

Alterações laboratoriais inerentes à lesão renal aguda induzida por aminoglicosídeos em ratos wistar

Laboratory changes inherent to acute kidney injury induced by aminoglycosides in wistar rats

Ana Carolina Queiroz Lima¹ , Ana Bárbara Freitas Rodrigues Godinho^{1*} , Caio Vitor Bueno Dias² , Vinícius Novaes Rocha³ , Hassan Jerdy¹ 

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos, RJ, Brasil

²Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas, TO, Brasil

³Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brasil

*Correspondente: anaanatomiaanimal@gmail.com

Resumo

A lesão renal aguda (LRA) é definida como um aumento superior a 0,3 mg/dL da creatinina sérica em 48 horas e é a principal causa de morte em pacientes em unidades de terapia intensiva. Vinte e quatro ratos Wistar foram divididos em três grupos: Controle (solução salina 0,9%), Genta (gentamicina 50 mg.kg⁻¹ BID) e Des + Genta (gentamicina 50 mg.kg⁻¹ BID + restrição hídrica) e testados em um Modelo AKI por administração de aminoglicosídeos e sujeição à desidratação. Os animais do grupo Des + Genta apresentaram o menor peso médio e o menor consumo de ração após o quinto dia de experimento. Nesse mesmo período, o consumo de água do grupo Genta foi inferior ao do grupo Controle, mas nos dias posteriores do experimento, o grupo Genta apresentou polidipsia. O grupo Des + Genta apresentou média de uréia sérica mais elevada após o quinto dia. Os grupos tratados com gentamicina apresentaram médias superiores à do grupo Controle para a creatinina sérica, que se mostrou um marcador renal tardio de IRA. O valor de GGT sérico foi maior no grupo Des + Genta, enquanto o valor de GGT urinário foi maior nos grupos que receberam gentamicina, caracterizando enzimúria, mas a desidratação severa pode mascarar os resultados por apresentar valores falsos negativos. A enzima GGT urinária não atuou como um biomarcador precoce de IRA. A diminuição da taxa de filtração glomerular aumentou a concentração de componentes do sangue e mascarou componentes urinários e teciduais.

Palavras-chave: Gentamicina; Roedores; Alteração bioquímica.

Abstract

Acute kidney injury (AKI) is defined as an increase greater than 0.3 mg/dL of serum creatinine within 48 hours and is a major cause of death in patients in intensive care units. Twenty-four Wistar rats were divided into three groups: Control (0.9% saline), Genta (gentamicin 50 mg.kg⁻¹ BID) and Deh+Genta (gentamicin 50 mg.kg⁻¹ BID + water restriction) and tested in an AKI model by aminoglycoside administration and dehydration implementation. The animals in the Deh+Genta group exhibited the lowest average weight and feed intake after the fifth day of the experiment. In this same period, water consumption by the Genta group was lower than the Control group, but in the following days of the experiment, polydipsia was noted for this group. The Deh+Genta group displayed the highest mean serum urea after the fifth day. The gentamicin-treated groups exhibited higher means than the Control group for serum creatinine, which proved to be a late renal marker for AKI. Serum GGT was higher in the Deh+Genta group, whereas urinary GGT was higher in the groups that received gentamicin, characterizing enzymuria, although severe dehydration can mask the results by indicating false negative values. The urinary GGT enzyme did not act as an early AKI biomarker. Decreased glomerular filtration rates enhanced the concentration of blood components and masked urinary and tissue components.

Keywords: Gentamycin; Rodents; Biochemical change.

Recebido : 30 de agosto de 2021. Aceito: 8 de novembro de 2021. Publicado: 2 de fevereiro de 2022.

www.revistas.ufg.br/vet como citar - disponível no site, na página do artigo.

Introdução

A doença renal é um problema de saúde pública global, afetando mais de 750 milhões de pessoas em todo o mundo⁽¹⁾. A importância dos rins para a sobrevivência torna-se evidente quando se observam as consequências da perda de função renal. O indivíduo em insuficiência renal retém progressivamente os produtos do

metabolismo nitrogenado, perde a capacidade de diluir e concentrar a urina e torna-se incapaz de regular o equilíbrio ácido-base ou de manter o balanço e os níveis plasmáticos de eletrólitos⁽²⁾. A insuficiência renal aguda (IRA) é definida como a perda abrupta da filtração glomerular dos rins com consequente alteração no equilíbrio hidroeletrólítico e acidobásico no organismo⁽³⁾. Esse desequilíbrio, por sua vez, leva ao acúmulo de

substâncias no sangue como a ureia e a creatinina⁽⁴⁾.

Recentemente o termo “insuficiência” foi substituído por injúria, já que nem todos os pacientes com injúria renal aguda estão em insuficiência renal e nem todos apresentam lesão estrutural. Apesar de o termo ter sido substituído, manteve-se a mesma sigla (IRA) para referir-se à síndrome⁽⁵⁾

De acordo com o *Kidney Disease Improving Global Outcomes*⁽⁶⁾, em humanos, a Injúria Renal Aguda (IRA) é definida como o aumento maior que 0,3 mg/dL de creatinina sérica dentro de 48h, ou aumento de 1,5 vezes da creatinina sérica a partir da linha de base dentro de 7 dias, ou débito urinário inferior a 0,5 ml/kg/h por 6 horas. A IRA⁽⁷⁾ representa uma série contínua de lesões renais de leve, clinicamente inaparentes, perda de néfrons, para insuficiência renal aguda grave. Essa doença é considerada uma condição subdetectada que se estima ocorrer em 8-16% das internações hospitalares, e está agora bem estabelecida como um fator de risco para doença renal crônica⁽⁸⁾.

A International Renal Interest Society (IRIS) desenvolveu uma classificação de cinco graus para o reconhecimento precoce de IRA em cães e gatos. O grau 1 inclui pacientes não azotêmicos (creatinina inferior a 1,6 mg/dL) com IRA comprovada, presença de oligúria ou anúria ou aumentos progressivos da creatinina igual ou superior a 0,3 mg/dL em um intervalo de 48 horas. O Grau 2 inclui pacientes com azotemia estática ou progressiva (creatinina entre 1,7 e 2,5 mg/dl, enquanto o Grau 3 compreende creatinina entre 2,6 a 5,0 mg/dL, Grau 4, entre 5,1 a 10, 0 mg/dle e Grau 5, acima de 10 mg/dL⁽⁷⁾.

A apresentação clínica, o diagnóstico, a terapêutica e a profilaxia da IRA são influenciados pela fisiopatologia do processo. Em 1960, foi proposta uma classificação sobre três formas: IRA pré-renal, IRA renal e IRA pós-renal⁽⁹⁾.

As IRAs relacionada a nefrotoxinas, medicamentos alternativos, agentes infecciosos, assim como hospitalizações e procedimentos associados são mais pronunciados em países de baixa e média-baixa renda, e contribuem para o aumento do risco de mortalidade e DRC nesses locais⁽¹⁰⁾. Segundo Carvalho⁽¹¹⁾, o comprometimento da função renal na IRA resulta em desequilíbrio hidroeletrólítico e acúmulo de resíduos do metabolismo, causando azotemia, uremia, comprometimento sistêmico grave e elevada morbimortalidade em cães. Brown et al.⁽¹²⁾ relataram dois surtos de IRA ocorridos em cães e gatos em 2004 e 2007, associados à alimentação animal comercializada.

De acordo, KDIGO⁽⁶⁾ e ROY et al.⁽¹³⁾, a sepse é o gatilho mais comum para desenvolver a IRA em pacientes hospitalizados, afetando cerca de 36% dos pacientes em UTI, por causar hipoperfusão renal e isquemia, seguida de necrose tubular aguda, algumas das quais constituem as principais complicações da sepse, levando ao fator de

mortalidade⁽¹⁴⁾. A frequência de nefrotoxicidade por aminoglicosídeos pode chegar a 50% quando a terapia é realizada por mais de duas semanas.

O uso de substâncias nefrotóxicas tornou-se mais frequente, em ambiente hospitalar ou não, e que uma série de medicamentos e agentes nefrotóxicos foram incorporados à prática médica, como novos contrastes iodados, imunossupressores, anti-inflamatórios não hormonais, antibióticos, antifúngicos e agentes antivirais^(16,6,13). A evolução no tratamento de doenças graves e o surgimento de medicamentos cada vez mais eficazes e com diferentes mecanismos de ação são agora uma realidade. No entanto, essas drogas resultam em diversos efeitos colaterais, sendo a nefrotoxicidade um dos mais comuns e de maior morbidade.⁽¹⁷⁾

Na medicina humana, utilizam-se aminoglicosídeos para tratamento e profilaxia de infecções após cirurgias cardíacas, sepse e osteomielite⁽¹⁸⁾. Na medicina veterinária, os aminoglicosídeos são utilizados para perfusão regional de membros no tratamento das laminites⁽¹⁹⁾, osteomielites com perfusão intraóssea do antibiótico⁽²⁰⁾, pleuropneumonia e artrite séptica⁽²¹⁾ em cavalos. Além da forma injetável, também estão disponíveis formulações para tratamento de otites e cremes dermatológicos para animais domésticos. Os aminoglicosídeos também estão sendo usados para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes, como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina)⁽²²⁾.

Entretanto, esta droga possui características que a tornam tóxica, assim que penetra no tecido: a ligação na membrana tubular ocorre com a megalina, um receptor endocitótico expressado na membrana apical do epitélio tubular proximal. Uma vez ligado à megalina, o complexo aminoglicosídeo-megalina é transportado para dentro da célula e se une ao lisossomo, onde irá fundir-se com estruturas preexistentes, causando progressiva deposição de lipídeos polares, que adotam disposição lamelar concêntrica, formando o chamado corpo mielóide. Além disto, ocorrem várias outras alterações em organelas e enzimas, como nos ribossomos, nas mitocôndrias e na bomba Na/K-ATPase. Os aminoglicosídeos acumulam-se gradualmente nos lisossomos e induzem alterações morfológicas⁽¹⁵⁾. Nos achados histopatológicos, observa-se necrose tubular aguda tóxica variando de difusa a multifocal, atingindo região cortical externa até a corticomedular, proteinose tubular e infiltrado inflamatório intersticial mononuclear multifocal⁽²³⁾. Como o mecanismo de nefrotoxicidade se dá pelo acúmulo da droga no túbulo contorcido proximal, o uso de uma única dose e período curto de tratamento diminuem os riscos.

Desidratação e outros fatores, como associação com drogas nefrotóxicas, doença renal pré-existente, idade avançada, hipocalcemia e acidose metabólica agravam a injúria^(15,16).

Como a IRA é uma lesão de evolução rápida, os

biomarcadores devem apresentar características e funções para o diagnóstico precoce, como por exemplo: filtração glomerular livre, sem secreção ou reabsorção tubular, sem metabolização ou excreção extrarrenal, entre outras^(6,24).

Novos biomarcadores estão surgindo, e os mais estudados compreende NGAL, interleucina-18, KIM-1, cistatina-C, L-FABP, NAG, netrin-1, vanin-1 e MCP-1. Destes, NGAL é o mais empregado em estudos clínicos, enquanto NGAL e L-FABP são os primeiros, com KIM-1 e IL-18 posteriormente detectados com melhor especificidade⁽²⁵⁾.

Tendo como propósito a reprodução de um modelo de IRA, induzida pela gentamicina, em ratos Wistar normohidratados e desidratados este trabalho objetivou descrever as alterações laboratoriais inerentes à injúria renal aguda causada por gentamicina e potencializada pela desidratação.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Seção de Anatomia Animal do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e seguiu as normas experimentais estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo de número 293. Foram utilizados

24 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando entre 300-450 g, procedentes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ). Os animais foram divididos em 3 grupos de 8 animais, da seguinte maneira: CONTROLE, GENTA e DES+GENTA. O grupo GENTA recebeu a dose de 50mg.kg⁻¹ de gentamicina em duas doses diárias por oito dias; o grupo DES+GENTA foi submetido à restrição hídrica durante o experimento, recebendo o mesmo tratamento que o grupo GENTA; o grupo CONTROLE recebeu o mesmo volume, em mililitros, de solução salina 0,9% a cada 12h por oito dias (Tabela 1). A eutanásia foi realizada em dois momentos, dias 5 e 8, com o intuito de avaliar a condição histopatológica do fígado e consequentemente excluir a possibilidade de alteração hepática causando aumento da enzima GGT sérica. Um fragmento de 4 cm³ do fígado foi coletado e acondicionado em recipiente previamente identificado para serem processados em rotina histológica. Foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), a análise das amostras foi feita por microscopia de luz em um microscópio Olympus BX 41. Fotomicrografias foram realizadas com Nikon Eclipse 80i (Kurobane Nikon Co., Ltd, Otawara, Tochigi, Japan utilizando o software the NIS – Elements – BR).

Tabela 1. Descrição da estratégia experimental em função do tempo (dias) e da evolução dos grupos (Controle, Genta e Deh+Genta).

| Grupo/Dia | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Controle | NaCl 0.9% BID | NaCl 0.9% BID | NaCl 0.9% BID | NaCl 0.9% BID | NaCl 0.9% BID | NaCl 0.9% BID | NaCl 0.9% BID | NaCl 0.9% BID |
| | | | | | Eutanásia 4 animais | | | Eutanásia 4 animais |
| Genta | Gentamicina BID | Gentamicina BID | Gentamicina BID | Gentamicina BID | Gentamicina BID | Gentamicina BID | Gentamicina BID | Gentamicina BID |
| | | | | | Eutanásia 4 animais | | | Eutanásia 4 animais |
| Deh + Genta | Restrição de água + gentamicina BID | Restrição de água + gentamicina BID | Restrição de água + gentamicina BID | Restrição de água + gentamicina BID | Restrição de água + gentamicina BID | Restrição de água + gentamicina BID | Restrição de água + gentamicina BID | Restrição de água + gentamicina BID |
| | | | | | Eutanásia 4 animais | | | Eutanásia 4 animais |

Os animais receberam ração peletizada e água *ad libitum* durante todo o período do experimento (NEVES et al., 2013), com exceção do grupo DES+GENTA. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas modificadas e estas mantidas em uma sala com controle do ciclo claro-escuro (12/12 h), ventilação e da temperatura ambiente (20°C).

Os exames laboratoriais foram realizados a partir da coleta de sangue para realização do hemograma e análise bioquímica sérica de ureia, creatinina e gama glutamil transferase (GGT). A coleta de sangue foi feita nos animais previamente anestesiados (isoflurano, dose-efeito), por punção cardíaca com agulha 0,45x13 mm (26G) e seringa de 1 mL. A coleta de urina proporcionou

a dosagem da enzima gama glutamil transferase urinária (GGT urinária), da creatinina urinária e da proteína urinária. Estes exames foram efetuados imediatamente antes do início do experimento, confirmando a ausência de alterações sistêmicas. Para acompanhamento da IRA, foram repetidas a cada 48 horas as dosagens de ureia e creatinina sanguíneas e a cada 24h, a GGT urinária. Para excluir a possibilidade alteração hepática causando aumento da GGT na urina, esta enzima também foi mensurada no soro a cada coleta de sangue.

Análise hematológica

Os hemogramas foram realizados em analisador automático SDH-3 vet Labtest, onde foram obtidos os valores para células vermelhas, brancas e plaquetas.

Para a obtenção do valor do hematócrito, utilizou-se o método de microcentrifugação (10.000 rpm – 5 min) e após esse processamento fez-se a leitura do hematócrito em tabela específica.

Após obtenção do microhematócrito, o capilar foi fragmentado na altura da divisão entre o plasma e as células sanguíneas. O plasma foi então assentado no refratômetro devidamente calibrado para observação das proteínas totais.

Análise bioquímica

Os testes bioquímicos foram realizados utilizando-se kits comerciais Labtest®, através do aparelho semiautomático Bioplus 200. A determinação da creatinina foi realizada pelo método de Jaffé modificado e os níveis de ureia sérica foram determinados por teste enzimático colorimétrico. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e a concentração de ureia expressa em mg/dL.

Da mesma forma a dosagem da enzima gama glutamil transferase (GGT) no soro foi feita pelo kit comercial Labtest. Foi feita então a leitura da absorbância (A1) em 405 nm, disparando o cronômetro simultaneamente. A leitura foi repetida após dois minutos (A2).

Análise urinária

A dosagem de proteína foi feita nas amostras de urina por colorimetria usando-se o kit Sensiprot (Labtest®). É a dosagem da enzima gama glutamil transferase (GGT) na urina foi feita pelo mesmo processamento anteriormente descrito para GGT em soro.

Em relação às variáveis peso, consumo de ração e água, débito urinário, ureia e creatinina séricas, GGT sérica, GGT urinária, proteína urinária, assim como os dados oriundos da hematologia dos animais foram avaliados com uso de modelos mistos com o procedimento PROC

MIXED do software Statistical Analysis System (SAS System, Inc., Cary, NC, USA), e em caso de diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Peso dos animais, consumo de ração e água

Os animais do grupo Deh + Genta apresentaram o menor peso médio e o menor consumo de ração durante os oito dias de experimento. A perda de peso acentuada pode ser atribuída principalmente à desidratação, provavelmente associada à acidose metabólica e anorexia por intoxicação por gentamicina (27). Os três grupos apresentaram valores médios de peso iguais até o quinto dia de experimento, enquanto nos últimos dias o grupo Deh + Genta apresentou peso médio inferior aos outros dois grupos. Os animais do grupo Controle consumiram mais ração, enquanto os animais submetidos à desidratação consumiram menos (Figuras 1 e 2)

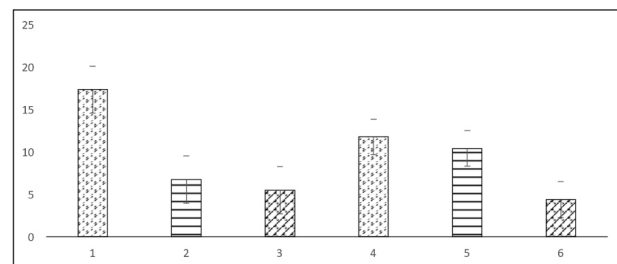


Figura 1: valores médios encontrados para a variável peso (em gramas). Os números 1,2,3 são referentes à interação entre o óbito do dia 5 com os tratamentos dos grupos CONTROLE, GENTA e DES+GENTA. Os números 4, 5 e 6 são referentes à interação entre o óbito do dia 8 com os tratamentos dos grupos CONTROLE, GENTA e DES+GENTA.

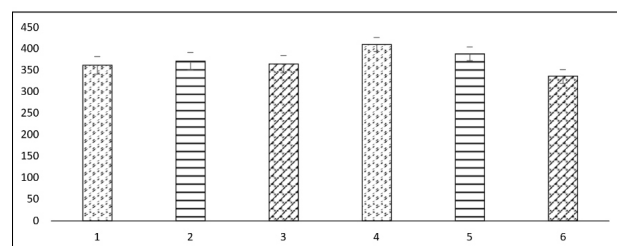


Figura 2: valores médios encontrados para a variável consumo de ração (em gramas). 1 é a interação entre o grupo CONTROLE e o óbito no dia 5; 2 é a interação entre o grupo GENTA e o óbito no dia 5 e 3 é a interação entre o óbito no dia 5 e o tratamento do grupo DES+GENTA. Já os números 4, 5 e 6 são referentes à interação entre o óbito do dia 8 com os tratamentos dos grupos CONTROLE, GENTA e DES+GENTA.

Provavelmente, anorexia e desconforto causaram o menor consumo de água observado no grupo Genta em comparação ao Controle até o quinto dia (27). Porém, nos últimos dias do experimento (até o oitavo dia), os animais do grupo Genta apresentaram o maior consumo médio de água em relação aos animais pertencentes ao mesmo grupo no primeiro momento de eutanásia, mas igual ao grupo Controle no mesmo período (Figura 3). Após o

quinto dia, o grupo Genta apresentou polidipsia, conforme também relatado por Dantas et al. (23) e Melchert et al. (28).

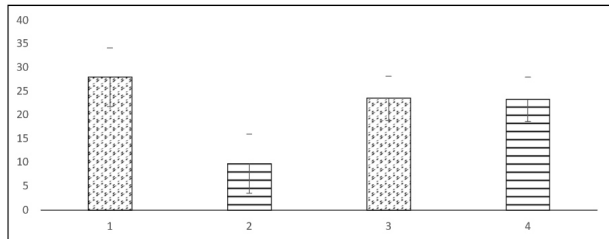


Figura 3: valores médios encontrados para a variável consumo de água (em mL). 1 é a interação entre o grupo CONTROLE e o óbito no dia 5; 2 é a interação entre o grupo GENTA e o óbito no dia 5. Já os números 3 e 4 são referentes à interação entre o óbito do dia 8 com os tratamentos dos grupos CONTROLE e GENTA.

Débito urinário (D.U.)

O débito urinário dos grupos GENTA e CONTROLE apresentou médias iguais em ambos os momentos de eutanásia, contradizendo com os estudos feitos por Erdem et al(27) e Oliveira et al(15), onde foi observada poliúria. Adbeen et al.(29), ainda comprovaram o aumento da excreção de aquaporina-2 na urina, associada a poliúria e danos nos túbulos renais. Devido à restrição hídrica, o grupo DES+GENTA apresentou a menor média e estatisticamente diferente dos outros grupos em ambos os momentos analisados (Figura 4).

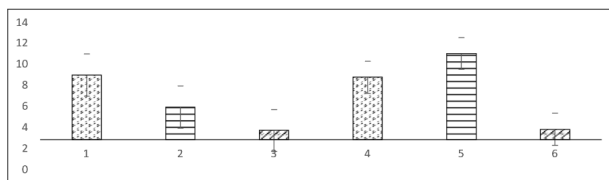


Figura 4: valores médios encontrados para as variável débito urinário (em mL). 1 é a interação entre o grupo CONTROLE e o óbito no dia 5; 2 é a interação entre o grupo GENTA e o óbito no dia 5 e 3 é a interação entre o óbito no dia 5 e o tratamento do grupo DES+GENTA. Já os números 4, 5 e 6 são referentes à interação entre o óbito do dia 8 com os tratamentos dos grupos CONTROLE, GENTA e DES+GENTA.

Ureia e creatinina séricas

Os maiores valores para ureia sérica foram encontrados no grupo DES+GENTA, enquanto que os grupos CONTROLE e GENTA não foram diferentes estatisticamente (Figura 5). A ureia é um preditor fraco da filtração glomerular, pois 40-70% retornam para o plasma por um processo de difusão passiva tubular, que é dependente do fluxo urinário(30).O aumento da ureia serica só foi possível de ser detectado tardiamente durante essa experimentação, no oitavo dia. Neste sentido, acreditamos na necessidade de desenvolvimento de novos biomarcadores para o diagnóstico precoce, estratificação de risco e prognóstico de lesão renal como indicado por Dusse et al(31). Outros fatores podem mudar

significativamente os valores séricos da ureia sem terem relação com a função renal, como a dieta, a taxa de produção hepática, desidratação, trauma, insuficiência cardíaca congestiva, infecção, depleção de sódio e uso de corticosteroides, diuréticos ou tetraciclina(32).

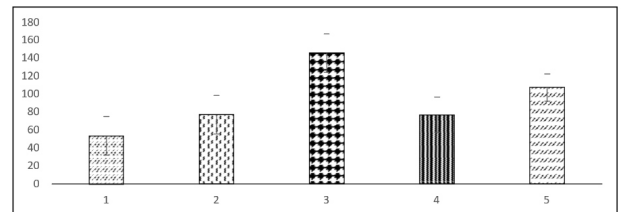


Figura 5: valores médios encontrados para a variável ureia (em mg/dL). Tratamento (1 a 3, onde 1 é o grupo CONTROLE, 2 é o grupo GENTA e 3 é o grupo DES+GENTA) e óbito (4 e 5, onde 4 é o óbito no dia 5 e 5 é o óbito no dia 8).

Os valores médios de creatinina para os três grupos até o quinto dia de experimento foram iguais, enquanto que do quinto ao oitavo dia, os animais que receberam o tratamento com gentamicina (GENTA e DES+GENTA) tiveram médias iguais, diferentes e superiores ao grupo CONTROLE. Estes resultados corroboram com os achados de Oliveira et al.(15), Cobrin et al.(24) and Abdeen et al.(29), nos quais foi observado que a creatinina sérica é um marcador renal tardio e só aumenta depois do terceiro dia de injúria renal. A restrição hídrica do grupo DES+GENTA não foi significativamente importante para determinar azotemia pré-renal e aumentar o nível de creatinina sérica (Figura 6).

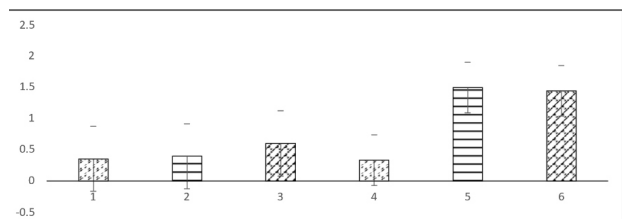


Figura 6: valores médios encontrados para a variável creatinina (em mg/dL). 1 é a interação entre o grupo CONTROLE e o óbito no dia 5; 2 é a interação entre o grupo GENTA e o óbito no dia 5 e 3 é a interação entre o óbito no dia 5 e o tratamento do grupo DES+GENTA. Já os números 4, 5 e 6 são referentes à interação entre o óbito do dia 8 com os tratamentos dos grupos CONTROLE, GENTA e DES+GENTA.

Vários fatores causam alterações renais, e os marcadores mais comumente empregados, os níveis de ureia e creatinina, variam apenas quando cerca de 66% a 75% da função total do néfron é perdida(33). Portanto, a lesão renal está presente antes do início das alterações bioquímicas em pacientes com insuficiência renal intrínseca que apresentam excesso de nitrogênio no sangue (34).

Ggt sérica e ggt urinária

O valor da GGT sérica foi maior e significativamente diferente no grupo DES+GENTA que nos demais grupos

(Figura 7). Com a desidratação, ocorre diminuição da taxa de filtração glomerular e aumento da reabsorção tubular⁽³⁵⁾. Como a GGT urinária é secretada pelas células com borda em escova do túbulo contorcido proximal, o fluido tubular foi absorvido de maneira sistêmica, corroborando com os valores de GGT sérica maiores no grupo DES+GENTA até o oitavo dia de experimento. CRIVELLENTI et al. 2014 conseguiram mensurar falsos valores positivos de GGT na urina quando se administrou uma droga não nefrotóxica em cães. É possível que os valores de GGT encontrados na urina deste estudo não sejam provenientes de lesão tubular.

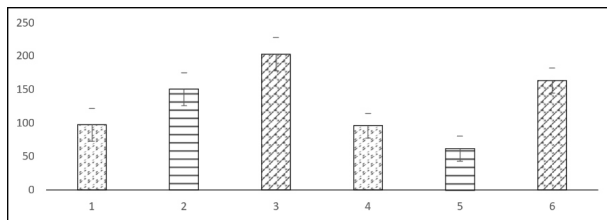


Figura 7: valores médios encontrados para a variável GGTsérica (em UI/L). 1 é a interação entre o grupo CONTROLE e o óbito no dia 5; 2 é a interação entre o grupo GENTA e o óbito no dia 5 e 3 é a interação entre o óbito no dia 5 e o tratamento do grupo DES+GENTA. Já os números 4, 5 e 6 são referentes à interação entre o óbito do dia 8 com os tratamentos dos grupos CONTROLE, GENTA e DES+GENTA.

Os resultados para os valores de GGT urinária em cães encontrados Dantas et al.⁽²³⁾ and Melchert et al.⁽²⁸⁾ indicaram que a GGT é um bom marcador precoce de lesão tubular aguda, pois foi observado que a enzima aumentava na urina dos animais com três dias de indução à IRA⁽²⁴⁾. No presente estudo, os valores de GGT urinário para os três grupos não mostraram qualquer interação com o momento da eutanásia (Figura 8). Os ratos que receberam gentamicina apresentaram níveis iguais e superiores aos do grupo Controle, corroborando com Vicente-Vicente et al.⁽³⁷⁾, que relataram que a gentamicina causa proteinúria e enzimúria.

Não houve alteração nas amostras histopatológicas para análise do tecido hepático no presente trabalho, evidenciando que as alterações na enzima GGT não interferiram em possível excreção renal, aumentando os valores da GGT urinária. Nale et al.⁽³⁸⁾ encontraram alterações hepáticas após administrar gentamicina por via intraperitoneal na dose diária de 40 mg/kg por 14 dias. Por sua vez, Noorei et al.⁽³⁹⁾ observaram efeito hepatotóxico da gentamicina na dose diária de 80 mg / kg por 7 dias, com desarranjo do cordão dos hepatócitos com alterações do citoplasma granular, edema de hepatócitos multifocal, congestão do sangue central, portal e sinusoidal vasos, degeneração focal e necrose, juntamente com infiltração de células mononucleares. Utilizamos a dose diária de 100 mg/kg, dividida em duas aplicações iguais, e ainda não foi observado comprometimento hepático, conforme relatado por outros autores.

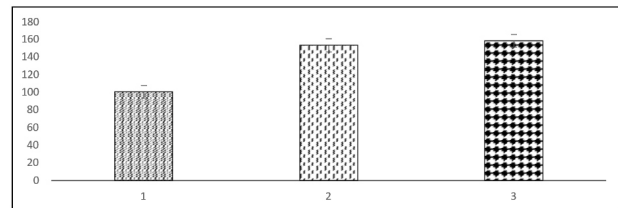


Figura 8: valores médios encontrados para a variável GGTurinária (em UI/L). não houve interação entre o dia do óbito e os tratamentos do experimento. As barras representam os valores médios para: 1 – grupo CONTROLE; 2 – grupo GENTA; 3 – grupo DES+GENTA.

Proteína urinária

Os níveis de proteína urinária só aumentaram após o quinto dia de experimento. O grupo Genta apresentou níveis significativamente superiores aos grupos Controle e Des + Genta. Os animais submetidos à desidratação apresentaram menores níveis de proteína urinária e débito urinário (Figura 9). Dividindo os valores médios de proteína urinária pelo débito urinário, obteve-se proteína urinária / ml de urina, em mg. Empregando essa métrica, os grupos Des + Genta e Genta foram estatisticamente iguais ($p = 0,46$), enquanto o grupo Controle foi significativamente diferente do grupo Des + Genta ($p = 0,01$). Não foi observada diferença significativa ($p = 0,21$) entre os grupos Controle e Genta. Como mencionado anteriormente, a gentamicina causa proteinúria e enzimúria^(24, 28, 37), mas a desidratação grave mascara esses efeitos, resultando em valores falsos negativos.

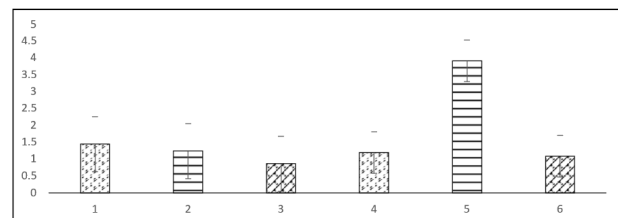


Figura 9: valores médios encontrados para a variável proteína urinária (g/dL). 1 é a interação entre o grupo CONTROLE e o óbito no dia 5; 2 é a interação entre o grupo GENTA e o óbito no dia 5 e 3 é a interação entre o óbito no dia 5 e o tratamento do grupo DES+GENTA. Já os números 4, 5 e 6 são referentes à interação entre o óbito do dia 8 com os tratamentos dos grupos CONTROLE, GENTA e DES+GENTA.

Hematologia

Os dados de hematologia foram registrados antes do início do experimento para garantir que os animais estivessem saudáveis e sem outras afecções concomitantes. As médias encontradas para a hematologia dos animais dos três grupos foram dentro do padrão estabelecido para a espécie⁽⁴⁰⁾.

Os animais foram submetidos a um novo hemograma para comparar os achados hematológicos 48 horas após o início do experimento. Os valores de eritrócitos e hematócrito dos animais do grupo DES+GENTA apresentaram $p < 0,05$ de significância, ou seja, os valores

dos componentes sanguíneos do dia três, para o referido grupo, foram diferentes dos demais grupos, e maiores que do dia um, devido à concentração no plasma. A hematologia do grupo DES+GENTA apresentou policitemia relativa, corroborando com os dados apresentados por Lopes et al⁽⁴¹⁾. A policitemia relativa comumente caracterizada pelo aumento do hematócrito é decorrente de desidratação que, por sua vez, reduz o volume plasmático e aumenta a concentração das proteínas plasmáticas e das hemácias. A leucopenia muitas vezes se deve à diminuição dos neutrófilos e pode ser de causas fisiológica ou induzida por drogas ⁽⁴²⁾ (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e erros padrão da hematologia entre os dias 1 e 3 do grupo DES+GENTA

| Valorp | Dia 3 | Dia 1 | Variáveis |
|--------|------------|------------|-------------------------|
| 0,0005 | 8,76±0,13 | 7,93±0,13 | Eritrócitos (x106/μL) |
| 0,318 | 13,14±0,27 | 12,24±0,27 | Hemoglobina (g/dL) |
| 0,0018 | 48,13±0,6 | 44,88±0,6 | Hematócrito (%) |
| 0,1912 | 4,96±0,65 | 6,22±0,65 | Leucócitos (/μL) |
| 0,0971 | 8,15±0,15 | 7,76±0,15 | Proteínas Totais (g/dL) |

Conclusões

Os resultados aqui relatados indicam que a administração de 100 mg/kg de gentamicina, BID, apesar de causar lesão renal aguda, não resultou em alterações hepáticas. O modelo IRA em ratos Wistar induzido pela gentamicina e potencializado pela desidratação foi capaz de provocar policitemia causada pela desidratação após 48 horas de restrição hídrica. É evidente que a diminuição das taxas de filtração glomerular causada pela desidratação, aumentam as concentrações de hemocomponentes e mascara os componentes urinários e o tecido renal. A busca por biomarcadores de IRA eficientes é, portanto, fundamental, pois a enzima urinária GGT não é um biomarcador precoce confiável para detectar lesão renal aguda.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições do autor

Conceituação: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho, C. V. B. Dias, V. N. Rocha, H. Jerdy; Curadoria de dados: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho; Análise formal: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho; Aquisição de financiamento: A. B. F. R. Godinho; Investigação: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho; Metodologia: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho, C. V. B. Dias, V. N. Rocha, H. Jerdy; Gerenciamento do projeto: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho; Recursos: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho, C. V.

B. Dias, V. N. Rocha, H. Jerdy; Supervisão: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Lima; Validação: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho, C. V. B. Dias, V. N. Rocha, H. Jerdy; Visualização: A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho; Redação (esboço original): A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho, C. V. B. Dias, V. N. Rocha, H. Jerdy; Redação (revisão e edição): A. C. Q. Lima, A. B. F. R. Godinho, C. V. B. Dias, V. N. Rocha, H. Jerdy

References

- Bikbov B, Perico N, Remuzzi G. Disparities in chronic kidney disease prevalence among males and females in 195 countries: Analysis of the Global Burden of Disease 2016 Study. *Nephron* [Internet]. 2018 May; 139(4): 313-318. Available from: <https://doi.org/10.1159/000489897>.
- Santos ESS, Marinho CMS. Principais causas de insuficiência renal aguda em unidades de terapia intensiva: intervenção de enfermagem [Main causes of acute renal insufficiency in intensive care units: nursing intervention]. *Revista de Enfermagem* [Internet]. 2013 Mar; serIII(9): 181-189. Available from: <https://dx.doi.org/10.12707/RIII1272>.
- Young WP, Eun AhH, Jang MH, Park SB, Chul-hyun K. The Risk Factors and Outcome of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Units. *The Korean Journal of Internal Medicine* [Internet]. 2010 Jun; 25(2): 181- 187. Available from: <https://doi.org/10.3904/kjim.2010.25.2.181>.
- Silva VTC, Yu L. Consulta nefrológica em 10 minutos: abordagem clínica da oligúria [Clinical approach to oliguria]. *Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da USP. Jornal Brasileiro de Nefrologia* [Internet]. 2009 July/Sept; 31(3): 173- 174. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0101-28002009000300001>.
- Wahab A, Sagladi AM. Acute kidney injury: new definitions and beyond. *Journal of Nephrol Therapeut* [Internet]. 2016 Jan; 6(1): 1-4. Available from: <https://doi.org/10.4172/2161-0959.1000234>.
- KDIGO. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney int (Suppl), Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group*; 2012. Available from: <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.6>.
- IRIS. Grading of Acute Kidney Injury (AKI) Guidelines para tratamento da IRA nefrotóxica. *International Renal Interest Society (IRIS)*; 2019. Available from: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/recommendations.html>. Portuguese.
- Sawhney S, Marks A, Fluck N, Levin A, Prescott G, Black C. Intermediate and Long-term Outcomes of Survivors of Acute Kidney Injury Episodes: A Large Population-Based Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases* [Internet]. 2017 Jan; 69(1): 18-28. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.05.018>.
- Yu L, Santos BFC dos, Burdman EA, Suassuna JHR, Batista PBP. Insuficiência Renal w1). Available from: <https://bjnephrology.org/article/insuficiencia-renal-aguda/>.
- Luyckx VA, Tuttle KR, Garcia-Garcia G, Gharbi MB, Heerspink HJL, Johnson DW, Liu Zhi-Hong, Massy ZA, Moe O, Nelson RG, Sola L, Wheeler DC, White SL. Reducing major risk factors for chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* [Internet]. 2017 Oct; 7(2), 71-87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2017.07.003>.
- Carvalho MB. Insuficiência renal aguda. In: Jericó MM, Neto JPA, Kogika MM. *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. Rio de Janeiro: Editora Roca; 2015. Portuguese.
- Brown CA, Kyu-Shikjeong RH, Poppenga BP, Miller DM,

- Ellis KAEK, Sum S, Cistola AM, Brown SA. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [Internet]. 2007 Sep; 19(5): 525-531. Available from: <https://doi.org/10.1177/104063870701900510>.
13. Roy AK, Gorrián MC, Treacy C, Kavanaugh E, Brennan A, Mahon NG, Murray TA. A Comparison of Traditional and Novel Definitions (RIFLE, AKIN, and KDIGO) of Acute Kidney Injury for the Prediction of Outcomes in Acute Decompensated Heart Failure. *Cardiorenal Medicine* [Internet]. 2013 Apr; 3(1): 26-37. Available from: <https://doi.org/10.1159/000347037>.
14. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Critical Care* [Internet]. 2008 Apr; 12(2): 1-9. Available from: <https://doi.org/10.1186/cc6863>.
15. Oliveira JF, Cipullo JP, Burdmann EA. Aminoglycoside: Nephrotoxicity. *Brazilian Journal Cardiovascular Surgery* [Internet]. 2006; 21(4): 444-452. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-76382006000400015>.
16. Costa JAC, Vieira-Neto OM, Moysés NM. Insuficiência renal aguda [Acute renal failure]. *Medicina (Ribeirão Preto)* [Internet]. 2003 Abr/Dez; 36(2/4): 307-324. Available from: <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v36i2/4p307-324>.
17. Sales GTM, Foresto RD. Drug-induced nephrotoxicity. *Revista da Associação Médica Brasileira* [Internet]. 2020 Jan; 66(1):82-90 Available from: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.S1.82>.
18. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. Osteomyelitis in long bones. *The Journal of Bone & Joint Surgery* [Internet]. 2004 Oct; 86(10): 2305-2318. Available from: <https://doi.org/10.2106/00004623-200410000-00028>.
19. Beccar-Varela AM, Epstein KL, White CL. Effect of Experimentally Induced Synovitis on Amikacin Concentrations after Intravenous Regional Limb Perfusion. *Veterinary Surgery* [Internet]. 2011 Sep; 40(7): 891-897. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2011.00875.x>.
20. Parker RA, Bladon BM, McGovern K, Smith KC. Osteomyelitis and Osteonecrosis after Intraosseous Perfusion with Gentamicin. *Veterinary Surgery* [Internet]. 2010 Jul; 39(5): 644-648. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2010.00685.x>.
21. Hagggett EF, Wilson WD. Overview of the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections in horses. *Equine Veterinary Education* [Internet]. 2008 Jan; 20(8): 433-448. Available from: <https://doi.org/10.2746/095777308X338893>.
22. Tan L, Zhou Z, Liu X, Li J, Z heng Y, Cui Z, Yang X, Liang Y, Li Z, Feng X, Zhu S, Yeung KWK, Yang C, Wang X, Wu S. Overcoming Multidrug-Resistant MRSA Using Conventional Aminoglycoside Antibiotics. *Advanced Science* [Internet]. 2020 2020; 7, 1902070: 1-9. Available from: <https://doi.org/10.1002/advs.201902070>.
23. Dantas AFM, Kommers GD, Hennemann CRA. Intoxicação experimental por gentamicina em cães [Experimental gentamicin toxicosis in dogs]. *Ciência Rural* [Internet]. 1997; 27(3): 451-456. Available from: <https://doi.org/10.2746/095777308X338893>.
24. Cobrin R, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg ACG, Dewey C. Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice* [Internet]. 2013 Oct; 54: 647-55. Available from: <https://doi.org/10.1111/jsap.12150>.
25. Peres LAB, Júnior ADC, Schäfer AJ, Silva AL, Gaspar AD, Scarpari DF, Alves JBF, Neto RG, Oliveira TFT. Biomarkers of acute kidney injury. 2013 Sep; 35(3): 229-236. Available from: <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130036>.
26. Neves SMP. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP; 2013. Available from: <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>. Portuguese.
27. Erdem A, Gündoğan NU, Usubütün A, Kiliç K, Erdem SR, Kara A, Bozkurt A. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2000 Aug; 15(8): 1175-1182. Available from: <https://doi.org/10.1093/ndt/15.8.1175>.
28. Melchert A, Laposy CB, Motta YP, Garcia ACFZ. Gama-glutamyl transpeptidase urinária como indicador de insuficiência renal aguda induzida por gentamicina em cães [Urinary gamma-glutamyl transpeptidase as an indicator of acute renal failure induced by gentamicin in dogs]. *Arquivos de Ciência Veterinária e Zootecia da UNIPAR* [Internet]. 2007 Jul/Dez; 10(2): 111-116. Available from: <https://revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/2057#>.
29. Abdeen A, Sonoda H, EL-Shawarby R, Takahashi S, Ikeda M. Urinary excretion pattern of exosomal aquaporin-2 in rats that received gentamicin. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2014 Dec; 307(11): 1227-1237. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00140.2014>.
30. Johnson AM. Aminoácidos e proteínas. In: Burtis CA, Ashwood ER, Brunts DE. *Fundamentos de Química Clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 295-325. Portuguese.
31. Dusse LMS, Rios DRA, Sousa LPN, Morais RM, Silva M, Domingueti CP, Gomes KB. Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente? [Biomarkers of renal function: what is currently available?]. *Revista RBAC* [Internet]. 2017; 49(1): 41-51. Disponível em: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600427>.
32. Vidigal PG. Investigação laboratorial do paciente com disfunção renal. In: Erichsen E, Viana LG, Faria RMD, Santos SME. *Medicina Laboratorial para o Clínico*. Belo Horizonte: Coopmed; 2009. p. 439-468. Portuguese.
33. Dibartola SP. Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of veterinary internal medicine*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 1600-1614.
34. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Comprehensive Physiology* [Internet]. 2012 Apr [Available in PMC 2014 Feb 10]; 2(2): 1303-1353. Available from: <https://doi.org/10.1002/cphy.c110041>.
35. Nelson RW, Couto GC. *Small Animal Internal Medicine*. St. Louis: Elsevier Saunders; 2009.
36. Crivellenti LZ, Mesa JS, Meirelles AÉ, Borin CS, Mireya EG, Canola JC, Hatayde MR, Santana AE, Dantas M, Silva GE. False positivity of gamma-glutamyl transpeptidase measurement in urine. *Renal Failure* [Internet]. 2014 May; 36(4): 581-584. Available from: <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.880325>.
37. Vicente-Vicente L, Ferreira L, González-Buitrago JM, López-Hernández FJ, López-Novoa JM, Morales AL. Increased urinary excretion of albumin, hemopexin, transferrin and VDBP correlates with chronic sensitization to gentamicin nephrotoxicity in rats. *Toxicology* [Internet]. 2013 Feb; 304: 83-91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.006>.
38. Nale LP, More PR, More BK, Ghumare BC, Shendre SB,

Mote CS. Protective effect of *Carica papaya* L. seed extract in gentamicin induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2012 Jul; 3(3): 508-515. Available from: <https://doi.org/10.1.1.640.2430>.

39.Noorei AA, Gupta K, Bhadada K, Kale MK. Protective Effect of Methanolic Leaf Extract of *Caesalpinia bonduc* (L.) on Gentamicin-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* [Internet]. 2011 Jan; 10(1): 21-25. Available from: https://www.researchgate.net/publication/233902416_Protective-Effect_of_Methanolic_Leaf_Extract_of_Caesalpinia_Bonduc-L_on_GentamicinInduced_Hepatotoxicity_and_Nephrotoxicity_in_Rats

40.Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Dória GAA, Leite BLS, Serafini MR, Albuquerque-Junior RLC, Araújo AAS. Valores de

referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes [Reference values of the hematological and biochemical parameters in the rats (*Rattus norvegicus* Wistar) from the vivarium of the University Tiradentes]. *Scientia Plena* [Internet]. 2014 Jan; 10(3): 1-9. Available from: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/1784/948>.

41.Lopes STA, Cunha CMS. *Patologia Clínica Veterinária*. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria; 2002. 125 p. Portuguese.

42.Rebar AH, MacWilliams PS, Feldman BF, Metzger BF, Pollock RV, Roche J. *Guia de Hematologia para cães e gatos*. São Paulo: Editora Roca; 2003. Portuguese.