

A sepse como causa de lesão renal aguda: modelo experimental

THE SEPSIS AS CAUSE OF ACUTE KIDNEY INJURY: AN EXPERIMENTAL MODEL

LA SEPSIS COMO CAUSA DE LA LESIÓN RENAL AGUDA INDUCIDA: MODELO EXPERIMENTAL

Carolina Ferreira Pinto¹, Mirian Watanabe², Cassiane Dezoti da Fonseca³, Cecília Ide Ogata⁴, Maria de Fátima Fernandes Vattimo⁵

RESUMO

A sepse associada à falência de múltiplos órgãos como a lesão renal aguda (LRA) demonstra alta taxa de mortalidade no paciente crítico. Este estudo investigou a LRA induzida pela sepse em modelo experimental. Foram utilizados ratos da raça Wistar, adultos e machos divididos nos seguintes grupos: Controle – controle cirúrgico e Sepse – indução da sepse pela ligadura e punção do cécon (LPC). Foram avaliados os parâmetros fisiológicos (temperatura retal, pressão arterial média – PAM, glicemia sérica e fluxo urinário); a função renal (clearance de creatinina); o estresse oxidativo (peróxidos urinários e substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico – TBARS) e realizada a análise histológica renal. O estudo conclui que a LRA induzida pela sepse caracteriza-se por lesão endotelial com disfunção hemodinâmica, liberação de mediadores inflamatórios e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células tubulares, caracterizando-se como uma associação de vasoconstrição renal de origem hemodinâmica e inflamatória.

DESCRIPTORIOS

Lesão renal aguda
Sepse
Inflamação
Oxidação
Experimentação animal

ABSTRACT

Sepsis associated with multiple organ failure such as acute kidney injury (AKI) shows a high mortality rate in critically ill patients. This study investigated the sepsis induced AKI in experimental models. Adult, males, Wistar rats divided into the following groups: Control-surgical control and Sepsis-sepsis induction for the cecal ligation and puncture (CLP). Physiological parameters (rectal temperature, mean arterial pressure-MAP, serum glucose and urinary flow); renal function (creatinine clearance); oxidative stress (urinary peroxides and thiobarbituric acid reactive substances-TBARS) and kidney histological analysis were evaluated. That study concludes that sepsis induces AKI by endothelial injury with hemodynamic dysfunction, release of inflammatory mediators and reactive oxygen species (ROS) generation by tubular cells, in an association of renal vasoconstriction due to hemodynamic and inflammatory disturbances.

DESCRIPTORS

Acute kidney injury
Sepsis
Inflammation
Oxidation
Animal experimentation

RESUMEN

La sepsis asociada la insuficiencia múltiple de órganos como la lesión renal aguda (LRA) muestra una alta tasa de mortalidad en pacientes críticos. Este estudio investigó los mecanismos implicados en la LRA inducida por la sepsis en modelo experimental. Fueron utilizados ratones Wistar, adultos y machos distribuidos en los grupos: Control - control de cirugía, Sepsis - inducción por l ligadura y cecon punción (LPC). Se evaluon los parámetros fisiológicos (temperatura rectal, presión arterial media - PAM, glucosa en suero y flujo de orina), función renal (clearance de creatinina), estrés oxidativo (peróxidos urinarios y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico - TBARS) y histología renal. El estudio concluye que LRA inducida por la sepsis caracteriza por una lesión endotelial con disfunción hemodinámica, liberación de mediadores inflamatorios y generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) por las células tubulares que caracteriza como una asociación de la vasoconstricción renal causas hemodinámica e inflamatorias.

DESCRIPTORIOS

Lesión renal aguda
Sepsis
Inflamación
Oxidación
Experimentación animal

¹ Doutoranda da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil vascof@uol.com.br ² Doutora pela Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. Bolsista FAPESP. São Paulo, SP, Brasil. mirianwat@uol.com.br ³ Doutoranda da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. Bolsista CAPES. São Paulo, SP, Brasil. cassianedezoti@usp.br ⁴ Enfermeira Graduada pela Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. e-mail ceciliaogata@hotmail.com ⁵ Professora Livre Docente do Departamento de Médico-Cirúrgico da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. nephron@usp.br

INTRODUÇÃO

O diagnóstico da lesão renal aguda (LRA) ocorre com a redução súbita da filtração glomerular (FG) e o primeiro exame diagnóstico de perda de função renal é clinicamente evidenciado pelo aumento dos níveis de creatinina sérica, critério este pouco preciso e tardio⁽¹⁻²⁾. Em 2004, com o objetivo de uniformizar os critérios diagnósticos da LRA, o grupo ADQI (*Acute Dialysis Quality*) propôs a classificação de gravidade da LRA, o RIFLE (em inglês *Risk* – risco, *Injury* – lesão, *Failure* – falência, *Loss* – perda, *End* – doença renal terminal)⁽³⁾. Posteriormente, outro grupo de pesquisadores, AKIN (*Acute Kidney Injury Network*), modificou a classificação RIFLE e definiu a LRA como aumento da creatinina sérica igual ou maior a 0,3 mg/dl ou aumento percentual igual ou maior a 1,5 vez o valor basal obtido no último período de 48 horas. Além disso, o critério redução do fluxo urinário passou a exercer função de marcador. Essas organizações diagnósticas são as mais aceitas na atualidade⁽⁴⁾.

A LRA pode ocorrer em diferentes cenários clínicos, entre eles a sepse. Estudo multicêntrico clássico realizado em unidades de terapia intensiva, envolvendo 29.269 pacientes, confirmou a incidência de LRA em aproximadamente 6% daqueles pacientes críticos, e a sepse e a sua forma mais grave, o choque séptico, corresponderam a 50% dos casos⁽²⁾. Outros estudos apresentam incidência de 45% a 70% para a LRA induzida pela sepse⁽⁵⁾.

A sepse é caracterizada como uma intensa resposta inflamatória associada à infecção bacteriana sistêmica grave e apresenta altas taxas de mortalidade em unidades de terapia intensiva, particularmente na presença de falência de múltiplos órgãos, como a LRA, em que alcançam valores de 20% a 35%^(1,5). Apesar de ser descrita como uma síndrome de caráter reversível, o desenvolvimento da insuficiência renal crônica ou doença renal em estágio terminal deve ser considerado nos casos de sepse⁽⁷⁾. Vários rascunhos fisiopatológicos foram propostos para descrever a LRA induzida por sepse, como a vasodilatação que induz a hipoperfusão glomerular, o processo inflamatório e lesão oxidativa, e a disfunção tubular⁽⁸⁾. O exato mecanismo envolvido na LRA induzida por sepse é pouco conhecido pela dificuldade de obter dados histológicos ou análise bioquímica de função renal nas diferentes fases da sepse em estudos clínicos⁽⁹⁾. Estudos experimentais que envolvem modelos animais são indispensáveis para melhor definir e caracterizar a sequência fisiopatológica e para sugerir estratégias de tratamento e acompanhamento que alterem a estatística desfavorável da LRA induzida por sepse⁽⁹⁾.

Os modelos animais de indução da sepse estão divididos em três categorias: modelo inflamatório de indução por lipopolissacarídeos (LPS), sendo a LPS um compo-

nente da membrana celular de bactérias gram-negativas, a sua infusão resulta em processo inflamatório sistêmico que reflete a fase inicial do quadro clínico da sepse com indução de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina -1 (IL-1); administração de bactérias exógenas no animal e reprodução do cenário infeccioso, técnica utilizada em animais de grande porte para estudo hemodinâmico de um órgão específico; e a técnica de ligadura e punção do cécon (LPC), que é largamente utilizada para indução de sepse em modelos animais, que se caracteriza pela ligadura distal da válvula ileocecal e punção do cécon com a saída do conteúdo fecal para o peritônio do animal, seguida de bacteremia e sepse⁽⁹⁾.

A sepse é uma síndrome grave e de causa multifatorial. As respostas clínicas são extremamente agressivas e poucas intervenções farmacológicas têm demonstrado sucesso, uma vez que evolui de forma rápida e descontrolada, sem indicativos do melhor momento clínico para intervir. O estudo da sepse em humanos é restrito por questões éticas e pela rapidez com que desfechos desfavoráveis acontecem.

Assim, a hipótese deste estudo é que o modelo animal de sepse se traduzirá em importante instrumento para a descrição de mecanismos que possam vir a elucidar a fisiopatologia dessa síndrome inflamatória.

OBJETIVOS

Caracterizar mecanismos envolvidos na fisiopatologia da LRA induzida pela sepse em ratos e padronizar o modelo de sepse experimental em animais.

MÉTODO

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, protocolo registrado nº 92 nas fls 106 do livro 02 para uso de animais em experimentação. Todos os animais tiveram acesso livre a água e alimentos, permanecendo em condições térmicas com ciclos de dia e noite durante todo o experimento. Foram utilizados ratos da raça Wistar, adultos e machos pesando entre 250 e 300 gramas divididos nos seguintes grupos: *Controle* – controle cirúrgico com simulação do ato cirúrgico, sem a realização da técnica de LPC; *Sepse* – indução da sepse através da técnica de LPC. Os animais foram anestesiados com tiopental de sódio 40-50 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), submetidos a laparotomia para realização da técnica LPC e colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas. Os animais foram anestesia-

dos novamente com tiopental de sódio 60 mg/kg após esse período para nova laparotomia e coleta de sangue através da punção da aorta abdominal para estudos de função renal (FR), função tubular e estresse oxidativo. O rim esquerdo foi retirado e preparado para realização de cortes histológicos e a coloração do tecido renal foi realizada com hematoxilina-eosina. Nessa última etapa foram avaliados parâmetros fisiológicos dos animais, como: temperatura retal, pressão arterial média (PAM), glicemia sérica e fluxo urinário.

Avaliação da função renal (FR): Efetuada pelo clearance de creatinina por meio da mensuração de creatinina plasmática e urinária realizada pelo método de Jaffe⁽¹⁰⁾. **Estresse oxidativo:** Mensuração dos níveis de peróxidos urinários (PU) pelo método FOX-2. A mensuração dos níveis de PHU é considerada biomarcador da geração de peróxidos de hidrogênio e preditor da extensão de estresse oxidativo em modelos experimentais *in vivo*⁽¹¹⁾. Dosagem de TBARS (substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico) na urina é um método analítico utilizado para detecção de aldeídos reativos ao ácido tiobarbitúrico. O malodealdeído (MDA) é um dos aldeídos frequentemente analisados

Tabela 2 - Função renal

Grupos	Ureia (mg/dl)	Creatinina Sérica (mmHg)	Fluxo Urinário (ml/min)	Clearance Creatinina/100g (mg/dl)
Controle (n = 6)	48±8	0,41±0,33	0,007±0,002	0,65±0,15
Sepse (n = 6)	99±6	0,70±0,36	0,010±0,008	0,21±0,10*

*p < 0,001 versus Controle

A Tabela 2 demonstra a FR dos grupos, e o grupo Sepse apresentou aumento nos níveis de ureia e creatinina plasmática sem significância estatística e manutenção do fluxo urinário. Contudo, observou-se redução significativa do clearance de creatinina no grupo Sepse, confirmando a ocorrência de lesão renal não oligúrica induzida pela sepse.

Tabela 3 - Estresse oxidativo

Grupos	Peróxidos Urinários (nmol/mg de creatinina)	TBARS Urinário (nmol/mg de creatinina)
Controle (n = 6)	2,2±2,3	4,3±2,2
Sepse (n = 6)	12,5±2,2*	13,0±3,4*

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

*p < 0,05 versus Controle

A Tabela 3 mostra os animais do grupo Sepse com valores de peróxidos urinários e de TBARS urinários mais elevados do que o controle, confirmando o desequilíbrio redox e liberação de maiores níveis de aldeídos como o MDA (TBARS urinário) e a presença de lesão oxidativa por peroxidação lipídica.

A Figura 1 ilustra os cortes histológicos para análise dos grupos. O grupo Controle (A) não demonstrou alterações tubulares nos cortes histológicos. Por outro lado, o grupo Sepse (B) foi caracterizado por edema e infiltrado inflamatório difuso do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação da luz tubular e desnudamento da membrana basal na região cortical.

em métodos analíticos para determinação dos índices de peroxidação lipídica⁽¹²⁾. **Glicemia sérica:** caracterizou-se pela mensuração da glicemia sérica, de amostra sanguínea obtida da aorta abdominal ao final do experimento.

Análise Estatística: Utilizou-se a Anova univariada e teste de comparações múltiplas ajustados para Bonferroni. Os valores p < 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

Tabela 1 - Parâmetros fisiológicos

Grupos	Temperatura Retal (°C)	PAM (mmHg)	Glicemia Capilar (mg/dl)
Controle (n=6)	36,4±0,1	88±3	148±55
Sepse (n=6)	34,3±1,1*	60±2*	250±44

PAM – pressão arterial média *p < 0,05 versus Controle

A Tabela 1 mostra que os animais induzidos à sepse demonstraram redução da temperatura retal (p < 0,05) e da pressão arterial média (p < 0,05), com elevação não significativa da glicemia capilar e manutenção do fluxo urinário.

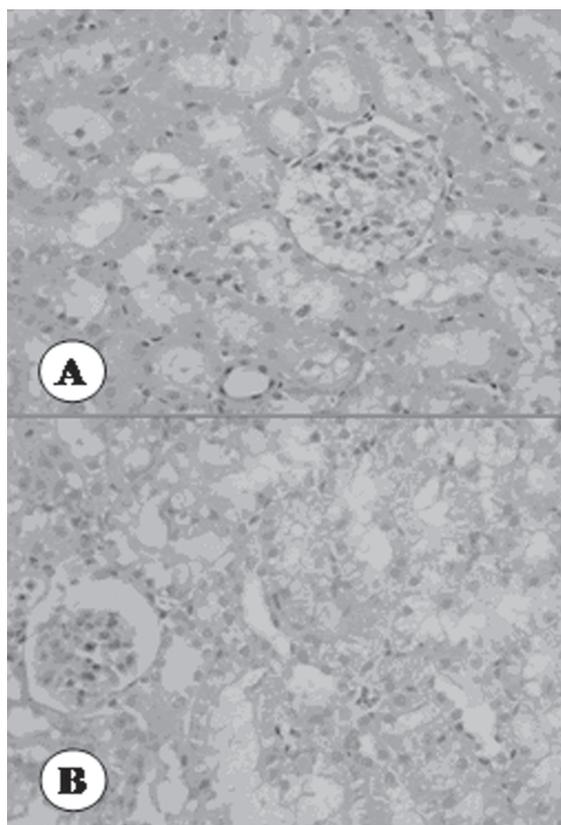


Figura 1 - Fotos dos cortes histológicos para análise dos grupos (aumento de 400X): Controle (A) e Sepse (B).

DISCUSSÃO

A sepse é caracterizada como uma síndrome complexa, não linear, de grande variação e que apresenta critérios e definições divididos em grandes grupos: sepse, sepse grave e choque séptico^(7,12). É também definida como resposta inflamatória e disfunção imunológica que evoluem de um estado hiperdinâmico, em fases precoces, para um estado hipodinâmico em fase tardias⁽⁸⁾.

As primeiras manifestações clínicas da sepse são a taquicardia, a hipotensão, a hipertermia ou a hipotermia com evolução gradativa para falência de múltiplos órgãos^(9,13). A caracterização do grupo Sepse inclui a hipotermia, redução da PAM para 60 mmHg, LRA confirmado pelo aumento nos níveis de ureia e creatinina sérica com redução do *clearance* de creatinina.

O mecanismo de isquemia/reperfusão renal é descrito como a principal causa de LRA associada à sepse. A redução do fluxo sanguíneo renal e hipoperfusão resultam em baixas demandas de oxigênio que induzem a lesão das células do epitélio tubular, a apoptose e necrose tubular aguda em caso de hipoperfusão prolongada⁽¹⁴⁾. Outros fatores associados à própria fisiopatologia da sepse, como a hipovolemia absoluta, vasoplegia e extravasamento capilar com edema intersticial, são fatores que contribuem para redução do transporte de oxigênio⁽¹⁵⁾. A falência renal ocorre com o comprometimento da funcionalidade do órgão que apresenta sinais de desequilíbrio da homeostase de água e eletrólitos e acúmulo por redução da excreção de produtos nitrogenados do metabolismo, como a ureia e a creatinina sérica^(9,14).

O estudo confirmou a redução do *clearance* de creatinina nos animais do grupo Sepse, sublinhando a disfunção renal. Além disso, apesar de não ter sido demonstrada redução significativa, o menor fluxo urinário nos animais sépticos, se aplicado ao sistema classificador de disfunção renal, o AKIN, mencionado na introdução deste trabalho, classificaria esse grupo na categoria 1 (risco), pela creatinina sérica maior ou igual a 0,3 mg/dl ou aumento de uma vez e meia a duas vezes o valor basal. O aumento da creatinina sérica e a redução do ritmo de FG foram descritos como eventos secundários a diminuição da resistência vascular renal (RVR) em estudo experimental em modelo animal de indução da sepse⁽¹⁶⁾. A presença de endotoxinas, a resposta inflamatória com liberação de TNF- α , interferon- γ (IFN- γ) e IL-1 induzem a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na medula renal, nas células mesangiais glomerulares e nas células do endotélio da vasculatura renal com a liberação de altas concentrações de óxido nítrico (NO) de forma intensa e contínua que acarretam em vasodilatação e redução da RVR^(6,9). Paralelamente, o estado de acidose decorrente do choque séptico acarreta baixos níveis celulares de ATP na musculatura lisa das células endoteliais que favorecem a hiperpolarização celular e a saída do íon potássio pelos canais da membrana dependentes de ATP e perpetua o esta-

do de vasodilatação, hipotensão sistêmica e a resistência para catecolaminas e angiotensina II⁽⁹⁾.

A lesão endotelial na LRA induzida pela sepse favorece a formação de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), moléculas de adesão (VCAM) e as selectinas P e E, que promovem a interação leucócito-endotelial, adesão plaquetária e obstrução mecânica da microvasculatura renal⁽¹⁷⁾. A disfunção endotelial induz a formação de citocinas pró-inflamatórias pelas células tubulares que intensificam o processo inflamatório, propiciam a apoptose principalmente das células da região tubular e a lesão oxidativa por geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)^(9,17).

Neste estudo, análise do componente estresse oxidativo para o grupo Sepse sugere lesão oxidativa seguida pelo aumento da liberação do intermediário peróxido de hidrogênio e MDA urinário como produto final da peroxidação lipídica. A descrição do estresse oxidativo na sepse está relacionado com o aumento na produção de EROs e redução nos níveis de antioxidantes⁽¹⁸⁾. Outro fator que intensifica a lesão oxidativa durante a sepse e a cascata inflamatória é a geração de óxido nítrico (NO), considerado um radical livre com a capacidade de interagir com EROs e formar moléculas tóxicas como o peroxidonitrito, que oxidam e lesam as proteínas da membrana celular com toxicidade ainda maior⁽⁹⁾.

A análise da histologia do córtex renal mostrou edema e infiltrado inflamatório difuso do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação da luz tubular e desnudamento da membrana basal na região cortical para o grupo Sepse. Estudos com análise histológica em modelos de LRA induzida por sepse revelam heterogeneidade, sendo relevante o infiltrado inflamatório e alteração da morfologia das células tubulares com perdas das bordas em escova e apoptose. Outras alterações, como disfunção da junção intercelular que favorece o refluxo do fluido tubular através do epitélio renal, a membrana basal que segue com descolamento celular e formação de *debris* na luz dos túbulos com o aparecimento de sedimentos e cilindros tubulares na urina, também são descritas, porém não foram identificadas neste estudo⁽¹⁹⁾.

Resumidamente, na sepse ocorre a ativação de moléculas de adesão no endotélio que resulta na integração leucócitos-endotelial. Os leucócitos ativos aumentam a liberação de mediadores inflamatórios e a geração de EROs pelas células tubulares, que contribuem para progressão da lesão e falência do órgão, caracterizando o quadro de LRA induzida por sepse. Esses mecanismos mais íntimos de lesão não foram avaliados neste estudo, porém os resultados de peroxidação lipídica no grupo Sepse pressupõem que essa desorganização celular e molecular fez-se presente.

A resposta funcional renal e a manifestação precisa do desequilíbrio redox neste estudo caracterizaram o efeito deletério da sepse sobre o rim e esclareceram que possivelmente a geração de espécies livres de oxigênio associada provavelmente ao consumo da reserva antioxidante endógena, seja os principais mecanismos precipitadores

dessa complicação. Esses dados reforçam a propriedade do modelo experimental de sepse como uma alternativa promissora para investigações nessa temática.

CONCLUSÃO

A lesão renal aguda induzida pela sepse em modelo animal se caracteriza por lesão endotelial com disfunção

REFERÊNCIAS

1. Padilha KG, Sousa RMC, Silva MCM, Rodrigues AS. Patient's organ dysfunction in the Intensive Care Unit according to the Logistic Organ Dysfunction System. *Rev Esc Enferm USP* [Internet]. 2009 [cited 2011 Nov 11];43(spe 2):1205-5. Available from: http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v43nspe2/en_a18v43s2.pdf
2. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critical ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005; 294(7):813-8.
3. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mentha RL, Palevsky P. Acute renal failure – definition, outcomes measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-12.
4. Mentha 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.
5. Ostermann M, Chang RW. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE. *Crit Care Med*. 2007;35(8):1837-43.
6. Chandra A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber LD, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clinics*. 2006;61(1):71-6.
7. Coca SG, Yusuf B, Shlipak 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):961-73.
8. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2868-78.
9. Regueira T, Andresen M, Mercado M, Downey P. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda durante la sepsis. *Med Intensiva*. 2011;35(7):424-32.
10. Dezoti C, Watanabe M, Pinto CF, Neiva LBM, Vattimo MFF. Proteção funcional da enzima heme oxigenase-1 na lesão renal aguda isquêmica e tóxica. *Acta Paul Enferm*. 2009;22(n.esp):490-3.
11. Wolff SP. Ferrous ion oxidant in presence of ferric ion indicator xylenol orange for mensuration of hydroperoxides. *Methods Enzymol*. 1994;233:182-9.
12. Walker PD, Shah SV. Reactive oxygen metabolites in endotoxin-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int*. 1990;38(6):1125-32.
13. Delliger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guideline for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2008;36(1):296-327.
14. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4210-21.
15. Wan L, Bellomo R, Giantomasso D, Ronco C. The pathogenesis of septic acute renal failure. *Curr Opin Crit Care*. 2003;9(6):496-502.
16. Lagenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R. Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2007;33(9):1614-8.
17. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004;66(2):480-5.
18. Himmelfarb J, McMonagle E, Freedman S, Klenzak J, McMenamin E, Le P, et al. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(9):2449-56.
19. Fink MP, Delude RL. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin*. 2005; 21(2):177-96.