurácia de marcadores de disfunção hemodinâmica em cirrose (atividade plasmática de renina e noradrenalina sérica) na predição do desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana; b) acurácia de marcadores de função hepática, parâmetros hemodinâmicos, marcadores inflamatórios e testes laboratoriais de lesão renal tradicionalmente utilizados na prática clínica na predição do desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana; c) acurácia de marcadores de disfunção hemodinâmica em cirrose (atividade plasmática de renina e noradrenalina sérica) na predição de resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico estabelecido de SHR; d) acurácia de marcadores de função hepática, parâmetros hemodinâmicos, marcadores inflamatórios e testes laboratoriais de lesão renal tradicionalmente utilizados na prática clínica na predição de resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico estabelecido de SHR; e) comparar o conceito tradicional de LRA em cirrose com a nova classificação ICA-AKI para prever mortalidade intra-hospitalar, em 30 e 90 dias em pacientes com cirrose e infecção bacteriana; f) acurácia do NGAL para prever mortalidade intra-hospitalar em pacientes com cirrose e infecção bacteriana. **PACIENTES E MÉTODOS:** Critérios de inclusão: a) cirrose; b) ascite e/ou hidrotórax hepático; c) idade maior que 18 anos; d) concordância em participar no estudo; e) LRA e/ou infecção bacteriana. Critérios de exclusão: a) comorbidades graves; b) choque; c) nefropatia intrínseca; d) uso de drogas nefrotóxicas; e) diálise prévia; f) transplante hepático. Foram coletadas amostras de urina para dosagem de NGAL e sangue para dosagem de atividade plasmática de renina e noradrenalina sérica no momento da inclusão do paciente no

estudo. Os pacientes com SHR receberam o tratamento padrão atual com albumina e terlipressina. **RESULTADOS:** Foram incluídos 199 pacientes: 179 com infecção bacteriana para avaliação de desenvolvimento ou progressão da LRA e 58 com SHR para avaliação da resposta ao tratamento (38 pacientes foram avaliados nas duas partes do estudo). O NGAL urinário apresentou associação com a progressão da LRA (AUC: 0,67; $p=0,002$), mas não com o seu desenvolvimento ($p=0,973$). Outras variáveis associadas à progressão da LRA foram INR ($p=0,033$), MELD ($p=0,012$), FEUr ($p=0,026$) e relação proteinúria/creatinina urinária ($p=0,023$). Houve associação entre NGAL urinário e a resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com SHR (AUC: 0,70; $p=0,007$). Outras variáveis associadas à resposta ao tratamento da SHR foram INR ($p=0,028$), MELD ($p=0,004$) e relação proteinúria/creatinina urinária ($p=0,003$). Combinando o MELD com o NGAL urinário foi possível identificar subgrupos de pacientes com taxas de resposta ao tratamento com albumina e terlipressina distintas (9,1% x 48,1% x 80,0%, $p<0,001$). Tanto o conceito tradicional de LRA na cirrose quanto a classificação ICA-AKI foram capazes de prever mortalidade intra-hospitalar, em 30 e 90 dias ($p<0,05$). O NGAL urinário também foi capaz de prever mortalidade intra-hospitalar (AUC: 0,71; $p<0,001$). **CONCLUSÕES:** a) NGAL urinário aumentado foi associado à progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana; b) atividade plasmática de renina e noradrenalina sérica não se correlacionaram ao desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana; c) NGAL urinário foi preditor de resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com SHR; d) atividade plasmática de renina e noradrenalina sérica não se correlacionaram à resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com SHR; e) tanto o conceito tradicional de LRA em cirrose quanto a classificação ICA-AKI mostraram-se adequados para prever mortalidade intra-hospitalar, em 30 e 90 dias em pacientes com cirrose e infecção bacteriana; f) NGAL urinário aumentado foi associado à maior mortalidade intra-hospitalar em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.

Descritores: cirrose; ascite; lesão renal aguda; infecções bacterianas; síndrome hepatorenal; proteína de lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos humanos.

ABSTRACT

Ximenes RO. Urinary biomarker NGAL in patients with cirrhosis: diagnostic accuracy to predict acute kidney injury development or progression and response to therapy of hepatorenal syndrome [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION: Acute kidney injury (AKI) is a frequent complication of cirrhosis, and is often triggered by bacterial infection. The mortality of patients with cirrhosis and AKI varies from 10 to 100%, depending on the stage of cirrhosis, etiology and progression of AKI, and treatment. Patients with AKI that progresses have a higher in-hospital mortality than those with AKI that does not progress. AKI diagnostic criteria are based on serum creatinine. However, this biomarker has limited diagnostic accuracy, taking up to 48 hours to rise, and does not distinguish the etiology of AKI. This latter limitation is particularly important in patients with suspected hepatorenal syndrome (HRS), because treatment involves high cost medication (albumin and terlipressin) with limited efficacy. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) is a biomarker of renal tubular necrosis which has been proposed as a more accurate AKI biomarker in cirrhosis because it rises earlier than creatinine and its urinary levels vary according to the etiology of AKI. **OBJECTIVES:** The primary endpoints were the establishment of the accuracy of urinary NGAL to predict: a) development or progression of AKI in patients with cirrhosis and bacterial infection; b) response to treatment with albumin and terlipressin in patients with diagnosed HRS. The secondary endpoints were: a) accuracy of biomarkers of hemodynamic dysfunction in cirrhosis (renin plasma activity and serum noradrenaline) to predict AKI development or progression in patients with cirrhosis and bacterial infection; b) accuracy of biomarkers of hepatic function, hemodynamics, inflammation and kidney injury routinely used in clinical practice to predict AKI development or progression in patients with cirrhosis and bacterial infection; c) accuracy of biomarkers of hemodynamic dysfunction in cirrhosis (renin plasma activity and serum noradrenaline) to predict response to treatment with albumin and terlipressin in patients with diagnosis of HRS; d) accuracy of biomarkers of hepatic function, hemodynamics, inflammation and kidney injury routinely used in clinical practice to predict response to treatment with albumin and terlipressin in patients with diagnosis of HRS; e) compare the traditional definition of AKI in cirrhosis with the new classification ICA-AKI to predict in-hospital, 30-day and 90-day mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection. f) accuracy of urinary NGAL in predicting in-hospital mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection. **PATIENTS AND METHODS:** Inclusion criteria: a) diagnosis of cirrhosis; b) presence of ascites and/or hepatic hydrothorax; c) age over 18 years old; d) consent to participate in the study; e) AKI and/or bacterial infection. Exclusion criteria: a) severe systemic comorbidities; b) shock; c) intrinsic nephropathy; d) nephrotoxic drug use; e) previous dialysis; f) liver transplantation recipient. Urine and blood samples were collected for urinary NGAL and renin plasma activity and serum noradrenaline measurement at the inclusion. Patients with HRS received standard treatment with albumin and terlipressin. **RESULTS:** 199 patients were included: 179 with bacterial infection for the analysis of AKI development or progression and 58 with HRS for the analysis of response to treatment (38 patients were analyzed in both parts of the study). Urinary NGAL was associated with AKI progression (AUC: 0.67, $p=0.002$), but not with AKI

development ($p=0.973$). Other variables associated with AKI progression were INR ($p=0.003$), MELD ($p=0.012$), FEUr ($p=0.026$) and proteinuria/urinary creatinine ratio ($p=0.023$). There was also an association of urinary NGAL with response to HRS treatment with albumin and terlipressin (AUC: 0.70, $p=0.007$). Other variables associated with response to HRS treatment were INR ($p=0.028$), MELD ($p=0.004$) and proteinuria/urinary creatinine ratio ($p=0.003$). Combining MELD and urinary NGAL we could identify subgroups of patients with distinct response rates to treatment with albumin and terlipressin (9.1% x 48.1% x 80.0%, $p<0.001$). Both the traditional definition of AKI in cirrhosis and the classification ICA-AKI predicted in-hospital, 30-day and 90-day mortality ($p<0.05$). Urinary NGAL was also associated with in-hospital mortality (AUC: 0.71, $p<0.001$). **CONCLUSIONS:** a) High urinary levels of NGAL were associated with AKI progression in patients with cirrhosis and bacterial infection; b) renin plasma activity and serum noradrenaline were not associated with AKI development or progression in patients with cirrhosis and bacterial infection; c) urinary NGAL was associated with response to combined treatment with albumin and terlipressin in patients with HRS; d) renin plasma activity and serum noradrenaline were not associated with response to combined treatment with albumin and terlipressin in patients with HRS; e) both traditional definition of AKI in cirrhosis and ICA-AKI classification were able to predict in-hospital, 30-day and 90-day mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection; f) high urinary levels of NGAL were associated with in-hospital mortality in patients with cirrhosis and bacterial infection.

Descriptors: cirrhosis; ascites; acute kidney injury; bacterial infections; hepatorenal syndrome; neutrophil gelatinase-associated lipocalin protein, human.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão renal aguda no paciente com cirrose

Lesão renal aguda (LRA) é uma complicação comum da cirrose, com incidência de até 20% em paciente hospitalizados.(1) Várias causas identificáveis contribuem para essa alta incidência, incluindo o uso de drogas nefrotóxicas, infecções bacterianas, hemorragia digestiva alta, hipotensão arterial e desidratação por uso de diuréticos.(2)

Em pacientes com cirrose e infecção bacteriana, a incidência de LRA é de cerca de 33% durante a internação hospitalar, podendo ser ainda maior a depender da presença de ascite e do sítio da infecção.(3) Pacientes com cirrose e ascite apresentam risco quatro vezes maior de desenvolver LRA durante infecções bacterianas quando comparados a pacientes com cirrose sem ascite. Além disso, aqueles com peritonite bacteriana espontânea, infecções gastrintestinais ou biliares apresentam maior risco da LRA quando comparados a pacientes com infecções de outros sítios.

A presença de LRA é um fator de mau prognóstico, conferindo mortalidade de 10 a 100% a depender de fatores como o estágio da cirrose, etiologia da LRA, evolução da LRA e do tratamento recebido.(2, 4, 5) De fato, pacientes com cirrose, infecção bacteriana e LRA irreversível apresentam mortalidade de 100% em 90 dias. Ademais, pacientes com LRA e *Model of End-stage Liver Disease* (MELD) score maior do que 20 apresentam mortalidade em 90 dias de 70%, comparada a 10% de mortalidade em pacientes em que o MELD score é menor que 20.(5)

O prognóstico dos pacientes com cirrose e LRA é diferente conforme a sua etiologia. A sobrevida em 90 dias é de 73% em pacientes com nefropatia parenquimatosa, 46% na insuficiência renal pré-renal, 31% na LRA associada a infecção e de apenas 15% na síndrome hepatorenal (SHR).(2)

1.2 Alterações hemodinâmicas no paciente com cirrose e sua relação com LRA

Alterações cardiovasculares associadas à cirrose são descritas na literatura médica há quase 60 anos, quando se observou que pacientes com cirrose alcoólica apresentavam débito cardíaco aumentado, resistência vascular sistêmica diminuída e redução do gradiente arteriovenoso de oxigênio.(6)

A hipótese de que o aumento do débito cardíaco fosse secundário à diminuição da resistência vascular sistêmica confirmou-se em trabalhos subsequentes, que destacaram ainda a importância dessa alteração na retenção de sódio e água e na evolução para ascite e SHR.(7, 8)

O aparecimento da ascite marca a fase de transição da cirrose compensada para descompensada e traz consigo mau prognóstico, com uma mortalidade em torno de 20% em um ano.(9) A formação da ascite envolve retenção de sódio e água, justificada por ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e sistema nervoso simpático, em resposta à vasodilatação esplâncnica e à disfunção circulatória.(10) Ocorre liberação de noradrenalina, que produz vasoconstrição renal e hepática. Como consequências clínicas, agravam-se a hipertensão portal e a disfunção renal, respectivamente.(11)

Com progressiva deterioração cardiocirculatória, surgem quadros de ascite refratária e SHR.(10, 12) Comparando-se pacientes com e sem ascite, os primeiros apresentam maior disfunção cardíaca,(13) que demonstra associação cada vez mais evidente na literatura com prognóstico desfavorável.(14, 15)

Modelos experimentais em ratos e estudos em pacientes com cirrose permitiram a determinação das alterações fisiológicas e bioquímicas com consequências na função cardiocirculatória que ocorrem nesses pacientes. A queda da resistência vascular sistêmica secundária à vasodilatação arterial mediada pelo óxido nítrico leva a um estado de hipovolemia efetiva. A hipovolemia, por sua vez, ativa sistemas vasoconstritores como o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona que levariam a aumento da frequência cardíaca e da absorção renal de sódio e água na tentativa de restaurar a volemia.(11, 16) Apesar da ativação dos sistemas neuro-humorais, o paciente com cirrose apresenta hiporreatividade vascular à noradrenalina e à angiotensina-II, provavelmente relacionada aos níveis aumentados de óxido nítrico circulante.(17) Acrescente-se que esse mediador apresenta ainda efeito direto na diminuição da contratilidade cardíaca e no estímulo para hipertrofia miocárdica.(18)

De maneira análoga ao que ocorre nos vasos sanguíneos, o paciente com cirrose apresenta uma hiporresponsividade cardíaca a estímulos adrenérgicos. Tal fato é justificado pela diminuição na expressão de receptores beta-adrenérgicos(19) e pela

menor resposta dos mesmos a agentes beta-agonistas. Fatores implicados incluem alteração de fluidez da membrana plasmática ocasionada pelo aumento da relação colesterol:fosfolípides(20) e maior expressão de proteína G inibitória e de fosfodiesterase, levando a uma menor concentração intracelular de AMPc.(21)

Há controvérsias quanto às alterações de função sistólica e diastólica em pacientes com cirrose em repouso. De qualquer forma, o estresse tem sido implicado no desencadeamento de quadros de congestão pulmonar na cirrose. O estresse pode ser farmacológico, cirúrgico ou ocasionado pelo aumento do volume telediastólico do ventrículo direito quando se insere shunt portossistêmico intra-hepático transjugular.(22) Durante o ecocardiograma com estresse farmacológico, alguns pacientes com cirrose apresentam resposta ventricular esquerda abaixo da esperada com a infusão de dobutamina, característica denominada cardiomiopatia cirrótica.(23) Porém, em pacientes mais graves, as alterações cardíacas podem ser evidentes mesmo na ausência de estresse.(24)

1.3 Diagnóstico da LRA em cirrose – do conceito tradicional às novas classificações

Por ser uma complicação com incidência considerável e com prognóstico ruim, há grande interesse em melhorar a acurácia diagnóstica da LRA na cirrose. Tal interesse tem levado a intensas discussões e mudanças de conceitos nos últimos anos.

Tradicionalmente, o diagnóstico da LRA em pacientes com cirrose tem sido feito quando há uma elevação de creatinina sérica para valores acima de 1,5mg/dL, às vezes associado a uma elevação de pelo menos 50% da creatinina basal.(3, 4) Nos últimos anos, surgiram novas classificações de LRA desenvolvidas por grupos internacionais de Nefrologia, como o *Risk Injury Failure Loss of kidney function and End-Stage kidney disease* (RIFLE), *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) e a mais recente, *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO).(25-27) Talvez os maiores avanços de tais classificações tenham sido reconhecer que pequenas variações da creatinina sérica têm importância no prognóstico e estadiar a LRA de acordo com a sua gravidade, conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Critérios de LRA na população geral e em pacientes com cirrose

	RIFLE (25)	AKIN (26)	KDIGO (27)	Critérios convencionais em cirrose (3, 4)
Critérios diagnósticos	Aumento de Cr $\geq 1,5$ vezes o basal em até 7 dias OU queda da TFG $>25\%$ OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 6h	Aumento de Cr $\geq 0,3$ mg/dL em 48h OU Aumento de Cr $\geq 1,5$ vezes o basal em 48h OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 6h	Aumento de Cr $\geq 0,3$ mg/dL em 48h OU Aumento de Cr $\geq 1,5$ vezes o basal, conhecida ou presumivelmente ocorrido nos últimos 7 dias OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 6h	Aumento percentual de Cr $\geq 50\%$ para um valor final de Cr $>1,5$ mg/dL
Estadiamento	<p>Risk:</p> <p>Aumento de Cr 1,5-1,9 vezes o basal OU Queda da TFG 25-50%; OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 6h</p> <p>Injury:</p> <p>Aumento de Cr 2,0-2,9 vezes o basal OU Queda da TFG 50-75%; OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 12h</p> <p>Failure:</p> <p>Aumento de Cr $\geq 3,0$ vezes o basal OU Queda da TFG $>75\%$ OU Cr $\geq 4,0$ mg/dL com aumento agudo $\geq 0,5$ mg/dL OU Volume urinário $<0,3$ mL/kg/h por ≥ 24h OU Anúria por ≥ 12h</p>	<p>Estádio 1:</p> <p>Aumento de Cr 1,5-1,9 vezes o basal OU Aumento de Cr $\geq 0,3$ mg/dl OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 6h</p> <p>Estádio 2:</p> <p>Aumento de Cr 2,0-2,9 vezes o basal OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 12h</p> <p>Estádio 3:</p> <p>Aumento de Cr $\geq 3,0$ vezes o basal OU Cr $\geq 4,0$ mg/dL com aumento agudo $\geq 0,5$ mg/dL OU Volume urinário $<0,3$ mL/kg/h por ≥ 24h OU Anúria por ≥ 12h</p>	<p>Estádio 1:</p> <p>Aumento de Cr 1,5-1,9 vezes o basal OU Aumento de Cr $\geq 0,3$ mg/dl OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 6h</p> <p>Estádio 2:</p> <p>Aumento de Cr 2,0-2,9 vezes o basal OU Volume urinário $<0,5$ mL/kg/h por 12h</p> <p>Estádio 3:</p> <p>Aumento de Cr $\geq 3,0$ vezes o basal OU Cr $\geq 4,0$ mg/dL OU Início de terapia de substituição renal OU Volume urinário $<0,3$ mL/kg/h por ≥ 24h OU Anúria por ≥ 12h</p>	

Cr: creatinina sérica; TFG: taxa de filtração glomerular

Essas novas classificações de LRA foram posteriormente validadas em pacientes com cirrose em diferentes cenários. Cholongitas *et al.* (2009) avaliaram uma coorte de 412 pacientes com cirrose admitidos em unidade de terapia intensiva e os classificaram de acordo com o escore RIFLE.(28) Aqueles que não preenchiam critérios de LRA tiveram uma mortalidade hospitalar de 42,5%, comparada a 71% daqueles classificados como *Risk* e 88% dos classificados como *Injury/Failure* ($p < 0,05$). A classificação RIFLE teve uma sensibilidade de 90% para prever mortalidade intra-hospitalar, com especificidade de 44% e área sob a curva ROC de 0,70.

Belcher *et al.* (2013) estudaram 188 pacientes com cirrose internados com diagnóstico da LRA de acordo com os critérios de AKIN, ou que desenvolveram LRA durante a internação, incluindo pacientes em unidade de terapia intensiva e enfermarias.(29) Foi observada mortalidade crescente entre os estádios 1 a 3 de AKIN, especialmente naqueles que progrediram de estágio durante a internação, indo de uma mortalidade de 2% naqueles com estágio 1 até 71% naqueles com estágio 3 que precisaram de diálise.

Tsien *et al.* (2012) avaliaram ambulatorialmente 90 pacientes com cirrose, creatinina sérica basal menor que 1,25mg/dL e sem evidência de doença renal estrutural.(30) Tais pacientes foram acompanhados por um tempo mediano de 14 meses com repetição da dosagem de creatinina sérica a cada 4 a 6 semanas. LRA foi definida como uma elevação de creatinina sérica $> 0,3\text{mg/dL}$ ou $> 50\%$ do basal e ocorreu 82 vezes em 49 (54%) pacientes durante o acompanhamento. Apesar de a média do pico de creatinina sérica ter permanecido dentro dos valores de referência e do fato de 73 (89%) dos episódios da LRA terem se resolvido, pacientes que desenvolveram LRA apresentaram maior mortalidade durante o acompanhamento (16,3% x 2,4%, $p = 0,049$).

Diante dessas novas classificações e de sua validação em pacientes com cirrose, um consenso internacional foi publicado em 2015 com uma nova definição da LRA em cirrose.(31) A nova definição foi baseada em uma modificação da classificação de KDIGO, que foi chamada de ICA-AKI (*International Club of Ascites – Acute Kidney Injury*). De acordo com o ICA-AKI, LRA é conceituada como um aumento de creatinina sérica $\geq 0,3\text{mg/dL}$ em 48 horas ou um aumento percentual de creatinina sérica $> 50\%$ do basal conhecida ou presumivelmente ocorrido nos últimos 7 dias. A partir daí, a LRA é classificada em:

- Estádio 1: elevação de creatinina sérica $\geq 0,3\text{mg/dL}$ OU elevação de creatinina sérica $\geq 1,5$ a 2,0 vezes o basal.

- Estádio 2: elevação de creatinina sérica $> 2,0$ a 3,0 vezes o basal.

- Estádio 3: elevação de creatinina sérica $> 3,0$ vezes o basal OU creatinina sérica $\geq 4,0\text{mg/dL}$ com elevação aguda $\geq 0,3\text{mg/dL}$ OU início de terapia de substituição renal.

Uma das críticas à classificação ICA-AKI foi a sua adoção sem a demonstração de que apresentaria melhor acurácia em relação ao conceito tradicional de LRA em cirrose na predição de desfechos clínicos importantes. De fato, os trabalhos que fizeram a comparação das novas classificações da LRA com o conceito tradicionalmente utilizado mostraram superioridade deste último.(32, 33) Piano *et al.* (2013) avaliaram 233 pacientes com cirrose e ascite durante internação hospitalar e observaram que o conceito tradicional teve maior valor preditivo positivo de mortalidade intrahospitalar ($0,61[0,41-0,78]$ x $0,37[0,25-0,50]$) e valor preditivo negativo semelhante ($0,92[0,88-0,95]$ x $0,94[0,89-0,97]$).(32)

Além disso, apesar da crítica em se usar um ponto de corte fixo de creatinina sérica para definir disfunção renal nos pacientes com cirrose, o ponto de corte de $1,5\text{mg/dL}$ foi validado através de medição da taxa de filtração glomerular (TFG) pela depuração de inulina, correlacionando-se com $\text{TFG} < 40\text{mL/min}$ em 100% dos casos (figura 1).(34)

Nesse sentido, um trabalho do nosso grupo corrobora a importância prognóstica do ponto de corte de $1,5\text{mg/dL}$ de creatinina sérica em pacientes com cirrose.(35) Ao avaliarmos retrospectivamente 149 pacientes com cirrose descompensada internados pelo Departamento de Emergências do HCFMUSP entre 2009 e 2011, encontramos que os únicos parâmetros da admissão hospitalar independentemente associados à mortalidade intra-hospitalar foram creatinina sérica $> 1,5\text{mg/dL}$ (*odds ratio* 4,35, $p=0,001$) e INR $> 1,65$ (*odds ratio* 3,71, $p=0,002$). Apesar da elevação de creatinina sérica $\geq 0,3\text{mg/dL}$ nas primeiras 48h de internação hospitalar correlacionar-se com a mortalidade na regressão logística simples (*odds ratio* 2,98, $p=0,006$), essa associação não se confirmou nos modelos de regressão logística múltipla ($p=0,341$).

Figura 1. Relação entre TFG (depuração de inulina) e creatinina sérica em pacientes com cirrose e ascite (34)

Dessa forma, observa-se que a nova classificação da LRA em cirrose proposta pelo último consenso internacional ainda está sujeita a considerável controvérsia no que diz respeito à sua superioridade em relação ao conceito tradicionalmente aceito.

1.4 Creatinina como marcador de LRA e suas limitações

O uso da creatinina sérica e de suas variações para o diagnóstico da LRA nas novas classificações prejudica a sua acurácia pelas limitações inerentes a esse biomarcador. A creatinina sérica é, na realidade, um biomarcador de função renal, e não propriamente de lesão renal. Talvez por esse motivo, a creatinina apresenta caráter tardio na sua elevação. Caracteristicamente, há elevação de creatinina sérica quando a lesão instalada é suficiente para alterar a função renal, o que implica atraso na tomada de decisões terapêuticas.(36)

Acrescente-se que além de biomarcador tardio, a creatinina é influenciada por diversos fatores diferentes da função renal, como estado nutricional, idade, raça e sexo. No paciente com cirrose a creatinina apresenta limitações ainda mais importantes para determinar a função renal. A creatinina basal nesse grupo de pacientes é menor que a da

população geral. Tal diferença é explicada pela diminuição de produção hepática de creatina, aumento do volume de distribuição (acúmulo de fluidos extracelulares, edema e ascite), desnutrição e perda de massa muscular, comuns na fase avançada da doença.(37)

A adoção do novo conceito de LRA em cirrose (ICA-AKI) corrige, ainda que em parte, esse problema, já que leva em conta a creatinina basal do paciente e permite o diagnóstico da LRA com pequenas elevações de creatinina sérica (0,3mg/dL). Essa abordagem pode contribuir para um diagnóstico mais precoce. No entanto, a nova classificação não soluciona questões essenciais na condução de pacientes com cirrose e LRA, a saber:

I) Ao avaliar a creatinina sérica e suas variações, não é possível determinar a causa da LRA (insuficiência renal pré-renal, SHR, NTA), o que limita de forma importante a decisão terapêutica;

II) O estágio 1 da nova classificação tem valor prognóstico questionável, especialmente naqueles pacientes com creatinina sérica < 1,5mg/dL, que tem prognóstico semelhante a pacientes sem LRA.(32, 33)

Todavia, até o momento não está estabelecido na literatura o uso de outros biomarcadores com utilidade clínica para orientar o diagnóstico da LRA e intervenções terapêuticas precoces. Portanto, a dosagem sérica de creatinina ainda é o parâmetro tradicionalmente utilizado na prática clínica.

1.5 Progressão da LRA e sua importância prognóstica

Considerando as novas classificações de LRA, observamos que pacientes com os mesmos estádios iniciais da LRA apresentam prognóstico drasticamente diferente segundo a progressão subsequente. A tabela 2 mostra a mortalidade de cada estágio da LRA conforme a sua evolução em 188 pacientes com cirrose e LRA de acordo com os critérios de AKIN.(29)

Tabela 2. Mortalidade de pacientes com cirrose e LRA conforme evolução ao longo da internação (29)

Inicial	Evolução			
	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Diálise
Estádio 1	2%	29%	50%	55%
Estádio 2	7%		18%	60%
Estádio 3	21%			71%

Dessa forma, o estágio inicial da LRA não é capaz de prever precocemente o prognóstico dos pacientes, já que a progressão para estágios mais avançados ao longo da internação hospitalar têm impacto significativo na mortalidade. Portanto, biomarcadores capazes de identificar precocemente os pacientes com cirrose e LRA com maior risco de progredir para estágios mais avançados e falecerem são necessários.

1.6 Síndrome hepatorenal, seus diagnósticos diferenciais e tratamento

A SHR é uma alteração renal funcional que ocorre em pacientes com cirrose descompensados com ascite, atribuída à vasoconstrição renal acompanhada de redução do débito cardíaco. Tais alterações levam à diminuição da TFG. Ocorre por mecanismo semelhante àquele observado na LRA pré-renal, em que caracteristicamente não há lesão renal intrínseca. Trata-se, portanto, de um distúrbio funcional justificado pelas alterações hemodinâmicas encontradas na cirrose avançada.(38)

A SHR é diagnosticada quando um paciente com cirrose e ascite apresenta piora da função renal, na ausência de outras causas que a justifiquem. A maioria das causas pode ser facilmente excluída. O uso de drogas nefrotóxicas pode ser identificado pela história clínica. O diagnóstico de insuficiência renal crônica pode ser estabelecido pela identificação de fatores de risco, tais como hipertensão arterial e diabetes mellitus, assim como pelas dosagens prévias de creatinina sérica e sinais ultrassonográficos de alterações renais crônicas (rins diminuídos de tamanho e perda da diferenciação córtico-

medular). Glomerulopatias podem ser suspeitadas quando o sedimento urinário é alterado (hematúria dismórfica, cilindros e proteinúria importante). LRA pré-renal deve ser adequadamente excluída pela suspensão do uso de diuréticos e pela expansão volêmica com albumina administrada por via venosa durante 2 dias consecutivos.(12)

No caso de necrose tubular aguda (NTA), a exclusão é mais difícil. Trata-se de lesão das células tubulares renais com consequente necrose e disfunção renal, mais comumente relacionada à isquemia, sepse ou nefrotoxinas.(39) A fração de excreção de sódio na urina (FENa), historicamente utilizada para diferenciar SHR e NTA, tem baixa acurácia e por isso deixou de fazer parte dos critérios diagnósticos de SHR segundo as recomendações atuais da literatura.(12, 31, 38) O exame padrão-ouro para o diagnóstico de NTA seria a biópsia renal, porém seus riscos em um paciente com cirrose descompensada e/ou instável clinicamente não permitem ou justificam a sua realização de rotina. Como não há diagnóstico histológico na maioria dos casos, alguns autores preferem utilizar o termo LRA intrínseca ao invés de NTA.(40)

A SHR é dividida em 2 tipos. O tipo 1 é caracterizado por elevação aguda de creatinina sérica (em menos de 2 semanas), geralmente para um valor final acima de 2,5mg/dL. Pode ser desencadeada por diversos fatores, sendo os principais a ocorrência de infecção bacteriana (em especial peritonite bacteriana espontânea) e paracentese volumosa, i.e., com retirada de volume superior a 5 litros de líquido ascítico.

A SHR tipo 2 é caracterizada por elevação lentamente progressiva de creatinina sérica, geralmente para valores finais intermediários (entre 1,5 e 2,5mg/dL). Ocorre normalmente no contexto da ascite refratária. A SHR tipo 1 tem pior prognóstico que a tipo 2. Os critérios diagnósticos de consenso de SHR estabelecidos pelo *International Club of Ascites* em 2006 estão apresentados na tabela 3.(12)

Posteriormente, tais critérios foram atualizados em 2015 para adequá-los ao conceito atual da LRA em cirrose.(31) Nessa atualização, a mudança mais significativa foi a incorporação do conceito de LRA do ICA-AKI, i.e., aumento de creatinina sérica $\geq 0,3\text{mg/dL}$ em 48 horas ou um aumento percentual de creatinina sérica $> 50\%$ do basal conhecida ou presumivelmente ocorrido nos últimos 7 dias. De acordo com o fluxograma para tratamento da LRA apresentado no novo consenso, a suspeita de SHR deve ser levantada naqueles pacientes com LRA estágio 2 ou 3 (figura 2).

Tabela 3. Critérios diagnósticos da SHR (*International Club of Ascites*) (12)

Cirrose com ascite

Creatinina sérica > 1,5 mg/dL

Ausência de resposta à expansão com albumina na dose 1g/kg por pelo menos 2 dias

Ausência de choque

Ausência de uso de drogas nefrotóxicas

Ausência de hematúria acima de 50 hemácias por campo e/ou proteinúria maior que 500mg/24h e de alterações à ultrassonografia renal

Figura 2. Fluxograma de tratamento da LRA em cirrose de acordo com novo consenso internacional (ICA-AKI) (31)

O tratamento da SHR é precedido por suspensão dos diuréticos e expansão com albumina endovenosa na dose de 1g/kg durante 2 dias. Tal expansão faz parte dos critérios diagnósticos já mencionados e é necessária para excluir um componente pré-renal.(12, 31) Após a expansão inicial, a albumina é administrada na dose de 20 a 40g/dia. Juntamente com a albumina, é obrigatória a administração de um agente vasoconstrictor, geralmente a terlipressina. Alternativamente podem ser empregados midodrine, octreotide ou noradrenalina. A dose de terlipressina varia de 0,5 a 2 mg a cada 4 a 6 horas por via venosa (doses de 2 a 12mg/dia). Doses menores que 3mg/dia estão associadas a maior mortalidade, não sendo recomendadas.(41) O acompanhamento da resposta terapêutica é feito com a dosagem da creatinina sérica, sendo esperado decréscimo de 25% dos valores a cada 48 horas de tratamento. Se não houver resposta, a dose de terlipressina deve ser dobrada, até o valor máximo de 12mg/dia. O tempo máximo de tratamento combinado é de 14 dias.(12)

De acordo com o consenso do *International Club of Ascites* de 2006, resposta completa é representada pela diminuição da creatinina sérica para valores abaixo de 1,5mg/dL.(12) Como somente 40 a 60% dos pacientes obtém resposta com o tratamento atual, tem-se buscado na literatura a identificação de fatores associados à falta de resposta ou ao prognóstico desfavorável. A presença de leucocitose, bilirrubinas acima de 10mg/dL e creatinina inicial muito elevada estão associadas a menor probabilidade de resposta, porém são critérios com baixa acurácia, de modo que, apesar de presentes no início do tratamento, não identificam inequivocamente os não respondedores, gerando custos expressivos com o tratamento de pacientes que dele não se beneficiam.(42, 43)

Acrescente-se que a incidência de eventos adversos graves é alta, da magnitude de 20 e 40% dos casos.(42) Conforme esperado pela sua ação vasoconstrictora, os eventos adversos mais relevantes são congestão pulmonar e eventos isquêmicos, incluindo infarto agudo do miocárdio e isquemia arterial periférica. Doença cerebrovascular e arritmias cardíacas (bradi e taquiarritmias) também são descritas.

As baixas taxas de resposta, efeitos adversos frequentes e custos elevados coletivamente indicam a necessidade de avaliar biomarcadores de uso fácil e baixo custo para identificar os melhores candidatos à terapia combinada de albumina e terlipressina.

1.7 Biomarcadores de LRA

Dadas as limitações da creatinina como marcador de LRA e da sua progressão, têm sido pesquisados outros biomarcadores capazes de detectar a LRA de forma mais precoce e acurada. Os mais promissores são *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL), interleucina-18 (IL-18), *Kidney Injury Molecule-1* (KIM-1), *Liver-type Fatty Acid Binding Protein* (L-FABP) e cystatina C.(36) Dentre esses, o mais bem estudado e validado até o momento é o NGAL. Trata-se de biomarcador inflamatório produzido por neutrófilos ativados e por células tubulares renais lesadas. Sua concentração sérica e urinária aumenta logo nas primeiras horas após a lesão renal, precedendo a elevação de creatinina em até 48h, o que o torna interessante para diagnosticar e predizer LRA.(44) A concentração sérica de NGAL é marcadamente influenciada por fatores tais como presença de infecção e lesão hepática. (45, 46) Por esse motivo, a dosagem urinária é utilizada para diagnosticar LRA, enquanto dosagem no sangue pode ser empregada para avaliação de *acute-on-chronic liver failure* (ACLF).(47)

Considerando a cinética de elevação precoce do NGAL urinário e as desvantagens do tradicional uso da creatinina para diagnosticar LRA em pacientes com cirrose, dados recentes sinalizam que o primeiro pode ser um marcador promissor para esse fim.(48)

1.8 *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) em cirrose

Estudos publicados desde 2012 mostraram que concentrações urinárias de NGAL eram diferentes segundo a etiologia da LRA em pacientes com cirrose.(40, 49) A tabela 4 mostra os níveis de NGAL urinário em diferentes causas da LRA em pacientes com cirrose. Observa-se que pacientes com insuficiência renal pré-renal apresentam os menores níveis urinários de NGAL, pacientes com NTA apresentam valores muito aumentados de NGAL urinário, enquanto que pacientes com SHR apresentam níveis intermediários.

Tabela 4. NGAL urinário em pacientes com cirrose e LRA de diferentes etiologias

	Pré-renal	SHR	NTA
	Mediana (intervalo interquartil)		
Fagundes <i>et al.</i> (49)	30	76	417
µg/g creatinina	(20-59)	(43-263)	(239-2.242)
Ariza <i>et al.</i> (50)	36	104	1807
µg/g creatinina	(26-125)	(58-208)	(494-3.716)
Verna <i>et al.</i> (40)	20	105	325
µg/L	(15-45)	(27,5-387,5)	(100-700)
Belcher <i>et al.</i> (51)	54	115	565
µg/L	(17-180)	(51-373)	(76-1.000)
	Média±desvio padrão		
Qasem <i>et al.</i> (52)	161,15±60,75	380,6±132,32	580,51±238,75
µg/g creatinina			

Em outros trabalhos, porém, os níveis urinários de NGAL encontrados em pacientes com SHR diferem bastante dos apresentados na tabela acima. Ao avaliar 8 pacientes com cirrose e SHR tipo 1 e 22 com SHR tipo 2, Gungor *et al.* (2014) encontraram valores médios de NGAL urinário de 723,5±391,4 µg/L e 466±413,8 µg/L, respectivamente.(53) Por outro lado, Barreto *et al.* (2014) encontraram níveis médios de NGAL urinário de 59±46 µg/g de creatinina em 16 pacientes com cirrose, infecção bacteriana e SHR do tipo 1.(54)

Além disso, apesar das diferentes medianas de NGAL urinário nas diferentes etiologias de LRA, observa-se uma grande sobreposição desses valores, o que fica ainda

mais evidente em trabalhos que forneceram gráficos com os valores individuais de NGAL, conforme demonstrado na figura 3.(49, 55)

Figura 3. Valores individuais de NGAL urinário nas diferentes causas de LRA em cirrose (49, 55)

Dessa forma, observamos que o uso do NGAL urinário no diagnóstico diferencial da LRA em pacientes com cirrose ainda não está completamente estabelecido.

Apesar das dúvidas em relação à capacidade do NGAL no diagnóstico diferencial das etiologias da LRA em cirrose, trabalhos mais recentes buscaram testar a acurácia do NGAL urinário em prever desfechos clínicos relevantes, como desenvolvimento da LRA, evolução da LRA e mortalidade.

Um estudo piloto do nosso grupo demonstrou que, em 9 pacientes com cirrose e infecção bacteriana, a dosagem urinária de NGAL se correlacionou com o desenvolvimento da LRA pelo conceito tradicional em cirrose.(56) Fato relevante é que, apesar do diagnóstico de LRA pela creatinina sérica ter sido firmado após 5,4 dias em média, os níveis urinários de NGAL desses pacientes já eram elevados a partir de 6 horas de internação hospitalar (143 ± 33 µg/g creatinina em pacientes que desenvolveram LRA x 48 ± 13 µg/g creatinina em pacientes que não desenvolveram, $p=0,047$). A

evolução temporal dos níveis de creatinina sérica e NGAL urinário dos pacientes que desenvolveram LRA pode ser vista na figura 4.

Figura 4. Evolução temporal dos níveis de creatinina sérica e NGAL urinário em pacientes com cirrose e infecção bacteriana que desenvolveram LRA (56)

Elia *et al.* (2015) avaliaram 30 pacientes com cirrose e LRA secundária ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais e observaram que aqueles que tiveram LRA persistente apresentavam níveis urinários de NGAL maiores do que aqueles que tiveram LRA transitória ($953 \pm 1.198 \mu\text{g/g creatinina}$ x $83 \pm 79 \mu\text{g/g creatinina}$, $p=0,008$). (55)

De forma análoga, Barreto *et al.* (2014) demonstraram em 132 pacientes com cirrose, internados com infecção bacteriana, que os níveis urinários de NGAL eram maiores naqueles com LRA persistente do que naqueles com LRA transitória ($281 \pm 477 \mu\text{g/g creatinina}$ x $85 \pm 79 \mu\text{g/g creatinina}$, $p<0,001$). (54)

Ariza *et al.* (2015) avaliaram 51 pacientes com cirrose descompensada (com ou sem LRA) e demonstraram que o NGAL urinário se correlacionou com a mortalidade em 3 meses. (50) De fato, os níveis medianos de NGAL urinário foram de 39 (27-108) $\mu\text{g/g de creatinina}$ e 458 (114-3.661) $\mu\text{g/g de creatinina}$ em pacientes sobreviventes e

não sobreviventes, respectivamente ($p < 0,0001$), com acurácia de 0,88 (0,78-0,97) em prever mortalidade em 3 meses.

Dessa forma, entendemos que a dosagem urinária de NGAL pode prever desfechos clínicos relevantes em pacientes com cirrose e possivelmente auxiliar nas decisões terapêuticas. Dentre as suas utilidades potenciais, talvez aquela com maior impacto na prática clínica seria a identificação dos pacientes com SHR-1 que não se beneficiariam do tratamento combinado com albumina e terlipressina.

Racional e hipóteses do estudo

O *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) é um biomarcador urinário precoce de lesão de túbulos renais. Valores elevados são demonstráveis nas primeiras horas após a agressão, antes mesmo de se observar aumento da creatinina sérica. Essa peculiaridade o torna promissor para tomada de decisão terapêutica e estabelecimento de prognóstico em pacientes com LRA.

Com base nesse racional, desenhamos o presente estudo para testar as seguintes hipóteses:

- a) A dosagem urinária de NGAL é capaz de prever o desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana, por se tratar de biomarcador que se altera até 48 horas antes da creatinina sérica. Os níveis urinários de NGAL nas primeiras horas do diagnóstico da infecção bacteriana poderiam se correlacionar com o grau de lesão renal e prever o desenvolvimento de LRA em pacientes com creatinina sérica ainda normal, assim como a progressão da LRA para estágios mais avançados naqueles com creatinina alterada à admissão hospitalar;
- b) A dosagem urinária de NGAL é capaz de identificar dentre os pacientes com diagnóstico estabelecido de SHR aqueles que não se beneficiam do tratamento combinado com albumina e terlipressina por apresentarem lesão tubular instalada e irreversível. Na SHR, a resposta ao tratamento farmacológico combinado de albumina e terlipressina situa-se ao redor de 50% dos casos. Dentre os motivos para a falta de resposta nos demais pacientes, incluem-se

casos de NTA não identificada previamente. Essa identificação seria importante para diminuir os custos associados ao tratamento combinado com albumina e terlipressina, bem como evitar eventos adversos associados ao mesmo.

2. OBJETIVOS

Os objetivos primários do trabalho foram avaliar a acurácia do NGAL urinário para prever:

- a) Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana;
- b) Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico estabelecido de SHR.

Os objetivos secundários foram:

- a) Avaliar a acurácia de marcadores de disfunção hemodinâmica em cirrose (atividade plasmática de renina e noradrenalina sérica) na predição do desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana;
- b) Avaliar a acurácia de marcadores tradicionalmente utilizados na prática clínica na predição do desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana. Os marcadores avaliados são:
 - Função hepática: bilirrubinas séricas, albumina sérica, INR, Child e MELD;
 - Parâmetros hemodinâmicos: frequência cardíaca e pressão arterial média;
 - Marcadores inflamatórios: leucócitos, neutrófilos, PCR e presença de sepse;
 - Testes laboratoriais de lesão renal: creatinina sérica, sódio sérico, FENa, fração de excreção de uréia (FEUr) e relação proteinúria/creatinina urinária;
- c) Avaliar a acurácia de marcadores de disfunção hemodinâmica em cirrose (atividade plasmática de renina e noradrenalina sérica) na predição de resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico estabelecido de SHR;
- d) Avaliar a acurácia de marcadores tradicionalmente utilizados na prática clínica na predição de resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina

em pacientes com diagnóstico estabelecido de SHR. Os marcadores avaliados foram:

- Função hepática: bilirrubinas séricas, albumina sérica, INR, Child e MELD;
 - Parâmetros hemodinâmicos: frequência cardíaca e pressão arterial média;
 - Marcadores inflamatórios: leucócitos, neutrófilos, PCR e presença de sepse;
 - Testes laboratoriais de lesão renal: creatinina sérica, sódio sérico, FENa, FEUr e relação proteinúria/creatinina urinária;
- e) Comparar o conceito tradicional de LRA em cirrose com a nova classificação ICA-AKI para prever mortalidade intra-hospitalar, em 30 e 90 dias em pacientes com cirrose e infecção bacteriana;
- f) Avaliar a acurácia do NGAL para prever mortalidade intra-hospitalar em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão abaixo foram designados para participar de pelo menos um dos braços do estudo:

- a) Braço 1- Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana;
- b) Braço 2 - Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR.

A. Critérios de inclusão

- I) Diagnóstico de cirrose realizado por biópsia ou pela combinação de achados clínicos, radiológicos, laboratoriais e/ou endoscópicos;
- II) Presença de ascite e/ou hidrotórax hepático;
- III) Idade maior que 18 anos;
- IV) Concordância em participar no estudo, registrada através de assinatura de Termo de Consentimento Informado;
- V) Presença de LRA e/ou infecção bacteriana provável ou confirmada (incluindo peritonite bacteriana espontânea, pneumonia, infecção do trato urinário, infecções de pele, bacteremia).

B. Critérios de exclusão

- I) Comorbidades graves, incluindo insuficiência cardíaca classe funcional IV, doença pulmonar obstrutiva crônica O₂ dependente e neoplasias avançadas (metastáticas e/ou localmente avançadas);
- II) Choque, conforme definição do *American College of Chest Physicians*, i.e. hipotensão persistente apesar de ressucitação volêmica adequada (pelo menos 20mL/kg de cristalóides).(57) Os critérios de hipotensão são: pressão arterial sistólica menor que 90mmHg, pressão arterial média menor que 70mmHg , queda de mais de 40mmHg na

pressão arterial sistólica e/ou pressão arterial sistólica menor que 2 desvios-padrão abaixo do normal para a idade;

III) Nefropatia intrínseca definida como: insuficiência renal crônica com creatinina sérica persistentemente maior que 1,5 mg/dL nos 6 meses prévios à internação; alterações morfológicas compatíveis com nefropatia crônica à ultrassonografia de rins e vias urinárias; hematúria maior que 50 hemácias/CGA e dismorfismo eritrocitário e/ou proteinúria maior que 500mg/24 horas;

IV) Uso de drogas nefrotóxicas nos últimos 30 dias;

V) Estar em diálise previamente à inclusão no estudo;

VI) Transplante hepático previamente à inclusão no estudo.

Tratamento dos pacientes não incluídos

Os pacientes que não preencheram os critérios de inclusão foram registrados indicando a causa pela qual não puderam participar do estudo. Igualmente, foram registradas todas as exclusões e perdas de seguimento que ocorreram durante o período do estudo. Esses pacientes receberam o tratamento padrão oferecido na instituição para casos semelhantes.

3.2 Métodos

3.2.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, multicêntrico nacional, delineado de acordo com a metodologia STARD – *Standards for reporting studies of diagnostic accuracy initiative requirements*.⁽⁵⁸⁾ Pacientes com cirrose descompensada por infecção bacteriana e/ou LRA com necessidade de internação foram avaliados para inclusão no projeto dentro das primeiras 24 horas do diagnóstico da infecção bacteriana ou, nos casos de LRA com suspeita de SHR, 12 horas antes da administração de albumina a 6 horas após a administração de terlipressina.

Tratamento da LRA

O tratamento da LRA foi feito conforme as recomendações atuais.(12, 31) Tais recomendações foram seguidas tanto para os pacientes que já apresentavam LRA no momento da inclusão quanto para aqueles que desenvolveram LRA durante a internação incluindo os casos de suspeita de SHR. Inicialmente, os pacientes receberam albumina humana endovenosa (EV) na dose de 1g/kg/dia por pelo menos 2 dias. Aqueles que não responderam à expansão inicial receberam tratamento combinado com albumina e terlipressina. A dose de albumina nessa fase do tratamento foi de 1g/kg no primeiro dia, seguida por 30g/dia. A dose de terlipressina inicial foi de 1mg EV de 6/6h, que foi aumentada caso não houvesse resposta (queda de 25% da creatinina sérica em 2 dias) para 1mg EV 4/4h, 2mg EV 6/6h, até a dose máxima de 2mg EV 4/4h. O tempo máximo de tratamento foi de 14 dias, com a possibilidade de suspensão em menor tempo em casos com ocorrência de eventos adversos.

3.2.2 Braço 1- Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana

Desfecho principal

O desfecho principal foi o desenvolvimento ou progressão da LRA, definidos conforme as recomendações atuais do *International Club of Ascites* (31):

a) Desenvolvimento de LRA (pacientes sem LRA à admissão): aumento de creatinina sérica $\geq 0,3\text{mg/dL}$ em 48 horas ou um aumento percentual de creatinina sérica $> 50\%$ do basal conhecida ou presumivelmente ocorrido nos últimos 7 dias;

b) Progressão da LRA (pacientes com LRA à admissão): aumento de pelo menos um estágio em relação ao inicial. Em casos de pacientes com LRA estágio 3, progressão foi definida como necessidade de diálise ou óbito sem recuperação da função renal.

Desfechos secundários

Os desfechos secundários avaliados foram:

a) Mortalidade intra-hospitalar: definida como falecimento do paciente durante o período da internação hospitalar na qual o mesmo foi incluído no estudo;

b) Mortalidade em 30 dias e 90 dias: definida como falecimento do paciente em até 30 dias e 90 dias, respectivamente, da inclusão no estudo e registrada através do acompanhamento do prontuário ou, em caso do paciente não retornar ao hospital no período, através de ligação telefônica ou pesquisa pelo site www.falecidosnobrasil.org.br.

3.2.3 Braço 2 - Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR

Desfecho principal

O desfecho principal foi a resposta ao tratamento combinado da SHR, definida pelos critérios do *International Club of Ascites* de 2007 (12) (i.e., queda de creatinina sérica para um valor final abaixo de 1,5mg/dL), já que este era o critério vigente durante a maior parte do estudo e foi aquele que guiou as decisões terapêuticas tomadas pela equipe de assistência ao paciente.

3.2.4 Avaliações

Avaliação clínica inicial

Foram colhidos os seguintes dados, mediante consulta do prontuário do paciente:

I) Identificação (nome, idade, sexo);

II) Etiologia da cirrose;

III) Encefalopatia hepática;

IV) Ascite;

V) Comorbidades;

VI) Sinais vitais (frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura axilar);

VII) Medicamentos em uso (incluindo uso de beta-bloqueadores, diuréticos, drogas nefrotóxicas);

VIII) Exames laboratoriais de até 6 meses antes da internação (hemograma, bilirrubinas séricas, albumina sérica, INR, PCR, creatinina sérica, sódio sérico, FENa, FEUr e relação proteinúria/creatinina urinária).

Exames complementares de rotina

Os pacientes foram submetidos aos exames de rotina solicitados pelo seu médico assistente, independente de sua participação no estudo. Esses exames foram necessários para a determinação da causa e gravidade da descompensação da cirrose e para condução do tratamento, incluindo:

I) Exames laboratoriais gerais (hemograma, bilirrubinas séricas, albumina sérica, INR, PCR, creatinina sérica, sódio sérico, FENa, FEUr e relação proteinúria/creatinina urinária);

II) Rastreamento de infecções (urina I, radiografia de tórax, culturas);

III) Exames de imagem (radiografia de abdome, ultrassonografia de abdome, tomografia computadorizada);

IV) Endoscopia digestiva alta.

Exames específicos do estudo

Foram exames previstos no presente estudo e que não faziam parte necessariamente da rotina assistencial do paciente com cirrose descompensada. Foram coletadas amostras de sangue (30 ml) e urina (30 ml) para tais exames no momento da inclusão do paciente. Nos pacientes com infecção bacteriana, a coleta de exames de sangue e urina foi realizada em até 24 horas do diagnóstico da infecção. Nos pacientes com suspeita de SHR, a coleta de exames de sangue e urina foi feita de 12 horas antes da administração de albumina a 6 horas após a administração da primeira dose de terlipressina. Nenhum desses marcadores foi utilizado para definir o diagnóstico ou o

tratamento. As dosagens não foram realizadas com finalidades clínicas. Por esse motivo, a equipe clínica não teve conhecimento desses resultados e a equipe laboratorial não teve acesso aos dados clínicos (estudo cego).

I) NGAL urinário;

II) Noradrenalina sérica;

III) Atividade plasmática de renina.

3.2.5 Coleta e processamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas através de punção atraumática de veia antecubital após período de repouso absoluto do paciente por 30 minutos. Foram utilizados tubos com EDTA e tubos com Glutathione+EGTA. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C e congeladas a -80°C até a análise.

As amostras de urina foram coletadas em frasco estéril (espontaneamente ou através de sondagem vesical) e centrifugadas imediatamente a 3.000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C e congeladas a -80°C até a análise.

A dosagem de NGAL foi realizada através do método de ELISA conforme as instruções do fabricante (kit 036 NGAL ELISA kit [human] - BioPorto®, Copenhagen, Dinamarca). Trata-se de um ensaio de ELISA do tipo sanduíche realizado em micropoços revestidos com anticorpo monoclonal contra NGAL humano. O NGAL ligado é detectado por outro anticorpo monoclonal biotinizado e o ensaio é revelado com estreptavidina conjugada a peroxidase de rábano (CPR) e um substrato cromógeno. O ensaio é um procedimento de 4 passos:

- Primeiro passo: alíquotas dos calibradores, amostras diluídas e controles são incubados em micropoços pré-revestidos com anticorpo monoclonal de captura. O NGAL presente na solução ligar-se-á ao revestimento, enquanto que o material não ligado será removido por lavagem.

- Segundo passo: anticorpo monoclonal biotinizado de detecção é acrescentado a cada poço de teste e incubado. O anticorpo de detecção se prende ao NGAL ligado; anticorpos de detecção não ligados são removidos por lavagem.

- Terceiro passo: estreptavidina-CPR é acrescentada a cada poço de teste para formar um complexo com o anticorpo biotinizado ligado. O conjugado não ligado é removido por lavagem.

- Quarto passo: um substrato cromogênico de peroxidase contendo tetrametilbenzidina é acrescentado a cada poço de teste. A estreptavidina-CPR reage com o substrato para gerar um produto colorido. A reação enzimática é interrompida quimicamente e a intensidade da cor é lida a 450nm em um leitor de ELISA. A absorbância é uma função da concentração de NGAL originalmente acrescentado a cada micropoço. Os resultados dos calibradores são usados para construir uma curva a partir da qual as concentrações de NGAL nas amostras foram lidas.

3.2.6 Seguimento

Os pacientes incluídos no estudo tiveram coletados os dados clínicos de seu acompanhamento de rotina nos ambulatórios durante três meses após a alta hospitalar com dados censurados por óbito, transplante ou recusa em permanecer no estudo.

3.3 Cálculo amostral

O cálculo amostral do estudo foi feito para garantir um poder estatístico de 80% com um nível de significância de 5% para os desfechos primários (desenvolvimento ou progressão da LRA e resposta ao tratamento combinado da SHR).

No braço 1 do estudo, considerando que a incidência de desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana é de 30% (3, 29) e que o NGAL urinário seria capaz de estratificar os pacientes em um grupo com alta incidência (40%) e outro com baixa incidência (20%) de desenvolvimento ou progressão da LRA, a amostra necessária seria de 81 pacientes por grupo (162 pacientes com cirrose e infecção bacteriana).

No braço 2 do estudo, considerando a taxa média de resposta ao tratamento descrita na literatura de 50% e que o NGAL urinário seria capaz de estratificar os pacientes em um grupo com alta taxa (70%) e outro com baixa taxa de resposta (30%), a amostra necessária seria de 23 pacientes por grupo (46 pacientes com SHR).

3.4 Análise estatística

Realizamos a análise descritiva, com dados expressos como mediana (intervalo interquartil) ou valor absoluto (porcentagem). As variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste t de Student's. As variáveis contínuas não paramétricas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney ou teste t Brunner-Munzel, quando apropriados. As variáveis categóricas foram comparadas pelos testes de Fisher ou Chi-quadrado, quando apropriados.

Foram construídas curvas ROC para cada variável contínua, com determinação da área sob a curva e do melhor ponto de corte, estabelecido pelo índice de Youden. Determinamos a acurácia, sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e razão de verossimilhança negativa (RVN).

As variáveis relacionadas aos desfechos do estudo foram inseridas em modelos de regressão logística múltipla, construído pelo método *backward* para determinação das variáveis independentemente associadas. Por se tratar de variável de distribuição não paramétrica, o NGAL urinário foi incluído nos modelos de regressão logística após transformação logarítmica natural.

$p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o software R, versão 3.3.2 (The R Foundation for Statistical Computing, 2015)

3.5 Aspectos éticos

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki. O protocolo foi aprovado pela Comissão Ético-Científica do

Departamento de Gastroenterologia e pela Comissão de Normas Éticas do HCFMUSP (CAPPesq) e se encontra registrado na plataforma Brasil do Ministério da Saúde (CAAE: 09137713.4.1001.0068). O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foi o centro coordenador. Nos demais centros, obtivemos a aprovação dos respectivos CEPs locais, segundo as resoluções CONEP para estudos multicêntricos.

Cada paciente recebeu explicações em linguagem clara sobre o estudo. O pesquisador responsável obteve de cada paciente a assinatura do consentimento informado, por escrito, previamente à inclusão. O pesquisador responsável o informou sobre os benefícios e riscos de participar na pesquisa e de seu direito de retirar seu consentimento a qualquer momento, comprometendo-se a informar ao paciente a ocorrência de resultados desfavoráveis que impedissem a continuação do estudo.

3.6 Período e locais do estudo

O estudo foi realizado no período de junho de 2013 a junho de 2016. O projeto foi desenvolvido por um consórcio de instituições universitárias públicas nacionais, sob a coordenação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As instituições participantes são:

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Hospital das Clínicas

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Hospital de Base da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal

3.7 Financiamento

O projeto foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp processo 2013/18214-7).

4. RESULTADOS

No período de junho de 2013 a junho de 2016 foram incluídos 199 pacientes divididos nos dois braços do estudo:

Braço 1: 179 pacientes com infecção bacteriana (com ou sem LRA de qualquer etiologia à admissão) para avaliação do desenvolvimento ou progressão da LRA;

Braço 2: 58 pacientes com diagnóstico de SHR (com ou sem infecção bacteriana) para avaliação da resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina.

Dessa forma, 38 pacientes foram avaliados nos dois braços do estudo por apresentarem tanto infecção bacteriana quanto SHR. A figura 5 demonstra o fluxograma de inclusões e exclusões.

Figura 5. Fluxograma de inclusões e exclusões

4.1 Braço 1 - Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana

Dos 179 pacientes com cirrose e infecção bacteriana, 36,9% (n=66) não apresentavam LRA à admissão e 63,1% (n=113) apresentavam LRA à admissão. O estágio inicial da classificação de ICA-AKI dos pacientes com LRA à admissão foi 1

em 46,9% (n=53), 2 em 31,0% (n=35) e 3 em 22,1% (n=25). Quanto à etiologia da LRA à admissão, 46,0% (n=52) apresentavam LRA pré-renal, 33,6% (n=38) SHR, 14,2% (n=16) NTA e 6,2% (n=7) não tiveram um diagnóstico etiológico definitivo da LRA (figura 6).

Figura 6. Etiologia da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana

As características basais dos pacientes estão nas tabelas 5 e 6. A figura 7 demonstra o desenvolvimento ou progressão da LRA desses pacientes ao longo da internação.

Tabela 5. Dados clínicos basais dos pacientes com cirrose e infecção bacteriana

	Todos (n=179)	Sem LRA à admissão (n=66)	Com LRA à admissão (n=113)	p
Idade (anos)	56 (48-62)	53 (43-61)	57 (49-62)	0,052
Sexo masculino	125 (69,8%)	42 (63,6%)	83 (73,4%)	0,180
Etiologia da cirrose				0,529
- Álcool	60 (33,5%)	19 (28,8%)	41 (36,3%)	
- Hepatite C	32 (17,9%)	11 (16,7%)	21 (18,6%)	
- Criptogênica	24 (13,4%)	11 (16,7%)	13 (11,5%)	
- Álcool + Hep. C	15 (8,4%)	4 (6,0%)	11 (9,7%)	
- Outras	48 (26,8%)	21 (31,8%)	27 (23,9%)	
Sítio de infecção				0,759
- PBE	91 (50,3%)	35 (53,0%)	56 (49,6%)	
- ITU	38 (21,2%)	15 (22,7%)	23 (20,4%)	
- Outras infecções	50 (27,9%)	16 (24,2%)	34 (30,0%)	
Frequência cardíaca (bpm)	81 (72-93)	80 (73-92)	82 (72-93)	0,962
Pressão arterial média (mmHg)	80 (72-87)	83 (76-90)	78 (70-86)	0,016
Sepse	64 (35,8%)	22 (33,3%)	42 (37,2%)	0,631
Child				0,004
- A	1 (0,6%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	
- B	51 (28,5%)	27 (40,9%)	24 (21,2%)	
- C	127 (70,9%)	38 (57,6%)	89 (78,8%)	
MELD	22 (16-29)	16 (13-21)	27 (21-31)	<0,001

PBE: peritonite bacteriana espontânea. ITU: infecção do trato urinário.

Tabela 6. Exames laboratoriais basais dos pacientes com cirrose e infecção bacteriana

	Todos (n=179)	Sem LRA à admissão (n=66)	Com LRA à admissão (n=113)	P
Leucócitos (/mm³)	6.900 (4.125-10.660)	5.390 (3.635-8.995)	7.600 (4.560-11.890)	0,012
Neutrófilos (/mm³)	4.650 (2.915-8.270)	3.640 (2.430-7.130)	5.400 (3.160-9.545)	0,016
Proteína C reativa (mg/L)	52,0 (26,5-84,5)	34,9 (12,0-71,2)	63,2 (32,2-92,8)	<0,001
Albumina (g/dL)	2,9 (2,5-3,2)	2,9 (2,4-3,2)	2,9 (2,5-3,2)	0,399
Bilirrubinas totais (mg/dL)	3,1 (1,8-6,8)	2,8 (1,5-5,3)	3,6 (2,1-8,0)	0,017
INR	1,8 (1,5-2,3)	1,7 (1,4-2,0)	1,9 (1,6-2,5)	0,001
Creatinina (mg/dL)	1,5 (0,8-2,4)	0,8 (0,7-0,9)	2,0 (1,6-2,8)	<0,001
Sódio (mEq/L)	135 (131-139)	136 (133-140)	135 (130-138)	0,026
FENa (%)	0,20 (0,09-0,61)	0,12 (0,04-0,64)	0,25 (0,13-0,59)	0,007
FEUr (%)	27,4 (17,0-38,6)	32,8 (25,2-40,1)	23,8 (14,0-37,1)	0,006
Proteinúria/ creatinina urinária	0,24 (0,12-0,41)	0,17 (0,12-0,28)	0,25 (0,12-0,43)	0,183
Atividade plasmática de renina (ng/mL)	4,9 (0,9-15,9)	2,9 (0,8-8,7)	6,7 (1,0-17,9)	0,040
Noradrenalina (pg/mL)	670 (452-1.137)	546 (376-783)	788 (513-1.258)	0,003
NGAL urinário (µg/L)	192,2 (90,4-550,4)	97 (51-229)	296 (139-950)	<0,001

Figura 7. Fluxograma dos pacientes avaliados para inclusão no estudo de desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana

Observamos que 37,4% dos pacientes desenvolveram ou apresentaram progressão da LRA. Comparando os 67 pacientes com desenvolvimento (n=22) ou progressão (n=45) da LRA com aqueles 112 pacientes sem desenvolvimento (n=44) ou progressão (n=68) da LRA, as variáveis com diferença estatisticamente significativa entre os grupos estão na tabela 7.

Tabela 7. Variáveis associadas a desenvolvimento ou progressão da LRA

	Desenvolvimento/ progressão da LRA (n=67)	Sem desenvolvimento/ progressão da LRA (n=112)	p
Neutrófilos (/mm³)	5.800 (3.090-12.360)	4.480 (2.800-7.200)	0,040
MELD	24 (19-30)	22 (15-28)	0,047
FEUr (%)	22,8 (13,9-34,4)	31,3 (21,4-39,4)	0,018
NGAL urinário (µg/L)	307 (95-1.099)	157 (77-336)	0,013

Incluindo todas as variáveis associadas ao desenvolvimento ou progressão da LRA em um modelo de regressão logística múltipla, aquelas independentemente associadas a tal desfecho foram contagem de neutrófilos ($p=0,014$) e o NGAL urinário ($p=0,026$).

A figura 8 mostra a comparação dos valores de NGAL urinário entre os pacientes com desenvolvimento ou progressão da LRA e aqueles sem desenvolvimento ou progressão. A figura 9 mostra a comparação dos valores das demais variáveis entre os pacientes com desenvolvimento ou progressão da LRA e aqueles sem desenvolvimento ou progressão.

Figura 8. Comparação dos valores de NGAL urinário entre os pacientes com desenvolvimento ou progressão da LRA e aqueles sem desenvolvimento ou progressão

Figura 9. Comparação dos valores das demais variáveis entre os pacientes com desenvolvimento ou progressão da LRA e aqueles sem desenvolvimento ou progressão

A área sob a curva ROC do NGAL urinário para predizer desenvolvimento ou progressão da LRA foi de 0,62. O ponto de corte com maior acurácia foi de 995 μ g/L. Utilizando-se esse ponto de corte obtivemos acurácia de 0,70, Se 0,31, Sp 0,93, VPP 0,72, VPN 0,69, RVP 4,43 e RVN 0,74. Portanto, 72% dos pacientes com NGAL urinário $\geq$ 995 μ g/L desenvolveram ou apresentaram progressão da LRA comparados a 31% daqueles com NGAL urinário < 995 μ g/L.

Analisando-se de forma separada os pacientes com ou sem LRA à admissão, encontramos que o NGAL urinário se associou à progressão da LRA em pacientes com LRA à admissão ($p=0,002$), mas não ao desenvolvimento da LRA naqueles pacientes sem LRA à admissão ($p=0,973$). Outras variáveis que tiveram associação com

progressão da LRA foram o INR ($2,2[1,7-2,7] \times 1,8[1,5-2,3]$, $p=0,033$), MELD ($29[24-33] \times 25[20-31]$, $p=0,012$), FEUr ($19,5[11,0-27,3] \times 27,8[19,3-38,8]$ %, $p=0,026$) e relação proteinúria/creatinina urinária ($0,34[0,19-0,56] \times 0,24[0,10-0,36]$, $p=0,023$).

A figura 10 mostra a comparação dos valores de NGAL urinário entre os pacientes com progressão da LRA e aqueles sem progressão.

Figura 10. Comparação dos valores de NGAL urinário entre os pacientes com progressão da LRA e aqueles sem progressão

A área sob a curva ROC do NGAL urinário para prever progressão da LRA foi de 0,67. O ponto de corte com maior acurácia foi de 995µg/L. Utilizando-se esse ponto de corte obtivemos acurácia de 0,71, Se 0,42, Sp 0,91, VPP 0,76, VPN 0,70, RVP 4,67 e RVN 0,64. Portanto, 76% dos pacientes com NGAL urinário $\geq 995\mu\text{g/L}$ apresentaram progressão da LRA comparados a 30% daqueles com NGAL urinário $< 995\mu\text{g/L}$.

A tabela 8 mostra a análise de curva ROC das variáveis associadas à progressão da LRA.

Tabela 8. Análise de curva ROC das variáveis associadas à progressão da LRA

	AUC	Acur.	Se	Sp	VPP	VPN	RVP	RVN
MELD, ≥ 36	0,63	0,63	0,20	0,91	0,60	0,63	2,22	0,88
INR, ≥ 2,2	0,62	0,63	0,47	0,74	0,54	0,68	1,81	0,72
Prot/Cr, ≥ 0,3	0,64	0,66	0,58	0,72	0,56	0,73	2,07	0,58
FEUr, < 20,8%	0,63	0,65	0,55	0,73	0,57	0,71	2,04	0,62
NGAL, ≥995µg/L	0,67	0,71	0,42	0,91	0,76	0,70	4,67	0,64

AUC: área sob a curva ROC. Acur.: acurácia. Prot/Cr: relação proteinúria/creatinina urinária.

4.2 Braço 2 - Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR

Dos 58 pacientes com diagnóstico de SHR, 51,7% (n=30) responderam ao tratamento combinado com albumina e terlipressina. As características basais dos pacientes respondedores e não respondedores estão nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Dados clínicos basais dos pacientes com diagnóstico de SHR

	Todos (n=58)	Respondedores (n=30)	Não respondedores (n=28)	p
Idade (anos)	58 (48-62)	58 (48-61)	60 (49-66)	0,522
Sexo masculino	45 (77,6%)	23 (76,7%)	22 (78,6%)	1,000
Etiologia da cirrose				0,505
- Álcool	24 (41,4%)	11 (36,7%)	13 (46,4%)	
- Hepatite C	9 (15,5%)	7 (23,3%)	2 (7,1%)	
- Hepatite B	5 (8,6%)	3 (10,0%)	2 (7,1%)	
- Álcool + Hepatite C	4 (6,9%)	2 (6,7%)	2 (7,1%)	
- Outras	16 (27,6%)	7 (23,3%)	9 (32,1%)	
Sítio de infecção				0,662
- PBE	18 (31,0%)	11 (36,7%)	7 (25,0%)	
- Outras infecções	27 (46,6%)	13 (43,3%)	14 (50,0%)	
- Não infectados	13 (22,4%)	6 (20,0%)	7 (25,0%)	
Frequência cardíaca (bpm)	81 (69-90)	85 (69-91)	79 (69-88)	0,432
Pressão arterial média (mmHg)	78 (72-86)	77 (73-83)	81 (70-86)	0,975
Child				0,073
- B	15 (25,9%)	11 (36,7%)	4 (14,3%)	
- C	43 (74,1%)	19 (63,3%)	24 (85,7%)	
MELD	29 (23-34)	27 (21-30)	30 (26-38)	0,004

PBE: peritonite bacteriana espontânea

Tabela 10. Exames laboratoriais basais dos pacientes com diagnóstico de SHR

	Todos (n=58)	Respondedores (n=30)	Não respondedores (n=28)	p
Leucócitos (/mm³)	7.635 (4.830-11.128)	6.740 (4.145-10.438)	9.140 (5.682-11.828)	0,261
Neutrófilos (/mm³)	5.660 (3.310-9.258)	4.580 (3.085-9.530)	6.900 (4.345-9.192)	0,301
Proteína C reativa (mg/L)	51,4 (32,1-87,1)	44,9 (33,5-81,9)	55,7 (32,0-87,3)	0,815
Albumina (g/dL)	2,9 (2,6-3,3)	3,0 (2,6-3,8)	2,7 (2,4-3,0)	0,067
Bilirrubinas totais (mg/dL)	3,3 (1,8-7,0)	3,1 (1,7-4,2)	4,4 (2,0-16,9)	0,081
INR	1,9 (1,7-2,2)	1,9 (1,6-2,0)	2,1 (1,8-2,5)	0,028
Creatinina (mg/dL)	2,7 (2,3-3,4)	2,6 (1,9-3,2)	2,9 (2,4-3,7)	0,060
Sódio (mEq/L)	134 (130-138)	134 (130-138)	136 (130-138)	0,463
FENa (%)	0,19 (0,10-0,44)	0,17 (0,09-0,26)	0,27 (0,14-0,69)	0,065
FEUr (%)	20,4 (11,1-26,3)	21,1 (13,1-32,1)	18,3 (9,0-24,0)	0,073
Proteinúria/ creatinina urinária	0,23 (0,12-0,46)	0,17 (0,05-0,26)	0,34 (0,20-0,70)	0,003
Atividade plasmática de renina (ng/mL)	7,1 (1,2-18,2)	8,5 (1,0-16,5)	5,8 (2,1-20,8)	0,700
Noradrenalina (pg/mL)	764 (434-1.266)	770 (361-1.217)	758 (437-1.310)	0,743
NGAL urinário (µg/L)	334 (148-1.220)	190 (114-577)	729 (235-2.190)	0,007

Comparando-se os pacientes respondedores e não respondedores, as variáveis que tiveram diferença estatisticamente significativa foram: INR, MELD, relação proteinúria/creatinina urinária e NGAL urinário. Incluindo todas essas variáveis em um modelo de regressão logística múltipla, a única independentemente associada à resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina foi o NGAL urinário (p=0,027).

A figura 11 mostra a comparação dos valores de NGAL urinário entre os

pacientes que responderam ou não ao tratamento com albumina e terlipressina, e a figura 12 a comparação das demais variáveis associadas à resposta ao tratamento.

Figura 11. Valores de NGAL urinário entre os pacientes com SHR que responderam ou não ao tratamento com albumina e terlipressina

Figura 12. Valores das demais variáveis associadas à resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina

A área sob a curva ROC do NGAL urinário para prever resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina foi de 0,70. O ponto de corte com maior acurácia foi de 214µg/L. Utilizando-se esse ponto de corte obtivemos acurácia de 0,67, Se 0,47, Sp 0,82, VPP 0,76, VPN 0,62, RVP 2,61 e RVN 0,65. Portanto, 76% dos pacientes com NGAL urinário < 214µg/L responderam ao tratamento comparados a 38% daqueles com NGAL urinário ≥ 214µg/L.

A tabela 11 mostra a análise de curva ROC de todas as variáveis associadas à resposta a albumina e terlipressina.

Tabela 11. Análise de curva ROC das variáveis associadas à resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina

	AUC	Acur.	Se	Sp	VPP	VPN	RVP	RVN
MELD, < 37	0,71	0,67	0,97	0,36	0,62	0,91	1,42	0,08
INR, < 2,1	0,67	0,67	0,80	0,54	0,65	0,71	1,74	0,37
Prot/Cr, < 0,2	0,73	0,71	0,64	0,78	0,75	0,68	2,91	0,46
NGAL, <214µg/L	0,70	0,67	0,47	0,82	0,76	0,62	2,61	0,65

AUC: área sob a curva ROC. Acur.: acurácia.

O fluxograma da figura 13 mostra a combinação do MELD e NGAL urinário para determinar a probabilidade de resposta ao tratamento com albumina e terlipressina. Tais variáveis foram escolhidas pela sua alta sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Figura 13. Fluxograma para determinação da probabilidade de resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina combinando MELD e NGAL urinário

A combinação do MELD com o NGAL urinário foi capaz de subdividir os pacientes em 3 subgrupos com probabilidade de resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina distintas (9,1%, 48,1% e 80%, $p < 0,001$).

4.3 Análise de sobrevida

A mortalidade intra-hospitalar, em 30 e 90 dias dos 179 pacientes com infecção bacteriana foi respectivamente de 29,6% (n=53), 33,3% (n=56) e 40,7% (n=66). Tanto o conceito tradicional de LRA em cirrose como a classificação ICA-AKI foram capazes de prever mortalidade intra-hospitalar, em 30 dias e 90 dias, conforme demonstrado na tabela 12.

Tabela 12. Mortalidade intra-hospitalar, em 30 dias e 90 dias conforme o conceito tradicional de LRA em cirrose e a classificação ICA-AKI

Mortalidade intra-hospitalar							
LRA-	LRA+	OR	p	ICA-AKI-	ICA-AKI+	OR	p
17,9%	41,1%	3,19	<0,001	17,2%	38,2%	2,96	0,004
Mortalidade em 30 dias							
LRA-	LRA+	OR	p	ICA-AKI-	ICA-AKI+	OR	p
22,8%	45,2%	2,78	0,003	21,7%	41,7%	2,58	0,010
Mortalidade em 90 dias							
LRA-	LRA+	OR	p	ICA-AKI-	ICA-AKI+	OR	p
29,7%	54,3%	2,79	0,002	26,8%	51,5%	2,88	0,04

A mortalidade intra-hospitalar entre os pacientes ICA-AKI estágio 1 e creatinina sérica < 1,5mg/dL foi de 22,2%, que é semelhante àqueles pacientes sem LRA (17,2%).

Ao avaliarmos a mortalidade intra-hospitalar nos pacientes com LRA conforme sua progressão, encontramos uma maior mortalidade naqueles pacientes que progrediram quando comparados aos que não progrediram.

O NGAL urinário foi capaz de prever mortalidade intra-hospitalar ($p < 0,001$), com área sob a curva ROC de 0,71. O melhor ponto de corte foi de 837µg/L, com acurácia de 0,73, Se 0,50, Sp 0,88, VPP 0,72, VPN 0,74, RVP 4,17 e RVN 0,57. 72% dos pacientes com NGAL $\geq 837\mu\text{g/L}$ faleceram durante a internação comparados com 26% daqueles com NGAL < 837µg/L.

A tabela 13 mostra a mortalidade intra-hospitalar nos diferentes estágios da LRA conforme progressão e valores urinários de NGAL.

Tabela 13. Mortalidade intra-hospitalar nos pacientes com LRA conforme estágio da classificação ICA-AKI, progressão e NGAL urinário

Estádio	Todos (n=110)	Sem progressão (n=68)	Progressão (n=42)	NGAL<837µg/L (n=81)	NGAL≥837µg/L (n=29)
1	28,8%	8,3% *	75,0%	20,5% **	85,7%
2	42,9%	18,2% *	84,6%	34,6%	66,7%
3	52,2%	0% *	92,3%	30,0%	69,2%
Todos	38,2%	10,3% *	83,3%	26,3% **	72,4%

*p<0,05 na comparação Sem progressão x Progressão. **p<0,05 na comparação NGAL < 837µg/L x NGAL ≥ 837µg/L.

5. DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana

Nossos resultados demonstram que o NGAL urinário se associa com a progressão da LRA em pacientes com cirrose, infecção bacteriana e LRA à admissão ($p=0,002$). O ponto de corte de maior acurácia ($995\mu\text{g/L}$) foi consideravelmente elevado, sugerindo que pacientes com lesão tubular renal grave têm um alto risco de progressão, mas que pacientes com lesão tubular menos pronunciada ainda podem responder às medidas terapêuticas e não progredir para estádios mais avançados da LRA. Tal constatação é corroborada pelos resultados de Elia *et al.* (2015), que observou que na LRA por AINES em pacientes com cirrose aqueles pacientes com LRA persistente apresentavam NGAL urinário muito aumentado ($953\pm 1.198\ \mu\text{g/g}$ creatinina).(55)

No entanto, no trabalho de Belcher *et al.* (2014), os níveis de NGAL urinário associados com a progressão da LRA foram consideravelmente mais baixos.(59) Ao avaliar 188 pacientes com cirrose e LRA de acordo com os critérios de AKIN, Belcher *et al.* (2014) observaram níveis medianos de NGAL urinários nos pacientes em que não houve progressão da LRA de 76 (17-180) $\mu\text{g/L}$, comparados com 100 (49-544) $\mu\text{g/L}$ em pacientes com progressão da LRA mas que sobreviveram ($p=0,02$) e 366 (112-910) $\mu\text{g/L}$ em pacientes com progressão da LRA e que faleceram durante a internação ($p<0,001$). Os valores mais baixos de NGAL urinário encontrados quando comparados ao nosso trabalho justificam-se pela inclusão no estudo de Belcher *et al.* (2014) de pacientes sem ascite (portanto, de menor gravidade) e pelo pequeno número de pacientes com infecção bacteriana (6%, comparado com 100% em nosso estudo).

Uma potencial aplicabilidade clínica de nossos achados é que pacientes com NGAL urinário elevado devem ser monitorizados de perto e que medidas para reverter a LRA têm alta chance de insucesso. Nesses casos, o tratamento para LRA deve ser prioritariamente de suporte, já que o mecanismo mais provável é de NTA, que apenas irá se recuperar após a regeneração dos túbulos renais, o que pode levar até 4 semanas para ocorrer.

Não foi observada, no entanto, associação dos níveis urinários de NGAL com o desenvolvimento da LRA em pacientes com função renal normal à admissão. Nossa

principal hipótese para essa ausência de associação é que o desenvolvimento da LRA durante a infecção bacteriana em pacientes com cirrose está relacionado com a resposta ao tratamento da infecção e intercorrências que surgem durante a internação (hemorragia digestiva, novas infecções, choque séptico, uso de drogas nefrotóxicas).(3) Dessa forma, a dosagem urinária de NGAL no momento do diagnóstico da infecção não reflete esses fatores dinâmicos que ocorrem ao longo da internação de um paciente com cirrose. Uma forma de corrigir essa limitação teria sido a realização de dosagens seriadas de NGAL urinário durante a internação, o que não foi possível no nosso trabalho por uma questão de custos.

Em nosso estudo piloto, havíamos encontrado uma associação do NGAL urinário com o desenvolvimento de LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.(56) No entanto, utilizamos na ocasião o conceito tradicional de LRA em cirrose, que possui uma sensibilidade menor que a classificação ICA-AKI. Dessa forma, 44,4% (n=4) dos pacientes incluídos já apresentavam LRA à admissão pela nova classificação e a elevação de 50% da creatinina sérica na internação representaria na realidade uma progressão da LRA já instalada.

Outra limitação do nosso estudo foi não ter podido analisar nossos resultados de forma separada por etiologia da LRA, já que diferentes etiologias da LRA têm prognósticos e níveis de NGAL urinário distintos. Essa limitação deu-se sobretudo pela formação de subgrupos com casuística reduzida, em função dessa estratificação por etiologia.

5.2 Resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR

Os resultados do nosso estudo confirmam a hipótese de que a dosagem urinária de NGAL está independentemente associada à resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com diagnóstico de SHR. Por se tratar de desfecho principal do trabalho e baseado no qual o estudo foi desenhado, esse achado confere uma forte evidência da existência real dessa associação.

O único estudo prévio a testar essa hipótese falhou em demonstrar diferença do NGAL urinário entre respondedores e não respondedores ao tratamento da SHR ($57 \pm 35 \mu\text{g/g}$ creatinina x $84 \pm 79 \mu\text{g/g}$ creatinina, respectivamente, $p=\text{n.s.}$).⁽⁵⁴⁾ Porém, o número de pacientes com SHR avaliados foi pequeno (4 não respondedores e 8 respondedores), conferindo baixo poder estatístico ao estudo.

Nossa hipótese é de que níveis elevados de NGAL urinário estão associados à lesão tubular renal já instalada e, portanto, não passível de ser revertida mesmo com a melhora hemodinâmica resultante do tratamento com albumina e terlipressina. Pacientes com NGAL urinário aumentado não teriam, portanto, um distúrbio puramente funcional como se acredita acontecer em pacientes com SHR. Reforçando essa hipótese, também houve associação da relação proteinúria/creatinina urinária aumentada (que é um outro marcador de lesão renal) ⁽⁶⁰⁾ com resposta ao tratamento combinado da SHR com albumina e terlipressina.

Foi possível ainda determinar um ponto de corte do NGAL urinário ($214 \mu\text{g/L}$) com boa utilidade clínica para identificar subgrupos de pacientes com taxas de resposta distintas ($76\% \times 38\%$). No entanto, seria importante uma validação externa dos nossos resultados, preferencialmente em uma amostra maior de pacientes, para confirmar o ponto de corte e parâmetros de análise de curva ROC obtidos. Pela dificuldade em se incluir um número maior de participantes com SHR, o que pode ser ilustrado pelo fato de nosso trabalho ter uma amostra maior que a maioria dos outros trabalhos em SHR, ^(42, 43) uma alternativa seria a realização de uma metanálise dos trabalhos que avaliaram preditores de resposta ao tratamento combinado da SHR.

Um ponto que merece destaque é que o NGAL urinário é um biomarcador dosado por técnica amplamente conhecida e padronizada (ELISA) a um custo relativamente baixo quando comparado ao custo do tratamento (aproximadamente R\$50,00 por dosagem). De fato, apenas os custos diretos das medicações utilizadas no tratamento da SHR (albumina e terlipressina) podem chegar a mais de R\$45.000 reais por paciente, com base na tabela de pagamento do Sistema Único de Saúde brasileiro. Portanto, apesar de uma avaliação de custo-efetividade estar além dos objetivos do nosso estudo, o custo da dosagem do NGAL urinário não parece ser um limitante para o seu uso.

Conforme pode ser observado na figura 11, uma possível limitação à aplicabilidade clínica de nossos achados decorre da grande sobreposição de valores de NGAL urinário entre pacientes respondedores e não respondedores. Dessa forma, mesmo em pacientes com NGAL urinário $\geq 214\mu\text{g/L}$ a taxa de resposta é razoável (38%), o que indica que ainda assim esses pacientes deveriam ser tratados e que outros preditores são necessários para identificar com maior precisão pacientes que não irão se beneficiar do tratamento.

A avaliação da associação de outras variáveis com a resposta ao tratamento combinado deve ser considerada com cautela, já que se trata de um desfecho secundário do nosso estudo. Como foram avaliadas outras 23 variáveis, a cada avaliação soma-se a chance de erro tipo 1 (alfa), aumentando a possibilidade de que uma ou mais das associações encontradas sejam ao acaso. Talvez seja esse o caso de estudos prévios sobre preditores de resposta ao tratamento da SHR. Nos trabalhos de Martín-Llahi *et al.* (2008) (42) e Nazar A *et al.* (2010) (43), os desenhos dos estudos não previam a avaliação específica de uma variável como principal, tendo sido avaliadas pelo menos 17 e 23 variáveis, respectivamente. Tal fato é uma importante limitação desses estudos e aumentam a chance de seus achados não serem confirmados em validações externas, o que pode ser ilustrado pelo fato de que as variáveis basais associadas a resposta ao tratamento nos dois estudos são completamente diferentes (creatinina, volume urinário e leucócitos no primeiro e bilirrubinas no segundo). Além disso, o estudo de Martín-Llahi *et al.* (2008) (42) incluiu pacientes tratados apenas com albumina na avaliação de preditores de resposta ao tratamento. Como este não é o tratamento padrão atual, seus resultados devem ser vistos com limitações.

Feitas essas ressalvas, as variáveis associadas à resposta ao tratamento combinado no nosso estudo refletem lesão tubular renal (NGAL urinário e relação proteinúria/creatinina urinária) e disfunção hepática (MELD e INR). De fato, apesar de não pudermos demonstrar associação estatisticamente significativa em relação a outros marcadores de disfunção hepática como Child, albumina e bilirrubinas, houve uma tendência estatística nesse sentido ($p=0,073$, $p=0,067$ e $p=0,081$, respectivamente).

A análise combinada do MELD (que é um escore amplamente validado e utilizado em pacientes com cirrose) e do NGAL urinário nos permitiu identificar 3 subgrupos com taxas de resposta ao tratamento significativamente distintas. Pacientes

com MELD muito elevado (≥ 37) tiveram uma baixa taxa de resposta (9,1%), que se compara à taxa de resposta do grupo placebo em estudos controlados de tratamento da SHR.(42) Esse dado sugere que o uso de albumina e terlipressina é ineficaz neste grupo de pacientes com disfunção hepática grave. Nos pacientes com MELD < 37, aqueles com NGAL urinário $\geq 214\mu\text{g/L}$ tiveram uma taxa de resposta significativamente menor do que naqueles com NGAL urinário < $214\mu\text{g/L}$ (48,1% x 80%, $p < 0,001$), revelando a utilidade prognóstica desse biomarcador nesse grupo de pacientes.

5.3 Análise de sobrevida

Tanto o conceito tradicional de LRA em cirrose quanto a classificação ICA-AKI tiveram associação com mortalidade intra-hospitalar, em 30 e 90 dias. Esse resultado sugere que a classificação ICA-AKI tem valor prognóstico e que, portanto, sua adoção na prática clínica pode ajudar na determinação prognóstica e terapêutica de pacientes com cirrose. Soma-se a essa associação com a mortalidade algumas outras vantagens previamente descritas da classificação ICA-AKI:

- 1) Permite o diagnóstico mais precoce da LRA por se basear em pequenas alterações de creatinina sérica ($0,3\text{mg/dL}$ em 48 horas);

- 2) Utiliza a variação da creatinina sérica ao invés de seus valores absolutos, o que contribuiu para superar algumas das limitações desse biomarcador em pacientes com cirrose (a creatinina sérica é influenciada pelo estado nutricional, idade, raça, sexo, produção hepática de creatina e volume de distribuição);

- 3) O estadiamento da LRA em grupos de prognóstico distinto.

Todavia, o valor prognóstico da LRA estágio 1 com creatinina sérica abaixo de $1,5\text{mg/dL}$ em nosso estudo foi questionável, já que esses pacientes apresentaram mortalidade semelhante àqueles sem LRA (22,2% x 17,2%).

Trabalhos prévios que avaliaram a classificação de AKIN e subdividiram o estágio 1 em pacientes com creatinina < $1,5\text{mg/dL}$ e $\geq 1,5\text{mg/dL}$ obtiveram resultados semelhantes. Fagundes *et al.* (2013) (33) acompanharam prospectivamente 375 pacientes com cirrose e ascite, hospitalizados por complicações da cirrose, e

demonstraram que pacientes com LRA estágio 1 de AKIN e valores de creatinina sérica $\geq 1,5\text{mg/dL}$ têm prognóstico distinto daqueles com creatinina sérica $< 1,5\text{mg/dL}$. De fato, pacientes com LRA estágio 1 de AKIN e creatinina sérica $< 1,5\text{mg/dL}$ tiveram sobrevida em 90 dias semelhante àqueles sem LRA (84% x 88%, $p=0,52$), enquanto aqueles com creatinina sérica $\geq 1,5\text{mg/dL}$ tiveram uma menor sobrevida (68%, $p<0,0001$).

De forma semelhante, Piano *et al.* (2013) (32) avaliaram 233 pacientes com cirrose e ascite durante internação hospitalar e observaram que pacientes com LRA estágio 1 de AKIN tiveram mortalidade intrahospitalar semelhante àqueles que não preenchiam os critérios de AKIN (12,5% x 6,4%, $p=0,22$). Porém, quando se compararam pacientes com LRA de qualquer estágio cuja creatinina sérica era $\geq 1,5\text{mg/dL}$ com aqueles com creatinina sérica $< 1,5\text{mg/dL}$, houve diferença significativa em relação à mortalidade (46,5% x 11,1%, $p<0,025$).

Esse último autor validou recentemente essa subdivisão em uma coorte prospectiva de 547 pacientes com cirrose descompensada e confirmou que a sobrevida em 90 dias dos pacientes com LRA estágio 1 e creatinina $< 1,5\text{mg/dL}$ é melhor que daqueles com creatinina $\geq 1,5\text{mg/dL}$ (82% x 55% respectivamente, $p=0,001$). (61) Contudo, essa diferença parece ser justificada pela diferença etiológica da LRA nesses pacientes, já que aqueles com creatinina $< 1,5\text{mg/dL}$ apresentavam em sua maioria LRA pré-renal e aqueles com creatinina $\geq 1,5\text{mg/dL}$ apresentavam principalmente SHR e NTA. Portanto, ao invés de subdividirmos os pacientes de acordo com valores absolutos de creatinina sérica, uma alternativa interessante seria dividirmos os mesmos de acordo com a etiologia da LRA.

Outro resultado importante de nosso estudo é que o prognóstico dos pacientes com LRA foi drasticamente diferente conforme sua evolução. Pacientes em que a LRA progrediu apresentaram mortalidade de 83,3% comparada com 10,3% naqueles em que não houve progressão ($p<0,05$). Essa diferença se confirmou em todos os estágios da LRA. Com isso, observamos que a classificação ICA-AKI possui valor prognóstico limitado no início da internação. Esse fato reforça a utilidade do NGAL urinário como marcador prognóstico precoce, já que a dosagem desse biomarcador no início da internação foi capaz de identificar grupos de pacientes com LRA com prognóstico distinto (mortalidade intra-hospitalar de 26,3% x 72,4%, $p<0,05$).

5.4 Direções futuras

O presente estudo abre novas perspectivas e direções para pesquisas futuras. Um primeiro ponto é a continuação das inclusões no nosso projeto para permitir uma análise de progressão da LRA conforme a sua etiologia e a validação dos resultados obtidos do NGAL urinário na predição da resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina. Fato relevante é que, mesmo com NGAL urinário aumentado, uma parcela significativa dos pacientes com SHR respondeu ao tratamento combinado, sugerindo que há outros fatores envolvidos na chance de resposta além da lesão tubular renal. Essa constatação abre campo para trabalhos que tentem identificar tais fatores. Três abordagens nos parecem promissoras nesse momento:

a) A combinação do NGAL urinário com outros biomarcadores de lesão renal, como IL-18, KIM-1 e L-FABP, tanto para predizer desenvolvimento e progressão de LRA quanto resposta ao tratamento;

b) A avaliação de marcadores inflamatórios mais sofisticados, já que a inflamação tem sido reconhecida como causa de disfunção orgânica no paciente com cirrose.⁽⁶²⁾ Todavia, marcadores tradicionalmente utilizados para medir inflamação (leucócitos, neutrófilos e proteína C reativa) não estiveram associados com a resposta ao tratamento da SHR no presente estudo;

c) Aprofundar na avaliação hemodinâmica dos pacientes com SHR, já que os marcadores tradicionalmente utilizados (pressão arterial média, atividade plasmática de renina e noradrenalina) não se associaram com resposta ao tratamento. As medidas do débito cardíaco e outros marcadores hemodinâmicos mensurados através de ecocardiograma nos parecem promissoras.

Em síntese, demonstramos neste estudo que o NGAL urinário está associado à progressão da LRA, à resposta ao tratamento da SHR com albumina e terlipressina e à mortalidade intra-hospitalar aumentada de pacientes com cirrose e infecção bacteriana. Esses resultados abrem a perspectiva para estudos visando a sua incorporação na rotina assistencial após adequada validação e determinação da utilidade de sua combinação com outros biomarcadores.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, podemos concluir que:

- a) NGAL urinário aumentado foi associado à progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana, mas não com o seu desenvolvimento naqueles pacientes sem LRA à admissão;
- b) Atividade plasmática de renina e níveis de noradrenalina sérica não se correlacionaram ao desenvolvimento ou progressão da LRA em pacientes com cirrose e infecção bacteriana;
- c) NGAL urinário foi preditor de resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com SHR;
- d) Atividade plasmática de renina e níveis de noradrenalina sérica não se correlacionaram à resposta ao tratamento combinado com albumina e terlipressina em pacientes com SHR;
- e) Tanto o conceito tradicional de LRA em cirrose quanto a classificação ICA-AKI mostraram-se adequados para prever mortalidade intra-hospitalar, em 30 e 90 dias, sendo o prognóstico influenciado pela evolução da LRA nesses pacientes;
- f) NGAL urinário aumentado foi associado à maior mortalidade intra-hospitalar em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fede G, D'Amico G, Arvaniti V, Tsochatzis E, Germani G, Georgiadis D, et al. Renal failure and cirrhosis: a systematic review of mortality and prognosis. *J Hepatol.* 2012;56(4):810-8.
2. Martín-Llahí M, Guevara M, Torre A, Fagundes C, Restuccia T, Gilabert R, et al. Prognostic importance of the cause of renal failure in patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* 2011;140(2):488-96.e4.
3. Fasolato S, Angeli P, Dallagnese L, Maresio G, Zola E, Mazza E, et al. Renal failure and bacterial infections in patients with cirrhosis: epidemiology and clinical features. *Hepatology.* 2007;45(1):223-9.
4. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, et al. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med.* 1999;341(6):403-9.
5. Terra C, Guevara M, Torre A, Gilabert R, Fernández J, Martín-Llahí M, et al. Renal failure in patients with cirrhosis and sepsis unrelated to spontaneous bacterial peritonitis: value of MELD score. *Gastroenterology.* 2005;129(6):1944-53.
6. Kowalski H. The cardiac output at rest in Laennec's cirrhosis. In: Abelman W, editor. *J Clin Invest* 1953. p. 1025-33.
7. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S121-31.
8. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology.* 1988;8(5):1151-7.
9. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* 2006;44(1):217-31.
10. Wilkinson SP, Moore KP, Arroyo V. Pathogenesis of ascites and hepatorenal syndrome. *Gut.* 1991;Suppl:S12-7.
11. Ginès P, Schrier RW. Renal failure in cirrhosis. *N Engl J Med.* 2009;361(13):1279-90.

12. Salerno F, Gerbes A, Ginès P, Wong F, Arroyo V. Diagnosis, prevention and treatment of hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Gut*. 2007;56(9):1310-8.
13. Valeriano V, Funaro S, Lionetti R, Riggio O, Pulcinelli G, Fiore P, et al. Modification of cardiac function in cirrhotic patients with and without ascites. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(11):3200-5.
14. Krag A, Bendtsen F, Henriksen JH, Møller S. Low cardiac output predicts development of hepatorenal syndrome and survival in patients with cirrhosis and ascites. *Gut*. 2010;59(1):105-10.
15. Ruiz-del-Arbol L, Monescillo A, Arocena C, Valer P, Ginès P, Moreira V, et al. Circulatory function and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Hepatology*. 2005;42(2):439-47.
16. Henriksen JH, Møller S, Ring-Larsen H, Christensen NJ. The sympathetic nervous system in liver disease. *J Hepatol*. 1998;29(2):328-41.
17. Helmy A, Newby DE, Jalan R, Johnston NR, Hayes PC, Webb DJ. Nitric oxide mediates the reduced vasoconstrictor response to angiotensin II in patients with preascitic cirrhosis. *J Hepatol*. 2003;38(1):44-50.
18. García-Estañ J, Ortiz MC, Lee SS. Nitric oxide and renal and cardiac dysfunction in cirrhosis. *Clin Sci (Lond)*. 2002;102(2):213-22.
19. Gerbes AL, Remien J, Jüngst D, Sauerbruch T, Paumgartner G. Evidence for down-regulation of beta-2-adrenoceptors in cirrhotic patients with severe ascites. *Lancet*. 1986;1(8495):1409-11.
20. Ma Z, Lee SS, Meddings JB. Effects of altered cardiac membrane fluidity on beta-adrenergic receptor signalling in rats with cirrhotic cardiomyopathy. *J Hepatol*. 1997;26(4):904-12.
21. Ceolotto G, Papparella I, Sticca A, Bova S, Cavalli M, Cargnelli G, et al. An abnormal gene expression of the beta-adrenergic system contributes to the pathogenesis of cardiomyopathy in cirrhotic rats. *Hepatology*. 2008;48(6):1913-23.
22. Møller S, Henriksen JH. Cirrhotic cardiomyopathy. *J Hepatol*. 2010;53(1):179-90.

23. Kim MY, Baik SK, Won CS, Park HJ, Jeon HK, Hong HI, et al. Dobutamine stress echocardiography for evaluating cirrhotic cardiomyopathy in liver cirrhosis. *Korean J Hepatol.* 2010;16(4):376-82.
24. Kazankov K, Holland-Fischer P, Andersen NH, Torp P, Sloth E, Aagaard NK, et al. Resting myocardial dysfunction in cirrhosis quantified by tissue Doppler imaging. *Liver Int.* 2011;31(4):534-40.
25. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, workgroup ADQI. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care.* 2004;8(4):R204-12.
26. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007;11(2):R31.
27. Kellum JA, Lameire N, Group ftKAGW. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care.* 2013;17(1):204.
28. Cholongitas E, Calvaruso V, Senzolo M, Patch D, Shaw S, O'Beirne J, et al. RIFLE classification as predictive factor of mortality in patients with cirrhosis admitted to intensive care unit. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(10):1639-47.
29. Belcher JM, Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Bhogal H, Lim JK, Ansari N, et al. Association of AKI with mortality and complications in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology.* 2013;57(2):753-62.
30. Tsien CD, Rabie R, Wong F. Acute kidney injury in decompensated cirrhosis. *Gut.* 2012.
31. Angeli P, Ginès P, Wong F, Bernardi M, Boyer TD, Gerbes A, et al. Diagnosis and management of acute kidney injury in patients with cirrhosis: revised consensus recommendations of the International Club of Ascites. *J Hepatol.* 2015;62(4):968-74.
32. Piano S, Rosi S, Maresio G, Fasolato S, Cavallin M, Romano A, et al. Evaluation of the Acute Kidney Injury Network criteria in hospitalized patients with cirrhosis and ascites. *J Hepatol.* 2013;59(3):482-9.

33. Fagundes C, Barreto R, Guevara M, Garcia E, Solà E, Rodríguez E, et al. A modified acute kidney injury classification for diagnosis and risk stratification of impairment of kidney function in cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;59(3):474-81.
34. Arroyo V, Terra C, Ginès P. Advances in the pathogenesis and treatment of type-1 and type-2 hepatorenal syndrome. *J Hepatol.* 2007;46(5):935-46.
35. Ximenes RO, Farias AQ, Scalabrini Neto A, Diniz MA, Kubota GT, Ivo MM, et al. Patients with cirrhosis in the ED: early predictors of infection and mortality. *Am J Emerg Med.* 2016;34(1):25-9.
36. Siew ED, Ware LB, Ikizler TA. Biological markers of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(5):810-20.
37. Slack A, Yeoman A, Wendon J. Renal dysfunction in chronic liver disease. *Crit Care.* 2010;14(2):214.
38. Nadim MK, Kellum JA, Davenport A, Wong F, Davis C, Pannu N, et al. Hepatorenal syndrome: the 8th international consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care.* 2012;16(1):R23.
39. Haller M, Schelling G. [Acute kidney failure. Physiopathology--clinical diagnosis--therapy]. *Anaesthesist.* 2000;49(4):349-52.
40. Verna EC, Brown RS, Farrand E, Pichardo EM, Forster CS, Sola-Del Valle DA, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts mortality and identifies acute kidney injury in cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2012;57(9):2362-70.
41. Colle I, Durand F, Pessione F, Rassiat E, Bernuau J, Barrière E, et al. Clinical course, predictive factors and prognosis in patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome treated with Terlipressin: a retrospective analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(8):882-8.
42. Martín-Llahí M, Pépin MN, Guevara M, Díaz F, Torre A, Monescillo A, et al. Albumin and terlipressin vs albumin in patients with cirrhosis and hepatorenal syndrome: a randomized study. *Gastroenterology.* 2008;134(5):1352-9.
43. Nazar A, Pereira GH, Guevara M, Martín-Llahi M, Pepin MN, Marinelli M, et al. Predictors of response to therapy with albumin and terlipressin in patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome. *Hepatology.* 2010;51(1):219-26.

44. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, Group NM-aI. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;54(6):1012-24.
45. Borkham-Kamphorst E, van de Leur E, Zimmermann HW, Karlmark KR, Tihaa L, Haas U, et al. Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(5):660-73.
46. Xu MJ, Feng D, Wu H, Wang H, Chan Y, Kolls J, et al. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: a critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology.* 2015;61(2):692-702.
47. Ariza X, Graupera I, Coll M, Solà E, Barreto R, García E, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a biomarker of acute-on-chronic liver failure and prognosis in cirrhosis. *J Hepatol.* 2016;65(1):57-65.
48. Wong F, Nadim MK, Kellum JA, Salerno F, Bellomo R, Gerbes A, et al. Working Party proposal for a revised classification system of renal dysfunction in patients with cirrhosis. *Gut.* 2011;60(5):702-9.
49. Fagundes C, Pépin MN, Guevara M, Barreto R, Casals G, Solà E, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as biomarker in the differential diagnosis of impairment of kidney function in cirrhosis. *J Hepatol.* 2012;57(2):267-73.
50. Ariza X, Solà E, Elia C, Barreto R, Moreira R, Morales-Ruiz M, et al. Analysis of a urinary biomarker panel for clinical outcomes assessment in cirrhosis. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128145.
51. Belcher JM, Sanyal AJ, Peixoto AJ, Perazella MA, Lim J, Thiessen-Philbrook H, et al. Kidney biomarkers and differential diagnosis of patients with cirrhosis and acute kidney injury. *Hepatology.* 2014;60(2):622-32.
52. Qasem AA, Farag SE, Hamed E, Emara M, Bihery A, Pasha H. Urinary biomarkers of acute kidney injury in patients with liver cirrhosis. *ISRN Nephrol.* 2014;2014:376795.

53. Gungor G, Ataseven H, Demir A, Solak Y, Gaipov A, Biyik M, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in prediction of mortality in patients with hepatorenal syndrome: a prospective observational study. *Liver Int.* 2014;34(1):49-57.
54. Barreto R, Elia C, Solà E, Moreira R, Ariza X, Rodríguez E, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts kidney outcome and death in patients with cirrhosis and bacterial infections. *J Hepatol.* 2014;61(1):35-42.
55. Elia C, Graupera I, Barreto R, Solà E, Moreira R, Huelin P, et al. Severe acute kidney injury associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs in cirrhosis: A case-control study. *J Hepatol.* 2015;63(3):593-600.
56. Ximenes RO, Farias AQ, Helou CM. Early predictors of acute kidney injury in patients with cirrhosis and bacterial infection: urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cardiac output as reliable tools. *Kidney Res Clin Pract.* 2015;34(3):140-5.
57. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
58. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2003;138(1):W1-12.
59. Belcher JM, Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Thiessen-Philbrook H, Peixoto AJ, Perazella MA, et al. Urinary biomarkers and progression of AKI in patients with cirrhosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(11):1857-67.
60. Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, Garella S. Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. *N Engl J Med.* 1983;309(25):1543-6.
61. Huelin P, Piano S, Solà E, Stanco M, Solé C, Moreira R, et al. Validation of a Staging System for Acute Kidney Injury in Patients With Cirrhosis and Association With Acute-on-Chronic Liver Failure. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016.
62. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology.* 2013;144(7):1426-37, 37.e1-9.