Universidade de São Paulo
Escola de Enfermagem

Carolina Ferreira Vasco

**LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA PELA SEPSE E
POTENCIAIS TERAPIAS RENOPROTETORAS**

São Paulo

2018

Carolina Ferreira Vasco

LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA PELA SEPSE E POTENCIAIS TERAPIAS RENOPROTETORAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto-PROESA da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Saúde do adulto

Linha de Pesquisa: Tecnologia da Saúde do Adulto

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Fernandes Vattimo

São Paulo

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Catálogo na Publicação (CIP)

Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”

Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Vasco, Carolina Ferreira

Lesão renal aguda induzida pela sepse e potenciais terapias renoprotetoras / Carolina Ferreira Vasco. São Paulo, 2017.43p.

Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Fernandes Vattimo
Área de concentração: Saúde do Adulto

1. Sepse. 2. Lesão renal aguda. 3. Antioxidante. 4. Rato.
5. Vasodilatador. 6. Renoprotetor. I. Título.

Nome: Carolina Ferreira Vasco

Título: Lesão renal aguda induzida pela sepse e potenciais terapias renoprotetoras.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Mariana e Danilo por serem meu porto seguro nos momentos mais difíceis, pelos muitos carinhos, beijos e sorrisos de onde tirei forças durante todo o tempo.

Aos meus pais Eliseu e Carmen que, apesar de terem partido há muito tempo, me deram a vida e me orientaram nos primeiros e decisivos passos.

Aos meus tios José e Ana Maria por terem sido pais presentes e compreensivos, por terem me mostrado o caminho da verdade, do respeito e da honestidade, pela formação que me proporcionaram, pelo carinho e amor em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Cristina, Júlio e Juliana, pelo carinho e amizade de sempre e pela cumplicidade que somente os irmãos são capazes de ter.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria de Fátima F.Vattimo, minha orientadora nesta tese, agradeço a oportunidade de novamente fazer parte do seu grupo de estudo, pelos sucessos e dissabores compartilhados que muito contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Às minhas amigas de sempre Mirian Watanabe e Cassiane Dezoti da Fonseca pelo apoio incondicional durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

À funcionária do Laboratório Experimental de Modelos Animais-LEMA da Escola de Enfermagem, Neusa da Silva Oliveira, agradeço pela amizade, carinho e por ter estendido as mãos em um momento muito difícil de minha vida. Hoje tenho a certeza de que Deus coloca anjos em nosso caminho.

Ao meu amigo André Luiz Baptiston Nunes pela amizade, carinho e por literalmente ter segurado em minha mão para a execução da técnica de ligadura e punção do ceco, pois sem isso nada seria possível.

À minha gerente de enfermagem Sandra Maria Degrande pelo apoio, compreensão e por ter concordado com minhas ausências no hospital, sem as quais este trabalho não poderia ter sido concluído.

Ao Prof. Francisco Soriano por ter aberto as portas do seu laboratório para que parte desta pesquisa pudesse ser realizada. Obrigada ainda pela contribuição nesta tese com sua experiência em pesquisa experimental.

A bióloga Denise Fredine pelo tempo dispensado na realização da técnica para dosagem das citocinas e por toda paciência durante este período.

A equipe de enfermagem da UTI-adulto e UTI cardiológica do Hospital São Luiz Anália Franco pelos vários momentos em que precisei me ausentar.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

VASCO, C.F. Lesão renal aguda induzida pela sepse e potenciais terapias renoprotetoras [tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2017.

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação comum no paciente grave e está associada à alta mortalidade, tendo a sepse como o mais prevalente fator de risco em pacientes críticos. A LRA na sepse está envolvida com estresse oxidativo e vasoconstrição. Diversas medidas terapêuticas para minimizar os danos renais na sepse já foram investigadas, com destaque para os fármacos antioxidantes, e não se confirmaram como intervenção a ser incorporada na clínica. O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta inflamatória sistêmica na sepse, a função renal e os efeitos renoprotetores do vasodilatador cilostazol e dos antioxidantes n-acetilcisteína (NAC) e diosmina hesperidina no modelo de sepse experimental. Foram avaliados parâmetros sistêmicos, o perfil inflamatório renal, intestinal e pulmonar (TGF- α e interleucina 6-IL-6), a função renal (FR-*clearance* de creatinina), a geração urinária de peróxidos (PU) e a análise histopatológica dos rins. Foram utilizados ratos Wistar, machos, divididos em 5 grupos: Sham (controle); Sepse: sepse induzida pela técnica de ligadura e punção do cecon (LPC); Sepse+Cilostazol; Sepse+N-acetilcisteína (NAC) e Sepse+Diosmina. Os resultados mostraram que o grupo Sepse apresentou elevação de TGF- α e IL-6 e parâmetros globais como redução da temperatura e hipotensão que caracterizaram o padrão da sepse. Os grupos sepse, tratados ou não, mostraram redução da função renal, com diminuição do fluxo urinário e elevação do parâmetro oxidante analisado, os PUs. Apenas o grupo Sepse+Diosmina demonstrou atenuar a redução da FR desencadeada pela sepse e redução dos PUs na comparação ao grupo Sepse. Todos os grupos sepse apresentaram alterações histológicas renais. O estudo confirmou a LRA por sepse, sendo que apenas o fármaco diosmina hesperidina contribuiu para a melhora da função renal e redução do estresse oxidativo.

PALAVRAS-CHAVE: Sepse. Lesão Renal Aguda. Rato. Antioxidante. Vasodilatador. Renoprotetor. Enfermagem

VASCO, C.F. Acute kidney injury induced by sepsis and potential renoprotective therapies [thesis]. São Paulo: School of Nursing, University of São Paulo; 2017.

ABSTRACT

Acute renal injury (AKI) is a common complication in critically ill patient and it is associated with high mortality, with sepsis being the most prevalent risk factor for renal failure in critically ill patients. LRA in sepsis is involved with oxidative stress and vasoconstriction. Therapeutic initiatives aimed at minimizing renal damage in sepsis were not confirmed. This study evaluated the systemic inflammatory response in sepsis, renal function and renoprotective effects of the vasodilator cilostazol and the antioxidants n-acetylcysteine (NAC) and diospenes hesperidin. Systemic parameters, the inflammatory renal, in the intestine and in the lungs profile (TGF- α and interleukin 6-IL-6), renal function (RF-creatinine clearance), urinary peroxides generation (PU) and histopathological analysis of the kidneys were performed. Male Wistar rats were divided into 5 groups: Sham (control); Sepsis: sepsis induced by the technique of ligation and puncture of the cecon (LPC); Sepsis+cilostazol; Sepsis+N-acetylcysteine (NAC) and Sepsis+diosmin. The results showed that the Sepsis group presented elevation of TGF- α and IL-6 and global parameters such as temperature reduction and hypotension characterizing the sepsis pattern. Sepsis groups showed reduced renal function and urinary flow and elevation on UPs. The Sepsis+Diosmina group was the only one to attenuate RF reduction and PU reduction when compared to the Sepsis group. All sepsis groups had renal histological changes. The study confirmed that sepsis induces AKI, being diosmin hesperidin the only agent to contribute to the improvement of renal function and reduction of oxidative stress.

KEY WORDS: Sepsis. Acute kidney Injury. Mouse. Antioxidant. Vasodilator. Renoprotective. Nursing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Algorítmico organizacional para os critérios clínicos de sepse e choque séptico	2
Figura 2 – Análise histológica do rim esquerdo do grupo Sham	26
Figura 3 – Análise histológica do rim esquerdo do grupo Sepse	26
Figura 4 – Análise histológica do rim esquerdo do grupo Sepse + cilostazol	27
Figura 5 – Análise histológica do rim esquerdo do grupo Sepse + n-acetilcisteína	27
Figura 6 – Análise histológica do rim esquerdo do grupo Sepse + diosmina	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados dos parâmetros fisiológicos sistêmicos dos grupos Sham; Sepses: Sepses+NAC; Sepses+Cilostazol e Sepses+Diosmina	22
Tabela 2 – Resultados dos parâmetros de função renal dos grupos Sham, Sepses; Sepses+NAC; Sepses+Cilostazol e Sepses+Diosmina	23
Tabela 3 – Resultados dos peróxidos urinários dos grupos Sham, Sepses; Sepses+NAC; Sepses+Cilostazol e Sepses+Diosmina	24

LISTA DE ABREVIATURAS

et al	e colaboradores
E	esquerda
h	hora
vs.	versus
i.p.	intra-peritoneal
e.v.	endovenoso
g	grama

LISTA DE SIGLAS

UTI	Unidade de terapia intensiva
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
FR	frequência respiratória
lpm	inspirações por minuto
RPM	respirações por minuto
PCO ₂	pressão de gás carbônico
PaO ₂	pressão de oxigênio
TNF- α	fator de necrose tumoral α
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
NK	célula natural killer
PAF	fator ativador de paquetas
LPS	lipopolissacarídeo
LRA	lesão renal aguda
RIFLE Failure	Risk, Injury, Failure, Loss and End-Stage Renal
AKIN	Acute Kidney Injury Network
CIVD	coagulação intravascular disseminada

NTA	necrose tubular aguda
NO	óxido nítrico
iNO	óxido nítrico indutível
Na/Katpase	sódio potássio atpase
EROs	espécies reativas de oxigênio
NAC	n-acetilcisteína
SOD	super oxido dismutase
CAT	catalase
GPx	glutathione peroxidase
CD62P	glicoproteína P seletiva
CD 63	antígeno 63
TXB ₂	tromboxano 2
VCAM-1	molécula de adesão da célula vascular 1
ICAM-1	molécula de adesão 1
MCP-1	proteína quimiotática de monócito 1
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
LPC	ligadura e punção do cecum
LEMA	laboratório experimental de modelo animal
Clcr	clearance de creatinina
PAM	pressão arterial média
CRp	creatinina plasmática
CRu	creatinina urinária
Vu	volume urinário

Du	débito urinário
XO	xilenol Orange
BHT	butylato de hydroxitolina
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6(H ₂ O)	sulfato ferroso de amônia
HE	hematoxilina eosina
Rpm	respirações por minuto
G	glicemia
TC	temperatura corporal
PU	peróxidos urinários
PAS	coloração ácido periódico Schiff
BGN	bactéria gram negativa
MOFS	síndrome de falência de múltiplos órgãos
T-BARS	ácido tiobarbitúrico
MDA	malondealdeído
ATP	adenosina trifosfato
TFG	taxa de filtração glomerular
TRS	terapia renal substitutiva
FSR	fluxo sanguíneo renal
DRC	doença renal crônica
KDIGO	Diretrizes clínicas para o diagnóstico, avaliação, prevenção e tratamento do distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica
NF-Kappa β	Fator nuclear Kappa-β

SSC	Surviving Sepsis Campaign
EUA	Estados Unidos da América
SOFA	Sequential Organ Failure Assessments Score
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessments Score
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentos com animais
HE	Hematoxilina eosina

LISTA DE SÍMBOLOS

ml	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
°C	graus centígrados
ml/min	mililitros por minuto
mg/dl	miligramas por decilitro
ml/kg/h	mililitros por kilograma por hora
nm	nanômetro
mm	milímetros
mg/kg	miligramas por kilo
mmol	milimol
mg	miligramas
µl	microlitros
%	porcentagem
<	menor
>	maior
-	menos
±	mais ou menos
+	mais
≥	maior igual
uM	micromolar
nM	nanomolar

M	molar
P	nível de significância do resultado estatístico
n	número de animais estudados
nmol/gCr	nanomol por grama de creatinina
pg/mg prot	picograma de miligramas de proteínas

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos	12
3. Materiais e métodos	13
3.1 Dosagens de citocinas	15
3.2 Análise de glicemia	15
3.3 Mensurações de pressão arterial média (PAM) invasiva	16
3.4 Estudos para função renal: clearance de creatinina	16
3.5 Mensuração de peróxidos de hidrogênio urinários	17
3.6 Estudos histológicos dos rins	18
3.7 Local do estudo	18
3.8 Análise estatística	18
4. Resultados.....	20
4.1 Quantificação de mediadores inflamatórios: IL-6 e TNF- α no rim	20
4.2 Parâmetros fisiológicos: temperatura corporal (TC), pressão arterial média (PAM) e glicemia capilar (GC)	22
4.3 Função renal: clearance de creatinina (Clcr)	23
4.4 Metabólitos do estresse oxidativo: peróxidos urinários (PU)	24
4.5 Histologia dos rins	25
5. Discussão.....	30
6. Conclusões	37
7. Referências bibliográficas.....	38
8. Anexo	39

1. INTRODUÇÃO

A sepse é definida como uma disfunção de órgãos com risco de morte, causada por uma série desregulada de respostas à infecção, especialmente se não reconhecida e tratada rapidamente ^(1, 2). A Incidência e a prevalência de sepse tem aumentado globalmente nos últimos anos. A sepse tem se destacado como a causa mais frequente de internação em unidades de terapia intensiva (UTI), de readmissões hospitalares e a mais comum causa de morte. O *Global Burden of Disease*, um programa abrangente de pesquisa regional e global de carga de doença que avalia a mortalidade e a incapacidade de doenças, lesões e fatores de risco importantes, descreve que infecção é causa de morte em 10 milhões de pessoas por ano, e a sepse afeta entre 3 e 10 por mil pessoas anualmente em países desenvolvidos ⁽³⁾. Além da gravidade nata da síndrome, o grande número de complicações, com destaque para a lesão renal aguda (LRA), também compromete significativamente o prognóstico do paciente com sepse.

Em 2016, a *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), com o objetivo de padronizar a nomenclatura, definiu sepse como uma resposta inflamatória sistêmica à infecção, sendo a sepse severa ou grave descrita como aquela acompanhada de disfunção orgânica e anormalidades de perfusão (acidose láctica, oligúria, alterações do nível de consciência) na ausência de outras causas conhecidas para essas anormalidades, ou acompanhada de episódios de hipotensão (valores de pressão sistólica inferiores à 90mmHg ou redução de 40mmHg dos valores basais), sendo responsiva a hidratação vigorosa. O choque séptico é descrito como a sepse associada à hipotensão, não responsiva a hidratação vigorosa, que ocorre associada à disfunção orgânica e anormalidades de perfusão, na ausência de outras causas conhecidas para essas anormalidades. A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) é aquela deflagrada por infecção ou diversos outros insultos, tais como pancreatite, isquemia, trauma e choque hemorrágico. É caracterizada pela presença de ao menos dois dos seguintes parâmetros, hipotermia (temperatura corpórea inferior à 36°C) ou febre (superior à 38°C), taquicardia (frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto [bpm]), taquipnéia (frequência respiratória [FR] acima de 20 inspirações por minuto [ipm] ou pCO₂ abaixo de 32mmHg) e leucocitose, leucopenia ou se constatado mais do que 10% de formas imaturas de leucócitos no leucograma ⁽³⁾.

Em 2016, a revista JAMA publicou uma série de artigos atualizando as definições de sepse e choque séptico. Essa atualização mostrou-se necessária devido ao maior número de recursos de suporte à vida disponível nas UTIs, especialmente em países desenvolvidos e em decorrência do melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas disfunções celulares e moleculares relacionadas à sepse e que contribuem para morbidade e mortalidade associadas a essa síndrome (1,2).

A derivação e a validação inicial dos critérios para a atualização dos critérios de sepse envolveu a identificação de 148,907 casos com suspeita de infecção numa coorte de 1.3 milhões de atendimentos médicos registrados em prontuários eletrônicos em 12 hospitais da Pensilvânia, EUA. O passo seguinte consistiu em uma análise com 706,399 atendimentos em 165 hospitais norte-americanos e alemães onde dois escores demonstraram bom desempenho diagnóstico para a sepse: SOFA (sequential organ failure assessments score) e qSOFA (quick sequential organ failure assessments score) (1, 2).

As novas definições e os critérios de sepse permitiram a criação de um algoritmo organizacional para os critérios clínicos de sepse e choque séptico, conforme descrito na Figura 1 e significaram grande avanço na logística de atendimento ao paciente com sepse.

Fig. 1 Singer M, Deutschman C, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016;

Apesar do crescente desenvolvimento de diversos métodos diagnósticos e terapêuticos, a taxa de mortalidade relacionada à sepse permanece intocada, em torno de 30 a 40% há décadas. Se analisarmos grupos específicos como idosos e portadores de doenças crônicas, essa taxa se eleva a índices em torno de 70% ⁽³⁾.

A prevalência de sepse nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI's) brasileiras é de aproximadamente 20%, sendo a principal causa de morte em pacientes críticos com a incidência se elevando nos últimos anos. A taxa de mortalidade da sepse grave é muito elevada (em torno de 70%) com um alto custo para as instituições de saúde ⁽⁴⁾.

A principal consequência da resposta inflamatória na sepse é o comprometimento de muitos órgãos com evolução para a síndrome da insuficiência de múltiplos órgãos, que é acompanhada de mortalidade ainda mais elevada.

Quando a infecção ocorre, a primeira linha de defesa do hospedeiro são as células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares) e ativação de complementos, de maneira ainda inespecífica. No momento subsequente, as imunoglobulinas e as células imunocompetentes iniciam uma resposta imune específica ^(5, 6).

Os mecanismos envolvidos no choque e na lesão de órgãos induzidos no choque séptico são multifatoriais. Diversas respostas moleculares de inflamação e danos celulares podem estar implicados nesta patogênese, incluindo a geração de citocinas, espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico, ânions superóxido ou peroxinitrito. A geração de espécies reativas de oxigênio durante reperfusão após isquemia ou hipóxia ou por atividade de neutrófilos é mediadora de danos tissulares, perpetuando a lesão inicial ⁽⁷⁾.

Danos causados por radicais livres de oxigênio ocorrem via peroxidação lipídica em uma variedade de processos patológicos, incluindo o choque. Os componentes da parede bacteriana são os principais ativadores dessa resposta do hospedeiro, sendo eles as endotoxinas dos microorganismos gram-negativos e o ácido teicóico dos microorganismos gram-positivos. Esses componentes desencadeiam uma cascata inflamatória, sendo, inicialmente, liberados o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina-1 (IL-1), que estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de

mediadores secundários, com a quimiotaxia e ativação de granulócitos. Os mediadores secundários são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso inflamatório ⁽⁸⁾.

As citocinas são proteínas, em geral, com mais de 20kDa, que agem de diversas formas, podendo ativar a própria célula que a produziu, assim como outras células. Seus efeitos incluem indução de proliferação, quimiotaxia, apoptose e diferenciação celular, com ação sobre diferentes tipos celulares ⁽³⁾. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, as IL-1, IL-2, IL-8 e TNF- α são as de maior relevância e as mais estudadas em sepse. O TNF- α , produzido por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, NK e linfócitos T, é a primeira citocina liberada em resposta a endotoxemia, atingindo níveis séricos máximos uma a duas horas após a indução da sepse nos casos experimentais. O TNF- α induz a liberação de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, fator ativador de plaquetas (PAF), eicosanoides, antagonista do receptor de IL-1 e receptor de TNF solúvel. É um potente ativador de macrófagos e neutrófilos, induz proliferação celular e produção de moléculas de adesão por células endoteliais, levando à hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de neutrófilos nos pulmões, anorexia, diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico intestinal, hiperglicemia, alterações no perfil lipídico, acidose, coagulação e, por ação direta no hipotálamo, hiperpirexia ⁽³⁾. A IL-6, durante muito tempo, foi vista como uma citocina pró-inflamatória, induzida por lipopolissacarídeo (LPS), assim como outras citocinas, tais como TNF- α e IL-1. Embora seja utilizada frequentemente como um marcador de resposta sistêmica pró-inflamatória, ela apresenta também propriedades anti-inflamatórias. De fato, estudos recentes com camundongos knockout para IL-6 demonstraram que seu papel é predominantemente anti-inflamatório ⁽⁸⁾.

Como mencionado anteriormente, a sepse causa falência de múltiplos órgãos, dentre eles os rins, sendo que a taxa de mortalidade é maior no grupo com comprometimento prévio da função renal ⁽⁹⁾. A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação comum entre pacientes críticos internados em unidades de terapia intensiva (UTI). A incidência de LRA tem aumentado significativamente quando comparado com dados anteriores, sendo que mais de 50% dos pacientes desenvolvem LRA em algum momento durante o curso de sua internação ⁽¹⁰⁾.

A mortalidade entre pacientes internados em UTI com LRA e falência múltipla de órgãos foi relatada como sendo superior a 50%, podendo chegar à 80% nos pacientes que necessitam de terapia renal de substituição (TRS) ⁽¹⁰⁾.

A lesão renal aguda (LRA) é considerada o melhor termo para designar a condição na qual o declínio agudo da função renal é quase sempre secundário a uma lesão determinante de alterações estruturais e funcionais nos rins ⁽¹¹⁾. É diagnosticada clinicamente quando ocorre elevação da creatinina sérica de 0,3mg/dl e/ou oligúria menor ou igual a 0,5ml/kg/h por um período de 6 horas ⁽¹²⁾. Numerosas definições foram propostas para caracterizar a lesão renal aguda (LRA), resultando em grande discrepância no relatório de incidência de LRA. Essa heterogeneidade de dados tornou a comparação entre vários estudos publicados com foco em LRA difícil e, em muitos casos, impossível. O desenvolvimento de dois novos sistemas de classificação para a LRA na última década, RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, and End-Stage Renal Failure) e AKIN (Acute Kidney Injury Network) proporcionou maior uniformidade entre dados de pesquisas e conhecimento mais preciso sobre a epidemiologia da LRA, demonstrando maior sensibilidade e especificidade no seu diagnóstico e estratificação ⁽¹³⁾.

Recentemente, as classificações RIFLE e AKIN foram mescladas e foi proposta a classificação KDIGO (Diretrizes clínicas para o diagnóstico, avaliação, prevenção e tratamento do distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica), com o objetivo de fornecer informações integradas com critérios simplificados para a clínica, para a pesquisa e vigilância da saúde pública. Nesta classificação, a severidade foi estratificada da mesma maneira que no AKIN, exceto por uma simplificação dos critérios necessários para atingir o estágio 3. Teoricamente, o KDIGO oferece vantagens sobre os outros dois sistemas na identificação de pacientes com LRA e na previsão do desfecho ^(13, 14). Assim sendo, a classificação KDIGO é de recomendação atual internacional para a identificação da LRA.

Um estudo prospectivo multicêntrico incluindo 29.269 pacientes graves revelou que a ocorrência de lesão renal aguda em UTI foi de aproximadamente 6%, sendo que a sepse foi o fator que mais contribuiu para esse quadro (50%) ⁽¹³⁾. Considerando que a ocorrência de LRA hospitalar isolada é rara, essa prevalência eleva-se a cada

associação com outra condição grave. Outros estudos mostraram que 45% a 70% das LRAs estão associadas aos quadros sépticos ⁽⁵⁾.

A patogênese da LRA na sepse é considerada multifatorial ^(15, 16). Diferentes mecanismos fisiopatológicos têm contribuído para o seu desenvolvimento como a hipoperfusão glomerular, a alteração da circulação da rede de capilares peritubulares, a reação inflamatória causada pelas citocinas sistêmicas ou pela produção de citocinas locais ⁽¹⁷⁾ e a disfunção tubular induzida pelo estresse oxidativo ^(18, 19). A relação entre a oferta de oxigênio, consumo e oxigenação tecidual, com especial atenção para as consequências funcionais e resposta biológica nesse cenário ainda é pouco compreendida ⁽¹⁹⁾.

Há que se considerar ainda que a LRA na sepse pode ter como causa a nefrotoxicidade por medicamentos, como os antibióticos. A fisiopatologia da LRA na sepse e no choque séptico resulta de isquemia renal secundária a vasoconstrição e fluxo sanguíneo renal inadequado, entre outros. Os mecanismos que podem estar direta ou indiretamente associados são a alteração na hemodinâmica com subsequente vasoconstrição renal levando a isquemia e hipóxia tissular, hiperglicemia causando alteração funcional nos leucócitos e macrófagos induzindo a inflamação e ativação da cascata fibrinolítica ativando a coagulação intravascular disseminada (CIVD) e trombose microvascular ⁽²⁰⁾.

Evidências experimentais confirmam que a falência renal precoce na sepse tem como fator determinante a vasoconstrição renal com função tubular intacta, demonstrada pelo aumento da reabsorção de água e sódio pelo túbulo. A hipoperfusão renal secundária à redução do fluxo sanguíneo renal leva à isquemia e necrose tubular aguda (NTA). Sendo assim, a intervenção precoce como medida para preservar o fluxo renal pode prevenir a evolução para NTA. Em alguns casos de sepse com volemia adequada e débito cardíaco aumentado, observa-se declínio do fluxo sanguíneo devido à vasoconstrição local e redistribuição do fluxo sanguíneo renal ^(3, 20). Em outros casos, há vasodilatação dos vasos renais acompanhando a vasculatura sistêmica independente da diminuição do fluxo sanguíneo renal. A ativação do sistema simpático e do eixo renina-angiotensina-aldosterona, a liberação de vasopressina e o aumento do débito cardíaco são essenciais na manutenção da integridade da vasculatura arterial na sepse e no choque séptico. O débito cardíaco é fator determinante para manutenção do fluxo sanguíneo renal. Sendo assim, podemos

dizer que há alterações hemodinâmicas e não hemodinâmicas envolvidas na patogênese da LRA na sepse^(3, 21).

A síntese de óxido nítrico (NO) e a geração de radicais livres de oxigênio causam lesão tubular relacionada ao peroxinitrito também estão envolvidas no rim da sepse havendo evidências de que são responsáveis por induzir alteração celular e apoptose tubular. A síntese de NO provoca vasodilatação sistêmica e diminui a regulação da síntese de NO endotelial. A endotoxemia pode aumentar a síntese de NO induzido (iNO) dentro do rim, onde há várias células com essa capacidade como as células epiteliais tubulares, células mesangiais e macrófagos.

Os efeitos do NO sobre o rim durante a sepse são complexos. As várias células renais podem produzir altos níveis de NO seguidos de citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos induzindo a síntese de iNO. Estas células incluem as epiteliais tubulares proximais, células mesangiais e macrófagos. As células tubulares renais podem sofrer lesão por isquemia ou por agentes citotóxicos ⁽²¹⁾. Há nesses casos lesões celulares com e sem morte celular. Entre as lesões com morte estão descritas a necrose e a apoptose. Estudos *in vitro* têm mostrado que as citocinas induzem alterações tubulares específicas em células do citoesqueleto e em suas funções. Isso inclui perda da polaridade e da borda em escova, aumento da permeabilidade epitelial, alteração no transporte do soluto e redistribuição apical e basolateral da bomba Na/K-ATPase (causando edema celular), além de dissolução da integrina, mediada por molécula de adesão. Essas se caracterizam por lesões sem morte. A evolução dessa lesão pode induzir a necrose ou apoptose, quando as células tubulares destacam-se da membrana basal para a luz, causando obstrução tubular, aumentando a pressão intratubular e o escape do filtrado glomerular para fora do túbulo em direção ao interstício e veias renais ⁽²¹⁾. Além disso, neutrófilos ativados acumulados dentro dos capilares tubulares interagem com o endotélio vascular, causando disfunção endotelial, ativação da coagulação e lesão celular tubular. A liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes dos neutrófilos podem induzir alterações da célula tubular. A endotoxina ativa os neutrófilos, que através da lesão causada pela reperfusão após um período de hipoperfusão estimulam a produção de EROs. Experimentos indicam que as EROs estão intimamente relacionadas com nefropatia por contraste e são conhecidas por causarem dano glomerular em vários modelos de isquemia renal e inflamação, como no caso da LRA induzida pela sepse ^(15, 22, 23).

A LRA na sepse grave ou choque séptico, na maioria dos casos, inicia-se com alteração do débito urinário, sendo a oligúria a mais frequente. O rim se apresenta como o terceiro sistema comprometido, antecedido apenas pelo sistema cardiovascular e pulmonar. A oligúria pode ser revertida com medidas terapêuticas, porém nem sempre com sucesso. A evolução da LRA mostra alterações dos marcadores sanguíneos como uréia e creatinina ^(10, 21). Esses conceitos fisiopatológicos organizam movimentos celulares, moleculares e funcionais na sepse que induzem a LRA, no entanto, pouco se definiu até o momento com relação a medidas renoprotetoras ou intervenções terapêuticas que tenham impacto na evolução da sepse e que evitem a ocorrência da LRA.

Nesse sentido, na busca por tratamentos que atenuem os danos renais decorrentes de diversas causas, seja de origem nefrotóxica, isquêmica ou séptica e considerando os efeitos vasoconstritores e o estresse oxidativo induzido pelo desequilíbrio entre EROS e enzima antioxidantes, alguns estudos experimentais e clínicos utilizando vasodilatadores e antioxidantes foram realizados. Dentre os antioxidantes utilizados na clínica e em modelos experimentais, destaca-se a N-acetilcisteína (NAC). Recentes estudos sugerem que as suas propriedades vasodilatadoras e antioxidantes confirmam-se como protetoras da função renal em situação de exposição ao contraste iodado, por melhorar a hemodinâmica renal e minimizar os danos tissulares oxidativos diretos ^(9, 24). A NAC é um composto de tiol com propriedades antioxidantes e vasodilatadoras que pode proteger o tecido por efeito antioxidante direto, além de aumentar a concentração de antioxidantes endógenos como a glutathione intracelular.

Considerando os possíveis mecanismos que podem levar à LRA, seja estresse oxidativo ou vasoconstrição, é possível vislumbrar algumas medidas terapêuticas com efeitos vasodilatadores e antioxidantes que podem contribuir para a proteção renal ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

A diosmina hesperidina é um flavonóide insaturado, um polifenol biologicamente ativo que possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, anti-hiperglicêmico e antimutagênicas. Atua sobre o sistema venoso, diminuindo a distensibilidade e a estase venosa, melhorando o tônus venoso na microcirculação, normalizando a permeabilidade e reforçando a resistência dos vasos capilares, resultando em diminuição do edema de origem venosa. Os flavonóides são compostos

polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos, dentre outros ⁽²⁸⁾. Em modelo murino, Ahmed e colegas mostraram o papel renoprotetor da diosmina na nefropatia induzida por aloxano ⁽²⁹⁾.

Srinivasan S e Pari L (2012) investigaram a ação antioxidante da diosmina no Diabetes Mellitus, também em modelo murino. Os resultados mostraram que a diosmina atua no estresse oxidativo, revertendo a baixa atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) ⁽²³⁾.

Silambarasan T e Raja B (2012) estudaram um modelo de hipertensão pós nefrectomia unilateral com o tratamento com diosmina. Nos animais tratados, observou-se redução da pressão arterial, assim como elevação significativa da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Os achados de resposta renoprotetora da diosmina se repetiram na histologia renal e no coração ⁽²⁴⁾.

O cilostazol é um inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo III com ação vasodilatadora, antiagregante plaquetária e antitrombótica. É considerado fármaco de primeira escolha na claudicação venosa intermitente devido à doença arterial obstrutiva periférica. Este medicamento parece ter efeito benéfico na sensibilidade à insulina, podendo ser útil na nefropatia glomerular precoce e nos estados de hiperinsulinemia. Na nefropatia diabética de seres humanos, o cilostazol diminuiu significativamente as micropartículas derivadas das plaquetas, produzidas pela ativação plaquetária, e a relação CD62P/CD63 (glicoproteína P-seletiva/antígeno 63), podendo apresentar efeito benéfico nas complicações trombóticas do Diabetes Mellitus ligadas à nefropatia. O cilostazol atuou também o TxB-2 (tromboxano 2) melhorando a nefropatia diabética ^(30, 31). Em ratos, o cilostazol melhorou o fluxo sanguíneo e a sensibilidade à insulina, apesar de não diminuir a gordura abdominal ou níveis de glicose ⁽²⁹⁾. Além disso, normalizou a hiperfiltração e diminuiu a microalbuminúria por atenuar a nefropatia glomerular sem modificar o peso renal ou a massa glomerular ⁽³²⁾.

Wang F et al (2008) analisaram a ação do cilostazol na nefropatia diabética induzida por estreptozocina. Os resultados deste estudo demonstraram que o cilostazol apresenta efeito renoprotetor que pode se caracterizar por ação anti-

inflamatória, incluindo inibição da ativação da NF-kappa β e subsequente diminuição dos fatores pró-inflamatórios como a expressão de VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1), ICAM-1 (moléculo de adesão 1), MCP-1 (proteína quimiotática de monócito 1) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) nos rins dos ratos diabéticos ⁽³³⁾.

Na última década, a sepse grave e o choque séptico têm sido objetos de diversos estudos que significou avanço nos dados científicos disponíveis relativos a essa síndrome. Apesar de existirem algumas publicações que descrevem o modelo de sepse experimental por meio da ligadura e punção do ceco (LPC) ^(34, 35) com o objetivo de estudar o rim, não há dados concretos sobre o efeito do tratamento com fármacos antioxidantes e vasodilatadores na lesão renal aguda induzida pela sepse. Peng et al 2012 descreveram que a lesão renal induzida pela sepse por meio da técnica de LPC em ratos e compararam o grupo medicado com antibiótico com o grupo placebo, mostrando que os grupos tratados com antibiótico demonstraram maior inflamação renal, porém com maior sobrevida ⁽³³⁾. A sepse como doença extremamente heterogênea é de difícil reprodução em laboratório. Para um tratamento mais eficaz, evitando disfunções de órgãos vitais, tais como o rim, talvez seja necessário o uso combinado de diversos fármacos, assim como a estratificação dos pacientes em diversos grupos, buscando particularizar a gravidade de cada indivíduo e buscar a intervenção mais adequada.

A hipótese desse estudo é que o emprego de estratégias de proteção como antioxidantes ou vasodilatadores podem ter impacto no resgate ou na prevenção da LRA por sepse.

Algumas intervenções podem diminuir a incidência de LRA na sepse tais como terapia precoce como o controle da glicemia, evitar uso de medicamentos nefrotóxicos e ajustar antibióticos e outros medicamentos de acordo com a depuração de creatinina, além do cuidado com os exames contrastados. Para isso, o enfermeiro tem um papel de relevância na identificação dos riscos, contribuindo na intervenção e evitando, juntamente com os outros profissionais, a evolução da doença para disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.

Estudos experimentais relacionados à identificação de possibilidades farmacoterapêuticas que possam ser aplicadas na clínica se justificam pela ausência,

até o momento, de medidas que tenham gerado impacto na epidemiologia dessa síndrome e confirmam a necessidade da identificação de novas intervenções que possam reduzir o curso natural da LRA e evitar formas mais graves com suporte de terapia renal substitutiva, além de promover melhora na sobrevida do paciente crítico com LRA decorrente da sepse.

2. OBJETIVOS:

- ✓ Padronizar o modelo de sepse experimental, utilizando a técnica de ligadura e punção de cécum.
- ✓ Caracterizar a sepse em ratos por meio de marcadores sistêmicos e a resposta inflamatória nos rins, intestino e pulmões.
- ✓ Caracterizar o efeito da sepse sobre a função renal de ratos.
- ✓ Avaliar o efeito de agentes antioxidantes e vasodilatadores sobre a função renal, perfil oxidativo renal e histologia renal em ratos submetidos à sepse;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental em ratos com abordagem quantitativa. O estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, sob protocolo 92, na página 106, livro 02.

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Modelos Animais-LEMA da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados 45 ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 250g a 320g. Os animais foram divididos em 5 grupos de 9 ratos.

A reprodução do modelo de sepse em ratos foi feita realizada por meio da técnica de ligadura e punção do ceco (LPC), considerado modelo padrão para esse fim, pois mimetiza a natureza e o curso clínico da sepse ^(34, 35). Nesta técnica, após os animais terem sido anestesiados, foram submetidos a laparotomia mediana, por incisão de aproximadamente dois centímetros no abdômen, abrangendo pele, plano músculo-aponeurótico e peritônio, expondo as vísceras abdominais. O ceco foi ligado abaixo da válvula ileocecal com obstrução total objetivando aumentar a pressão dentro deste segmento do intestino, sem provocar isquemia, e não permitir o livre trânsito do conteúdo do intestino delgado para o intestino grosso. Após a ligadura, o ceco foi perfurado com agulha de punção venosa, seguida de pressão digital gentil da alça intestinal, para a certificação de o extravasamento das fezes na cavidade abdominal, e, por fim, foi recolocado no abdome. Ao final do experimento, a cavidade abdominal foi suturada.

Em todos os grupos foram avaliados parâmetros sistêmicos e específicos da função renal associados à sepse, quais sejam a temperatura corporal, a pressão arterial média (PAM), a glicemia, o *clearance* de creatinina e a concentração de peróxidos de hidrogênio urinário. Os resultados obtidos no grupo controle foram considerados valores normais de referência para a função renal.

Os animais foram randomizados e agrupados da seguinte forma:

- ✓ **Grupo Sham (controle):** animais submetidos apenas à laparotomia (após anestesia padronizada descrita a seguir), porém sem a realização do modelo experimental de sepse ou qualquer outro tipo de tratamento;
- ✓ **Grupo Sepse:** os animais submetidos à laparotomia para realização da LPC ⁽³⁴⁻³⁶⁾.
- ✓ **Grupo Sepse+NAC (N-acetilcisteína):** animais receberam NAC (150mg/kg, gavagem, dose única), 30 minutos antes da LPC.
- ✓ **Grupo Sepse+Cilostazol:** animais receberam Cilostazol (8 mg/kg, gavagem, dose única), 30 minutos antes da LPC.
- ✓ **Grupo Sepse+Diosmina:** os animais receberam Diosmina Hesperidina (13mg/kg, gavagem, dose única), 30 minutos antes da LPC.

Após o procedimento cirúrgico, os animais de cada grupo permaneceram em gaiola metabólica por 24 horas para a coleta de urina e posterior dosagem de creatinina urinária e pesquisa de estresse oxidativo por meio da mensuração de peróxidos de hidrogênio urinários pelo método FOX II ⁽³⁷⁾. Ao final de 24 horas, os animais foram novamente anestesiados com Tiopental (50mg/Kg) para realização de laparotomia, pela mesma incisão, puncionando a artéria aorta para verificação da pressão arterial média por monitor multiparâmetros (DIXTAL) e posterior coleta de sangue para determinação de glicemia e creatinina sérica para a realização do cálculo do clearance de creatinina pelo método de Jaffé ⁽³⁸⁾.

A temperatura retal foi mensurada com termômetro digital convencional antes da laparotomia. O rim esquerdo (E), devido a facilidade de acesso do ponto de vista anatômico, foi retirado para a realização de estudo histológico. Ao final dos procedimentos, os animais foram eutanasiados de acordo com as normas de recomendação para utilização de animais de experimentação.

Foi realizado o estudo de imunohistoquímica por meio da técnica ELISA ⁽³⁹⁾ no grupo que apresentou melhores resultados frente aos tratamentos adotados, analisados por meio da função renal. As doses dos medicamentos foram calculadas tendo como base o peso médio dos animais, usando como referência as doses estabelecidas para seres humanos adultos.

3.1. Dosagens de citocinas

Preparo das amostras de pulmão, rim e intestino para dosagem de TNF- α e IL-6 por ELISA ⁽³⁹⁾.

A extração protéica dos pulmões, intestinos e rins foi realizada por meio da pulverização em gral de aço inoxidável e pistilo de cerâmica em nitrogênio líquido e ressuspensos em 1 ml de tampão de lise de proteínas (NP40- NP40 10%; glicerol 10%; NaCl 135mM; Tris 20mM; PMSF 1mM). As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo gangorra por 1 hora em gelo e centrifugadas a 10000 rpm por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado a -80°C até o momento da dosagem.

A quantificação de proteína total foi realizada por meio do método de Badford (Bio Agency®) nos homogenatos dos órgãos.

Quantificação TNF- α e IL-6 por ELISA ⁽³⁹⁾

As dosagens dos mediadores inflamatórios foram realizadas pelo método de ELISA com os kits Duo Set (R&D Systems®) TNF- α (DY 510), IL-6 (DY506).

A densidade óptica das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Genius – TECAN) com filtro de 450nm. As concentrações das citocinas (pg/mL) encontradas em pulmão, intestino e rim foram normalizadas pelas concentrações de proteína total.

3.2. Análise de glicemia:

A amostra sanguínea para dosagem da glicemia sérica dos animais foi obtida da artéria aorta. Foram utilizados o aparelho Metrolab CM 2300 Plus, o calibrador *A plus* da Wiener e kit da marca Wiener® para dosagem. Foi realizado controle com o kit Standratol SE em dois níveis, normal e patológico, da marca Wiener. Estas dosagens foram realizadas no laboratório veterinário Labvet.

3.3. Mensurações da Pressão arterial média (PAM) invasiva

A mensuração da pressão arterial média (PAM) foi realizada por meio da punção direta da artéria aorta, na bifurcação com as artérias ilíacas direita e esquerda com scalp 21.

O scalp foi conectado a um sistema de coluna d'água (domus transdutor) ligado a um cabo de pressão arterial invasiva ao monitor multiparâmetros da marca DIXTAL.

3.4. Estudos para função renal: *clearance* de creatinina

A função renal (FR) dos animais foi dada através da mensuração do clearance de creatinina (Clcr), utilizando os valores de creatinina sérica e urinária, calculados através do método de Jaffé ⁽³⁸⁾, obtido por meio da fórmula apresentada a seguir:

$$\text{Clcr} = \frac{\text{Vu (volume urinário)} \times \text{Cru (creatinina urinária)}}{\text{CRp (creatinina plasmática)}}$$

Sendo: Clcr = clearance de creatinina

Para a mensuração do volume urinário, os animais permaneceram em gaiola metabólica por 24h, onde é possível realizar a coleta da urina neste período. A creatinina foi dosada na amostra retirada através da punção da artéria aorta ao final das 24h.

3.5. Mensurações de peróxidos de hidrogênios urinários

Os peróxidos são encontrados em todos os fluídos corporais, especialmente na urina. Alterações de seus níveis são consideradas como marcadores de geração de H_2O_2 ou preditores da extensão da lesão oxidativa *in vivo* ⁽³⁸⁾. A mensuração direta de peróxidos pode ser realizada através do método de análise FOX-2 ⁽³⁷⁾.

O método FOX-2 consiste na determinação dos níveis de peróxido pelo método ferro-xilenol laranja. Os peróxidos são considerados como potenciais indicadores da formação ou resultantes das moléculas reativas de oxigênio.

Os peróxidos oxidam o íon Fe^{2+} para íon Fe^{3+} quando diluídos em solução ácida, como descrita na reação abaixo:

O xilenol laranja apresenta alta seletividade para o íon Fe^{3+} , produzindo um complexo de coloração azul-arroxeadado ($\alpha = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^(19, 37).

A preparação da solução obedeceu à seguinte ordem para realização do método de xilenol laranja versão 2 (FOX-2):

- 90 ml de metanol e 10 ml de água bidestilada;
- 100 μM de xilenol laranja;
- 4 mM de BHT;
- 25 mM da solução de ácido sulfúrico;
- 250 μM de sulfato ferroso de amônio (Vetec Química – RJ, Brasil).

A resultante da somatória dos reagentes acima consistiu na solução FOX. Na etapa seguinte, 100 μl da amostra urinária fresca foi acrescentada em 900 μl da solução FOX-2. A solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 560 nm, após a retirada de resíduos de proteínas ou outros materiais da centrifugação. Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos/grama creatinina.

3.6. Estudos histológicos dos rins

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE)⁽⁴⁰⁾. A análise histológica que foi realizada através de microscopia óptica visou determinar se a sepse proporcionou alterações estruturais nos rins, assim como o impacto dos tratamentos realizados sobre o tecido renal submetido à sepse.

Todos os rins foram examinados pela mesma patologista que desconhecia o tratamento dado aos animais, configurando uma análise histológica cega.

3.7 Local do Estudo

Esse estudo foi realizado no Laboratório experimental de Modelos Animais (LEMA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

3.8. Análise Estatística

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e mediana – análise de variância (ANOVA), para comparar todas as médias em um único teste e visando identificar a existência de ao menos uma diferença entre os grupos. Para as médias corrigidas pelo peso e a comparação dos grupos 2 a 2 foi utilizado o teste de Bon Ferroni⁽⁴¹⁾.

Para as variáveis qualitativas foram calculadas frequências absolutas e relativas. Para a análise estatística da histologia foi utilizado o teste qui-quadrado, para comparar duas ou mais populações com relação a uma variável categórica e verificar se existe associação entre duas variáveis qualitativas.

A análise das citocinas foi realizada através do teste de ANOVA – pós-teste de Tukey-Kramer ⁽⁴¹⁾.

Em todas as análises estatísticas foi utilizado o software SPSS. Em todas as comparações foi considerado o risco < 5% de cometer o erro α ou tipo I, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação de mediadores inflamatórios: IL-6 e TNF- α no rim.

O **Gráfico 1** demonstra a quantidade dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α presentes nos rins analisados, onde evidenciou-se um aumento dos marcadores inflamatórios no grupo Sepse quando comparado ao grupo Sham, no entanto apenas a IL-6 mostrou-se estatisticamente significativa.

Gráfico 1: Resultados dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α nos rins dos animais dos grupos Sepse e Sham.

Sendo ^a $p < 0,05$ versus Sham

No **Gráfico 2** podemos evidenciar a expressão dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α nos intestinos dos animais estudado. Também foi evidenciado aumento dos marcadores inflamatórios no grupo Sepse quando comparado ao grupo Sham.

Gráfico 2: Resultados dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α nos intestinos dos animais dos grupos Seps e Sham

Sendo ^ap < 0,05 versus Controle

O **Gráfico 3** mostra a expressão dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α nos pulmões dos animais estudados. Neste órgão, a expressão da IL-6 foi expressivamente maior no grupo Seps quando comparado ao grupo Sham. O mesmo não ocorreu com relação ao mediador inflamatório TNF- α , sendo que este foi menor no grupo Seps quando comparado ao grupo Sham.

Gráfico 3: Resultados dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α nos pulmões dos animais dos grupos Seps e Sham.

Sendo:

^ap < 0,05 versus Controle

4.2 Parâmetros fisiológicos: Temperatura corporal (TC), Pressão arterial média (PAM) e Glicemia Capilar (GC).

A **Tabela 1** demonstra parâmetros fisiológicos temperatura corporal (TC), pressão arterial média (PAM) e glicemia sérica (GS) dos diversos grupos.

O grupo Seps induzida por meio da LPC apresentou redução significativa da TC e PAM em relação ao grupo Controle (Seps: $34,0 \pm 0,7$ e 47 ± 08 vs Controle: $36,0 \pm 0,1$ e 88 ± 03 ; $p < 0,001$). Os grupos Seps apresentaram elevação nos níveis da GC em relação Sham, porém sem relevância estatística (Seps: 250 ± 44 ; Seps+NAC 174 ± 75 , Seps+Cilostazol 194 ± 61 , Seps+Diosmina 221 ± 51 vs Sham 148 ± 55).

Em relação aos demais grupos tratados, o grupo Seps+NAC apresentou aumento significativo da PAM quando comparado com o grupo Seps (Seps+NAC: 77 ± 15 vs Seps: 47 ± 08 ; $p < 0,05$). Os grupos Seps+Cilostazol e Seps+Diosmina apresentaram aumento significativo na TC e na PAM quando comparados ao grupo Seps (Seps+Cilostazol: $35,2 \pm 0,8$ e 81 ± 08 ; Seps+Diosmina: $36,0 \pm 0,1$ e 92 ± 6 vs Seps: $34,0 \pm 0,7$ e 47 ± 08 ; $p < 0,05$, respectivamente).

Tabela 1 – Resultados dos parâmetros fisiológicos sistêmicos dos grupos Sham; Sepses; Sepses+NAC; Sepses+Cilostazol e Sepses+Diosmina.

Grupos	n	TC (° C)	PAM (mmHg)	GC (mg/dl)
Sham	9	36,0±0,1	88±03	148±55
Sepses	9	34,0±0,7 ^a	47±08 ^a	250±44
Sepses+NAC	9	35,6±0,8	77±15 ^b	174±75
Sepses+Cilostazol	9	35,2±0,8 ^b	81±08 ^b	194±61
Sepses+Diosmina	9	36,0±0,1 ^b	92±06 ^b	221±51

Sendo: TC – temperatura corporal; PAM – pressão arterial média e GC – glicemia capilar.

^a p < 0,001 *versus* Controle.

^b p < 0,05 *versus* Sepses.

Os valores representam média ± desvio padrão.

4.3 Função Renal: *Clearance de creatinina (Clcr)*

Conforme apresentado na **Tabela 2**, os diversos grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao fluxo urinário. A função renal foi avaliada por meio do *clearance* de creatinina. O grupo Sepses apresentou redução significativa da função renal em relação ao grupo Sham (Sepses: 0,23 ± 0,04 vs Sham: 0,71 ± 0,04; p < 0,05).

Os grupos Sepses tratados com NAC ou Cilostazol apresentaram valores de *clearance* de creatinina semelhantes ao grupo Sepses (Sepses+NAC: 0,18±0,05; Sepses+Cilostazol: 0,27±0,08 vs Sepses: 0,23±0,04), enquanto que o grupo Sepses+Diosmina apresentou melhora significativa da função renal quando comparado ao grupo Sepses (Sepses+Diosmina: 0,40±0,07 vs Sepses: 0,23±0,04; p < 0,001), porém, o Sepses+Diosmina mantém diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo Sham, (Sepses+Diosmina: 0,40±0,07 vs Sham: 0,71 ± 0,04, p < 0,001).

Tabela 2 - Resultados dos parâmetros de função renal dos grupos Sham, Seps, Seps+NAC, Seps+Cilostazol e Seps+Diosmina.

Grupos	n	Fluxo urinário (mg/dl)	Creatinina Plasmática (mg/dl)	Creatinina Urinária (mg/dl)	Clearance Cr 100 gramas (ml/min)
Sham	9	0,073±0,001	0,38±0,02	104,9±8,3	0,71 ± 0,04
Seps	9	0,012±0,006 ^a	0,81±0,18	41,3±7,8 ^a	0,23 ± 0,04 ^a
Seps+NAC	9	0,010±0,003 ^a	0,74±0,20	38,1±7,9 ^a	0,18 ± 0,05 ^a
Seps+Cilostazol	9	0,019±0,003 ^a	1,16±0,85 ^a	31,0±11,0 ^a	0,27 ± 0,08 ^a
Seps+Diosmina	9	0,008±0,002 ^a	0,85±0,11	94,0±8,0 ^b	0,40 ± 0,07 ^{ab}

Sendo: Cr – creatinina.

^a p < 0,001 *versus* Controle.

^b p < 0,001 *versus* Seps.

Os valores representam média ± desvio padrão

4.4. Metabólitos do estresse oxidativo: Peróxidos Urinários (PU).

A **Tabela 3** representa os valores de PU dos diversos grupos. Os valores apresentados pelo grupo Sham foram considerados como referência de normalidade (Sham: 2,95±0,7).

Os PUs mostraram-se significativamente elevados nos grupos Seps, Seps+NAC, Seps+Cilostazol em relação ao grupo Sham (Seps:13,89±2,11; Seps+NAC: 9,05±2,65; Seps+Cilostazol: 13,27±3,06 vs Sham: 2,95±0,7, p < 0,05), sendo que o grupo Seps+NAC mostrou redução desse parâmetro na comparação com o grupo seps. O tratamento com diosmina, observado pelos resultados do grupo Seps+Diosmina, resultou em redução significativa dos PUs, quando comparado a todos os outros grupos, com ou sem tratamento. Adicionalmente, o grupo Seps+Diosmina mostrou redução desse parâmetro, tendo se comportado como o

grupo Sham, tendo sido, portanto, o tratamento que mostrou efeitos antioxidantes mais relevantes nesse protocolo.

Tabela 3 – Resultados de peróxidos urinários (PU) dos grupos: Sham, Sepsé, Sepsé+NAC, Sepsé+Cilostazol e Sepsé+Diosmina.

Grupos	n	PU (nmol/ grama de Cr urinária)
Sham	4	2,95±0,70
Sepsé	4	13,89±2,11 ^a
Sepsé+NAC	4	9,05±2,65 ^{ab}
Sepsé+Cilostazol	4	13,27±3,06 ^a
Sepsé+Diosmina	4	2,86±0,84 ^{bcd}

^a p < 0,05 *versus* Sham.

^b p < 0,05 *versus* Sepsé.

^c p < 0,05 *versus* NAC

^d p < 0,05 *versus* diosmina

Os valores representam média±desvio padrão.

4.5 Histologias dos rins

O **Quadro 1** descreve de forma resumida as principais alterações histopatológicas apresentadas pelos diversos grupos.

O grupo Sham não demonstrou alterações glomerulares ou tubulares nos cortes histológicos. Na **Figura 1**, demonstra-se o estudo histopatológico do rim esquerdo do grupo Sham, onde são evidenciadas membranas basais e bordadura em escova das células tubulares proximais, sem alterações hitopatológicas.

Por outro lado, o grupo Sepsé apresentou grau de isquemia glomerular discreto para moderado (**Figura 2**). Evidenciou-se também alterações evidentes como perda da bordadura em escova e presença de grânulos PAS positivos no citoplasma no grupo Sepsé+Cilostazol (**Figura 3**); acúmulo de material amorfo PAS positivo em região corticomedular no grupo Sepsé+NAC (**Figura 4**) e tumefação celular com

obliteração do lúmen tubular e congestão no grupo Sepse+Diosmina (**Figura 5**) ($p < 0,08$ vs Sham).

Quadro 1 – Descrição das alterações histopatológicas apresentadas no tecido renal dos diversos grupos.

Grupos	Histologia Renal						p
	Glomérulos isquêmicos	PAS	Tumefação celular tubular	Congestão	Grânulos PAS e células tubulares	Material PAS e amófo corticomedular	
Sham (n=5)	-	-	-	-	-	-	
Sepse (n=5)	+ / ++	+	++	+++	+	+	$p < 0,08$
Sepse+NAC (n=5)	+	+	+++	++	++	+++	$p < 0,08$
Sepse+Cilostazol (n=5)	+	+	++ / +++	+++	++	++	$p < 0,08$
epse+Diosmina (n=5)	+	++	+++	++	++	++	$p < 0,08$

Sendo: NAC - n-acetilcisteína; PAS – perda da bordadura em escova em túbulos proximais.

Legenda: (-) ausente, (+) discreto, (++) moderado, (+++) grave.

$p < 0,08$ vs Sham.

Conforme apresentado no quadro 1, todos os grupos Sepse, tratados ou não, apresentaram as mesmas lesões celulares, porém em maior ou menor intensidade, sem significância estatística entre eles.

Houve diferença estatística significativa em todos os grupos em relação ao grupo controle ($p < 0,08$).

Figura 1- Análise histopatológica do rim esquerdo do grupo **Sham** (aumento de 400x). Setas apontando a evidência de membranas basais e da bordadura em escova das células tubulares proximais

Figura 2 – Análise histopatológica do rim esquerdo do grupo **SEPSE** (aumento de 400x).
Mostra evidência de glomérulo isquêmico

Figura 3 – Análise histopatológica do rim esquerdo do grupo **Sepse+Cilostazol**. Alterações evidentes como a perda da bordadura em escova e presença de grânulos PAS-positivos no citoplasma (aumento de 1000x).

Figura 4 - Análise histopatológica do rim esquerdo do **grupo sepse + NAC**.

Acúmulo de material amorfo PAS – positivo em região corticomedular (aumento de 100x).

Figura 5 - Análise histopatológica do rim esquerdo do grupo **Sepse+Diosmina**. Observa-se tumefação celular com obliteração do lúmen tubular e congestão.

5 - DISCUSSÃO

A lesão renal aguda (LRA) é uma frequente complicação em pacientes graves internados em unidade de terapia intensiva (UTI), sendo a sepse o maior fator de risco para falência renal. A prevalência de LRA nos casos de sepse grave é de 25% chegando a 50% nos casos de choque séptico, ultrapassando 75% de mortalidade nos casos de lesão renal aguda. A sepse acomete 750.000 pessoas anualmente e mais de 210.000 delas morrem ^(25, 26).

A endotoxemia por bactérias gram negativas (BGN) determina inúmeras atividades biológicas. Em humanos e animais induz choque caracterizado por febre ou hipotermia, hipotensão, coagulação intravascular e falência múltipla de órgãos e sistemas (MOFS). MOFS é uma importante causa de morbidade e mortalidade, afetando 1% de todos os pacientes hospitalizados, sendo 20 a 30% dos pacientes das unidades de terapia intensiva^(3, 6).

A fisiopatologia da LRA por sepse é considerada multifatorial. A liberação inapropriada de vários mediadores inflamatórios e o desequilíbrio entre substâncias vasoativas causando efeito citotóxico direto que compromete a microvasculatura podem ser fatores determinantes ⁽³⁾.

Diferentes mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos para explicar a LRA na sepse como a hipoperfusão glomerular induzida pela vasodilatação, a desregulação na circulação da rede de capilar peritubular, a reação inflamatória mediada por liberação de citocinas sistêmicas ou a produção de citocinas locais e a indução de disfunção tubular induzida por estresse oxidativo^(3, 8).

Após a inoculação de endotoxinas, várias células do organismo começam a liberar citocinas inflamatórias que induzem respostas inflamatórias por meio da ligação a receptores específicos. A sequência clássica dessa síndrome é a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), seguido pelas interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), chamadas de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas TNF- α e IL-1 são os principais mediadores endógenos da resposta inflamatória. Em aproximadamente uma hora após a endotoxemia, ambos são secretados em grande quantidade na circulação, causando efeitos locais e à distância.

Altos níveis de TNF- α livre estão associados com morbidade e aumento da mortalidade no choque acompanhado de bacteremia por BGN. A liberação sistêmica

de TNF- α causa vasodilatação e perda de volume plasmático devido a um aumento da permeabilidade vascular, conduzindo ao choque. No choque séptico, a coagulação intravascular disseminada (CIVD) é igualmente deflagrada pelo TNF- α , levando à formação de coágulos nos pequenos vasos e ao consumo de proteínas da coagulação, de modo que o paciente perde a capacidade de coagular o sangue de maneira apropriada. Tal condição leva frequentemente à falência dos órgãos vitais como rins, fígado, coração e pulmões, que são rapidamente comprometidos pela insuficiência de perfusão normal ⁽²⁴⁾.

Todas as células do organismo podem produzir a IL-6, porém, os monócitos, macrófagos e as células endoteliais são os principais produtores durante a sepse. A IL-6 possui atividade variada, entre as quais o crescimento e diferenciação de células T e B, produção de proteínas de fase aguda e febre. A principal função da IL-6 *in vivo* é sua capacidade de induzir a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Há estudos relacionando os níveis mais altos de mortalidade à presença de níveis aumentados de IL-6 ^(2, 3).

Outro mecanismo que pode contribuir para a instalação da LRA na sepse são as espécies reativas de oxigênio (EROS). Na sepse, vários tipos celulares são ativados, como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, resultando na liberação de inúmeros mediadores, incluindo as citocinas. Essa sequência de eventos leva à ativação de células do sistema imune, com liberação de EROS ^(2, 3).

Estudos na década de 1980 foram os primeiros a constatar o desequilíbrio redox em pacientes sépticos⁽²⁾. Posteriormente, diversos outros estudos descreveram estresse oxidativo severo em pacientes sépticos, seja pela determinação de valores reduzidos de capacidade antioxidante total do plasma, seja por meio da dosagem de níveis maiores de substâncias reativas como o ácido tiobarbitúrico (TBARS), malondealdeído (MDA) ou 4-hidroxinonenal, marcadores de lesão lipídica pelo estresse oxidativo ⁽²⁾. Sob uma variedade de condições anormais, a taxa de produção de EROs pode exceder a capacidade dos antioxidantes naturais induzindo a um estresse oxidativo que pode desencadear injúria tissular e disfunção ^(23, 24, 26).

Os rins tem sido apontados como órgãos capazes de gerar EROs podendo ser vulneráveis aos seus efeitos prejudiciais. O rim sadio produz pequena quantidade de EROs no curso do metabolismo oxidativo renal. É um órgão que compreende menos de 1% do peso corporal e consome grande quantidade de oxigênio, contabilizando

10% do total de oxigênio consumido pelo corpo. Este oxigênio é utilizado em elevada quantidade para manter a fosforilação oxidativa, a síntese de ATP e para o processo de transporte tubular renal. No rim saudável, as baixas quantidades de EROs geradas são toleradas sem nenhum efeito adverso aparente, entretanto, EROs produzidas excessivamente podem contribuir para o aparecimento de LRA ou dano renal progressivo ^(23, 24, 26).

Considerando que a LRA na sepse é multifatorial e um dos mecanismos de ação é o estresse oxidativo, estas observações reforçam a hipótese deste estudo de que a produção excessiva de radicais livres de oxigênio pode representar um papel determinante na sua fisiopatologia, além da produção aumentada de citocinas e as alterações hemodinâmicas renais no desenvolvimento da LRA pela sepse. Esses achados serão discutidos a seguir.

O primeiro achado do estudo mostra que a técnica de LPC reproduziu o modelo experimental de sepse em ratos Wistar. Quando avaliou-se a quantidade de citocinas inflamatórias liberadas durante a sepse nos tecidos renal, pulmonar e intestinal, a TNF- α apresentou aumento nos grupos sepse em todos os órgãos, exceto no pulmão, sendo mais expressiva no tecido renal. A citocina TNF- α é a primeira a ser evidenciada no rim durante a sepse ^(34, 36). Este perfil se confirmou quando analisou-se a liberação da citocina IL-6 nos três órgãos, onde os grupos sepse também apresentaram elevada quantidade desta citocina. Esse resultado confirma a indução da resposta inflamatória característica da sepse de origem abdominal.

Quanto aos sinais clínicos de inflamação sistêmica, o estudo mostrou que o grupo Sepse apresentou valores de temperatura inferiores aos grupos Sham e Sepse+Cilostazol e Sepse+Diosmina. Segundo Lomar, os quadros clínicos clássicos de febre, leucocitose, taquicardia e taquipnéia podem não ser observados em todos os casos de sepse ⁽²⁾, por outro lado, a hipotermia demonstra relação com pior prognóstico 15 a 20% dos pacientes, sendo sinal significativo de quadro inflamatório grave, como o observado nesse estudo.

Com relação aos dados hemodinâmicos dos animais dos grupos estudados, o grupo Sepse apresentou diferença estatisticamente significativa de PAM quando comparado aos grupos Sham e Sepse+Diosmina. A hipotensão é uma disfunção orgânica mais comumente observada em pacientes com sepse severa. A disfunção miocárdica na sepse caracteriza-se pela redução na fração de ejeção dos ventrículos

direito e esquerdo, aumento dos volumes diastólicos finais, frequência cardíaca aumentada e débito cardíaco elevado. Apesar da contratilidade comprometida, o aumento dos volumes diastólicos finais faz com que o paciente consiga manter um débito cardíaco acima do normal ⁽²⁸⁾ por tempo determinado antes da evolução mais grave dessa condição clínica.

Observaram-se ainda alterações glicêmicas em todos os grupos estudados, sendo que os grupos Sepses mostraram glicemias mais elevadas, porém sem significância estatística. A patogênese da hiperglicemia é multifatorial, envolvendo liberação de hormônios contra-regulados pelo estresse induzido e pelo quadro séptico, além da promoção de glicogenólise hepática e aumento da gliconeogênese. Além disso, ocorre ainda um aumento da resistência periférica à insulina, induzida por citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α). Na clínica esta alteração pode ocorrer ainda como resultado de efeitos colaterais a drogas e fatores iatrogênicos, incluindo a administração de glicocorticoides, drogas simpatomiméticas e fluidos contendo glicose ^(1, 2).

Adicionalmente, o modelo de sepse induziu a piora significativa da função renal, mostrada pelo *clearance* de creatinina do grupo sepse quando comparado ao seu grupo controle, o Sham.

Os tratamentos com NAC e cilostazol não foram capazes de controlar o impacto da sepse sobre a função renal. Por outro lado, o tratamento com diosmina hesperidina mostrou proteção sobre esse parâmetro. Esse achado pode representar que a diosmina hesperidina pode ter induzido resposta de proteção mais abrangente, para além do efeito antioxidante, que também foi expressivo, possivelmente na hemodinâmica renal, que não foi alterada quando comparado ao tratamento dos antioxidantes NAC e cilostazol.

Ao analisarmos o estresse oxidativo, observou-se que a expressão de EROs mostrou-se inferior apenas no grupo diosmina hesperidina, tendo se mostrado igual ao grupo Sham. Esse fato pressupõe que a diosmina hesperidina confirmou-se com efeito antioxidante mais exuberante do que as demais terapias usadas nesse estudo, além de, possivelmente, a diosmina, estando associada à hesperidina, que também é um flavonóide, ter desencadeado maior resposta na microvasculatura glomerular e tubular normalizando a permeabilidade e reforçando a resistência dos vasos capilares,

enquanto a NAC atua apenas como agente antioxidante, sem ação comprovada na microvasculatura.

Estudos mostram que os EROS tem importante papel no mecanismo de nefropatias ⁽²³⁾ e que a suplementação dietética com o antioxidante “vitamina E” diminui a taxa de progressão da deterioração renal atenuando a nefrotoxicidade e melhorando a ocorrência de glomeruloesclerose na nefrectomia em estudos com ratos⁽⁴²⁾.

Estudo realizado por Wang em 2008 mostra que a administração de antioxidante antes da LPC foi associada à melhora significativa da taxa de filtração glomerular (TFG) e do fluxo sanguíneo renal (FSR) durante a endotoxemia. Este resultado foi ainda mais exuberante quando o antioxidante foi administrado algumas horas após o procedimento, assim como também observou-se redução significativa na taxa de mortalidade até 24 horas após ⁽³²⁾.

Baseados em achados experimentais e clínicos, diversos antioxidantes, isolados ou em combinação, foram testados em pequenos estudos com o objetivo de verificar a ação destes mediante quadros de sepse ⁽²⁾.

Foram testados a N-acetilcisteína (precursor da glutathione, o principal responsável pela manutenção do equilíbrio redox intracelular), o selênio (presente na glutathione peroxidase, enzima responsável pela redução de peróxido de hidrogênio a água, com oxidação da glutathione) e as vitaminas C e E ⁽²⁾. Nesses estudos, alguns resultados obtidos foram animadores, como por exemplo o restabelecimento da hemodinâmica, menor tempo de ventilação mecânica e de internação em UTI e melhora do padrão inflamatório. Os dados, porém, não são conclusivos, pois a maioria deles utilizou como parâmetro a diminuição da resposta inflamatória, mas não avaliou, ou não conseguiu demonstrar, impacto sobre a mortalidade ⁽²⁾.

Estudos “in vitro” tem mostrado que as citocinas inflamatórias induzem alterações tubulares específicas em células do citoesqueleto e em suas funções. Isto inclui perda da polaridade e da borda em escova, aumento da permeabilidade epitelial, alteração no transporte do soluto e redistribuição apical e basolateral da bomba de Na/K-ATPase, causando edema celular e dissolução de integrina, mediada pela molécula de adesão. Por consequência, células tubulares sofrem necrose ou apoptose e destacam-se da membrana basal para a luz, causando obstrução tubular,

aumentando a pressão intratubular e o escape do infiltrado glomerular para fora do túbulo em direção ao interstício e veias renais ⁽¹⁾.

Nesse estudo, por meio do estudo histológico dos rins, verificou-se que todos os grupos sepse, tratados ou não, apresentaram o mesmo tipo de lesão em maior ou menor intensidade, onde a tumefação celular tubular e a congestão foram as alterações mais frequentes e expressivas, não sendo evidenciadas necrose, apoptose ou inflamação em nenhum dos rins estudados. O dano tecidual causado nos rins pela sepse é estrutural e pode ou não ser reversível.

As alterações histológicas que ocorrem na sepse são escassas e inespecíficas. Uma revisão sistemática mostrou que somente 22% de 184 pacientes tinham evidência de necrose tubular aguda (NTA) e concluiu que a evidência experimental e em humanos disponível não apoia a concepção de NTA como uma manifestação característica da LRA na sepse ^(3, 15).

Os dados relacionados ao estudo ora apresentado demonstraram que na LRA pela sepse ocorre estresse oxidativo evidenciado pelo aumento do PU na urina. Apesar da vasoconstrição inicial descrita durante a sepse, o vasodilatador cilostazol não demonstrou benefício como protetor renal. Entre os antioxidantes utilizados, somente a diosmina hesperidina foi capaz de apresentar melhor efeito renoprotetor. Os dados pressupõem que esse efeito possa estar associado não só a seu efeito antioxidante, mas também por atuar na microvasculatura, tendo a atenuação do efeito vasoconstritor da sepse como um dos mecanismos de equilíbrio da oxidação nesse modelo.

Na clínica, apesar dos avanços tecnológicos e terapêuticos no tratamento e manejo da sepse, os pacientes continuam evoluindo com disfunção múltipla de órgãos, dentre eles o rim, com alta mortalidade e morbidade, especialmente aqueles com condições crônicas. Estudos pré-clínicos mostram que os antioxidantes atenuam a lesão e melhoram a função renal por reduzir o dano oxidativo e / ou inflamação, apesar de vários antioxidantes terapêuticos terem falhado em grande parte em mostrar benefícios em humanos ⁽²⁶⁾. Apesar da grande diversidade de estudos sobre os benefícios das terapias antioxidantes, seus efeitos de proteção celular e funcional ainda precisam de dados mais consistentes para a sua aplicação definida na clínica.

Sumariamente, os resultados desse estudo demonstram a padronização do modelo de sepse de origem abdominal por meio da ligadura e punção do cecon,

confirmada por parâmetros inflamatórios renais, intestinais e pulmonares, além dos sistêmicos. A sepse induziu LRA, com manutenção de fluxo urinário e elevação da excreção de peróxidos urinários. Entre as terapias com potencial efeito renoprotetor investigadas nesse estudo, a NAC, o cilostazol e a diosmina-hesperidina, apenas a diosmina-hesperidina foi capaz de atenuar o dano renal induzido pela sepse, por ter demonstrado efeito antioxidante mais abrangente e possivelmente por exercer mecanismo de proteção sobre a hemodinâmica renal.

Considerando que diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da lesão renal aguda na sepse, é recomendável considerar estratégias ampliadas de intervenção precoce buscando mecanismos de proteção renal com o objetivo de minimizar os danos, possibilitar a reabilitação, melhorar a sobrevida, assim como reduzir a taxa de mortalidade associada a disfunção de órgãos em decorrência da sepse. Nesse cenário, deve-se considerar a associação de terapias, o tempo exato de intervenção, o perfil dos pacientes, estágio de evolução da lesão renal assim como o tratamento efetivo da sepse.

6 – Conclusões

Este estudo concluiu que:

- ✓ O modelo de LPC reproduziu com sucesso o quadro de sepse de origem abdominal em ratos.
- ✓ A sepse se caracterizou por aumento de TNF- α e IL-6 nos pulmões, intestinos e rins, além de redução da temperatura corporal e da pressão arterial média.
- ✓ Os animais em sepse desenvolveram LRA com redução do *clearance* de creatinina e elevação da excreção de peróxidos urinários.
- ✓ O vasodilatador cilostazol e o antioxidante NAC não mostraram efeito renoprotetor na função renal e no estresse oxidativo nos grupos sepse. Por outro lado, a diosmina hesperidina mostrou-se eficaz na redução da peroxidação lipídica esse achado pode ter contribuído para melhora da função renal.
- ✓ As terapias utilizadas, cilostazol, NAC e Diosmina-Hesperdina, não reverteram as lesões histológicas induzidas pela sepse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):801-10.
2. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):775-87.
3. Genga KR, Russell JA. Update of Sepsis in the Intensive Care Unit. J Innate Immun. 2017;9(5):441-55.
4. Rea Neto A. Fisiopatologia e manifestações clínicas da sepse. Clín Bras Med Intensiva. 1996;1:1-9.
5. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. J Clin Invest. 2009;119(10):2868-78.
6. Quality Focus: Increasing Community Awareness and Involvement in Sepsis. Schroeder S.S D Med. 2018 Sep;71(9):427.
7. Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;47(2):167-77.
8. Mikacenic C, Price BL, Harju-Baker S, O'Mahony DS, Robinson-Cohen C, Radella F, et al. A Two-Biomarker Model Predicts Mortality in the Critically Ill with Sepsis. Am J Respir Crit Care Med. 2017;196(8):1004-11.

9. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.
10. Mohsenin V. Practical approach to detection and management of acute kidney injury in critically ill patient. *J Intensive Care*. 2017;5:57.
11. Li JY, Yong TY, Sebben R, Khoo E, Disney AP. Bilateral basal ganglia lesions in patients with end-stage diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2008 Feb; 13(1):68-72.
12. Johannes T, Mik EG, Ince C. Nonresuscitated endotoxemia induces microcirculatory hypoxic areas in the renal cortex in the rat. *Shock*. 2009;31(1):97-103.
13. Pereira M, Rodrigues N, Godinho I, Gameiro J, Neves M, Gouveia J, et al. Acute kidney injury in patients with severe sepsis or septic shock: a comparison between the 'Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, End-stage kidney disease' (RIFLE), Acute Kidney Injury Network (AKIN) and Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) classifications. *Clin Kidney J*. 2017;10(3):332-40.
14. Kara I, Yildirim F, Kayacan E, Bilaloglu B, Turkoglu M, Aygencel G. Importance of RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, and End-Stage Renal Failure) and AKIN (Acute Kidney Injury Network) in Hemodialysis Initiation and Intensive Care Unit Mortality. *Iran J Med Sci*. 2017;42(4):397-403.
15. Regueira T, Andresen M, Mercado M, Downey P. [Physiopathology of acute renal failure during sepsis]. *Med Intensiva*. 2011;35(7):424-32.
16. Ware LB, Fessel JP, May AK, Roberts LJ. Plasma biomarkers of oxidant stress and development of organ failure in severe sepsis. *Shock*. 2011;36(1):12-7.

17. White LE, Chaudhary R, Moore LJ, Moore FA, Hassoun HT. Surgical sepsis and organ crosstalk: the role of the kidney. *J Surg Res.* 2011;167(2):306-15.
18. Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care.* 2014;20(6):588-95.
19. Pinto CF, Watanabe M, Vattimo Mde F. Hydration and N-acetylcysteine in acute renal failure caused by iodinated contrast medium: an experiment with rats. *J Nephrol.* 2008;21(5):783-8.
20. Johannes T, Ince C, Klingel K, Unertl KE, Mik EG. Iloprost preserves renal oxygenation and restores kidney function in endotoxemia-related acute renal failure in the rat. *Crit Care Med.* 2009;37(4):1423-32.
21. Zavariz SMR, Leite CE, Pires MGS, Oliveira JR, Nunes FB. Marcadores Laboratoriais do Choque Séptico. *Sci Med.* 2006;16(1):29-37.
22. Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues das Dores RG, Santos AF, Nagem TG. Flavonóides: Potencial Terapêutico no Estresse Oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;28(3):241-49.
23. Srinivasan S, Pari L. Ameliorative effect of diosmin, a citrus flavonoid against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2012;195(1):43-51.
24. Silambarasan T, Raja B. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2012;679(1-3):81-9.
25. Joannidis M, Druml W, Forni LG, Groeneveld ABJ, Honore PM, Hoste E, et al. Prevention of acute kidney injury and protection of renal function in the intensive care unit: update 2017 : Expert opinion of the Working Group on Prevention, AKI section,

- European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):730-49.
26. Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients.* 2017;9(7).
 27. Ergin B, Guerci P, Zafrani L, Nocken F, Kandil A, Gurel-Gurevin E, et al. Effects of N-acetylcysteine (NAC) supplementation in resuscitation fluids on renal microcirculatory oxygenation, inflammation, and function in a rat model of endotoxemia. *Intensive Care Med Exp.* 2016;4(1):29.
 28. Abdel-Daim MM, Khalifa HA, Abushouk AI, Dkhil MA, Al-Quraishy SA. Diosmin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic, Renal, and Cardiac Injury: A Biochemical and Histopathological Study in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3281670.
 29. Ahmed S, Mundhe N, Borgohain M, Chowdhury L, Kwatra M, Bolshette N, et al. Diosmin Modulates the NF- κ B Signal Transduction Pathways and Downregulation of Various Oxidative Stress Markers in Alloxan-Induced Diabetic Nephropathy. *Inflammation.* 2016;39(5):1783-97.
 30. Rosa MP, Baroni GV, Portal VL. Potencial Terapêutico para a Prevenção e Tratamento da Nefropatia e Neuropatia Diabéticas: Evidências do Uso do Cilostazol. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(9):1528-32.
 31. Lee WC, Chen HC, Wang CY, Lin PY, Ou TT, Chen CC, et al. Cilostazol ameliorates nephropathy in type 1 diabetic rats involving improvement in oxidative stress and regulation of TGF-Beta and NF-kappaB. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74(7):1355-61.
 32. Wang F, Li M, Cheng L, Zhang T, Hu J, Cao M, et al. Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2008;83(25-26):828-35.

33. Peng ZY, Wang HZ, Srisawat N, Wen X, Rimmele T, Bishop J, et al. Bactericidal antibiotics temporarily increase inflammation and worsen acute kidney injury in experimental sepsis. *Crit Care Med*. 2012;40(2):538-43.
34. Toscano MG, Ganea D, Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp*. 2011 May 7;(51). pii: 2860. doi: 10.3791/2860
35. Li W, Zhang W, Deng M, Loughran P, Tang Y, Liao H, et al. Stearoyl Lysophosphatidylcholine Inhibits Endotoxin-Induced Caspase-11 Activation. *Shock*. 2017.
36. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol*. 2011;19(4):198-208.
37. Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;262(3):605-9.
38. Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem*. 1999;273(2):149-55.
39. Miller O. Diagnóstico Bacteriológico e Imunobiológico. O Laboratório e os Métodos de Imagem para o Clínico. São Paulo: Atheneu; 2002.
40. Effect of apigenin on apoptosis induced by renal ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro. Wang X, Wang W, Wang JZ, Yang C, Liang CZ. *Ren Fail*. 2018 Nov;40(1):498-505.
41. Vasco CF, Watanabe M, Fonseca CDD, Vattimo MFF. Sepsis-induced acute kidney injury: kidney protection effects by antioxidants. *Rev Bras Enferm*. 2018 Jul-Aug;71(4):1921-1927.

42. Heydari M, Ahmadizadeh M, Ahmadi Angali K. Ameliorative effect of vitamin E on trichloroethylene-induced nephrotoxicity in rats. *J Nephropathol*. 2017;6(3):168-73.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **92** nas fls. **106** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria de Fátima Fernandes Vattino**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*O efeito das estatinas na lesão renal aguda induzida por sepse em ratos*" do qual participam o(s) alunos **Cecília Ide Ogata**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.07.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 18 de julho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP