

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR RENAL DE PACIENTES
SOBREVIVENTES DE INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA SEVERA
SUBMETIDOS À DIÁLISE

BIANCA PAULA MENTZ CHIELLA

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR RENAL DE PACIENTES
SOBREVIVENTES DE INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA SEVERA
SUBMETIDOS À DIÁLISE

BIANCA PAULA MENTZ CHIELLA

Orientador: Fernando Saldanha Thomé

Dissertação apresentada

ao programa de pós graduação em

Medicina: Ciências Médicas, UFRGS,

como requisito para obtenção do título de

Mestre.

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Mentz Chiella, Bianca Paula
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TUBULAR RENAL DE PACIENTES
SOBREVIVENTES DE INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA SEVERA
SUBMETIDOS À DIÁLISE / Bianca Paula Mentz Chiella. --
2012.
65 f.

Orientador: Fernando Saldanha Thomé.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Insuficiência renal aguda. 2. Biomarcadores
Urinários. 3. Terapia renal substitutiva. 4. Função
Tubular. 5. Dano Renal. I. Saldanha Thomé, Fernando,
orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico a todos os participantes do estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Angelo, minha mãe e meu pai pela paciência, compreensão e apoio em todos os momentos. Minha sogra pelas palavras consoladoras, meu sogro pela ajuda com os controles para o estudo e ao meu cunhado Fernando pelo carinho. Meu amigo e orientador Fernando Saldanha Thomé. Meus colaboradores Carmen Pilla e Elvino Barros. A minha “fiel escudeira” Alessandra Heglert e as minhas amigas da pesquisa clínica.

“A vida é breve, a ciência é duradoura, a oportunidade é ardilosa, a
experimentação é perigosa, o julgamento é difícil.”
(Hipócrates-Aforisma I.1)

RESUMO

Introdução: Em torno de 30 a 50% dos pacientes críticos desenvolvem insuficiência renal aguda (IRA), sendo que sua progressão leva à necessidade de terapia renal substitutiva (TRS). Dentre os sobreviventes, em torno de 15 a 23% possuem a necessidade de diálise após alta. A ocorrência da insuficiência renal aguda tem sido associada à futura progressão para doença renal crônica. É possível que marcadores tubulares estejam alterados após a recuperação da IRA, antecipando o desenvolvimento de doença renal crônica.

Objetivos: Comparar a β 2 Microglobulina, as enzimas urinárias N-acetil- β -D-glucosaminidase, lactato desidrogenase e fosfatase alcalina, as frações de excreção de magnésio, fósforo, potássio e ácido úrico e o gradiente transtubular de potássio, bem como a presença de microalbuminúria e proteinúria entre pacientes normais sem qualquer história prévia de dano ou qualquer tipo de disfunção renal, com pacientes sobreviventes de IRA severa com necessidade de hemodiálise que recuperaram função renal de forma a avaliar se existem diferenças entre os 2 grupos.

Métodos: Foram incluídos pacientes que apresentaram insuficiência renal aguda com necessidade de hemodiálise internados no centro de terapia intensiva (CTI) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e que receberam alta nos períodos de 2007 a 2010, sem apresentar as seguintes co-morbidades: insuficiência renal crônica, hepatopatia

crônica, pacientes HIV positivo, transplantados, doença vascular severa, diabetes com complicações crônicas e rim único funcionante e que apresentavam função renal normal definida por taxa de filtração glomerular $> 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ calculada pela equação CKD-EPI. Os mesmos foram comparados com voluntários sadios pareados por sexo e idade (± 4 anos). Para avaliação das frações de excreção e do gradiente transtubular de potássio foram feitas análises excluindo o uso de medicamentos diuréticos, inibidores da ECA e bloqueadores dos receptores de angiotensina.

Resultados: A fração de excreção de magnésio encontrou-se aumentada no grupo com IRA prévia seguida por um menor gradiente transtubular de potássio bem como lactato desidrogenase elevada. O grupo com IRA prévia apresentou proteinúria e microalbuminúria e embora sem significância estatística ($P=0,052$) uma maior fração de excreção de fósforo.

Conclusão: Mesmo com taxa de filtração glomerular normal comparável, os sujeitos do grupo com ira prévia apresentaram sugestivas alterações em nível tubular refletidas por maior fração de excreção de magnésio, elevada lactato desidrogenase e um menor gradiente transtubular de potássio, microalbuminúria e proteinúria que refletem um possível dano renal. Estes achados levam à hipótese de que sujeitos com prévia IRA severa com necessidade de terapia de renal substitutiva, apresentam uma possível sequela relativa à IRA prévia ou uma predisposição para insuficiência renal crônica.

PALAVRAS CHAVE: insuficiência renal aguda, biomarcadores urinários, terapia renal substitutiva, função tubular, dano renal

ABSTRACT

Background: About 30 to 50% of the critically ill patients develop acute renal failure (ARF) and the progression leads to the need of renal replacement therapy. Between the survivors 15 to 23% has the need of dialysis after discharge. The severity of the ARF is a robust predictor for the development of a future chronic kidney disease. The occurrence of acute renal failure has been associated with future progression of chronic kidney disease.

Objective: Compare β_2 -microglobulin, the urinary enzymes N-acetyl- β -D-glucosaminidase, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase fractional excretion of magnesium, phosphorous, potassium and uric acid transtubular potassium gradient, including the presence of microalbuminuria and proteinuria between subjects with normal renal function without any previous history of acute renal injury or any kind of renal dysfunction with survivors of severe ARF with the needed of hemodialysis that recovered renal function in order to evaluate if there are differences between the 2 groups.

Methods: It was enrolled patients that presented acute renal failure with the need of hemodialysis hospitalized on intensive care unit (ICU) and discharged on the period of 2007 to 2010 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, without the following co-morbidities chronic renal failure, chronic hepatopathy, positive HIV, transplants, severe vascular disease, diabetes with chronic complications and single functioning kidney that

presented normal renal function defined as glomerular filtration rate (GFR) $> 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ calculated by CKD EPI formula. The subjects were compared with healthy volunteers and paired by sex and age (± 4 years). To evaluate fractional excretions and transtubular potassium gradient, analyses were made excluding subjects that were taken diuretic medication, ACE inhibitors and angiotensin block receptors.

Results: The fractional excretion of magnesium was finding increased on the previous ARF group followed by a lower transtubular potassium gradient and elevated lactate dehydrogenase. The previous ARF group showed proteinuria and microalbuminuria and although without statistical significance ($p=0.052$) an elevated phosphorous excretion.

Conclusion: Although normal glomerular filtration rate, the subjects with previous ARF, showed suggested tubular alterations reflected by a higher fractional excretion of magnesium, elevated lactate dehydrogenase and a lower transtubular potassium gradient, microalbuminuria and proteinuria that reflects a possible renal damage. Those findings lead to the hypothesis that subjects with previous severe ARF with the need of renal replacement therapy present a possible sequel related to previous ARF or a predisposition to chronic kidney disease.

KEYWORDS: acute kidney injury, urinary biomarkers, tubular function, renal replacement therapy, renal damage

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. (critérios da acute kidney injury network (AKIN) para lesão renal aguda).....	17
Tabela 2. (critérios de RIFLE).....	17
Table 1. (Baseline characteristics between the groups).....	55
Table 2. (Urinary enzymes, β_2 microglobulin, protein-creatinine index and microalbuminuria between groups).....	56
Table 3. (Fractional excretions, urinary and serum electrolytes, uric acid and transtubular potassium gradient between the groups without subjects that were taken diuretic medication).....	57
Table 4. (Fractional excretions, urinary and serum electrolytes, uric acid and transtubular potassium gradient between the groups without subjects that were taken diuretic ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers medications).....	58

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. (Selection of the subjects on the study).....	59
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

IRA- Insuficiência renal aguda

TFG- Taxa de filtração glomerular

TRS- Terapia renal substitutiva

CTI- Centro de terapia intensiva

IRC- Insuficiência renal crônica

LDH- Lactato desidrogenase

NAG-N-acetyl- β -D glucosaminidase

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2 INTRODUÇÃO.....	16
2.1(Insuficiência renal aguda e epidemiologia em pacientes críticos).....	16
2.2(IRA e sua predisposição para desenvolvimento de insuficiência renal crônica).....	21
2.3(Marcadores de função).....	23
3 JUSTIFICATIVA.....	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo primário.....	31
4.2 Objetivos secundários.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO.....	32
6. ARTIGO EM INGLÊS.....	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8. ANEXO (Termo de consentimento livre e esclarecido.....	61

1 REVISÃO DA LITERATURA

Utilizou-se a base de dados do pubmed, access medicine (livros eletrônicos), ebooks springer, focando na relevância do tema retroativo entre 5 a 10 anos (revisão realizada em junho e julho de 2012), procurando os seguintes termos:

- **Acute kidney injury:** post acute kidney injury, outcomes of acute kidney injury, acute kidney injury /epidemiology
- **Biomarkers:** urinary biomarkers, tubular biomarkers, biomarkers in post acute renal failure received renal replacement therapy, biomarkers and severe acute kidney injury recovery
- **Urinary alkaline phosphatase:** somada a kidney disease, chronic kidney disease ou acute renal failure
- **Urinary lactate dehydrogenase:** somada a kidney disease, chronic kidney disease ou acute renal failure
- **Microalbuminuria:** somada a kidney disease, chronic kidney disease ou acute renal failure
- **Fractional excretion:** fractional excretion of magnesium, fractional excretion of phosphorous, fractional excretion of uric acid, fractional excretion of potassium somados a kidney disease, chronic kidney disease ou acute renal failure

- **Proteinuria:** somada a kidney disease, chronic kidney disease ou acute renal failure
- **Transtubular potassium gradient :** somada a kidney disease, chronic kidney disease ou acute renal failure

2 INTRODUÇÃO

2.1 Insuficiência renal aguda e epidemiologia em pacientes críticos

Insuficiência renal aguda (IRA) ou lesão renal aguda (termo recentemente introduzido) é o declínio súbito da função renal, resultando na incapacidade renal de manter equilíbrio eletrolítico (sódio, potássio, fósforo e magnésio) e eliminar resíduos nitrogenados (uréia e creatinina) bem como outros produtos de eliminação comum pelo rim. Sua detecção diagnóstica laboratorial se divide entre 2 critérios os de AKIN (tabela 1), recentemente introduzido na prática clínica, definida a partir de um aumento na creatinina sérica maior ou igual de 0,3 mg/dL ou aumento maior que 150 a 200% (1,5 a 2 vezes) do valor basal ou uma redução de menos de 0,5 mL/kg/h por mais de 6 horas do débito urinário sendo este o primeiro estágio apresentando outros dois estágios descritos na tabela 1; ou pelos critérios clássicos de RIFLE (tabela 2), onde um aumento da creatinina em 2 vezes ou a diminuição da taxa de filtração glomerular maior que 50% ou débito urinário menor que 0,5 mL Kg⁻¹ h⁻¹ por 12 horas indica a presença de dano renal e o aumento da creatinina em 3 vezes ou a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) maior que 75% ou creatinina maior igual a 4 mg por 100 mL (aumento agudo maior ou igual a 0,5 mg por 100mL dL) ou débito urinário menor que 0,3 mL kg⁻¹ h⁻¹ por 24 horas ou anúria por 12 horas indicam insuficiência e uma perda total da função renal é considerada IRA persistente (tabela 2).

Tabela 1- Critérios de acute kidney Injury Network (AKIN) para lesão renal aguda

Estágio	Critério de creatinina sérica	Critério do débito urinário
1	Aumento na creatinina sérica maior ou igual a 0,3 mg/dL ou aumento maior que 150 a 200% (1,5-2x) do valor basal	Menos de 0,5 mL/kg/h por mais de 6 horas
2	Aumento na creatinina sérica maior ou igual a 200 a 300% (2-3x) do basal	Menos de 0,5 mL/kg/h por mais de 12 horas
3	Aumento na creatinina sérica maior que 300% (>3x) do valor basal ou creatinina sérica maior ou igual a 4.0 mg/dL	Menos de 0,3 mL/kg/h por 24 horas ou anúria por 12 horas

Tabela 2 – Critérios de RIFLE

	Critérios de TFG	Critérios de débito urinário
Risco	Aumento da creatinina X 1,5 ou diminuição da TFG > 25%	Débito urinário < 0,5 mL kg ⁻¹ h ⁻¹ por 6 horas

Injúria	Aumento da creatinina x 2 ou diminuição da TFG > 50%	Débito urinário < 0,5 mL kg ⁻¹ h ⁻¹ por 12 horas
Insuficiência	Aumento da creatinina x 3 ou diminuição da TFG >75% ou creatinina ≥ 4 mg por 100 mL(aumento agudo ≥ 0,5 mg por 100 mL dL)	Débito urinário < 0,3 mL kg ⁻¹ h ⁻¹ por 24 horas ou anúria por 12 horas
Perda IRA persistente= perda total da função renal > 4 semanas		
Estágio final de doença renal		

A etiologia da doença encontra-se dividida em 3 categorias:

Pré renal: Implica na diminuição da pressão de perfusão do rim cujas causas mais comuns são hipovolemia, diminuição do débito cardíaco ,diminuição do fluxo renal efetivo.

Renal: Implica em causas intra renais ocasionando lesões em nível glomerular (glomerulonefrites agudas) e intersticial (nefrite intersticial por drogas e infecção auto-imune),vascular (vasculites) e tubular (necrose tubular,que podem ser causadas por medicamentos a como anfotericina B,aminoglicosídeos, contraste radiológico iodado).

Pós renal: Implica em obstrução do trato urinário, sendo de causa intrínseca (deposição intratubular de substâncias, cálculos renais), ou extrínseca (obstrução extra-renal por co-morbidades como hiperplasia de próstata, neoplasia de próstata e colo uterino).

Quanto à histologia, o dano celular na insuficiência renal aguda envolve 3 formas de lesões: dano sub-letal resultante de despolarização celular, morte celular através de apoptose e necrose (5), resultando em dano no túbulo proximal na IRA severa, sendo que a recuperação envolve um complexo repovoamento celular, onde a proliferação de células epiteliais representa uma importante parte do processo.

Estima-se que em torno de 30 a 50% dos pacientes críticos desenvolvem insuficiência renal aguda (6). A progressão da IRA leva à necessidade de terapia renal substitutiva (TRS), a qual possui diferentes modalidades (hemofiltração venovenosa contínua, hemodiálise venovenosa contínua, hemodiafiltração venovenosa contínua e hemodiálise intermitente). O momento ideal para o início da TRS é amplamente estudado, sendo baseado na função renal, presença de distúrbio eletrolítico e de ácido – base ou da presença de expansão de volume (7,10). Estima-se uma mortalidade em torno de 50 a 80% dos pacientes em centro de terapia intensiva (CTI) (11). Os grupos com IRA associada à sepse e cirurgia cardíaca estão entre os piores desfechos e maiores taxas de mortalidade (13). Estudos como o de Lefrance et al (12), mostraram que um pequeno aumento da creatinina está associado a um alto risco de mortalidade.

O acompanhamento a longo prazo dos pacientes focado na sua sobrevivência tem sido frequentemente estudado. Em meta-análise de 2009 de Coca et al (14), envolvendo 15 estudos que possuíam dados de mortalidade com controles sem IRA, a taxa de mortalidade estimada de pacientes que sobreviveram à hospitalização por IRA foi de 8,9 mortes /100 pessoa ano contra 4,3 mortes /100 pessoa ano relativa aos controles. Schiffli, et al (15).acompanhou uma coorte de 425 pacientes que tiveram insuficiência renal aguda severa e necessitaram terapia renal substitutiva por um período de 5 anos observando que 25% da coorte original permaneceu viva. Bagshaw ,et al (16) observou uma taxa de mortalidade anual de pacientes acompanhados por um ano que tiveram IRA severa de 7,3 por 100 000 em estudo baseado na população ocorrido no período entre 1999 e 2002. NG, et al (17) observou uma taxa de sobrevivência após 1 ano em uma análise com 481 pacientes de 37,67%.

A IRA é freqüentemente a complicação de disfunções de múltiplos órgãos e mesmo após a sua reversibilidade, pode resultar no acometimento de outros órgãos vitais podendo afetar na sobrevivência futura dos pacientes, bem como na ocorrência de desfechos desfavoráveis a longo prazo. Podendo ser possivelmente justificado através de estudos com animais aos quais mostraram que a insuficiência renal aguda pode induzir dano nos tecidos de outros órgãos, como o coração e pulmão (14).

Os desfechos dos pacientes a curto e longo prazo variam de acordo com as múltiplas co-morbidades dos pacientes (a exemplos população idosa, diabéticos, cardiopatas isquêmicos, hepatopatias, pacientes que sofreram intervenção cirúrgicas, paciente que tiveram nefrotoxicidade por medicamentos, etc).

2.2 IRA e sua predisposição para desenvolvimento de insuficiência renal crônica

A reversibilidade do quadro de insuficiência renal aguda de modo geral, é observada através da recuperação da função renal determinada pelos níveis de creatinina. Dentre os sobreviventes em torno de 15 a 23% possuem a necessidade de diálise após alta. Porém mesmo com a recuperação da função renal suficiente para parar diálise por meses, existe uma chance de em torno de 10% da necessidade de diálise crônica no futuro (18). Wald, et al (19). em acompanhamento em torno de 3 anos de pacientes pós hospitalização com e sem IRA, verificou que os pacientes que tiveram IRA apresentaram uma taxa de incidência aproximadamente 3 vezes maior de necessidade de diálise crônica que aqueles sem IRA (2,63/100 pessoa ano versus 0,91/100 pessoa ano). Estudos histológicos com animais (20,21) levantaram a hipótese de existência de alterações a longo prazo ou permanentes na estrutura celular e na função renal como resultado de lesão isquêmica severa. Estas alterações justificariam uma predisposição de insuficiência renal crônica (IRC) em pacientes que apresentaram IRA severa frente a um desenvolvimento de defeito funcional sub clínico. Sendo justificativa para

necessidade de acompanhamento inclusive de pacientes que recuperaram função renal na alta hospitalar.

Em nível de estudos em humanos, recentemente Bucaloiu, et al (22) avaliou o risco de desenvolvimento de insuficiência renal crônica entre indivíduos que se recuperaram de insuficiência renal aguda pareando com controles sem insuficiência renal aguda, mostrando que mesmo com rápida recuperação da função renal, episódios envolvendo um rápido e modesto aumento da creatinina sérica foram associados a 90% de aumento do risco de desenvolvimento de IRC. Ponte, et al (23). em análise retrospectiva por 10 anos de pacientes que desenvolveram IRA, de etiologia diagnosticada como necrose tubular aguda, observou que 46% dos pacientes recuperaram sua função renal basal, porém 40% dos pacientes, que apresentaram uma função renal prévia normal, desenvolveram disfunções moderadas a severas. Em contrapartida Schiff, et al (15) observou função renal normal em 86% dos pacientes que apresentaram IRA secundária à necrose tubular aguda após um período de acompanhamento de 5 anos e não observou nenhuma deterioração da função renal em pacientes que tiveram alta hospitalar com completa recuperação da função renal. Chawla, et al (24) observou em uma população de 5321 pacientes que a severidade da insuficiência renal aguda é um robusto preditor para o desenvolvimento de insuficiência renal crônica. Outros fatores que levam a uma predisposição de IRA para IRC incluem idade (idosos) (16,22,25) e

diversas co-morbidades como hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva (16).

2.3 Marcadores de função

A creatinina sérica é um marcador padrão usado para avaliar função renal, devido a sua estabilidade na amostra sanguínea coletada e seu baixo custo para análise, porém possui algumas limitações, uma vez que fatores como idade, massa muscular e estado nutricionais podem afetar seu valores além da incapacidade de detecção do início da lesão renal, sendo que sua elevação ocorre apenas após a ocorrência de uma perda significativa da função renal (26). Em função das limitações da creatinina, outros marcadores são agregados à rotina clínica e novos marcadores estão sendo estudados no desafio de mais sensibilidade e especificidade para detecção diagnóstica precoce, acompanhamento e prognóstico de doenças renais.

A β -2 microglobulina é uma proteína de baixo peso molecular sendo filtrada pelos glomérulos e reabsorvida e catabolizada pelas células do túbulo proximal renal. Em condições normais não é detectada na urina, porém em caso de dano celular em nível tubular a sua reabsorção e catabolização ficam comprometidas sendo a mesma eliminada na urina. Tem demonstrado eficiência como marcador para IRA ocasionada por agentes nefrotóxicos e bom preditor para necessidade de TRS (28). Em nível de preditor prognóstico de insuficiência renal crônica em nefropatia idiopática membranosa a β -2-microglobulina urinária mostrou forte preditor em nível de progressão e

remissão da nefropatia superior a N-acetyl- β -D-glucosaminidase urinária tanto em nível de função renal como em remissão de proteinúria (29).

A fosfatase alcalina urinária é uma enzima formada no túbulo proximal, o aumento de sua excreção urinária reflete dano tubular, atingindo microvilosidades e a membrana de escova. Chew et al (30) mostrou que o aumento da fosfatase alcalina estaria associada com desfechos como mortalidade em pacientes com IRA. Estudo que avaliou pacientes com diabetes tipo 2 com e sem nefropatia mostrou que a fosfatase alcalina urinária foi maior em pacientes com diabetes tipo 2 com nefropatia sugerindo um potencial valor no diagnóstico de nefropatia diabética tipo 2 (31).

A lactato desidrogenase (LDH) urinária é uma enzima de origem de múltiplos tecidos, sendo um biomarcador indicativo de lesão tubular. Estudo com pacientes diabéticos com controles saudáveis, que avaliou as enzimas urinárias LDH, NAG e fosfatase alcalina, mostrou excreção aumentada do LDH juntamente com as outras enzimas na amostra diabética o que indicaria um possível dano renal inicial (32). Em estudo com 73 pacientes com necrose tubular aguda a mesma não apresentou preditividade (prognóstico) para necessidade de terapia renal substitutiva (35).

A enzima lisossomal de alto peso molecular, encontrada no túbulo proximal na membrana de escova, N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), mostra-se um promissor marcador de dano tubular através do

aumento de sua atividade e conseqüentemente aumento de sua excreção na urina sendo efetivo para detecção de insuficiência renal aguda de diversas etiologias. Vem mostrando-se efetivo tanto em nível preditivo, na detecção inicial da IRA, como em nível prognóstico (34,36), relativos a desfechos clínicos (37), como na necessidade de terapia renal substitutiva (35). Em nível preditor de função glomerular em doença renal crônica a NAG apresentou correlação com a TFG em um estudo com crianças com doença glomerular crônica (38).

A Microalbuminúria, definida como um aumento da excreção urinária de albumina maior que 30mg/g de creatinina, é determinada pela quantidade filtrada pela barreira capilar glomerular e a quantidade reabsorvida pelas células tubulares. Ocorre em caso de lesão celular quando a mesma não é absorvida. A microalbuminúria em pacientes não diabéticos pode ser causada por alterações da matriz extracelular, levando ao aumento da pressão vascular e conseqüentemente a uma lesão endotelial. Em diabéticos o estado glicado da albumina leva a geração de espécies oxigênio reativas (39), provocando lesão direta nas células epiteliais da membrana glomerular. Desta forma a microalbuminúria é um marcador na nefropatia diabética, possuindo uma boa sensibilidade relativa ao dano em nível glomerular, sendo um poderoso preditor de estágio final de doença renal crônica (40). Sabry A (41) ao comparar pacientes com queimaduras severas, verificou aumento constante e em acompanhamento com a uréia e creatinina da

microalbuminúria de acordo com a severidade no grupo de pacientes que desenvolveram insuficiência renal aguda.

Proteinúria é o resultado de desordem permiseletiva da barreira de filtração glomerular, no caso de dano glomerular a filtração de proteínas de baixo peso molecular aumenta e proteínas grandes começam a penetrar na barreira de filtração glomerular, fazendo com que as células do túbulo proximal fiquem expostas a mais proteínas que sobrecarregam os sítios de receptores-ligante (42). Mostra-se um marcador de glomerulopatias e de severidade da doença renal.

O papel do magnésio e seu controle na doença renal crônica não tem sido muito estudado, mas recentemente os processos tubulares que levam à sua reabsorção foram apontados por estudos de mutações familiares. A maior parte da reabsorção do magnésio filtrado (2500 mg por dia) ocorre no túbulo proximal e no segmento espesso ascendente da alça de Henle, de modo passivo e para-celular. Duas proteínas, claudina-16 e claudina-19 foram identificadas na junção estreita das células da alça de Henle, como responsáveis por esse mecanismo reabsortivo. Até 10% da carga filtrada de magnésio é reabsorvida de forma ativa no túbulo contorcido distal, o que determina a concentração sérica final do cátion. No túbulo contorcido distal foi identificado um canal transportador, o “*transient receptor potential íon channel melastatin member 6*” ou TRPM6, que é estimulado pelo fator de crescimento epidérmico (EGF). Outro canal, o TRPM7 também pode estar envolvido no transporte (43).

O fósforo também sofre regulação pelos túbulos renais, sendo a carga filtrada quase toda reabsorvida nos túbulos proximal e distal e na alça de Henle. A capacidade máxima de reabsorção de fósforo constitui um ponto de equilíbrio que determina a concentração sérica do elemento. Esse ponto de equilíbrio é determinado principalmente pelo paratormônio e pelo fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF23), substâncias que inibem a reabsorção de fósforo e provocam fosfatúria (44). Com a diminuição da filtração glomerular, a excreção fracional de fósforo aumenta, fundamentalmente por ação dessas substâncias, porém lesões tubulares também podem provocar fosfatúria.

O potássio é livremente filtrado pelos glomérulos, e depois é praticamente todo reabsorvido no túbulo proximal e na alça de Henle. A excreção final de potássio é determinada pela secreção que ocorre nos túbulos distal e coletor cortical. Essa secreção é favorecida pela eletronegatividade da luz tubular que ocorre nessas regiões devida à reabsorção de sódio através dos canais epiteliais de sódio (ENaC), a qual é estimulada pela ação da aldosterona. Essa força secretora pode ser medida clinicamente pelo gradiente que se estabelece entre a célula principal do túbulo coletor cortical e a luz tubular, o chamado gradiente transtubular de potássio (TTKG). O gradiente transtubular de potássio reflete a atividade secretora de potássio nesse túbulo que pode estar associada com desequilíbrio da atividade da aldosterona (45). Para inferir-se a concentração de potássio na luz do túbulo cortical, usa-se a

razão entre a osmolaridade sérica e urinária para ajustar a quantidade de água reabsorvida no túbulo coletor medular.(46).

O ácido úrico, produto do metabolismo dos ácidos nucléicos e dos nucleotídeos, também sofre regulação renal da sua excreção, embora seus níveis séricos dependam também de fatores metabólicos. O ácido úrico é filtrado e sofre quase completa reabsorção no túbulo proximal. Entretanto, ainda no túbulo proximal, ele é secretado, e essa manipulação tubular faz com que sua excreção seja variável, dependendo de vários fatores. A excreção fracional média do ácido úrico se situa em torno de 10 %, podendo aumentar com expansão da volemia ou diminuir com hipovolemia. Algumas drogas também podem alterá-la. A diminuição da filtração glomerular tende a aumentar a excreção fracional de ácido úrico, o que impede uma queda significativa da uricosúria absoluta. Lesões tubulares proximais também levam ao aumento da excreção fracional de ácido úrico.

Em resumo, a existência de lesão das células renais tubulares leva a um desequilíbrio eletrolítico levando a alteração da excreção de eletrólitos como magnésio, potássio, fósforo e do ácido úrico. O aumento da fração de excreção de magnésio mostrou-se um marcador sensível para detecção precoce de injúria tubulointersticial em doença renal severa (47). As frações de excreção de ácido úrico e fósforo, mostraram eficiência para detectar dano tubular em nível mitocondrial sub clínico causado pelo antiretroviral tenofovir de nefrotoxicidade conhecida, apresentando-se aumentadas (48). A fração de excreção de potássio

mostrou uma correlação moderada ($r=0,6$) com a proteinúria, marcador que encontra-se aumentado decorrente de um aumento da permeabilidade glomerular e diminuição da reabsorção tubular de proteínas filtradas, em pacientes com queimaduras severas e sepse associadas à IRA (49).

Mais estudos devem ser realizados para determinar as aplicações destes marcadores na prática clínica, de forma a agirem em conjunto ou separadamente para detecção diagnóstica precoce, acompanhamento e prognóstico de disfunções renais.

3. JUSTIFICATIVA

Existem poucos estudos de longo prazo focados em pacientes que tiveram insuficiência renal aguda com necessidade de terapia substitutiva renal e que recuperaram função renal, sendo a sua maioria focados em desfechos de sobrevivência e usando marcadores de nível glomerular como a creatinina. Não foi identificado nenhum estudo usando marcadores de nível tubular de forma a auxiliar a identificar uma possível permanência de lesão tubular o que poderia indicar uma predisposição à doença renal crônica ou sequela da IRA havendo a necessidade de um maior acompanhamento clínico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo primário

Comparar biomarcadores sanguíneos e urinários entre pacientes com função renal normal sem qualquer história prévia de lesão renal aguda ou qualquer tipo de disfunção renal (grupo controle) provenientes de uma amostragem de conveniência com pacientes sobreviventes a insuficiência renal severa com necessidade de hemodiálise que recuperaram função renal (grupo caso) de forma a avaliar se existem diferenças entre os dois grupos.

4.2 Objetivos secundários

✓ Verificar se os pacientes do grupo caso apresentarão função tubular alterada através do gradiente transtubular de potássio, fração de excreção de potássio, magnésio, ácido úrico e fósforo, β 2-microglobulina e enzimas urinárias.

✓ Avaliar se somente a taxa de filtração glomerular reflete a realidade do estado renal dos pacientes do grupo caso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, eds. Harrison's principles of internal medicine, 18 ed (online), United States of America; 2012. McGraw- Hill
2. Stefani SD, Barros E, et al. Clínica médica : consulta rápida , 2 ed; 2002 Porto Alegre. Artmed
3. Mentha RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute kidney network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit care 2007; 11 (2):R31
4. Lewington AJ, Sayed A. Acute kidney injury: How do we define it?. Ann clin Biochem 2010; 47:4-7
5. Liu KD, Brakeman PR, Renal repair and recovery, Crit care med 2008; 36 (4) (suppl): S187-S192
6. Slocum J.L, Pennathur S. Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine?. Tras Res 2012; 159 (4): 277-289
7. Karvellas C.J, Farhat MR, Sajjad. A comparison of early versus late initiation of renal replacement therapy in critically ill patients with acute kidney injury: a systematic review and meta –analysis. Crit Care 2011; 15: 1-10
8. Srisawat N, Kellum JA. Acute kidney injury: definition, epidemiology and outcome. Curr opin in crit care 2011; 17: 548-555

9. Hegarty J, Middleton RJ, Krebs M, et al. Severe acute renal failure in adults, place care, incidence and outcomes. *Q J Med* 2005; 98: 661-666
10. Morgera S, Kraft AK, Siebert G, Friedrich LC, Neumayer HH. Long term outcomes in acute renal failure patients treated with continuous renal replacement therapies, *Am J kidney Dis* 2002; 40 (2): 275-279
11. Kes P, Jukic NB. Acute kidney injury in the intensive care unit, *Bosn J Basic Med Sci* 2010; 10(suppl): S8-S12
12. Lafrance JP, Miller DR. Defining acute kidney injury in database studies: The effects of varying baseline kidney function assessment period and considering CKD status. *Am J Kidney Dis* 2010; 56 (4): 651-660
13. Morgera S, Schneider M, Neumayer HH. Long term outcomes after acute kidney injury. *Crit care medi*, 2008; 36 (4) (suppl): S193-S197
14. Coca SG, Yusuf B, Shilipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long –term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis, *Am J Kidney Dis* 2009; 53 (6): 961-973
15. Schffl H, Fischer R. Five years outcomes of severe kidney injury requiring renal replacement therapy. *Nephrol Dial transplant* 2008; 23: 2235-2241
16. Bagshaw SM, Laupland KB, Doig CJ. Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study. *Criti Care* 2005; 9: R700-R709

17. Ng KP, Chanouzas D, Fallouh B, Baharani J. Short and long term outcome of patients with severe acute kidney injury requiring renal replacement therapy. *Q J Med* 2012; 105: 33-39
18. Waikar SW, Winkelmayer WC. Chronic on acute renal failure- Long – term implications of severe acute kidney injury. *JAMA* 2009; 302(11): 1227-1229.
- 19 Wald R, Quinn RR, Luo JM, et al. Chronic Dialysis and Death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis. *JAMA* 2009; 302 (11): 1179-1185
20. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillares and influences long term functions. *Am Journal physiol and renal physiol* 2001;281: F887-F899
21. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am Journal physiol and renal physiol* 2010; 300: F721-F733
22. Bucaloiu ID, Kirchner HL, Norfolk ER. Increased risk of death and *de novo* chronic kidney disease following reversible acute kidney injury, *Kidney int* 2012; 81: 477-485
23. Ponte B, Felipe C, Muriel A, Tenorio MT, Liaño F. Long-term functional evolution after an acute kidney injury: a 10-year study, *Nephrol dial and transplant* 2008; 23: 3869-3866

24. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts the progression to chronic kidney disease. *Kidney inter* 2011; 79: 1361-1369
25. Coca SG, Cho KC, Hsu CH. Acute Kidney injury in the elderly: predisposition to chronic kidney disease and vice versa. *Nephron clin pract* 2011; 119 (suppl 1): c 19-c24
26. Urbschat A, Obermuller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers* 2011; 16 (Suppl1):S22-S30
27. Waikar SS, Bonventure JV. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. *Nephron clin pract* 2008; 109: C192-C197
28. Myjak BL. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood purify* 2010, 29:357-365
29. Hofstra JM, Deegens JK, Willems HL, Wetzels JF. Beta-2-microglobulin is superior to N-acetyl- β -glucosaminidase in predicting in idiopathic membranous nephropathy. *Nephrol dial transplant* 2008, 23: 2546-2551
30. Chew SL, Lins RL, Daelemans R, Nuyts GD, De Broe ME. Urinary enzymes in acute renal failure. *Nephrol dial transplant* 1993; 8:507-511
31. Carvalho JA, Piva SJ, Hausen BS. Assessment of urinary- γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin chim acta* 2011; 412: 1407-1411

32. Karakani AM, Haghighi AS, Khansari MG, Hosseini R. Determination of urinary enzymes as a marker of early renal damage in diabetic patients, *J clin lab anal* 2007; 21: 413-417
33. Trof RJ, Di Maggio F, Leemrei J, Groeneveld AB. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock* 2006;26 (3): 245-253
34. Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol dial transplant* 2003; 18: 543-551
35. Rosenthal SH, Poppen D, Husing J, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin chem* 2004; 50 (3):552-558
36. Siew ed, Ware LB , Ikizler TA. Biological biomarkers of acute kidney injury. *J Am soc nephrol* 2011; 22: 810-822
37. Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, et al. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse event outcomes in acute renal failure. *J Am socof nephrol* 2007; 18:904-912
38. Hong JD, Lim IS. Correlation between glomerular filtration rate and urinary N- Acetyl- beta- D- glucosaminidase in children with persistent proteinuria in chronic glomerular disease. *Korean J pediatr* 2012; 55(4):136-142

39. Kholas N, Sarafidis PA, Bakris GL. Microalbuminuria .Clinics in laboratory medicine 2006; 26:635-653
40. Hallan SI, Ritz E, Lydersen S, Romudstad S, Kvenild K, Orth SR. Combining GFR and albuminuria to classify CKD improves prediction of ESRD. J Am Soc nephrol 2009; 20: 1069-1077
41. Sabry A. Markers of tubular and glomerular injury in predicting acute renal injury outcome in thermal burn patient: A prospective study. Ren fail 2009; 457-463
42. Tobli JE, Bevione P, Gennaro FD, Madalena L, Cao G, Angerosa M. Understanding the mechanism of proteinuria: therapeutic implications, Int J Nephrol 2012; 2012: 1-13
43. Glaudemans B, Knoers NVAM, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. New molecular players facilitating Mg²⁺ reabsorption in the distal convoluted tubule. Kidney Int 2010; 77(1):17-22
44. Myles W. Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease . J Am Soc Nephrol 2010; 21: 1427-1435
45. Choi MJ, Ziyadeh FN. The utility of the transtubular potassium gradient in the evaluation of hyperkalemia. J of Am soc of nephrol 2008; 19: 424-426
46. Kamel SK, Haperin M. Intrarenal urea recycling leads to a higher rate of excretion of potassium: an hypothesis with clinical implications, Curr opin nephrol and hypertens 2011; 20: 547-554

47. Deekajorndech T. A biomarker for detecting early tubulointerstitial disease and ischemia in glomerulonephropathy. *Ren Fail* 2007; 29:1013-1017
48. Maggi P, Montinaro V, Bellacosa C, et al. Early markers of tubular dysfunction in antiretroviral- experienced HIV- infected patients treated with tenofovir versus abacavir. *Aids patient care STDs* 2012; 26(1): 5-11
49. Mariano F, Cantaluppi V, Stella. Circulating plasma factors induce tubular and glomerular alterations in septic burns patients. *Critic care* 2008;12 (2):R42
50. Portney LG, Watkins MP. *Foundation of clinical research: applications to practice* .3ed. United States of America ;2009. Pearson prentice hall
51. Barret KE, Barman SM, Boitano S, Heddwen BL. *Ganong's review of medical physiology*. 24 ed. United States of America; 2012. McGraw- Hill

6. ARTIGO EM INGLÊS

Artigo será submetido à revista NDT Nephrology Dialysis Transplantation

Tubular function of survivors of severe acute kidney injury submitted to dialysis

Bianca Paula Mentz Chiella¹, Carmen Pilla², Elvino Barros³, Fernando Saldanha Thomé⁴

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Programa de Pós Graduação Ciência Médicas-Faculdade de Medicina, Porto Alegre- RS- Brazil

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre- Porto Alegre- RS- Brazil

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Faculdade de Medicina, Porto Alegre- RS- Brazil

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Faculdade de Medicina, Porto Alegre- RS- Brazil

Abstract

Background: About 30 to 50% of the critically ill patients develop acute kidney injury (AKI). The severity of the AKI is a robust predictor for the development of chronic renal kidney disease. The biomarkers of tubular function may help clinical practices acting together or separately on the early diagnosis and prognosis of renal dysfunctions in order take preventive conducts.

Methods: It was enrolled patients that presented acute kidney injury with the need of hemodialysis hospitalized on intensive care unit and discharged on the period of 2007 to 2010 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre; without the following co-morbidities chronic renal failure, chronic hepatopathy, HIV/AIDS, transplants, diabetes with chronic complications, severe vascular disease and single functioning kidney and with normal renal function defined as estimated glomerular filtration rate $> 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ based on CKD-EPI equation. The following biomarkers were evaluated Alkaline phosphatase, N- acetyl- β -D glucosaminidase, lactate dehydrogenase, β -2-microglobulin, proteinuria, microalbuminuria, transtubular potassium gradient and the fractional excretions of potassium, phosphorous, uric acid an magnesium The subjects were compared with healthy volunteers paired by sex and age.

Results: Compared with healthy volunteers the group with previous AKI showed an increased fractional excretion of magnesium ($p=0.032$) microalbuminuria ($p= 0.014$) and proteinuria ($p=0.007$)

Conclusions: Subjects that presented previously AKI needing renal replacement therapy presented, when compared with controls, possible sub-clinical abnormalities, characterized by elevated fractional excretion of magnesium, microalbuminuria and proteinuria, despite similar estimated glomerular filtration rates.

KEYWORDS: acute kidney injury, renal damage, renal replacement therapy, tubular function, urinary biomarkers

Summary

We evaluate urinary enzymes alkaline phosphatase, N-acetyl - β D-glucosaminidase, lactate dehydrogenase and the β -2 microglobulin, fractional excretions of solutes (Mg, P, K, uric acid), transtubular potassium gradient, microalbuminuria and proteinuria in subjects with previous severe acute kidney injury (AKI). Our findings suggested possible tubular and renal damage in subjects with normal glomerular filtration rate that presented previous severe AKI reflected by the increase of fractional excretion of magnesium, proteinuria and microalbuminuria when compared with healthy subjects.

Introduction

It is estimated that 30 to 50% of the critically ill patients develop acute kidney injury (AKI) [1]. The Severe cases in Intensive Care Unit (ICU) need renal replacement therapy (RRT), and the mortality of these patients is between 50 to 80% [2]. Among survivors, 15 to 23% need dialysis after hospital discharge. However, even with recovery of renal function enough to stop dialysis for months or years, there is a risk of about 10% of the need of future chronic dialysis [3]. Chawla, et al [4] observed that in a population of 5321 patients the severity of acute kidney injury is a robust predictor for the development of chronic kidney disease (CKD). Several studies have addressed the issue whether or not and how AKI could leads to CKD [5, 6, 7, 8, 9].

Histologic studies with animals [10,11], raised the hypothesis of long-term or permanent alterations on cellular structure and on renal function as a result of a severe ischemic injury which might justify a predisposition to CKD in patients that presented severe AKI.

The early diagnosis of functional sub-clinic defects related to possible renal damage or lesion in tubular or glomerular levels would be important and helpful on clinical practice.

The urinary enzymes alkaline phosphatase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase and lactate dehydrogenase and the β -2-microglobulin

are simple markers of tubular damage, as are functional parameters like the fractional excretion of solutes (potassium, phosphorous, magnesium, uric acid) and the transtubular potassium gradient. They might play a role in the detection of a possible subclinical tubular defect earlier than the current standard glomerular filtration marker creatinine whose limitations are well known. We designed a study to raise the hypothesis that these variables would be different in survivors of severe AKI when compared to healthy persons.

Subjects and Methods

This is a case-control study, nested in a cohort of survivors of previous severe AKI. We follow a cohort of all patients admitted to the ICU of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary teaching hospital, which needed RRT because of severe stage 3 AKI. From a total of 1038 patients treated in the period of 2006 to 2010 [12], 304 were discharged alive (figure 1). Subjects with the following criteria were excluded: previous chronic kidney disease, chronic hepatopathy, presence of HIV or AIDS, transplants, diabetes with chronic complications, severe vascular disease and single functioning kidney. Patients on RRT or with glomerular filtration rate (GFR) below $60 \text{ mL/min/1.73m}^2$, calculated by CKD-EPI equation, based on an available creatinine after discharge were also excluded. We tried contact with the 89 patients that were eligible, but 31 were reported dead and 26 were impossible to reach. Another 12 patients had conditions preventing them to participate (locomotion problems, neurologic impairment, psychiatric conditions), or declined

consent. Were enrolled 20 subjects (cases), that had been hospitalized in 2007 (3), in 2008 (5), in 2009 (5) and in 2010 (7). Their mean age at the time was 52.2 ± 12.3 years. They had been submitted to intermittent and continuous hemodialysis (12), only intermittent hemodialysis (3) or only continuous hemodialysis (5), with a mean of dialysis days or sessions of 10.2 ± 9.0 , and a length of 18.3 ± 17.3 days of dialysis treatment. Twelve subjects developed AKI of clinic origin, 7 of surgical origin, 1 of obstetric origin, sepsis was present in 18 of the subjects, and other associated conditions were: cardiovascular conditions (5), pneumonia (6), pancreatitis (2), portal venous thrombosis (1). The length of hospitalization was 24.1 ± 18.8 days. All the subjects were discharged from the CTI still needing RRT, but they all were free of dialysis at the hospital discharge.

After the initial work-up, three of the enrolled subjects presented a $\text{GFR} \leq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ and other evidences suggesting CKD, and we decided not to include them on the analysis.

We assembled a control group of 20 healthy volunteer recruited by a convenience sample paired by sex and age, without any history of renal dysfunction or the co-morbidities described above. All the 40 subjects signed an informed consent. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Number (CAAE: 04679312.6.0000.5327)).

Subjects were submitted to clinical interview where blood pressure, weight and height were obtained and urine and blood samples were taken for the analysis.

We evaluated the urinary enzymes alkaline phosphatase (UALP), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), lactate dehydrogenase (LDH), and also urinary β -2-microglobulin (U β 2M), proteinuria and microalbuminuria (MICA). We normalized these variables by urinary creatinine (Ucr). We also analyzed serum and urinary creatinine, osmolality (Osm), magnesium, phosphorous, potassium and uric acid, to obtain the fractional excretion of magnesium (FEMg), potassium (FEK), phosphorous (FEP), uric acid (FEUA) and the transtubular potassium gradient (TTKG). The urine and blood samples were analyzed at the laboratory of the clinical pathology service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The following methods were used: colorimetric enzymatic for uric acid (blood and urine) and NAG, chemiluminescence for β -2-microglobulin, Jaffé without deproteinization for creatinines, kinetic UV for LDH, kinetic colorimetric for UALP, phosphomolibdate UV for serum and urinary phosphorous, blue xilidil colorimetric for magnesium (serum and urinary) red of pirogalol colorimetric for total protein, ion selective electrode for potassium samples, immunoturbidimetry for microalbuminuria and cryoscopic lowering for osmolality (Osm).

To calculate the fractional excretions of the solutes (K, P, UA, Mg) it was used the generic formula:

$$\text{Fe (solute) (\%)} = \frac{\text{urinary solute X serum creatinine}}{\text{serum solute X urinary creatinine}} \times 100$$

To calculate transtubular potassium gradient the following formula was used [13]:

$$\text{TTKG} = \frac{\text{urinary K X blood Osm}}{\text{Serum K X urine Osm}}$$

Additional analyses were made for fractional excretions, Mg, P, UA, K and TTKG one excluding subjects taking diuretics and another excluding subjects taking diuretics, ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers, once that could possibly affect the results. Estimated GFR was calculated by the CKD-EPI equation [14]. T-test for independent samples was performed for continuous normally distributed variables and Mann Whitney test was performed for continuous not normally distributed variables; for categorical variables chi-square test was performed. The confidence interval was 95% (p-value <0.05). The software SPSS version 18 was used for the analysis.

Results

Baseline characteristics of subjects from both groups are described on table 1. Age was similar, but the group with previous AKI had a higher proportion of hypertension (64.7%), although the measured blood pressure (systolic and diastolic) at the day of the visit was similar between groups. Also the body mass index was similar between the groups. One control subject had history of type 2 diabetes (without

complications). The GFR was similar between the groups ($p = 0.138$). The mean time between the hospital discharge and the study was 3.2 ± 1.1 years.

We found no statistically significant differences between the groups related to $U\beta_2M$ ($p=0.784$), $UALP$ ($p=0.154$), NAG ($p=0.200$), either with the absolute value or normalized to U_{cr} . The absolute value of $ULDH$ ($p=0.043$) was higher in the previous AKI group, however when normalized to urinary creatinine no difference was shown ($p=0.120$) (table 2).

The group with previous AKI presented higher microalbuminuria than the group of healthy volunteers ($p=0.043$). Abnormal microalbuminuria ($>30\text{mg/g}$) was present in 29.4% of the cases and in none of the control subjects. Protein-creatinine index (PCI) was also higher in the cases ($p=0.007$). There were no differences in serum creatinine or estimated GFR (table 2).

The fractional excretions, Mg , P , K , UA and transtubular potassium gradient (TTKG) were compared between 10 of the group with previous AKI and 17 subjects of the group of healthy volunteers that were not taken diuretic medication (table 3) and 6 subjects of the group with previous AKI and 16 subjects of the group of healthy volunteers who were not taking diuretics, ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers (table 4). Ages were similar in both analyses (previous AKI group 52.2 ± 13.4 , healthy volunteers 54.1 ± 12.8 years in the analysis without diuretic taken). We found no differences between the groups in relation to: FEUA,

serum potassium (SK), urinary potassium (UK), serum uric acid (SUA), urinary uric acid (UUA), serum phosphorous (SP) and urinary phosphate (UP) and also in serum creatinine (Scr) and GFR in both analysis (table 3 and 4). The fractional excretion of phosphate was increased in the group of previous AKI, but the statistical significance was marginal ($p=0.052$) in the analysis without the subject taking diuretic medication.

The fractional excretion of magnesium (FEMg) and the transtubular potassium gradient were different between the groups. The previous AKI group showed a higher FEMg (3.55, 5.00-3.00) than healthy volunteers (2.70, 3.30-1.61) ($p=0.015$), an increased urinary magnesium (UMg) ($p = 0.024$) and a lower serum magnesium (SMg) ($p =0.033$) in the analysis without taking diuretic medication. In the analysis without subjects taking diuretics, ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers (table 4) the difference related to FEMg higher in the previous AKI group (4.42; 8.74-2.85) and healthy volunteers (2.7; 3.3-2.0) ($p= 0.032$) remains, however TTKG difference is not statistically significant ($p=0.094$).

Discussion

This is a case-control study, comparing previously healthy patients that had a critical disease and developed AKI in the ICU, severe enough to the requiring of RRT, and a group of sex and age matched controls. It is an exploratory study, trying to detect subclinical renal alterations between the two groups, raising the hypothesis that these changes could be markers of sequelae from the damaged kidney.

Our results suggest, a possible tubulointerstitial damage in subjects that developed previous severe AKI and recovered renal function. The increased FEMg in the group with previous AKI could be related to interstitial disease. Futrakul ,et al [15] correlates FEMg with renal microvascular disease and chronic renal ischemia reflecting in low peritubular capillary flow. Similar findings were found on a cross-sectional study with children with previous ischemic acute tubular necrosis [16] and also in severe kidney disease where FEMg represented early tubulointerstitial injury in nephrosis associated with focal segmental glomerulosclerosis and chronic kidney diseases with impaired renal function [17].

A study with diabetic subjects and healthy controls showed an elevated urinary lactate dehydrogenase on the diabetic group suggesting an initial renal disease [18] Our cases had elevated ULDH, but no differences persisted after normalization by Ucr.

Musso et al [19] points that there are structural and physiologic changes in the aging kidney that leads to a decrease in GFR of about 10% per decade. However the aged kidneys when compared with patients with CKD have many differences, although with similar decreases in GFR. Examples of these differences are increased FEMg and FEP. Our control group includes middle age and older individuals, which could explain a slightly decreased GFR, still they seem to have different tubular function than our cases.

We expected a decreased TTKG in the previous AKI group, due to hypoaldosteronism, we found it on the analysis without diuretic medication, but we could not find statistical significance between groups in the analysis without diuretic, ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers because of the small sample. The sample size also was insufficient to show any difference in the FEP that could unmask the presence of a sub-clinical secondary hyperparathyroidism and an increase in FGF-23 [20] in the case group.

The previous AKI subjects also showed microalbuminuria and proteinuria suggesting renal damage, since these are well established markers of chronic kidney disease [21, 22, 23, 24]. It is important to point that there were no diabetics in the previous AKI group, but there were hypertensives. It was not possible to determinate whether these patients had previous asymptomatic hypertension or kidney disease.

Based on our findings we raise the hypothesis, that these changes represent a possible sub-clinical kidney disease on the subjects with previous severe AKI that needed renal replacement therapy. It is not clear if this developed in a long-term (mean between the outcome and the study 3 years) consequence of severe AKI, a sequel related to the previous AKI, or if this merely reflects a previous predisposition for chronic kidney disease and AKI. More studies should be done to clarify our findings.

In conclusion, subjects that presented previously AKI needed RRT presented, when compared to controls, possible subclinical

abnormalities, characterized by elevated fractional excretion of magnesium, microalbuminuria and proteinuria, despite similar estimated glomerular filtration rates.

Acknowledge

We thanks for all the subjects that participate on the study.

References

1. Slocum JL, Heung M, Pennathur S. Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine?. *Transl Research* 2012; 159: 277-289
2. Kes P, Jukic NB. Acute kidney injury in the intensive care unit. *Bosn J Basic Med Sci* 2010; 10: S8-S12
3. Waikar SS, Winkelmayer WC. Chronic on acute renal failure- Long – term implications of severe acute kidney injury. *JAMA* 2009; 302: 1227-1229.
4. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts the progression to chronic kidney disease. *Kidney int* 2011; 79: 1361-1369
5. Rifkin DE, Coca SG, Zadeh KK. Does AKI lead to CKD?. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 979-984
6. Hs CY. Yes, aki truly leads to CKD. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 967-978

7. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney int* 2012; 81: 442-448
8. Palevsky PM. Chronic on acute kidney injury. *Kidney int* 2012; 81: 430-431
9. Coca SG, Cho KC, Hsu CY . Acute kidney injury in the elderly: predisposition to chronic kidney disease and vice versa. *Nephron Clin Pract* 2011; 119: C19-C24
10. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillares and influences long term function, *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F887-F899
11. Basile DP, Friedrich JL, Spahicn J, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J physiol Renal Physiol* 2010; 300: F721-F733
12. Morsch C, Thomé FS, Balbinotto A, Guimarães JF, Barros EG. Health-related quality of life and dialysis dependence in critically ill patients survivors of acute kidney injury. *Ren Fail* 2011; 30:946-956
13. Cho MJ, Zyadeh FN. The utility of the transtubular potassium gradient in the evaluation of hyperkalemia. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 424-426
14. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-612

15. Frutakul N, Frutakul P. A progression in peritubular capillary flow reduction and tubulointerstitial fibrosis reflected by FEMg predict the decline in glomerular filtration rate. *Kidney int* 2012; 81: 707
16. Gheissari A, Andalib A, Labibzadeh N, Modarresi M, Azhir A, Merrikhi A. Fractional of magnesium (FEMg), a marker for tubular dysfunction in children with clinically recovered ischemic acute tubular necrosis. *Saudi J of kidney dis and transpl* 2011; 22: 476-481
17. Deekajorndech T. A biomarker for detecting early tubulointerstitial disease and ischemia in glomerulonephropathy . *Renal Fail* 2007; 29:1013-1017
18. Karakani AM, Haghighi SA, Khansari MG, Hosseni R. Determination of urinary enzymes as a marker of early renal damage in diabetic patients. *J clin lab anal* 2007; 21: 413-417
19. Musso CG, Oreopoulos DG. Aging and physiological changes of the kidneys including changes in glomerular filtration rate . *Nephron physio* 2011; 119: p1-p5
20. Myles W. Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease . *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1427-1435
21. Cirrilo M. Evaluation of glomerular filtration rate and albuminuria/proteinuria. *J Nerphrol* 2010; 23 125-132
22. Hallan SI, Ritz E, Lydersen S, Romundstad S, Kvenild K, Orth SR. Combining GFR and albuminuria to classify CKD improves prediction of ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1069-1077

23. Glassock RJ. Is the presence of microalbuminuria a relevant marker of kidney disease. *Curr hypertens rep* 2010; 12: 364-368

24. Gansevoort RT, Nauta FL, Bakker SJ. Albuminuria: all you need to predict outcomes in chronic kidney disease?. *Curr Opin nephrol hypertens* 2010; 19: 513-518

Table 1- Baseline characteristics between the groups

	Subjects with previous AKI (N= 17)	Healthy volunteers (N=20)
Sex		
Women	9 (52.9%)	11 (55.0%)
Men	8 (47.1%)	9 (45.0%)
Age (years)	54.12 ±12.40 ¹	54.35 ± 12.40 ¹
Hypertension	11 (64.7%) ²	4 (20.0%) ²
Diabetes	0	1 (5.0%)
BMI (Kg/M²)	26.97± 6.53 ³	27.80± 1.10 ³
Blood pressure (BP) (mmHg)		
Systolic	127.76 ± 17.70 ⁴	126.50± 11.40 ⁴
Diastolic	78.24 ±14.60 ⁴	81.00 ± 9.00 ⁴
GFR (mL/min/1.73m²)	87.90 ± 13.80 ⁵	81.00 ±13.80 ⁵

Categorical variables expressed as number (%)

Continuous variables expressed by mean ± Standard deviation

¹ p-value= 0.955- T-test for independent analysis

² p value=0.08 - Chi-square test

³ p- value= 0.672 - T-test for independent samples

⁴ BP systolic (p-value= 0.802) and BP diastolic (p-value= 0.502) - T-test for independent samples

⁵ p- value= 0.138 -T-test for independent samples

Table 2-Urinary enzymes, β 2 microglobulin, protein-creatinine index and microalbuminuria between groups

	Subjects with previous AKI (17)	Healthy volunteers (20)	p-value
UALP (U/L)	5.00 (7.50-2.50)	3.50 (5.00-1.25)	0.154*
UALP (U/mmol U_{cr})	0.44 (1.09-0.23)	0.50 (0.72-0.27)	0.879 *
Uβ2M (U/L)	54.40 (153.00-25.45)	65.00 (85.75-28.50)	0.784*
ULDH (U/L)	22.00 (43.00-11.50)	12.00 (20.25-7.00)	0.043* +
ULDH (U/mmol U_{cr})	2.70 (5.16-1.70)	1.45 (3.10-1.08)	0.120 *
NAG (U/L)	7.00 (12.20-2.75)	5.00 (8.45-1.95)	0.200*
NAG (U/mmol ucr)	2.30 (7.00-1.60)	5.10 (13.20-1.50)	0.235 *
MICA (mg/L)	5.50 (66.30-3.50)	3.00 (8.50-3.00)	0.043 * +
MICA/ucr (mg/g)	7.13 (93.74-4.30)	4.90 (11.56-2.40)	0.055 *
MICA/ucr (mg/g)			
Abnormal>30 mg/g	5 (29.4%)	0	0.014 & +
Normal	12 (70.6%)	20 (100.0%)	
PCI	0.08 (0.21-0.06)	0.04 (0.08-0.04)	0.007* +
Scr (mg/dL)	0.87 \pm 0.16	0.94 \pm 0.16	0.178^

& Chi-square test - number (%)

*Mann Whitney test – Median (interquartile range)

+ Statistical significant (p value < 0.05)

^ T-Test for independent samples– Mean \pm Standard deviation

Table 3 -Fractional excretions, urinary and serum electrolytes, uric acid and transtubular potassium gradient between the groups without subjects that were taken diuretic medication

	Subjects with previous AKI (10)	Healthy volunteers (17)	P-value
Age (years)	52.50 ± 13.40	54.12 ± 12.81	0.758 ^
FEMg	3.55 (5.00-3.00)	2.70 (3.30-1.61)	0.015 * +
SMg (mg/dL)	2.10 ± 0.16	2.23 ± 0.15	0.033 ^ +
UMg (mg/dL)	10.30 ± 4.90	6.00 ± 2.20	0.024 ^ +
FEP	17.70 ± 5.90	13.20 ± 5.33	0.052 ^
SP (mg/dL)	3.13 ± 0.74	3.45 ± 0.65	0.255 ^
UP (mg/dL)	65.10(114.75-51.20)	55.50 (76.65-21.90)	0.248 *
FEK	9.94 (11.32-8.50)	12.02 (19.53-9.64)	0.192 *
SK (mEq/L)	4.60 (5.20-4.20)	4.50 (4.55-4.30)	0.277 *
UK (mEq/L)	57.40± 25.10	64.90± 38.04	0.584 ^
TTKG	4.20 ± 1.30	6.90 ± 3.50	0.010^ +
FEUA	9.1 (11.78-7.30)	7.04 (11.24-5.93)	0.393*
SUA (mg/dL)	5.10 ± 1.25	5.50 ± 1.60	0.446 ^
UUA (mg/dL)	60.3± 23.60	49.53± 26.63	0.301 ^
Urinary Osmolality	844.3± 188.75	670.24±243.06	0.064 ^
Scr (mg/dL)	0.87 ± 0.18	0.96 ±0.15	0.177 ^
GFR (mL/min/1.73m²)	87± 15.42	79.6±13.14	0.197 ^

* Mann Whitney test– Median (interquartile range)

+ Statistical significant (p value < 0.05)

^ T-Test for independent samples– Mean± Standard deviation

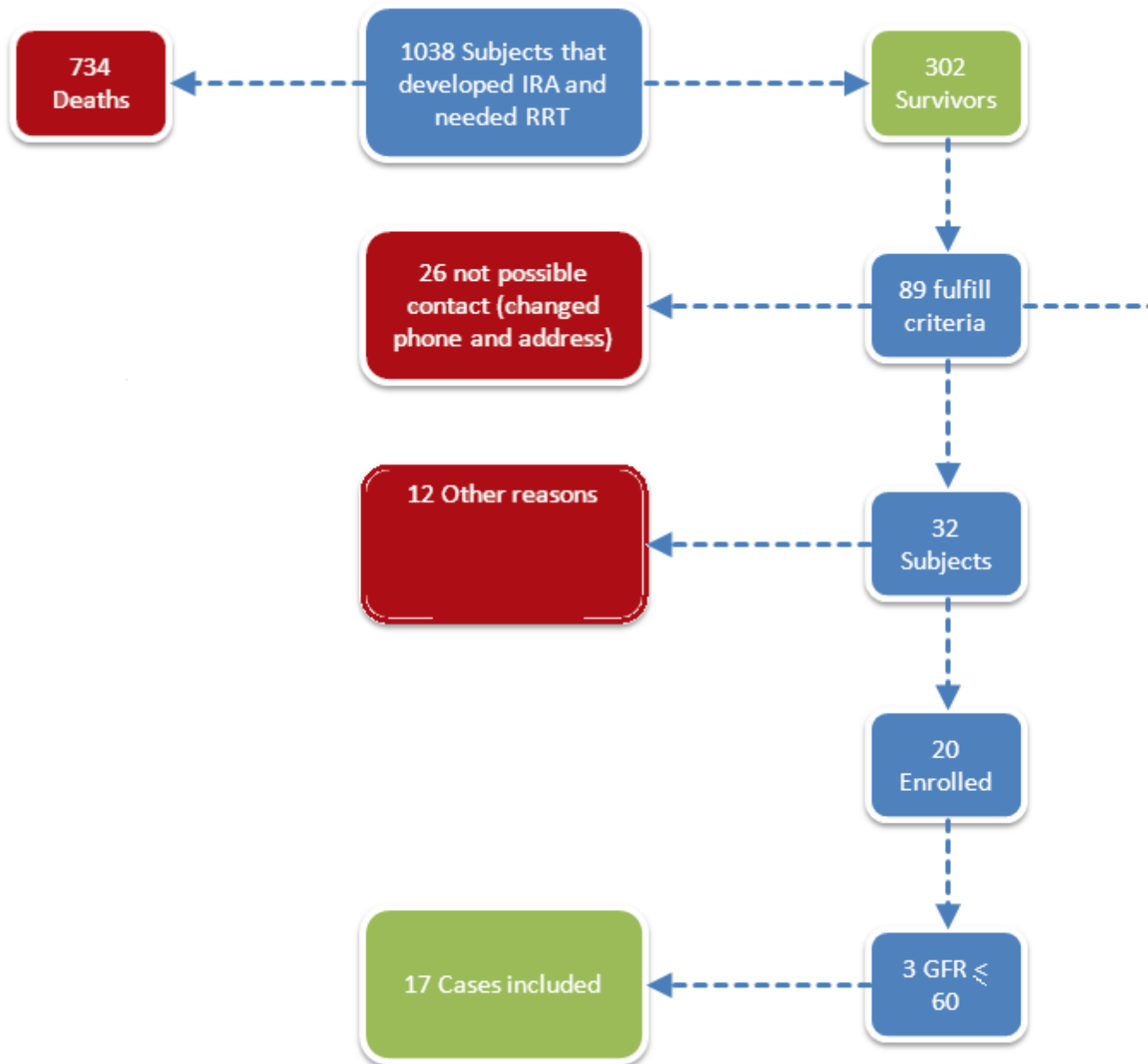
Table 4- Fractional excretions, urinary and serum electrolytes, uric acid and transtubular potassium gradient between the groups without subjects that were taken diuretic ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers medications

	Subjects with previous AKI (6)	Healthy volunteers (16)	P-value
FEMg	4.42 (8.75-2.86)	2.70 (3.30-1.93)	0.032 * ⁺
FEP	17.24 ± 4.60	13.56 ± 5.30	0.149 ^
FEK	11.13 (14.46-8.20)	11.47 (20.74-9.53)	0.693 *
TTKG	4.85 ± 1.22	6.51 ± 3.2	0.094 ^
FEUA	8.91 (11.80-4.83)	8.3 (11.36-5.84)	0.802 *

*Mann Whitney test– Median (interquartile range)

⁺ Statistical significant (p value < 0.05)

[^] T-Test for independent samples– Mean± Standard deviation

Figure 1- Selection of the subjects on the study

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados sugerem que pacientes com prévia insuficiência renal aguda severa com necessidade de terapia renal substitutiva apresentam possível sequela sub clínica caracterizada por dano tubular e glomerular mesmo apresentando uma taxa de filtração glomerular normal. Não é possível prever se os marcadores alterados nos pacientes com IRA indicam predição para IRC ou apenas sequela de IRA. Mais estudos devem ser feitos principalmente para elucidar o papel da fração de excreção de magnésio neste quadro geral.

8. ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Informações sobre a pesquisa

Título: **Avaliação da função tubular renal de pacientes sobreviventes de insuficiência renal aguda severa submetidos a diálise**

Pesquisadores envolvidos: **Dr. Fernando Saldanha Thomé, Dr. Elvino Barros, Farmacêutica Bianca Paula Mentz Chiella**

2. Objetivo

O objetivo deste documento é convidar o(a) sr (a) para participar, se você quiser, de um estudo de pesquisa que está sendo feito no Hospital de Clínicas de Porto Alegre na área de Nefrologia (dos rins). Por favor leia com atenção este documento e converse com o pesquisador envolvido caso tenha alguma dúvida.

Estamos avaliando o uso de um novo exame através da urina para medir como estão seus rins.

3. Procedimentos do estudo

Se você aceitar participar (lembre-se sua participação é voluntária) serão coletados cerca de 2 colheres de chá de urina (10mL) e cerca de 3 colheres de chá de sangue (15mL).

4. Efeitos indesejáveis

Em função da coleta de sangue pode ou não acontecer que a região a qual foi coletado o sangue fique dolorida, roxa e ou inchada que melhoram com o passar dos dias.

5.Participação voluntária

Lembre-se sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode se retirar do estudo a qualquer momento sem ter efeito nenhum no seu tratamento médico futuro.

5. Considerações Finais

Os pesquisadores envolvidos terão acesso às informações de seu prontuário mantendo o sigilo e confidencialidade, ou seja, não serão passadas a nenhuma pessoa não autorizada, seu nome será mantido em sigilo, sendo que o(a) sr(a) será identificado para o estudo através de suas iniciais do nome e um número.

Os pesquisadores envolvidos estão disponíveis através dos telefones 3359 8890 (farmacêutica Bianca Paula Mentz Chiella) ou 3359 8889 (Dr Fernando Saldanha Thomé) em horário comercial ou 99660550 (farmacêutica Bianca Paula Mentz Chiella) ou 99860257 (Dr Fernando Saldanha Thomé) em horário não comercial, para qualquer dúvida durante o período do estudo e o comitê de ética responsável pela supervisão é o Comitê de Ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através dos telefones 3359 8304.

Fui informado através da leitura e explicação das informações contidas neste documento de forma detalhada, bem como o esclarecimento das minhas dúvidas sobre a pesquisa “Avaliação da função tubular renal de pacientes

sobreviventes de insuficiência renal aguda severa submetidos a diálise”.Tenho claro que posso solicitar qualquer novo esclarecimento durante a pesquisa e que tenho a liberdade de retirar o meu consentimento de participação do estudo sem que isto prejudique meus futuros atendimentos no hospital.

Informo que aceito participar de forma espontânea e submeter-me aos procedimentos do estudo (item 3) e tenho claro sobre os possíveis efeitos indesejáveis (item 4) que possam ou não acontecer e que posso contar com a equipe do estudo para qualquer esclarecimento necessário.

Nome em letra de Forma do Paciente

Assinatura do paciente

Data: _____

Nome em letra de Forma do Pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data: _____

