



Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente

Luísa Petri Corrêa

Avaliação longitudinal de marcadores urinários de função renal glomerular e tubular em recém- nascidos prematuros saudáveis

Linha de pesquisa – Distúrbios dos Rins e Trato Urinário

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2020

Luísa Petri Corrêa

**Avaliação longitudinal de marcadores urinários de
função renal glomerular e tubular em recém-
nascidos prematuros saudáveis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Simões e Silva.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

Avaliação longitudinal de marcadores urinários de função renal glomerular e tubular em recém-nascidos prematuros saudáveis

Luísa Petri Corrêa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente - da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Ana Cristina Simões e Silva

Professora Titular do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2020

Corrêa, Luísa Petri.
C824a Avaliação longitudinal de marcadores urinários de função renal glomerular e tubular em recém-nascidos prematuros saudáveis [manuscrito]. / Luísa Petri Corrêa. - - Belo Horizonte: 2021. 78f.
Orientador (a): Ana Cristina Simões e Silva.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Testes de Função Renal. 2. Biomarcadores. 3. Recém-Nascido Prematuro. 4. Dissertação Acadêmica. I. Simões e Silva, Ana Cristina. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 541

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice Reitor: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof Dr Fábio Alves da Silva Junior

Pró Reitor de Pesquisa: Prof Dr Mário Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Humberto José Alves

Vice Diretor: Prof^a. Dr^a. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sub-coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Dr^a. Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do departamento de Pediatria: Prof^a. Dr^a. Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Maia de Castro Romanelli

Sub-coordenador: Prof^a. Dr^a. Débora Marques de Miranda

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE:

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Maia de Castro Romanelli

Prof^a. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Prof^a. Dra. Débora Marques de Miranda

Prof^a. Helena Maria Gonçalves Becker

Prof^a. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Prof^a. Juliana Gurgel Giannetti

Prof. Jorge Andrade Pinto

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Representante discente: Ariene Silva do Carmo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA - CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DE MARCADORES URINÁRIOS DE FUNÇÃO RENAL GLOMERULAR E TUBULAR EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS SAUDÁVEIS

LUIZA PETRI CORRÊA

Dissertação de Mestrado defendida no dia 25 de janeiro de 2021 como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE, e aprovada pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores Doutores: Ana Cristina Simões e Silva - Orientadora (UFMG), Débora Marques de Miranda (UFMG), Olberes Vitor Braga de Andrade (FCMSCSP).

Belo Horizonte, 25 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Simoes e Silva, Professora do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Debora Marques de Miranda, Professora do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Olberes Vitor Braga de Andrade, Usuário Externo**, em 01/02/2021, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0534118** e o código CRC **DEBF0C9A**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Verônica e Fábio, pelo suporte incondicional e presença sempre carinhosa.

À minha irmã, Júlia, por sempre confiar tanto em mim e sempre ser meu lar, independentemente de onde estamos.

À Prof^a Ana Cristina Simões e Silva, pela honra de ter sido orientada por uma pessoa de tanta excelência, envolvimento e consideração com tudo a que se propõe fazer. Além de tudo, Ana conseguiu tornar todo o caminho interessante, leve e divertido.

À Prof^a Roberta Maia de Castro Romanelli por ter me introduzido no mundo acadêmico e de pesquisa quando eu não imaginava que poderia fazer parte dele.

Ao Hiago, meu parceiro espero eu para toda a vida, que aceitou compartilhar minhas horas “livres” com esses e tantos outros projetos.

À minha querida família, aos meus tios Thereza, Waguinho, Ângela, Wellington, Beatriz, Eustáquio, Helênio e Gisele por compartilharem e celebrarem cada realização na minha vida.

À minha família da Residência de Pediatria, especialmente Eduarda, Rafael, Kevin, Kayleigh, Tereza e Raíra, que fizeram a caminhada ser mais leve e tornaram possível eu conciliar essas duas propostas ao longo desses anos.

Ao Dr. Rafael Magalhães por gentilmente ter me cedido o banco de dados que foi a base desse projeto.

À Dr^a Roberta Silva pelo auxílio na análise das amostras e dos resultados, assim como à acadêmica Alessandra Marzano pela contribuição na elaboração dos pôsteres e artigos frutos desse trabalho.

Às minhas amigas, que em todos esses anos continuam apostando em mim, sendo meu refúgio e carinho nas horas que mais preciso.

NOTA EXPLICATIVA

A apresentação da presente dissertação foi organizada sob a forma de redação e artigo científico, de acordo com a resolução 03/2010 aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, disponível em http://www.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude_crianca/arquivos/Resolucao03-2010.pdf.

O artigo original desta dissertação avaliou os níveis urinários biomarcadores de função renal Calbindina, Colágeno IV, FABP1, GST α , IP-10, KIM-1, Osteoactivina, Renina, TFF-3, TIMP-1, α -1-Microglobulina, Albumina, Clusterina, Cistatina C, EGF, Lipocalina-2/NGAL, Osteopontina em recém-nascidos prematuros saudáveis com 72h e 3 semanas de vida, que foram acompanhados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da Maternidade Sofia Feldman. Ressalta-se que esse artigo já foi aceito para publicação no Jornal de Pediatria (vide ANEXOS)

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção, conforme as normas de Vancouver (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication - www.ICMJE.org).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AWAKEN - Assessment of Worldwide Acute Kidney injury Epidemiology in Neonates

AKI – Acute kidney injury

Alfa-GST – Alfa-glutationa s-transferase

B2M – Beta-2-microglobulina

CPAP – Continuous positive airway pressure

DHEG – Doença hipertensiva específica da gestação

EGF – Fator de crescimento epitelial

EUA – Estados Unidos da América

FABP1 – Fatty acid binding protein

FENa – Fração de excreção de sódio

IG – Idade gestacional

IP-10 – Protein induced by interferon

IRA/LRA – Injúria renal aguda/Lesão renal aguda

KIM 1 – Kidney injury molecule 1

NGAL – Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica

nKDIGO – Definição modificada neonatal da Kidney Diseases: Improving Global Outcomes

OPN – Osteopontina

PTN – Preterm neonates

RFG – Ritmo de filtração glomerular

RN – Recém nascido

SCr – Nível sérico de creatinina

TFF-3 – Trefoil factor 3

TIMP-1 – Tissue inhibitor of metalloproteinase 1

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UMOD – Uromodulina

UTIN/NICU – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

RESUMO

Introdução: O marcador endógeno de função renal mais usado na prática clínica é a concentração sérica de creatinina. No entanto, especialmente para neonatos, níveis séricos de creatinina são variáveis e sofrem interferência da imaturidade renal e da concentração materna de creatinina. Nesse contexto, a busca por novos biomarcadores é um importante objetivo científico, principalmente para neonatos prematuros. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi de mensurar marcadores de função glomerular e tubular em recém-nascidos prematuros saudáveis com 72 horas e 3 semanas de vida. **Pacientes e métodos:** Amostras de urina foram coletadas em 40 prematuros com 28 a 34 semanas incompletas de idade gestacional. Nenhum dos participantes tinha comorbidades, malformações e infecções. As amostras foram coletadas com 72 horas de vida e com 3 semanas de vida pós natal. As mensurações de Calbindina, Colágeno IV, FABP1, GST α , IP-10, KIM-1, Osteoactivina, Renina, TFF-3, TIMP-1, α -1-Microglobulina, Albumina, Clusterina, Cistatina C, EGF, Lipocalina-2/NGAL e Osteopontina foram realizadas usando painéis 1 e 2 dos kits Multiplex Kidney Injury. Dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0. **Resultados:** 55% do prematuros incluídos eram do sexo masculino, com idade gestacional de 30 ± 1 semanas e peso de nascimento de 1477 ± 428 gramas. A condição materna mais frequente associada ao nascimento prematuro foi pré-eclâmpsia (80%). Moléculas relacionadas a função glomerular (albumina, EGF, clusterina, microglobulina e osteopontina) mostraram uma elevação significativa nas concentrações obtidas com 3 semanas de vida em comparação com as de 72 horas de vida. Por outro lado, Cistatina C não apresentou diferença. Marcadores relacionados a injúria tubular (KIM-1 e NGAL) permaneceram sem alterações com 72 horas e 3 semanas de vida pós natal. **Conclusão:** A elevação de moléculas relacionadas a função glomerular indicam um crescimento intenso do ritmo de filtração glomerular de 72 horas até 3 semanas de vida, o que não foi detectado com a mensuração da Cistatina C.

PALAVRAS-CHAVE: Função renal, marcadores biológicos, prematuros, neonatos

ABSTRACT

Introduction: The most used endogenous marker of renal function in clinical practice is serum creatinine concentration. However, especially for neonates, serum levels of creatinine are quite variable and suffer interference by the immature kidney and maternal creatinine concentration. In this context, the search for novel biomarkers is an important scientific goal, mainly for preterm neonates. Therefore, the aim of this study was to measure markers of glomerular and tubular function in healthy preterm neonates at 72 hours and 3 weeks of life. **Patients and Methods:** Urine samples were collected in 40 preterm neonates with 28 to 34 incomplete weeks of gestational age. None of the participants had comorbidities, malformations and infections. The samples were collected at 72 hours of life and at 3 weeks after birth. Measurements of Calbindin, Collagen IV, FABP1, GST α , IP-10, KIM-1, Osteoactivin, Renin, TFF-3, TIMP-1, α -1-Microglobulin, Albumin, Clusterin, Cystatin C, EGF, Lipocalin-2/NGAL and Osteopontin were performed using panels 1 and 2 of multiplex kits of kidney injury. Data were analyzed using the software GraphPad Prism version 6.0. **Results:** The preterm neonates included 55% of males with gestational age of 30 ± 1 weeks and birth weight of 1477 ± 428 grams. The most frequent maternal condition associated with preterm birth was preeclampsia (80%). Molecules related to glomerular function (albumin, EGF, clusterin, microglobulin and osteopontin) showed a significant increase in the concentrations obtained at 3 weeks of life compared to 72 hours of life. On the other hand, cystatin C did not change. Markers related to tubular injury (KIM-1 and NGAL) remained also unchanged at 72 hours and 3 weeks after birth. **Conclusion:** The elevation of molecules related to glomerular function indicates an intense increase of glomerular filtration rate from 72 hours until 3 weeks of life, which was not detected with the measurement of cystatin C.

KEY WORDS: Kidney function, Biological Markers, Preterm, Neonates

SUMÁRIO

1. <u>INTRODUÇÃO</u> -----	13
1.1. REFERÊNCIAS-----	16
2. <u>REVISÃO DE LITERATURA</u> -----	18
2.1. REFERÊNCIAS-----	37
3. <u>OBJETIVOS</u> -----	48
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL-----	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	48
4. <u>PACIENTES E MÉTODOS</u> -----	49
4.1. DELINEAMENTO-----	49
4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO-----	49
4.3. VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE INTERESSE-----	49
4.4. ASPECTOS ÉTICOS-----	50
4.5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO-----	50
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	51
4.7. REFERÊNCIAS-----	51
5. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO ORIGINAL</u> -----	52
5.1. REFERENCES-----	60
6. <u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u> -----	67
6.1. REFERÊNCIAS-----	69
7. <u>ANEXOS</u> -----	72

1. INTRODUÇÃO

A embriogênese renal se inicia por meio do pronefro que surge na 3^a semana de gestação e, em seguida, é substituído pelo mesonefro, a partir da 4^a semana de gestação, ambos envolvendo completamente. O metanefro, responsável pelo desenvolvimento dos rins permanentes, surgirá por volta de 30 dias de gestação e atingirá a formação completa dos néfrons somente entre a 34-36^a semana [1]. Apesar do número de néfrons não modificar após esse período, a maturação e hipertrofia dessa unidade funcional renal acontecerá até os 3 a 5 anos de idade [2].

Em um contexto de nascimento prematuro (< 37 semanas), esse desenvolvimento renal se completará na vida extra-uterina, mas o número total de néfrons será reduzido em relação aos recém-nascidos (RN) a termo [1]. Dessa forma, ao nascimento, RNs termos terão um Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) menor que crianças e adultos, e, no caso dos prematuros, o RFG será ainda menor, sendo ainda mais reduzido quanto menor a idade gestacional [1]. As funções tubulares também são reduzidas nos RNs e somente atingem sua funcionalidade plena no primeiro ano de vida [2].

A utilização de marcadores endógenos na prática médica pode prever desfechos clínicos. Nesse sentido, a utilização de marcadores que expressam mais fielmente as alterações biológicas assume relevância. Atualmente, o marcador de função renal mais utilizado na prática clínica é a concentração sérica de creatinina. Entretanto, principalmente em neonatos, esse nível sérico é consideravelmente variável e sofre interferência em decorrência da imaturidade renal e da concentração materna de creatinina. A creatinina atravessa livre e bilateralmente a placenta, principalmente por perfusão simples, assim, ao nascimento, a concentração sérica de creatinina do neonato é igual à materna [1, 3]. Em RNs a termo, há um declínio rápido desse nível sérico, principalmente nas primeiras 72h de vida, sendo esse processo completo nas primeiras duas semanas de vida. Entretanto, em prematuros, esse declínio da creatinina sérica pode levar de um a dois meses, podendo inclusive nos primeiros dias de vida sofrer uma elevação inicial devido a reabsorção tubular [4]. Além disso, as adaptações pós-natais, como perda de fluidos corporais e contração de volume intravascular, associadas a grandes variações de catabolismo proteico e função hepática, serão fatores importantes para a concentração deste marcador nessa faixa etária [4]. Dessa forma, a mensuração dos níveis séricos de creatinina não é considerada acurada para o período neonatal de forma geral, mas, menos ainda, para RNs prematuros. No entanto, num contexto de ausência de outras moléculas com desempenho

comprovadamente superior, a creatinina continua sendo o marcador mais utilizado. Existem disponíveis vários estudos que avaliaram o comportamento da creatinina em lactentes, RNs a termo, prematuros e de baixo peso. Bateman et al, em 2015, avaliaram a concentração sérica de creatinina em prematuros de 34-36 semanas de gestação com extremo baixo peso e descreveram 3 fases da concentração média de creatinina: elevação inicial, declínio rápido e equilíbrio. Em uma coorte multicêntrica com prematuros de 27-31 semanas, Vieux et al. em 2010 descreveram os valores de referência e percentis de RFG baseados na creatinina sérica. Em comum a todos esses estudos, a concentração de creatinina sérica reduz com o aumento da idade gestacional e idade pós-natal dos lactentes, enquanto o RFG terá comportamento inversamente proporcional a esses parâmetros [7].

Na busca de novos biomarcadores de função renal e para estimar o RFG, a Cistatina C tem sido uma das moléculas mais estudadas. Trata-se de um inibidor de protease produzido por todas as células nucleadas, que é livremente filtrado pelos glomérulos, assim como a creatinina. Apesar de evidências de que essa molécula possa atravessar a placenta de forma similar à creatinina, estudos indicam que a Cistatina C atravesse a placenta em menor intensidade, sugerindo que, no período pós-natal inicial, ela poderia ser um melhor marcador de função renal [4]. Além disso, já existem fórmulas validadas, tanto para crianças como lactentes, que utilizam a Cistatina C sérica isolada ou associada a outros marcadores (como creatinina e ureia) para estimar o RFG. Um dos obstáculos para a aplicação mais ampla dessa molécula na prática clínica ainda é a disponibilidade da realização da sua aferição, assim como o custo benefício em relação à creatinina e a padronização das análises.

Outros potenciais biomarcadores, principalmente urinários, têm sido alvo de estudos para melhor entendimento do funcionamento renal nessa faixa etária, na qual o rim ainda se encontra em pleno desenvolvimento e adaptação à vida extra-uterina, além de se tratar de uma população particularmente mais suscetível à injúria renal.

A incidência de lesão renal aguda em RNs muito prematuros é estimada em 20-40%, sendo a grande maioria dos quadros de etiologia pré-renal, associados à hipovolemia ou à redução da circulação renal, relacionando-se ou não à presença de infecção [8]. Essa incidência pode chegar a 56% em RNs asfixiados. Prematuridade, extremo baixo peso, malformações dos rins e do trato urinário, doenças cardíacas congênicas, sepse e uso de drogas nefrotóxicas são fatores que podem levar à lesão renal aguda [8, 9].

Nas unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN), nas quais a grande maioria dos RNs muito prematuros se encontram, o acometimento renal pode ser um desencadeador importante

de descompensação clínica e é associado à significativa morbi-mortalidade desses pacientes. Mesmo com tratamento adequado, a lesão renal aguda é associada a 25-50% de mortalidade em RNs, sendo fator de risco independente para esse desfecho. Além disso, a lesão renal aguda pode também ocasionar comprometimento da função renal em longo prazo, aumentando o risco de doença renal crônica na vida adulta [8, 9].

Considerando todas as dificuldades de interpretação da concentração sérica de creatinina, encontrar marcadores que permitam a avaliação de função renal e a identificação precoce, assertiva e pouco invasiva de lesão renal aguda em neonatos, principalmente naqueles prematuros, tem-se tornado alvo de estudos nos últimos anos. Dentre os biomarcadores urinários, os mais frequentemente estudados em RNs são: Cistatina C, NGAL, KIM-1, entre outros. Os principais resultados mostraram relação entre elevação dos níveis de NGAL e Cistatina C com a presença de lesão renal aguda, com especificidade e sensibilidade de 80% e 90%, respectivamente, em RN prematuros. Quanto a molécula de lesão renal 1 (KIM-1), ainda não existem evidências suficientes para avaliar a capacidade preditiva desse marcador para lesão renal nessa faixa etária [8]. Askenazi et al, em 2016, em uma coorte de 113 RNs com peso abaixo de 1200g identificaram que Cistatina C, NGAL, osteopontina (OPN), clusterina e alfa-glutathion s-transferase (alfa-GST) apresentaram valores 1,7 a 3,7 vezes mais altos em neonatos com lesão renal aguda em relação aqueles que não tiveram alteração renal. Enquanto os valores de fator de crescimento epitelial (EGF) e uromodulina (UMOD) foram 1,4 a 1,6 vezes mais baixos naqueles com lesão renal. Esse mesmo autor, em outro estudo com neonatos com peso de nascimento menor que 1500g encontrou relação positiva entre maiores níveis de OPN e KIM-1 e maior mortalidade às 36 semanas de idade gestacional [11].

Saeidi et al, em 2015, mostraram que NGAL, OPN e Cistatina C foram associadas com idade gestacional e idade pós-natal em RN prematuros, enquanto EGF e UMOD somente se associaram à idade gestacional e KIM-1 e alfa-GST somente à idade pós-natal. Ressalta-se, porém, que a maioria dos estudos ainda apresenta amostras relativamente pequenas e avalia pacientes que apresentaram lesão renal aguda por meio de painéis com poucos biomarcadores [8, 9, 13, 14, 15, 16].

Nesse contexto, a busca por novos biomarcadores da função renal é uma meta científica importante, principalmente para neonatos prematuros. Além disso, a pesquisa de novos marcadores poderá também ampliar os conhecimentos quanto ao funcionamento renal nesse momento em que o órgão ainda se encontra em desenvolvimento. Assim, o objetivo desse estudo foi de investigar o comportamento de marcadores de função glomerular e tubular numa

população de recém-nascidos prematuros, associando-os também às variáveis clínicas e demográficas [17]. Foram incluídos RNs prematuros saudáveis com amostras biológicas coletadas de forma seriada (com 72 horas de vida e na terceira semana de vida extra-uterina) para mensuração desses marcadores e avaliação da evolução natural dessas moléculas ao longo do tempo após o nascimento de prematuros saudáveis. Em linhas gerais, este projeto pretende avaliar como e se essas moléculas poderão ser utilizadas para avaliação de função renal nesses pacientes, no intuito de identificar biomarcadores para diagnóstico, acompanhamento e prognóstico.

1.1. REFERÊNCIAS

1. Filler G, Kanan RG, Elias ACA. Assessment of glomerular filtration rate in the neonate: is creatinine the best tool? *Current Opinion in Pediatrics*. 2016; 28(2):173-9.
2. Botwinski CA, Falco GA. Transition to postnatal renal function. *Journal of Perinatal and Neonatal Nursing*. 2014; 28(2):150-4.
3. Guignard JP, Drukker A. Why do newborn infants have a high plasma creatinine? *Pediatrics*. 1999; 103(4):e49.
4. Kastl, JT. Renan function in the fetus and neonate – The creatinine enigma. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2017; 22(2):83-89.
5. Bateman DA, Thomas W, Parravincini E, Polesana E, Locatelli CH, Lorenz JM. Serum creatinine concentration in very-low-birth-weight infants from birth to 34-36 weeks postmenstrual age. *Pediatric Research*. 2015; 77(5):696-702.
6. Vieux R, Hascoet JM, Merdarius D, Fresson J, Guillemin F. Glomerular filtration rate reference values in very preterm infants. *Pediatrics*. 2010; 125(5):e1186.
7. Boer DP, Rikje YB, Hop WC, Cransberg K, Dorresteijn EM. Reference values for serum creatinine in children younger than 1 year of age. *Pediatric Nephrology*. 2010; 25(10):2107.
8. Marin T, Derossett B, Bhatia J. Urinary biomarkers to predict neonatal acute kidney injury. *The Journal of Perinatal and Neonatal Nursing*. 2018;32(3):266-274
9. Argyri I, Xanthos T, Varsami M, Aroni F, Papalosis A, Dontas I, Fanos V, Iacovidou N. The role of novel biomarkers in early diagnosis and prognosis of acute kidney injury in newborns. *American Journal of Perinatology*. 2013;30(5):347-52.

10. Askenazi DJ, Koralkar R, Patil N, Halloran B, Ambalavanan N, Griffin R. Acute kidney injury urine biomarkers in very low-birth-weight infants. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2016; 11(9):1527-35.
11. Askenazi DJ, Montesanti A, Hunley H, Koralkar R, Awar P, Shuaib F, Liwo A, Deverajan P, Ambalavanan N. Urine biomarkers predict acute kidney injury and mortality in very low birth weight infants. *Journal of Pediatrics* 2011; 159(6):907.
12. Saeidi B, Koralkar R, Griffin RL, Halloran B, Ambalavanan N, Askenazi DJ. Impact of gestational age, sex, and postnatal age on urine biomarkers in premature neonates. *Pediatric Nephrology*. 2015; 30(11):2037.
13. Li Y, Fu C, Zhou X, Xiao Z, Zhu X, Jin M, Li X, Feng X. Urine interleukine-18 and cystatin-C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatric Nephrology* 2012; 27(5):851.
14. Hanna M, Brophy PD, Giannone PJ, Joshi MS, Bauer JA, Rao SR. Early urinary biomarkers of acute kidney injury in preterm infants. *Pediatric Research* 2016; 80(2):218-23
15. Shin SY, Ha JY, Lee SL, Lee WM, Park JH. Increased urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very-low-birth-weight infants with oliguria and normal serum creatinine. *Pediatric Nephrology* 2017; 32(6):1059-1065.
16. Gubhaju L, Sutherland MR, Horne RSC, Medhurst A, Kent AL, Ramsden A, Moore L, Singh G, Hoy WE, Black MJ. Assessment of renal functional maturation and injury in preterm neonates during the first month of life. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014; 307(2):F149.
17. Correa LP, Marzano ACS, Silva Filha R, Magalhães RC, Simões e Silva AC. Biomarkers of renal function in preterm neonates at 72 hours and 3 weeks of life. *Pediatric Nephrology*. 2019; 34:1901-1902 (Abstract IPN10583-88).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nefrogênese e Prematuridade

O nascimento de recém-nascidos prematuros tem tido um aumento relevante nas últimas décadas, sendo estimado que ocorram cerca de 12-15 milhões de partos prematuros por ano no mundo [1, 2]. Com isso, o interesse pela fisiologia e desenvolvimento renal nessa faixa etária tem crescido também.

A organogênese dos rins se inicia ainda nas primeiras semanas pós concepção. Por volta da 3-4ª semana surgem os pronefros, que consistem em estruturas rudimentares e transitórias, que formam um sistema não funcionante e que são naturalmente reabsorvidas, desaparecendo ao final da 4ª semana [1, 3, 4]. Em seu lugar, na 5ª semana de gestação, surge o mesonefro, a partir do mesoderma. Está estrutura, localizada em região torácica e lombar, irá se diferenciar em cerca de 20 pares de túbulos que já produzirão uma pequena quantidade de urina. O mesonefro também se degenerará espontaneamente como parte do processo natural de maturação do embrião, desaparecendo ao final do 1º trimestre de gestação. Nos embriões do sexo feminino, parte do mesonefron participará da formação da bexiga, enquanto no sexo masculino parte também formará o epidídimo e o ducto deferente [1, 3, 5].

A partir do segundo trimestre gestacional, o metanefro será então plenamente responsável pelo desenvolvimento dos rins. O metanefro surge por volta da 5-6ª semana, a partir de mesênquima metanéfrico e do ducto mesonéfrico (botão de epitélio ureteral), iniciando produção de urina por volta da 9ª semana e se desenvolverá plenamente até a 36ª semana de idade gestacional [1, 3, 4]. Inicialmente em posição sacral, essa estrutura migrará até a região lombar na 8ª semana, posição que será final e permanente [3].

Ao longo de todo o segundo trimestre e início do terceiro trimestre, ocorrerá a formação dos néfrons e do sistema coletor. Esse processo é resultado de diversas interações entre o metanefro e o epitélio ureteral, que incluem vários fatores de transcrição e o sistema renina-angiotensina [1, 4, 6]. O nascimento prematuro ocorre, então, em um momento no qual o sistema urinário não estará ainda plenamente desenvolvido e formado; pelo contrário, estará em pleno momento de organogênese [2, 6].

A formação final do rim ocorre em camadas, com o desenvolvimento e aumento do número de néfrons, a partir da zona nefrogênica na região cortical, aonde ficam as células-tronco [1, 4, 5, 6]. Essa aposição de novos néfrons resulta no crescimento dos rins fetais e a finalização da nefrogênese ocorre simultaneamente com o desaparecimento dessa zona. Após

esse momento, só será possível ocorrer crescimento tubular e vascular e expansão do tecido intersticial [7]. Kandasamy et al, em 2012, encontraram diferença significativa no tamanho dos rins entre fetos com 32 e 38 semanas de idade gestacional, com um crescimento de 3,6 cm de largura com 32 semanas para 4,2 cm com 38 semanas. Durante esse período, ocorre um aumento de volume renal de 14,5 cm² para 21,6 cm², o que representa um crescimento significativo de cerca de 30%. Sutherland et al também identificaram uma espessura significativamente menor da zona nefrogênica em RN prematuros em relação aos RNs termos, a partir de análises microscópicas.

Sendo assim, a partir do momento que ocorre a interrupção prematura da gestação, o processo de nefrogênese será modificado e, na maioria das vezes, encurtado. A maioria dos estudos conclui que o desenvolvimento renal continuará em ambiente extra-uterino por cerca de 3 semanas pós-natais, podendo chegar até 40 dias pós-natais em prematuros extremos, sendo encerrado com o desaparecimento prematuro da zona nefrogênica [1, 5, 7]. RNs prematuros, ao atingirem o termo, apresentam uma redução do número e qualidade de néfrons, avaliados na maioria dos estudos por meio do tamanho renal final em comparação com RNs a termo [1, 2, 9]. Estudos estimam que oligonefropatia acomete cerca de 8-24% dos RNs prematuros, sendo que desses, até 18% apresentam glomérulos morfológicamente anormais. Outras alterações como dilatação do espaço de Bowman e encurtamento dos tufos glomerulares também são relatadas [5].

Além disso, a prematuridade também está associada à ocorrência de outras alterações e circunstâncias que por si só também afetam a maturação renal ou são potencialmente causadoras de lesão renal, tais como baixo peso, crescimento intrauterino restrito, hipóxia, hiperóxia, sepse, exposição a drogas nefrotóxicas, entre outros [5, 6, 10, 11, 12]. Atualmente, a prematuridade já é considerada isoladamente como fator de risco para doença renal crônica e hipertensão arterial na vida adulta, considerando que, em um contexto de redução de número total e qualidade de néfrons, aqueles remanescentes funcionarão em contínua hiperfiltração glomerular no intuito de manter uma filtração final adequada [1, 2, 6, 12].

Função Glomerular e Tubular no Pretermo

A avaliação da fisiologia renal após o nascimento também tem sido alvo de estudos, que tentam ampliar o conhecimento a respeito de todas as adaptações que acontecerão durante e após essa transição da vida intra para extra-uterina.

Já é bem estabelecido que, independente de idade gestacional, recém-nascidos apresentam um RFG muito menor do que o identificado em crianças maiores e adultos e que essa capacidade de filtração apresenta elevação significativa nos primeiros dias após o parto, seguida de uma elevação mais gradual até o 1º-2º ano de vida [9, 13, 14, 15]. O RFG depende de diversos fatores e do equilíbrio entre eles, sendo os principais a permeabilidade à água pela barreira de filtração, a área de superfície dessa barreira, a diferença de pressão hidrostática entre a cápsula de Bowman e o lúmen glomerular, e também a pressão oncótica dentro desse lúmen glomerular [13, 15]. Durante o processo de amadurecimento renal, a barreira de filtração glomerular terá aumento tanto da sua área de superfície quanto da sua permeabilidade à água, resultando em um crescimento gradual do coeficiente de filtração à medida que a idade gestacional avança [13]. Esse processo também acontecerá nos RNs prematuros, mas, em ambiente extra-uterino, havendo, portanto, algumas diferenças nesse processo.

Ao nascimento, RNs a termo apresentam um RFG por volta de 15-25 mL/min/1.73m², enquanto prematuros apresentam por volta de 10-20 mL/min/1.73m². Com o passar dos dias, o RN termo apresentará rápida elevação desses valores até por volta de 45-55 mL/min/1.73m² com cerca de 1-2 semanas de vida. Essa elevação se dará de forma mais lenta e gradual nos RNs prematuros, chegando a 35-45 mL/min/1.73m² nesse mesmo período e atingindo por volta de 50 mL/min/1.73m² ao final do primeiro mês de vida [13, 15]. Principalmente nos primeiros 6 meses de vida dos RNs prematuros, parece ocorrer o que pode ser chamado de *catch up* renal, ou seja, apesar de inicialmente apresentarem rins menores, ao atingirem IG corrigida de termo, após essa idade os prematuros atingem tamanho renal comparável ao de RN termos com 6 meses de vida [16]. Valores de RFG próximos aos dos adultos (110-120 mL/min/1.73m²) só serão atingidos por volta do 2º-3º ano de vida [7, 13].

Além disso, dentro do grupo de prematuros, também existe variação importante entre o RFG, sendo identificado que RFG é diretamente proporcional à idade gestacional, enquanto que a magnitude de crescimento dessa filtração ao longo do tempo é inversamente proporcional à IG [7, 13, 17]. A adequação ao peso de nascimento esperado também parece influenciar nas variações de RFG. Aly et al, em 2019, encontraram que prematuros pequenos para idade gestacional apresentam níveis de creatinina mais elevados em relação aos seus pares com peso adequado para IG, no quinto dia de vida. Os autores sugerem que isso possa estar relacionado a um maior nível de comprometimento da função glomerular nesses recém-nascidos com menor peso. Vieux et al, em 2010, realizaram uma coorte multicêntrica, com 275 RN prematuros de 27 a 31 semanas de IG com aferições seriadas da creatinina com 7, 14, 21 e 28 dias de vida. Foi

verificada elevação constante do RFG neste primeiro mês de vida, e os autores propuseram valores de referência com percentis para cada IG a partir dos dados obtidos. Estudos anteriores também realizaram análises semelhantes, mas com amostras mais limitadas [19, 20].

O fluxo plasmático também influencia significativamente o RFG. A resistência vascular sistêmica cai rapidamente após o nascimento, o que gera uma redistribuição do fluxo sanguíneo. Ao nascimento, o fluxo sanguíneo renal está reduzido, associado a uma baixa pressão de perfusão e tônus aumentado da arteríola eferente, isto parece estar relacionado a menor fluxo renal efetivo e também possivelmente a algum grau de lesão glomerular em RNs prematuros neste momento [7, 9, 16]. Durante a transição pós-natal, ocorre aumento importante da pressão de perfusão renal decorrente de significativa elevação do percentual do débito cardíaco direcionado aos rins, que, no período fetal, era por volta de 3% do débito, na vida extra-uterina atingirá valores por volta de 25% [7]. A fração de filtração, obtida pela razão entre RFG e o fluxo plasmático renal, também sofrerá maturação, sendo inicialmente de 50% até atingir o valor de 20% após o amadurecimento renal. Esse processo também se dá de forma mais lenta e gradual nos neonatos prematuros [7]. Tudo isso interfere na capacidade de adaptação renal a variações pressóricas e de volume, assim como na capacidade de excreção renal, de metabólitos e fármacos [9].

Outro dado interessante é que, apesar de apresentarem rins menores ao atingirem o termo e mesmo até completarem 2 anos de vida, RNs prematuros apresentam RFG semelhante a RNs termos nessas mesmas idades [2, 21]. Isso sugere que o mecanismo de compensação para manter um nível de filtração glomerular final adequado seja devido a aumento da filtração individual dos néfrons que se encontram em menor quantidade naqueles lactentes que foram prematuros, o que caracteriza um estado de hiperfiltração [2, 21]. É incerto se essa hiperfiltração no período pós-natal imediato acontece também devido à resistência vascular elevada e ao baixo fluxo sanguíneo renal [9].

Após o nascimento, também ocorre um processo de amadurecimento da função tubular. Os túbulos renais participam diretamente do balanço hídrico, eletrolítico e ácido-básico do organismo [22]. Em relação aos íons, a fração de excreção de sódio (FENa) foi demonstrada ser inversamente proporcional a IG durante o primeiro mês de vida, mas com grande variação entre indivíduos. Após esse período, independentemente da IG de nascimento, os lactentes tendem a apresentar taxas semelhantes de FENa. Nessa transição, ocorrerá uma redução gradual de FENa de 8-18% no período fetal, maior que 3% nos pretermos no primeiro mês, até valores inferiores a 1% após amadurecimento completo [14, 22, 23, 24]. Isso sugere que há uma intensa

capacidade de amadurecimento tubular nos prematuros no primeiro mês de vida, inclusive naqueles prematuros extremos [14]. Ainda não é claro até que ponto essa natriurese inicial se deve somente à imaturidade renal e adaptação renal após nascimento, ou também a uma ativa regulação dos fluidos intracelulares que sofrem redução significativa pós-natal [23]. Apesar disso, quando submetidos a uma sobrecarga salina aguda, os RNs, especialmente os prematuros, apresentam uma restrição na capacidade de elevar a excreção de sódio, quando necessária [9]. A imaturidade tubular também está relacionada com maior perda urinária de glicose, eletrólitos, aminoácidos e proteínas de baixo peso molecular bem como a menor produção de eritropoietina, associando-se este fato à anemia da prematuridade [25].

Outros aspectos sobre a função tubular especificamente em prematuros ainda são pouco explorados. Sabe-se que a capacidade de concentrar a urina também é mais restrita em neonatos, isso estaria relacionado ao baixo gradiente de solutos corticomedulares, alças de Henle mais curtas e interferência das prostaglandinas. A concentração máxima que pode ser atingida é de cerca de 400-500 mosmol/kg nos primeiros dias de vida em prematuros versus 700 mosmol/kg em termos. Os valores costumam se aproximar das referências normais para crianças (1200 mosmol/kg) por volta de 1 a 2 anos de vida [23, 26, 27, 28]. A capacidade de reabsorção de bicarbonato e de excreção de ácidos também é comprometida nesta faixa etária, sendo esse comprometimento mais intenso nos RNs prematuros e de menor peso de nascimento [22, 29, 30, 31]. Foi demonstrado que a capacidade de excreção de ácidos está relacionada à idade gestacional e apresenta uma elevação gradual nas primeiras 3-4 semanas de vida pós-natal. Em contrapartida, elevação semelhante da reabsorção de bicarbonato ocorre por volta da primeira semana [22, 31]. Apesar disso, alguns estudos demonstram que neonatos prematuros conseguem apresentar reabsorção adequada de bicarbonato exógeno durante episódios de acidose metabólica com reposição endovenosa desse íon [22, 31].

Creatinina

A maneira mais utilizada e difundida de mensuração da função renal é por meio da mensuração do RFG. Especificamente na faixa etária neonatal e, mais ainda, nos prematuros, essa avaliação pode-se tornar mais complexa e imprecisa devido a inúmeros fatores. O padrão ouro continua sendo a utilização da inulina que consiste em um polímero exógeno que não é metabolizado, reabsorvido ou secretado pelas células tubulares renais, não se liga a proteínas, é eliminado exclusivamente pelos rins e, ao mesmo tempo, é livremente filtrado pelos glomérulos, inclusive em RNs pretermos [15, 32]. Apesar dessas vantagens quanto a fisiologia

desse marcador, o maior empecilho para a sua utilização na prática clínica é que sua mensuração envolve infusões contínuas, coletas precisas de urina e/ou múltiplas coletas de amostras de sangue, o que a torna um método mais invasivo, de realização mais complexa e custos mais elevados [15, 32].

Assim, outros marcadores endógenos e exógenos já foram explorados, dentre eles a creatinina é amplamente a mais utilizada em todas as faixas etárias [15, 32, 33, 34]. Mesmo sendo o mais utilizado, este marcador possui importantes limitações. A creatinina é uma substância de baixo peso molecular e é resultado da degradação da creatina e fosfocreatina dos músculos, portanto, sua concentração é diretamente proporcional a massa muscular do indivíduo, que é consideravelmente reduzida em neonatos [7, 13, 15, 34]. Existem diversos métodos laboratoriais para sua mensuração, sendo os principais o colorimétrico (método de Jaffe) e o enzimático. Apesar de já existirem evidências de uma significativa influência de fatores como hiperbilirrubinemia (alteração muito comum no período neonatal), hipertrigliceridemia, hemólise e corpos cetônicos nos resultados do método de Jaffe, ele ainda é um método muito utilizado, inclusive em pesquisas científicas, sendo que a maioria das evidências para cálculo do RFG em crianças a partir da creatinina foram baseados em estudos que utilizaram esse método [13, 15, 34, 35]. O método enzimático, a princípio, seria muito menos susceptível a esse tipo de interferência e é considerado atualmente o método ideal para análise da creatinina [13, 35].

Durante o período fetal, a creatinina atravessa livremente e bidirecionalmente a placenta, por perfusão simples, e, ao nascimento, sua concentração plasmática nos RNs nos primeiros dias estará diretamente relacionada à concentração materna [7, 15, 32, 33, 34, 36]. Estudo desenvolvido por Go et al, em 2018, avaliou a relação de condições materna e neonatais com os níveis de creatinina sérica em 614 RNs (prematturos e termos) e suas mães. Os autores encontraram uma relação significativa do nível sérico de creatinina (SCr) dos neonatos com a IG, enquanto não foi identificada influência de esteroides antenatais, administrações maternas, escore de APGAR, sexo e síndrome HELLP com SCr neonatal ao nascimento. O SCr neonatal e materno no grupo com doença hipertensiva específica da gestação (DHEG) foram significativamente maiores do que no grupo sem DHEG, ambos nos grupos de prematturos. Além disso, os autores demonstraram uma forte correlação entre o SCr materno e neonatal, sendo está correlação mais intensa nos prematturos em relação aqueles a termo.

Após o nascimento, nos RNs a termo, ocorrerá uma redução importante do SCr até o 3º ao 7º dia de vida, depois será mantida uma redução gradual até o final da 2ª semana de vida.

Por outro lado, nos RNs prematuros, inicialmente ocorre uma elevação dos seus valores até o 2º-4º dia de vida e só depois desse período inicia-se uma redução gradual, atingindo valores mais baixos somente por volta da 3ª semana de vida [13, 14, 15, 19, 33, 35, 37]. Bateman et al, em 2015, descreveram detalhadamente o comportamento da creatinina em 218 RN prematuros saudáveis. Os autores relataram essa fase inicial de elevação nos primeiros 3-4 dias de vida, sendo que a magnitude dessa elevação seria inversamente proporcional à IG. A segunda fase consiste em um período de queda rápida dos níveis séricos de creatinina entre 3-7 semanas de vida pós-natal, também havendo relação com a IG, ou seja, aqueles nascidos com maior IG (30-33 semanas) apresentaram essa redução em até 5 semanas. E, por último, a concentração de creatinina atinge um platô após equilíbrio entre a sua produção e excreção. Esse platô será atingido com 8-9 semanas naqueles com IG de 25-27 semanas, com 7-8 naqueles com IG 28-29 semanas e com 5-6 naqueles com IG 30-33 semanas, o que também evidencia uma relação entre o tempo para o amadurecimento e a IG de nascimento.

Algumas teorias tentam explicar o comportamento diferenciado dessa molécula nos prematuros. Aventa-se que a reabsorção tubular da creatinina esteja relacionada à elevação desse marcador nos primeiros dias de vida, o que resultaria em um RFG subestimado nesse momento. Essa reabsorção seria mais intensa quanto menor a IG e, portanto, maior imaturidade renal [7, 13, 14, 15, 19, 38]. Após esse período, inicia-se um momento de intensa maturação renal extra-uterina e ocorre modificação na massa muscular, na filtração glomerular e na secreção tubular, sendo que todas essas mudanças influenciam na concentração sérica final desse marcador [15, 33]. Nesse contexto, principalmente devido a secreção tubular e intestinal de creatinina, somado a um estado de hiperfiltração já descrito anteriormente, os cálculos resultariam em um RFG superestimado [15, 33, 36]. Além disso, neonatos, principalmente os prematuros, apresentam risco significativo para grandes variações no status de hidratação, no catabolismo proteico, na função hepática ao longo do tempo e estão mais sujeitos a complicações potencialmente nefrotóxicas, como asfixia, uso de drogas nefrotóxicas e sepse. Essa faixa etária também sofre grandes mudanças nas funções gastrointestinais, na capacidade de metabolização enzimática e no sistema tegumentar, além da própria maturação renal em si. Todos esses fatores interferem na interpretação da SCr [13, 14, 36, 39].

Dessa maneira, faixas de normalidade para neonatos prematuros baseadas no SCr não são facilmente definidas nem universalmente aceitas. Conforme descrito anteriormente, Vieux et al, em 2010, propuseram valores de referência de RFG para prematuros, estratificados por IG e classificados em percentis a partir da aferição do SCr. Em trabalho mais recente, Bruel et

al, em 2013, realizaram um estudo retrospectivo com mais de 1400 RNs prematuros em busca de valores críticos de SCr para essa faixa etária, associado a um acompanhamento desse grupo de pacientes até 2 anos de vida. Considerando o percentil 90 para esses valores críticos (com método de Jaffe modificado), os autores encontraram que prematuros com SCr acima de 1,6 mg/dL com 24-27 semanas, 1,1 mg/dL com 28-29 semanas e 1,0 mg/dL com 30-32 semanas apresentaram maior risco de mortalidade e de neurodesenvolvimento sub-ótimo com 2 anos de vida. Esses resultados continuaram relevantes mesmo após ajustes para IG, escore Z de peso de nascimento e sexo. Somente após ajustes para mudanças na concentração de sódio é que o impacto no neurodesenvolvimento deixou de ser estatisticamente significativo. A partir disso, os autores concluíram que essas variações de sódio seriam o fator principal para o desfecho em RNs prematuros. Em estudo semelhante realizado por Horie et al, em 2019, foi analisada a função renal de 168 prematuros menores de 35 semanas a partir da creatinina (método enzimático). Os autores não encontraram diferenças significativas por sexo, adequação do peso para IG ou uso de indometacina e aminoglicosídeos, mas o RFG com 2 anos de idade foi significativamente e positivamente associado ao peso de nascimento e IG de nascimento. Além disso, foi evidenciado que 18% dos pacientes persistiam com RFG reduzido ($< 90\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$) aos 2 anos de idade, sugerindo que o nascimento prematuro e o baixo peso de nascimento afetam a função renal não somente na vida adulta, mas também desde a primeira infância.

Por fim, a creatinina não é sensível a pequenas mudanças no RFG, pode não sofrer variações até que 25-50% da função renal basal seja perdida e, em crianças e lactentes, essas mudanças podem levar até 24-72 horas para acontecer após o insulto inicial [7, 13, 15, 33]. Mensurações isoladas podem não ser suficientes para avaliar o *status* de função renal do momento, sendo indicado o acompanhamento em curva para melhor monitoramento [15]. Mesmo com esses ajustes, em estudos como de Abitbol et al, que avaliaram a função renal, em RNs termo e prematuros, utilizando a creatinina e comparando com outros marcadores, os autores argumentam que a creatinina é um marcador ruim para determinar o RFG em prematuros, seja utilizando o SCr isoladamente ou em equações. Assim, existe uma busca no meio científico por outros biomarcadores de função renal que sejam mais precisos dentro de todo esse contexto de maturação renal pós-natal.

Injúria Renal Aguda

A injúria renal aguda (IRA) apresenta incidência relevante no contexto da terapia intensiva neonatal e, assim como já demonstrado para adultos e crianças maiores, também parece estar relacionado a importante piora dos desfechos, inclusive quanto à mortalidade [42, 43, 44, 45, 46]. Além disso, há crescentes evidências de que esta seja uma condição ainda subdiagnosticada na maioria dos serviços de atendimento neonatal [42, 43, 47].

Todos os fatores citados previamente em relação às peculiaridades da interpretação da creatinina na faixa etária neonatal e, mais ainda, nos prematuros, tornam-se fatores de complicação para se estabelecer critérios diagnósticos claros e universais para o acometimento agudo da função renal nessa população [42, 44, 45]. Assim sendo, a creatinina atualmente é reconhecida como um marcador precário de função renal, sendo ainda mais difícil sua aplicação como biomarcador para diagnóstico precoce de lesão. Sabe-se que pequenas elevações do SCr estão relacionados a piores desfechos clínicos [42, 44, 46].

Inicialmente, o diagnóstico de IRA neonatal era definido por valores absolutos do SCr. Ao longo do tempo, após o avanço dos conhecimentos científicos e a constatação da variabilidade entre valores “normais” do SCr nos diferentes subgrupos de neonatos e de prematuros (por IG e peso de nascimento, por exemplo), outros critérios diagnósticos passaram a ser considerados [42, 44, 45]. Em 2013, após um painel de experts no *National Institutes of Health*, foi concluído que a definição modificada neonatal da *Kidney Diseases: Improving Global Outcomes* (nKDIGO) para IRA neonatal seriam critérios mais adequados para essa população. Os critérios do nKDIGO incluem elevações pequenas quanto 0,3mg/dL no SCr e também incluem alterações de débito urinário, sendo que o critério mais grave atingido deve ser considerado na classificação da IRA [42]. No mesmo ano, Ricci e Ronco propuseram novos critérios para injúria renal aguda utilizando o minemônico nRIFLE (risk, injury, failure, loss e end-stage kidney disease) que também utilizam o SCr e o débito urinário [44, 45, 49]. A inclusão de critérios baseados no débito urinário tem sido alvo de importante discussão no contexto dos cuidados neonatais. A IRA era antes considerada uma condição principalmente não-oligúria nessa faixa etária. No entanto, hoje há uma melhor compreensão de que neonatos na verdade apresentam valores normais mais elevados de diurese comparado a adultos e crianças, sendo nos prematuros esses níveis ainda maiores. Dessa forma, valores específicos para essa população devem ser usados para o diagnóstico de uma possível IRA [43, 44, 50]. Após essas propostas, ocorreu um crescimento exponencial nos últimos anos em estudos para validação desses critérios nos mais diversos grupos de recém-nascidos [44, 47, 49, 51].

A lesão renal aguda (LRA) pode acontecer como resultado de alterações pré-renais, renais e pós-renais e o período de ocorrência dessas lesões também é variável (pré-natal, perinatal e pós-natal), resultando em etiologias multifatoriais na maior parte dos casos [42, 52, 53]. As causas pré-renais geralmente representam a grande maioria dos casos, cerca de 85%, e estão relacionadas a redução do fluxo sanguíneo renal. Tal redução pode estar associada a perdas placentárias durante o parto, perdas gastrointestinais ou insensíveis aumentadas, aumento de permeabilidade capilar (como ocorre na sepse ou na hipoalbuminemia) e débito cardíaco reduzido [42, 53]. Algumas drogas podem alterar também o fluxo renal, como antiinflamatórios não esteroidais e inibidores da enzima conversora de angiotensina [42, 51, 52, 54, 55]. As etiologias renais resultam de injúria direta ao parênquima renal e são responsáveis por cerca de 11% dos casos. A necrose tubular aguda é a principal manifestação histológica dessa condição [42]. A redução funcional do fluxo renal descrita previamente, quando persistente, pode levar a essas alterações renais e maiores comprometimentos vasculares como trombose de veias ou artérias renais também estão associadas a esse quadro [42]. Alguns medicamentos também têm potencial nefrotóxico, atuando diretamente sobre o parênquima renal, sendo os principais representantes antibióticos (aminoglicosídeos, vancomicina, anfotericina B e aciclovir) e os agentes de contrastes [42, 51, 52, 54, 55]. Por fim, a etiologia menos frequente para LRA são as alterações pós-renais, que representam somente cerca de 3% dos casos de LRA neonatal. Esses casos se relacionam a obstruções intrínsecas, como devido a bolas fúngicas, e também extrínsecas como as de malformação congênitas do trato urinário (válvula de uretra posterior, obstrução bilateral da junção ureteropélvica, entre outros) [42].

Considerando uma grande variedade de critérios disponíveis e utilizados para IRA neonatal e que muitos estudos avaliaram populações neonatais específicas (RNs asfixiados, sépticos, submetidos a cirurgias cardíacas, com baixo peso de nascimento, entre outros), os valores de incidência dessa condição variam enormemente, desde 3% até níveis maiores que 70% [42, 43, 44, 46, 49, 52]. Utilizando os critérios mais recentes, estudos sugerem uma incidência de 19-40% em neonatos de muito baixo peso e de 38% em RNs asfixiados [42].

Uma grande coorte multicêntrica e multinacional realizada em 2014 resultou no estudo AWAKEN (*Assessment of Worldwide Acute Kidney injury Epidemiology in Neonates*) [43]. O estudo avaliou os registros de todos os RNs admitidos em UTINs de 24 centros médicos presentes em 4 países (EUA, Canadá, Índia e Austrália), que permaneceram pelo menos 48h recebendo fluídos endovenosos no primeiro trimestre de 2014. Foram excluídos aqueles neonatos admitidos com mais de 14 dias de vida, com cardiopatia congênita que necessitaram

de intervenção cirúrgica nos primeiros 7 dias de vida, com anomalias cromossômicas letais, com malformações graves dos rins ou do trato urinário e aqueles que faleceram dentro de 48h da admissão. A partir de um levantamento de dados de mais de 4000 RNs, o estudo incluiu 2162 RNs, sendo 59% destes com menos de 36 semanas de IG. Este consiste no maior estudo atual na busca de melhor compreensão sobre IRA neonatal. A IRA foi definida a partir dos critérios de nKDIGO: elevação do SCr em 0,3mg/dL ou mais ou elevação de 50% ou mais do valor prévio mais baixo e/ou débito urinário menor que 1 mL/kg/h entre os dias 2 e 7 pós-natal. Os autores encontraram incidência geral de 30% para LRA entre esses neonatos, utilizando um ou ambos critérios (SCr e débito urinário). Cerca de metade dos pacientes diagnosticados com LRA foram classificados nos estágios 2 ou 3, ou seja, quadros moderados a graves. As maiores incidências foram encontradas nos grupos de IG menor que 29 semanas e maior que 36 semanas. Os principais fatores de risco associados foram maior categoria de peso de nascimento, nascimento externo aos hospitais participantes, admissão por encefalopatia hipóxico-isquêmica, crises convulsivas, cardiopatias congênitas, enterocolite necrotizante e acompanhamento cirúrgico. Mães de RNs com IRA eram menos propensas a ter hipertensão arterial crônica ou pré-eclâmpsia ou de terem recebido esteroides e anti-hipertensivos. Além disso, foi observado significativa associação entre a ocorrência de IRA e mortalidade e tempo de internação para todos os grupos de IG. Neonatos com ao menos um episódio de IRA em qualquer momento da hospitalização apresentaram aumento de 9 dias no tempo de internação e chance de mortalidade 4,6 vezes maior. As taxas de sobrevivência ficaram entre 78-100%. Os autores destacaram que houve grande variação nos padrões de vigilância de função renal entre os centros participantes e também uma grande variação de incidência de LRA entre os centros (entre 3 e 74%). Os centros que fizeram o menor número de aferições de SCr foram os que apresentaram menor incidência de LRA e o contrário também foi verdadeiro. Isso sugere que protocolos mais bem estabelecidos e frequentes de monitoração da função renal deveriam ser implementados e a incidência de LRA provavelmente seria maior se isso fosse realizado.

A partir de resultados subsequentes do estudo AWAKEN, foi realizada a estratificação em relação a incidência de IRA neonatal precoce (primeiros 7 dias de vida pós-natal) e tardia (após os primeiros 7 dias) [52, 56], estratificação essa pouco explorada em estudos anteriores. Quanto à IRA precoce, foi descrita uma incidência de 21% dos 2110 RNs selecionados, com maior incidência entre aqueles menores de 29 semanas e maiores que 36 semanas [52]. Os episódios ocorreram em média próximo ao 3º dia de vida ($2,8 \pm 1,8$). Comparado com aqueles neonatos que não tiveram IRA, os que tiveram apresentaram maior mortalidade associada, com

chance 2,6 vezes maior, assim como maior tempo de internação [52]. Os autores identificaram que nascimento externo aos hospitais participantes, admissão por indicação cirúrgica ou por hiperbilirrubinemia, necessidade de ressuscitação com epinefrina e presença de erros de metabolismo foram fatores associados a maior incidência de IRA nesse período, enquanto que gestação múltipla, esteroides para maturação fetal e hipertensão materna foram fatores de proteção. A exposição a drogas como antibióticos, diuréticos, vasopressores e metilxantinas foi associada a menor propensão à IRA nesse subgrupo [52]. Os autores argumentaram que esses resultados inesperados, principalmente em relação aos antibióticos, podem ser devidos a um viés de classificação pela maneira como definiram a exposição às drogas, além do fato dos antibióticos terem sido largamente utilizados na primeira semana de vida. Cerca de 69% de todos os RNs avaliados receberam ao menos um antibiótico nefrotóxico nesse período, e essa taxa chegou a 84% naqueles com IG menor que 29 semanas [52].

Em relação à IRA tardia, Charlton et al, em 2018, descreveram uma incidência de 9% entre os 2152 RNs avaliados, com mediana de ocorrência do evento no 17º de vida, sendo que 1/3 desses RNs já havia apresentado um episódio de IRA precoce. A maior incidência foi entre os RNs de IG menor que 29 semanas. Semelhante ao resultado principal e à IRA precoce, neonatos que apresentaram IRA tardia novamente tiveram maiores taxas de mortalidade (chance 2,1 vezes maior), sendo esta diretamente proporcional à gravidade da lesão, e também tiveram aumento do tempo de internação [56]. Os principais fatores de risco associados foram oligo ou polidrâmnio, intubação, diagnóstico à admissão de cardiopatia congênita, de enterocolite necrotizante e de necessidade cirúrgica, além do uso de drogas diuréticas, vasopressoras e antiinflamatórios não esteroidais, diferentemente do encontrado para IRA precoce. Fatores de proteção foram os mesmos de IRA precoce, incluindo também a presença de hipoglicemia [56].

Esses resultados corroboram achados semelhantes encontrados em estudos menores e realizados em centros únicos [45, 46, 49, 50, 53, 54, 57, 58]. As incidências de IRA neonatal de 7,5-44%, 62,5% e 10%, em RNs prematuros, em RNs prematuros com asfixia e em RNs de todas as IG, respectivamente. Os critérios diagnósticos utilizados nos estudos foram variados, assim como o método para aferição do S_{Cr}. Esses estudos também elencaram possíveis fatores de risco para IRA: canal arterial patente com necessidade de tratamento, menor IG e menor peso de nascimento, hipotensão com necessidade de ressuscitação volêmica ou esteroides, enterocolite necrotizante, sepse, uso de drogas nefrotóxicas, asfixia, desidratação, síndrome de desconforto respiratório, cardiopatia congênita. O fator de proteção presente nesses estudos foi

o relato de mães que receberam sulfato de magnésio [45, 46, 49, 50, 53, 54]. Além disso, alguns desses estudos também trouxeram a associação significativa entre IRA e piores desfechos em mortalidade e tempo de internação [47, 49, 50, 55, 57]. Os impactos em longo prazo para esses neonatos também estão começando a ser estudados. Harer et al, em 2020, fizeram uma revisão de estudos que buscaram avaliar esse tipo de desfecho. Os autores encontraram que muitos trabalhos trazem evidências de que a prematuridade e o baixo peso, por si só, estariam relacionados a risco aumentado em 2 a 3 vezes para o desenvolvimento de doença renal crônica e hipertensão na vida adulta. A maior coorte já realizada até o momento, acompanhou prematuros e neonatos de extremo baixo peso até os 30 anos de vida [59, 60]. Resultados semelhantes quanto a alterações pressóricas e de marcadores de hiperfiltração já foram encontrados em momentos mais precoces, desde crianças de 2 anos de vida até adolescentes nascidos prematuros [41, 61]. Harer et al também argumentam quanto a um possível *continuum* que pode acontecer entre a IRA e a doença renal crônica a depender da maneira como a reparação irá ocorrer no processo de recuperação após uma lesão inicial. O período descrito para adultos como 90 dias para completar essa reparação pode não ser tão semelhante e preciso quando se aborda a população neonatal, e os estudos já encontrados que tentaram relacionar a IRA e acometimentos crônicos foram pequenos e em centros únicos, trazendo evidências de menor nível. Assim, os autores propõem que ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas com estudos mais robustos, multicêntricos e com maior tempo de acompanhamento desses RNs [52].

Após feito um diagnóstico de IRA, infelizmente, ainda são poucos os recursos terapêuticos disponíveis e com algum nível de evidência comprovada [42]. Na maioria das vezes será feito um manejo clínico, com cuidados especiais ao balanço hídrico e aos distúrbios iônicos e ácido-básicos, indicando-se as terapias de substituição renal nos casos refratários [42]. Além disso, o real impacto de médio e longo prazo de um ou mais episódios de lesão renal aguda ainda estão sendo estudados, assim como sua especificidade nos prematuros quanto à ocorrência de uma lesão num órgão ainda em pleno desenvolvimento e por se tratar de uma população que, a princípio, já teria outros fatores de risco por si só associados a doença renal crônica e hipertensão na vida adulta [42, 43, 44, 50, 51]. Dessa maneira, a maioria dos estudos ressalta a importância de melhores marcadores de lesão renal que possam trazer a possibilidade de atuações mais preventivas e de diagnósticos mais precoces para essa condição potencialmente tão grave para os neonatos e mais ainda para os prematuros [42, 43, 44].

Biomarcadores Urinários

Um biomarcador de lesão ideal deve ser de fácil realização, se possível a partir do sangue ou urina, deve ser pouco invasivo, com bom custo benefício e utilizar um método bem padronizado. Idealmente, também deve ser estável em diferentes condições de temperatura e ter alta sensibilidade e especificidade, com aparecimento precoce. Quanto a um biomarcador de lesão renal, ele deve ser o mais específico possível para injúria renal, ser pouco afetado por comorbidades e ter um bom valor prognóstico na predição de desfechos desfavoráveis. Além disso, o biomarcador deve modificar-se rapidamente com o tratamento e auxiliar na diferenciação etiológica de LRA [62, 63].

Conforme o que já foi exposto previamente, dentre os atuais marcadores renais utilizados, principalmente quanto à creatinina, poucos desses critérios são atendidos, ainda mais na população neonatal prematura [44, 62, 64, 65, 66, 67]. Resumidamente, a creatinina mede função e não lesão, não se modifica até que cerca de 50% da função renal tenha se deteriorado, pode subestimar a função renal por ser secretada pelos túbulos, sofre variações significativas de acordo com massa muscular, status de hidratação, sexo, idade, medicações e substâncias endógenas (como bilirrubina) e não pode ser utilizada como parâmetro em pacientes em diálise [64, 67, 68, 69]. Especificamente na população neonatal, esse marcador representa a função renal materna nos primeiros dias de vida e sofre grandes variações ao longo dos primeiros meses de vida, durante a maturação renal [7, 64, 66].

Nesse contexto, principalmente na última década, vários estudos iniciaram uma busca por novos possíveis marcadores renais. Os biomarcadores urinários têm ganhado destaque pelo fato da coleta de urina ser de realização mais simples e não necessariamente invasiva, e não depender de fatores como volume máximo a ser colhido por possíveis efeitos deletérios, como ocorre com a coleta de sangue [64, 65, 70, 71].

Dentre os biomarcadores que serão avaliados neste estudo, em publicações dos últimos 10 anos, alguns já foram mais amplamente avaliados, tanto na população adulta quanto na pediátrica, como Cistatina C, NGAL, KIM1, OPN e GSTalfa, enquanto outros ainda foram pouco avaliados quanto ao seu papel na avaliação da função e/ou lesão renal [44, 62, 63, 66, 68, 69, 72]. A Cistatina C é uma proteína endógena de baixo peso molecular com função de inibição da enzima cisteína-protease, é produzida por todas as células nucleadas, em um ritmo constante, independente de massas muscular, e liberada na circulação sanguínea. Essa molécula é livremente filtrada pelo glomérulos e totalmente reabsorvida e catabolizada pelo pelas células proximais, não possui secreção tubular significativa e parece não atravessar a placenta. Nesse

sentido, vários estudos já pesquisaram a Cistatina C como marcador da filtração glomerular quando dosada no plasma e como marcador de lesão tubular quando encontrada na urina, inclusive na população neonatal e prematura [7, 44, 62, 63, 73, 74, 75]. A lipocaína associada à gelatinase neutrofílica, mais conhecida como NGAL, é uma proteína que faz parte do sistema imune inato ativando neutrófilos, e é excretada pelas células do túbulo proximal em resposta à LRA por nefrotoxicidade ou por lesão isquêmica. Além disso, pode também ser produzida durante a nefrogênese, sepse e lesão a outros órgãos (como pulmão e fígado) e também parece participar da quelação de ferro e produção de espécies reativas de oxigênio, com resultados ainda controversos em neonatos, crianças e adultos quanto ao seu potencial como marcador de lesão tubular [14, 44, 62, 63, 65, 67, 75, 76, 77, 78]. KIM-1, uma glicoproteína transmembrana, não é encontrada na urina em condições normais, mas é identificada em níveis elevados após lesão renal isquêmica ou tóxica, sendo eliminadas pelas células tubulares. Essa molécula parece permanecer no epitélio túbulo proximal até completa regeneração das células e tem surgido estudos evidenciando sua elevação urinária em quadros de LRA, como marcador tubular, em diferentes populações [62, 63, 67, 68, 74, 75]. A osteopontina (OPN) é uma citocina amplamente expressa e regulada durante inflamação, nos rins, é encontrada principalmente na alça de Henle e nos túbulos distais, podendo ter sua produção aumentada em todo o néfron após lesão renal. Já existem evidências de sua relação com regeneração renal e sua capacidade de predição de terapia de substituição renal e mortalidade em adultos criticamente enfermos, podendo ser um marcador de função tubular [64, 67, 79]. A glutathione s-transferase (GST) é uma enzima citosólica com as isoformas alfa e pi encontradas nos rins humanos. A alfa-GST é expressa no epitélio do túbulo proximal, é liberada em grandes quantidades na urina na presença de injúria tubular e recentemente também foi associada a fibrose túbulo-intersticial [44, 80, 81].

Outros marcadores ainda são encontrados de forma mais escassa em pesquisas. O fator de crescimento epitelial (EGF) é um fator que estimula crescimento celular, proliferação e diferenciação, tendo sido identificada função reparativa renal em ratos, mas poucos estudos avaliaram seu papel em humanos, sendo encontrados alguns relatos de sua relação em prever a recuperação de função renal em adultos [71, 82, 83]. Proteínas de ligação ao ácido graxo ou *fatty acid binding protein* (FABP) são uma família de proteínas de transporte de ácido graxo e outras substâncias lipofílicas. A do tipo 1 ou L (*liver*) é encontrada abundantemente no fígado, mas também no intestino, rins, pâncreas, estômago e pulmão. Níveis urinários e séricos elevados dessa proteína, em adultos, já foram relacionados à isquemia intestinal, injúria renal e isquemia renal [84, 85]. A proteína P 10 induzida por interferon gama, também conhecida por

IP-10, pertence à família das quimiocinas CXC e participa de resposta aloimune a partir da sua liberação por diferentes tipos de célula (leucócitos, neutrófilos, células endoteliais e epiteliais). Como marcador urinário, IP-10 já foi relacionada à rejeição de enxertos renais em adultos e como marcador sérico, parece associar-se à presença de nefrite lúpica em atividade em crianças [86, 87]. A calbindina é uma proteína encontrada no túbulo distal, cérebro e pâncreas e participa do transporte transcelular de cálcio e na modulação de reabsorção renal de cálcio. É relatado efeito protetor dessa proteína para nefrotoxicidade por ciclosporina em adultos, mas também já foi relacionada a processos de injúria e fibrose tubular [44, 88].

A microglobulina alfa-1 é uma pequena proteína plasmática globular, sintetizada no fígado, que está universalmente presente em vertebrados, incluindo humanos. Possui função de um potente aglutinante de heme livre e como uma proteína antioxidante. É facilmente filtrada pelo glomérulo renal e posteriormente é reabsorvida pelos túbulos proximais em sua quase totalidade. Assim, seus níveis urinários podem estar relacionados com a filtração glomerular e lesão tubular [44, 89]. As cadeias alfa do colágeno tipo IV estão localizadas principalmente nos rins, olhos e cóclea. O colágeno IV é um constituinte central das membranas basais, inclusive dos túbulos e glomérulo renal. A síndrome de Alport, uma nefrite hereditária, ocorre devido à mutação em genes que codificam essa proteína e a presença dela na urina foi pouco explorada como potencial marcador [90, 91, 92]. Neuroquinina-1 induzível por fator de crescimento hematopoiético ou Osteoactivina é uma proteína transmembrana presente em ratos, humanos e camundongos, que parece participar do deslocamento de fagócitos e lisossomos. Em alguns estudos, seu nível renal estava aumentado em ratos com nefrotoxicidade, após obstrução ureteral e também na nefropatia diabética humana [93]. O fator trefoil 3 (TFF3) é um pequeno peptídeo que está envolvido na proteção da mucosa, é amplamente expresso em vários tecidos, incluindo tecido renal e já foi relatado que seus níveis urinários estão significativamente aumentados em pacientes adultos com doença renal crônica e com fibrose tubulointersticial [94]. O inibidor de metalopeptidase (TIMP-1) é uma glicoproteína que se expressa em diferentes órgãos e estruturas, incluindo os rins. Atua restringido a degradação da matriz extracelular, parece ser capaz de promover a proliferação e também pode ter uma função anti-apoptótica. Estudos em crianças já avaliaram sua capacidade como marcador de lesão renal em pacientes portadores de quadros obstrutivos do trato urinário e de refluxo vésico-ureteral [95, 96]. E, por fim, a Clusterina, uma glicoproteína inibidora da lise celular é conhecida por estar envolvida na maturação do espermatozoide, transporte de lipídios, diferenciação e remodelação de tecidos e várias atividades biológicas celulares. Investigações com camundongos idosos

revelaram que a deficiência de clusterina se relaciona a uma glomerulopatia progressiva [97]. Estudos iniciais já mostraram que a clusterina urinária está associada a numerosas doenças renais em crianças, como a nefrite lúpica. No entanto, poucos estudos avaliaram seu comportamento com marcador de função túbulointersticial em neonatos e pretermos [98].

Saedi et al, em 2015, estudaram em uma coorte prospectiva 81 neonatos prematuros saudáveis, de muito baixo peso (peso de nascimento menor que 1200g) e/ou com IG menor que 31 semanas, sendo excluídos aqueles com comorbidades e os que evoluíram com LRA. Foi realizada dosagem de SCr nos dias 1, 2, 3, 4 e 12-14 de vida e urina foi colhida nos primeiros 4 dias de vida. Foram dosados na urina praticamente os mesmos biomarcadores que foram medidos no presente estudo: cistatina C, EGF, NGAL, OPN, uromodulina (UMOD), alfa-GST, calbidina, clusterina, KIM-1, osteoativina, TFF3 e albumina, além de beta-2-microglobulina (B2M) e fator de crescimento epitelial vascular (VEGF). Os autores encontraram que a maioria dos biomarcadores variaram de acordo com IG (cistatina C, VEGF, NGAL, OPN, EGF, UMOD, TFF3) e idade pós-natal (B2M, cistatina C, NGAL, OPN, clusterina, KIM-1, osteoativina, TFF3, VEGF e alfa-GST), além de destacarem que sexo teve impacto nos valores de albumina, NGAL, clusterina e VEGF. Os autores também estabeleceram proposta de percentis para cada biomarcador de acordo com as categorias de IG.

Askenazi et al, em 2011, desenvolveram um estudo piloto com 30 RNs de muito baixo peso, que foram acompanhados prospectivamente quanto aos desfechos de IRA e mortalidade e avaliaram o valor preditivo de biomarcadores urinários colhidos nos primeiros 6 dias de vida (NGAL, cistatina C, OPN, B2M, IL-18 e KIM-1). Os autores encontraram níveis máximos significativamente elevados de NGAL e de OPN naqueles que desenvolveram IRA. O uso da combinação de marcadores apresentou elevada capacidade de detectar IRA. Em relação à mortalidade, OPN e KIM-1 também apresentaram elevação significativa no grupo que apresentou IRA, e, quando combinados, resultaram em elevado poder de predição. Em 2012, agora com um grupo de 33 RNs nascidos a termo, Askenazi et al avaliaram praticamente os mesmos biomarcadores. Neste estudo, encontraram resultados diferentes. RNs a termo com IRA apresentaram níveis significativamente mais elevados de cistatina C e níveis significativamente mais baixos de UMOD e EGF. Os demais marcadores não apresentaram diferença significativa.

Em 2016, esse mesmo grupo de pesquisadores novamente avaliou papel de inúmeros potenciais marcadores renais em prematuros. Dessa vez com uma amostra de 113 RNPT de peso menor que 1200g e/ou $IG \leq 31$ semanas que foram acompanhados do nascimento até 36

semanas de idade gestacional corrigida. Foram dosados na urina dos primeiros 4 dias de vida 14 marcadores: albumina, B2M, cistatina C, EGF, VEGF, NGAL, OPN, UMOD, alfa-GST, calbidina, clusterina, KIM-1, osteoativina e TFF3. Nesse estudo, os autores também fizeram análise do *status* hídrico dos pacientes a partir da perda de peso e a possível influência disso no diagnóstico de IRA a partir do SCr e dos biomarcadores. Eles encontraram menor incidência de IRA quando ajustada para o *status* hídrico e argumentam que parte da elevação do SCr nos RNs prematuros pode se dever a uma concentração natural que ocorra pelo remanejamento de fluídos e perda de peso esperada de ocorrer nesse período. Os autores relataram que a performance de todos os biomarcadores melhoraram ao compararem com a definição de IRA corrigida para o *status* hídrico, sendo que NGAL foi o com melhor performance. Em outro artigo no mesmo ano, os autores detalharam os resultados sobre os biomarcadores. Semelhante ao primeiro estudo de 2011, dessa vez em uma coorte maior, os autores relataram níveis ajustados para creatinina urinária significativamente mais elevados de cistatina C, NGAL, clusterina, OPN, B2M, VEGF e alfa-GST em RNs que desenvolveram IRA e níveis mais baixos de EGF e UMOD nesse mesmo grupo, sendo que esses dois últimos, combinados com IG, foram os que apresentaram maior capacidade discriminativa.

Outros estudos dos últimos 10 anos avaliaram um ou mais biomarcadores na população prematura. Gubhaju et al, em 2016, avaliou NGAL, albumina e B2M em 129 RNs termos e pretermos e relatou valores inversamente associados a IG com grande variabilidade entre os grupos, não conseguindo definir até que ponto a proteinúria é um marcador de imaturidade ou de lesão renal. Shin et al, em 2017, encontrou em 57 neonatos prematuros de muito baixo peso que os níveis de NGAL seriam mais sensíveis que SCr ou nível sérico de cistatina C para predição de oligúria. Em 45 prematuros menores que 32 semanas, Hanna et al, em 2016, encontraram níveis elevados de NGAL, OPN e cistatina C e níveis mais baixos de EGF e UMOD em neonatos que apresentaram IRA, resultados semelhantes aos encontrados pelo grupo de Askenazi et al em 2016. Miklaszweska et al, em 2019, analisaram NGAL, KIM-1 e OPN na urina de 57 prematuros saudáveis com peso de nascimento menor que 1500g e encontraram tendência de redução dos níveis de NGAL com o avançar dos dias de vida pós-natal e níveis mais altos em meninas, enquanto que para KIM-1 e OPN há uma tendência de elevação quanto menor o peso de nascimento, sendo os níveis mais elevados em meninos. Capelli et al, em 2020, avaliaram NGAL, cistatina C, EGF, OPN e KIM-1 em 33 RNs menores de 32 semanas e relataram que todos os marcadores apresentaram associação significativa com IG, hipertensão materna e persistência de canal arterial. Já Kandasamy et al, em 2018, avaliaram

albumina e nefrina urinária em 53 RNs com IG menor que 28 semanas e descreveram uma redução gradual dos níveis de albuminúria nessa população até a idade termo, mas ainda assim atingindo níveis mais elevados em comparação com a população termo usada como controle. Os autores aventaram a hipótese de que os resultados sugerem que os prematuros podem ter um dano glomerular residual em relação àqueles nascidos a termos. A nefrina apresentou comportamento semelhante, sendo este o primeiro estudo a avaliar essa molécula em prematuros. Ozkaya et al, em 2012, avaliaram KIM-1 em 48 RNs com menos de 34 semanas e observaram que medidas seriadas desse marcador podem ser usadas como indicador não-invasivo de IRA. Kuribayashi et al, em 2016, analisaram NGAL urinária em 40 prematuros menores de 32 semanas e encontraram que elevações nos seus níveis podem ocorrer cerca de um dia antes que as alterações do SCr, podendo ser um marcador mais precoce de IRA. Em estudo semelhante, La Manna et al, em 2011, propuseram um valor de referência de 100 ng/mL para NGAL urinária como marcador de acometimento renal nas primeiras 3 semanas de vida de prematuros. Por fim, Li et al, em 2012, avaliaram níveis urinários de cistatina C e IL-18 em 62 RNs (termos e pretermos) e relataram que a cistatina C mostrou uma tendência de redução conforme a progressão da maturação renal e também se mostrou como um melhor biomarcador de predição de IRA, em comparação com SCr e com IL-18.

Aplicações em contextos mais específicos também já foram avaliadas em estudos recentes. Reiter et al, em 2017, realizaram estudo com 59 RNs e lactentes submetidos a cirurgias cardíacas com by-pass e dosaram IL-6 sérico e NGAL sérico e urinário antes e depois dos procedimentos. Os autores não encontraram diferença significativa nos níveis séricos nem urinários de NGAL, ao comparar os pacientes que tiveram LRA e os que não tiveram essa complicação pós-operatória, propondo que as alterações encontradas desse marcador nessa população seriam mais relacionados a um estado inflamatório e assim, que este não seria um bom biomarcador de alteração renal para esse tipo de paciente. Em um estudo prospectivo com 146 prematuros menores que 32 semanas, Sellmer et al, em 2017, não encontraram associação entre NGAL urinária e patência do canal arterial, independentemente do tamanho do canal ou da presença de repercussão hemodinâmica, assim como também não observaram associação significativa entre esse marcador e IRA. Ainda em relação à NGAL, mas em neonatos asfíxiados, Bellos et al, em 2018, realizaram uma metanálise na qual incluíram 11 estudos para análise qualitativa e 9 para quantitativa, com um total de 652 neonatos asfíxiados incluídos. De 7 estudos que avaliaram NGAL urinária, 6 deles encontraram elevação significativa desse marcador nos RNs que apresentaram IRA, com uma sensibilidade total de 89,7%. Esses estudos

demonstram como que a mesma molécula pode apresentar comportamentos diferentes em populações específicas e ressaltam a importância de cortes maiores para confirmar ou descartar o potencial diagnóstico desse biomarcador.

Além disso, esses e outros potenciais biomarcadores também têm sido explorados na avaliação renal além da IRA, como para marcadores em nefropatias e uropatias obstrutivas congênitas [80, 102] e na síndrome nefrótica idiopática [81]. Pesquisas envolvendo podocalixina, endotelina 1 e perfil metabólico também tentam esclarecer a relação dessas moléculas com a função renal e potencial diagnóstico na população neonatal [103, 104, 105].

Infelizmente, a maioria desses estudos ainda possuem limitações relevantes. Muitos foram realizados com amostras pequenas e/ou específicas (neonatos asfixiados, submetidos a cirurgias cardíacas, sépticos, etc) e analisaram poucos marcadores. A maioria deles avaliou cerca de 2-4 potenciais marcadores [2, 14, 65, 67, 68, 69, 71, 72, 76]. Além disso, aqueles que analisaram o potencial desses marcadores no diagnóstico mais precoce da IRA, o fizeram, na maior parte das vezes, a partir de uma comparação com alterações identificadas pelos critérios atuais de creatinina e débito urinário, que, apesar de serem os critérios mais utilizados e difundidos, não deveriam ser considerados padrão ouro, ainda mais para essa população [44, 70, 100]. Muitos autores também argumentam sobre a possibilidade de que, isoladamente, esses novos marcadores não sejam suficientes para prática clínica assertiva, mas que a elaboração de painéis de biomarcadores talvez seja a melhor forma de aplicação [44, 62, 69, 77, 100]. Assim, ainda é limitado o conhecimento sobre o comportamento normal dessas substâncias em neonatos saudáveis e doentes, prematuros ou não, ao longo da maturação renal que ocorre no período pós-natal. Estudos de maior porte e multicêntricos são necessários para estabelecimento de evidências de maior poder para futura aplicação clínica [44, 65, 70, 100].

Nesse sentido, o presente estudo tem como o objetivo de acrescentar novas informações sobre esses marcadores em recém-nascidos prematuros saudáveis numa população brasileira.

REFERÊNCIAS

1. Kandasamy Y, Smith R, Wright IM. Oligonephropaty of prematurity. *American Journal of Perinatology*. 2012; 29:115-120.
2. Kandasamy Y, Rudd D, Smith R, Lumbers ER, Wright IM. Extra uterine development of preterm kidneys. *Pediatric Nephrology*. 2018; 33:1007-1012.
3. Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 8a ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2008.

4. Glassberg KI. Normal and abnormal development of the kidney: a clinician's interpretation of current knowledge. *The Journal of Urology*. 2002, 167:2339-2351.
5. Minuth WW. Key features of the nephrogenic zone in the fetal human kidney—hardly known but relevant for the detection of first traces impairing nephrogenesis. *Cell and Tissue Research*. 2019; 375: 589–603.
6. Minuth WW. Concepts for a therapeutic prolongation of nephrogenesis in preterm and low-birth-weight babies must correspond to structural-functional properties in the nephrogenic zone. *Molecular and Cellular Pediatrics*. 2017; 4: 12.
7. Abitbol CL, DeFreitas MJ, Strauss J. Assessment of kidney function in preterm infants: lifelong implications. *Pediatric Nephrology* 2016; 31(12), 2213-2222.
8. Sutherland MR, Gubhaju L, Moore L, Kent AL, Dahlstrom JE, Horne RSC, Hoy WE, Bertram JF, Black MJ. Accelerated maturation and abnormal morphology in preterm neonatal kidney. *Journal of American Society of Nephrology*. 2011; 22:1365-1374.
9. Filler G, Kanan RG, Elias ACA. Assessment of glomerular filtration rate in the neonate: is creatinine the best tool? *Current Opinion in Pediatrics*. 2016; 28(2):173-9.
10. Botwinski CA, Falco GA. Transition to postnatal renal function. *Journal of Perinatal and Neonatal Nursing*. 2014; 28(2):150-4.
11. Hemker SL, Sims-Lucas S, Ho J. The role of hypoxia during nephrogenesis. *Pediatric Nephrology*. 2016; 31(10):1571-1577.
12. Buchholz B, Schley G, Eckardt KU. The impact of hypoxia on nephrogenesis. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2016; 25(3):180-186.
13. Kastl, JT. Renan function in the fetus and neonate – The creatinine enigma. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2017; 22(2):83-89.
14. Gubhaju L, Sutherland MR, Horne RSC, Medhurst A, Kent AL, Ramsden A, Moore L, Singh G, Hoy WE, Black MJ. Assessment of renal functional maturation and injury in preterm neonates during the first month of life. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014; 307(2):F149.
15. Otukesh H, Hoseini R, Rahimzadeh N, Hosseini S. Glomerular function in neonates. *Iran Journal of Kidney Diseases*. 2012 May;6(3):166-72.
16. Dyson A, Kent AL. The Effect of Preterm Birth on Renal Development and Renal Health Outcome. *NeoReviews*. 2019 Dec;20(12):e725-e736.
17. Vieux R, Hascoet JM, Merdarius D, Fresson J, Guillemin F. Glomerular filtration rate reference values in very preterm infants. *Pediatrics*. 2010; 125(5):e1186.

18. Aly H, Ez El Din Z, Soliman RM, Bhattacharjee I, Abdellatif MAK, Kamel A, Salah H. Renal function in small for gestational age preterm infants. *Journal of Perinatology*. 2019 Sep;39(9):1263-1267.
19. Guignard JP, Drukker A. Why do newborn infants have a high plasma creatinine? *Pediatrics*. 1999; 103(4):e49.
20. Gallini F, Maggio L, Romagnoli C, Marrocco G, Tortorolo G. Progression of renal function in preterm neonates with gestational age <32 weeks. *Pediatric Nephrology*. 2000; 15(1-2): 119-124.
21. Kandasamy Y, Rudd D, Lumbers ER, Smith R. An evaluation of preterm kidney size and function over the first two years of life. *Pediatrics Nephrology*. 2020 Aug;35(8):1477-1482.
22. Zilleruelo G, Sultan S, Bancalari E, Steele B, Strauss J. Renal bicarbonate handling in low birth weight infants during metabolic acidosis. *Biology of the Neonate*. 1986;49(3):132-9.
23. Fusch C, Jochum F. Water, sodium, potassium and chloride. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 2014;110:99-120.
24. Segar JL. A physiological approach to fluid and electrolyte management of the preterm infant: Review. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*. 2020;13(1):11-19.
25. Asada N. Tubular immaturity causes erythropoietin-deficiency anemia of prematurity in preterm neonates. *Scientific Reports*. 2018 Mar 13;8(1):4448.
26. Fisher DA, Pyle HR, Porter JC, Beard AG, Panos TC. Control of water balance in the newborn. *American Journal of Diseases of Children (1960)*. 1963 Aug;106:137-146.
27. Joppich R, Scherer B, Weber PC. Renal prostaglandins: relationship to the development of blood pressure and concentrating capacity in pre-term and full term healthy infants. *European Journal of Pediatrics*. 1979; 132:253.
28. Calcagno PL, Rubin MI, Weintraub DH. Studies on the renal concentrating and diluting mechanisms in the premature infant. *Journal of Clinical Investigation*. 1954; 33:91.
29. Eldemann CM, Soriano JR, Boichis H. Renal bicarbonate reabsorption and hydrogen ion excretion in normal infants. *Journal of Clinical Investigation*. 1967; 46:1309.
30. Manz F, Kalhoff H, Remer T. Renal acid excretion in early infancy. *Pediatric Nephrology*. 1997; 11:231.

31. Sato T, Takahashi N, Komatsu Y, Wada M, Matsunaga M, Ito K, Uchiyama M, Nishida H. Urinary acidification in extremely low birth weight infants. *Early Human Development*. 2002 Dec;70(1-2):15-24.
32. Filler G, Bhayana V, Schott C, Díaz-González de Ferris ME. How should we assess renal function in neonates and infants? *Acta Paediatrica*. 2020 Aug; 00:1-8.
33. Kandasamy Y, Rudd D, Smith R. The relationship between body weight, cystatin C and serum creatinine in neonates. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*. 2017;10(4):419-423.
34. Wilhelm-Bals A, Combescure C, Chehade H, Daali Y, Parvex P. Variables of interest to predict glomerular filtration rate in preterm newborns in the first days of life. *Pediatric Nephrology*. 2020 Apr;35(4):703-712.
35. Boer DP, de Rijke YB, Hop WC, Cransberg K, Dorresteijn EM. Reference values for serum creatinine in children younger than 1 year of age. *Pediatric Nephrology*. 2010 Oct;25(10):2107-13.
36. Filler G, Lopes L, Awuku M. The Importance of Accurately Assessing Renal Function in the Neonate and Infant. *Advances in Clinical Chemistry*. 2015;71:141-56.
37. Go H, Momoi N, Kashiwabara N, Haneda K, Chishiki M, Imamura T, Sato M, Goto A, Kawasaki Y, Hosoya M. Neonatal and maternal serum creatinine levels during the early postnatal period in preterm and term infants. *PLoS One*. 2018 May 24;13(5):e0196721.
38. Bateman DA, Thomas W, Parravicini E, Polesana E, Locatelli C, Lorenz JM. Serum creatinine concentration in very-low-birth-weight infants from birth to 34-36 wk postmenstrual age. *Pediatric Research*. 2015 May;77(5):696-702.
39. Zhang Y, Zeng HH. Renal Function Profiles in Preterm Neonates With Birth Asphyxia Within the First 24 H of Life. *Frontiers in Pediatrics*. 2020 Oct 30;8:583540.
40. Bruel A, Rozé JC, Flamant C, Simeoni U, Roussey-Kesler G, Allain-Launay E. Critical serum creatinine values in very preterm newborns. *PLoS One*. 2013 Dec 30;8(12):e84892.
41. Horie A, Abe Y, Koike D, Hirade T, Nariai A, Ito T, Katou F. Long-term renal follow up of preterm neonates born before 35 weeks of gestation. *Pediatrics International*. 2019 Dec;61(12):1244-1249.
42. Nada A, Bonachea EM, Askenazi DJ. Acute kidney injury in the fetus and neonate. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2017 Apr;22(2):90-97.

43. Jetton JG, Boohaker LJ, Sethi SK, Wazir S, Rohatgi S, Soranno DE, Chishti AS, Woroniecki R, Mammen C, Swanson JR, Sridhar S, Wong CS, Kupferman JC, Griffin RL, Askenazi DJ; Neonatal Kidney Collaborative (NKC). Incidence and outcomes of neonatal acute kidney injury (AWAKEN): a multicentre, multinational, observational cohort study. *The Lancet: Child & Adolescent Health*. 2017 Nov;1(3):184-194.
44. Libório AB, Branco KM, Torres de Melo Bezerra C. Acute kidney injury in neonates: from urine output to new biomarkers. *Biomed Research International*. 2014;2014:601568.
45. Mian AN, Guillet R, Ruck L, Wang H, Schwartz GJ. Acute Kidney Injury in Premature, Very Low-Birth-Weight Infants. *Journal of Pediatric Intensive Care*. 2016 Jun;5(2):69-78.
46. Zhang Y, Zeng HH. Renal Function Profiles in Preterm Neonates With Birth Asphyxia Within the First 24 H of Life. *Frontiers in Pediatric*. 2020 Oct 30;8:583540.
47. Cleper R, Shavit I, Blumenthal D, Reisman L, Pomeranz G, Haham A, Friedman S, Goldiner I, Mandel D. Neonatal acute kidney injury: recording rate, course, and outcome: one center experience. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2019 Oct;32(20):3379-3385.
48. Ricci Z, Ronco C. Neonatal RIFLE. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2013 Sep;28(9):2211-4.
49. Stojanović V, Barišić N, Milanović B, Doronjski A. Acute kidney injury in preterm infants admitted to a neonatal intensive care unit. *Pediatric Nephrology*. 2014 Nov;29(11):2213-20.
50. Stojanović V, Barišić N, Radovanović T, Bjelica M, Milanović B, Doronjski A. Acute kidney injury in premature newborns-definition, etiology, and outcome. *Pediatric Nephrology*. 2017 Oct;32(10):1963-1970.
51. Harer MW, Charlton JR, Tipple TE, Reidy KJ. Preterm birth and neonatal acute kidney injury: implications on adolescent and adult outcomes. *Journal of Perinatology*. 2020 Sep;40(9):1286-1295.
52. Charlton JR, Boohaker L, Askenazi D, Brophy PD, D'Angio C, Fuloria M, Gien J, Griffin R, Hingorani S, Ingraham S, Mian A, Ohls RK, Rastogi S, Rhee CJ, Revenis M, Sarkar S, Smith A, Starr M, Kent AL; Neonatal Kidney Collaborative. Incidence and Risk Factors of Early Onset Neonatal AKI. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2019 Feb 7;14(2):184-195.

53. Youssef D, Abd-Elrahman H, Shehab MM, Abd-Elrheem M. Incidence of acute kidney injury in the neonatal intensive care unit. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 2015 Jan;26(1):67-72.
54. Weintraub AS, Connors J, Carey A, Blanco V, Green RS. The spectrum of onset of acute kidney injury in premature infants less than 30 weeks gestation. *Journal of Perinatology*. 2016 Jun;36(6):474-80.
55. Barhight M, Altaye M, Gist KM, Isemann B, Goldstein SL, Akinbi H. Nephrotoxic Medications and Associated Acute Kidney Injury in Very Low Birth Weight Infants. *Journal of Clinical Nephrology Research*. 2017;4(4):1070.
56. Charlton JR, Boohaker L, Askenazi D, Brophy PD, Fuloria M, Gien J, Griffin R, Hingorani S, Ingraham S, Mian A, Ohls RK, Rastogi S, Rhee CJ, Revenis M, Sarkar S, Starr M, Kent AL; Neonatal Kidney Collaborative (NKC). Late onset neonatal acute kidney injury: results from the AWAKEN Study. *Pediatric Research*. 2019 Feb;85(3):339-348.
57. Nagaraj N, Berwal PK, Srinivas A, Berwal A. A study of acute kidney injury in hospitalized preterm neonates in NICU. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*. 2016;9(4):417-421.
58. Felipin LCS, Oliveira RR, Merino MFGL, Rodrigues BC, Higarashi IH. Associated factors for acute kidney injury in preterm infants. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2019 Dec;72(suppl 3):118-124.
59. Crump C, Sundquist J, Winkleby MA, Sundquist K. Preterm birth and risk of chronic kidney disease from childhood into mid-adulthood: national cohort study. *BMJ*. 2019 May 1;365:11346.
60. Crump C, Sundquist J, Sundquist K. Risk of hypertension into adulthood in persons born prematurely: a national cohort study. *European Heart Journal*. 2020 Apr 21;41(16):1542-1550.
61. South AM, Nixon PA, Chappell MC, Diz DI, Russell GB, Jensen ET, Shaltout HA, O'Shea TM, Washburn LK. Renal function and blood pressure are altered in adolescents born preterm. *Pediatric Nephrology*. 2019 Jan;34(1):137-144.
62. Argyri I, Xanthos T, Varsami M, Aroni F, Papalosis A, Dontas I, Fanos V, Iacovidou N. The role of novel biomarkers in early diagnosis and prognosis of acute kidney injury in newborns. *American Journal of Perinatology* 2013;30(5):347-52.

63. van Donge T, Welzel T, Atkinson A, van den Anker J, Pfister M. Age-Dependent Changes of Kidney Injury Biomarkers in Pediatrics. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2019 Sep;59 Suppl 1:S21-S32.
64. Askenazi DJ, Montesanti A, Hundley H, Koralkar R, Pawar P, Shuaib F, Liwo A, Devarajan P, Ambalavanan N. Urine biomarkers predict acute kidney injury and mortality in very low birth weight infants. *The Journal of Pediatrics*. 2011 Dec;159(6):907-12.e1.
65. Shin SY, Ha JY, Lee SL, Lee WM, Park JH. Increased urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very-low-birth-weight infants with oliguria and normal serum creatinine. *Pediatric Nephrology* 2017; 32(6):1059-1065.
66. Li Y, Fu C, Zhou X, Xiao Z, Zhu X, Jin M, Li X, Feng X. Urine interleukine-18 and cystatin-C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatric Nephrology* 2012; 27(5):851.
67. Miklaszewska M, Korohoda P, Drożdż D, Zachwieja K, Tomasik T, Moczulska A, Korzeniecka-Kozerska A, Kwinta P. eGFR values and selected renal urine biomarkers in preterm neonates with uncomplicated clinical course. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2019 Dec;28(12):1657-1666.
68. Genc G, Ozkaya O, Avcı B, Aygun C, Kucukoduk S. Kidney injury molecule-1 as a promising biomarker for acute kidney injury in premature babies. *American Journal of Perinatology*. 2013 Mar;30(3):245-52.
69. Capelli I, Vitali F, Zappulo F, Martini S, Donadei C, Cappuccilli M, Leonardi L, Girardi A, Aiello V, Galletti S, Faldella G, Poluzzi E, DE Ponti F, Gaetano M. Biomarkers of Kidney Injury in Very-low-birth-weight Preterm Infants: Influence of Maternal and Neonatal Factors. *In Vivo*. 2020 May-Jun;34(3):1333-1339.
70. Askenazi D, Saeidi B, Koralkar R, Ambalavanan N, Griffin RL. Acute changes in fluid status affect the incidence, associative clinical outcomes, and urine biomarker performance in premature infants with acute kidney injury. *Pediatric Nephrology*. 2016 May;31(5):843-51.
71. Hanna M, Brophy PD, Giannone PJ, Joshi MS, Bauer JA, Rao SR. Early urinary biomarkers of acute kidney injury in preterm infants. *Pediatric Research* 2016; 80(2):218-23
72. La Manna G, Galletti S, Capelli I, Vandini S, Nisi K, Aquilano G, Mancini R, Carretta E, Montini G, Faldella G, Stefoni S. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin

- at birth predicts early renal function in very low birth weight infants. *Pediatric Research*. 2011 Oct;70(4):379-83.
73. Allegaert K, Mekahli D, van den Anker J. Cystatin C in newborns: a promising renal biomarker in search for standardization and validation. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2015;28(15):1833-8.
 74. Marin T, Derossett B, Bhatia J. Urinary biomarkers to predict neonatal acute kidney injury. *The Journal of Perinatal and Neonatal Nursing* 2018; 32(3):266-274
 75. Sweetman DU, Onwuneme C, Watson WR, O'Neill A, Murphy JF, Molloy EJ. Renal function and novel urinary biomarkers in infants with neonatal encephalopathy. *Acta Paediatrica*. 2016 Nov;105(11):e513-e519.
 76. Kuribayashi R, Suzumura H, Sairenchi T, Watabe Y, Tsuboi Y, Imataka G, Kurosawa H, Arisaka O. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early predictor of acute kidney injury in premature infants. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016 Dec;12(6):3706-3710.
 77. Reiter K, Balling G, Bonelli V, Pabst von Ohain J, Braun SL, Ewert P, Ruf B. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects inflammation and is not a reliable renal biomarker in neonates and infants after cardiopulmonary bypass: a prospective case-control study. *Cardiology in the Young*. 2018 Feb;28(2):243-251.
 78. Bellos I, Fitrou G, Daskalakis G, Perrea DN, Pergialiotis V. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as predictor of acute kidney injury in neonates with perinatal asphyxia: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Pediatrics*. 2018 Oct;177(10):1425-1434.
 79. Lorenzen JM, Hafer C, Faulhaber-Walter R, Kümpers P, Kielstein JT, Haller H, Fliser D. Osteopontin predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*. 2011 Feb;26(2):531-7.
 80. Bieniaś B, Sikora P. Potential Novel Biomarkers of Obstructive Nephropathy in Children with Hydronephrosis. *Disease Markers*. 2018 Sep 13;2018:1015726.
 81. Bieniaś B, Zajączkowska M, Borzęcka H, Sikora P, Wieczorkiewicz-Płaza A, Wilczyńska B. Early Markers of Tubulointerstitial Fibrosis in Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome: Preliminary Report. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Oct;94(42):e1746.

82. Askenazi DJ, Koralkar R, Hundley HE, Montesanti A, Parwar P, Sonjara S, Ambalavanan N. Urine biomarkers predict acute kidney injury in newborns. *The Journal of Pediatrics*. 2012 Aug;161(2):270-5.e1.
83. Kwon O, Ahn K, Zhang B, Lockwood T, Dhamija R, Anderson D, Saqib N. Simultaneous monitoring of multiple urinary cytokines may predict renal and patient outcome in ischemic AKI. *Renal Failure*. 2010 Jul;32(6):699-708.
84. Obata Y, Kamiyo-Ikemori A, Ichikawa D, Sugaya T, Kimura K, Shibagaki Y, Tateda T. Clinical usefulness of urinary liver-type fatty-acid-binding protein as a perioperative marker of acute kidney injury in patients undergoing endovascular or open-abdominal aortic aneurysm repair. *Journal of Anesthesia*. 2016 Feb;30(1):89-99.
85. Yanishi M, Kinoshita H, Mishima T, Taniguchi H, Yoshida K, Komai Y, Yasuda K, Watanabe M, Sugi M, Matsuda T. Urinary l-type fatty acid-binding protein is a predictor of early renal function after partial nephrectomy. *Renal Failure*. 2017 Nov;39(1):7-12.
86. Raza A, Firasat S, Khaliq S, Aziz T, Mubarak M, Naqvi SA, Mehdi SQ, Rizvi SA, Abid A. The association of urinary interferon-gamma inducible protein-10 (IP10/CXCL10) levels with kidney allograft rejection. *Inflammation Research*. 2017 May;66(5):425-432.
87. Zhang CX, Cai L, Shao K, Wu J, Zhou W, Cao LF, Chen TX. Serum IP-10 is useful for identifying renal and overall disease activity in pediatric systemic lupus erythematosus. *Pediatric Nephrology*. 2018 May;33(5):837-845.
88. Huang KH, Guan SS, Lin WH, Wu CT, Sheu ML, Chiang CK, Liu SH. Role of Calbindin-D28k in Diabetes-Associated Advanced Glycation End-Products-Induced Renal Proximal Tubule Cell Injury. *Cells*. 2019 Jun 30;8(7):660.
89. Zager RA. Alpha 1 Microglobulin: A Potentially Paradoxical Anti-Oxidant Agent. *Advanced Techniques in Biology and Medicine*. 2017 Aug;5(3):238.
90. Bhave G, Colon S, Ferrell N. The sulfilimine cross-link of collagen IV contributes to kidney tubular basement membrane stiffness. *American Journal Physiology: Renal Physiology*. 2017 Sep 1;313(3):F596-F602.
91. Imafuku A, Nozu K, Sawa N, Hasegawa E, Hiramatsu R, Kawada M, Hoshino J, Tanaka K, Ishii Y, Takaichi K, Fujii T, Ohashi K, Iijima K, Ubara Y. Autosomal dominant form of type IV collagen nephropathy exists among patients with hereditary nephritis difficult to diagnose clinicopathologically. *Nephrology (Carlton)*. 2018 Oct;23(10):940-947.

92. Watson S, Padala SA, Bush JS. Alport Syndrome. 2020 May 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. PMID: 29262041.
93. Patel-Chamberlin M, Wang Y, Satirapoj B, Phillips LM, Nast CC, Dai T, Watkins RA, Wu X, Natarajan R, Leng A, Ulanday K, Hirschberg RR, Lapage J, Nam EJ, Haq T, Adler SG. Hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 (Gpnmb/Osteoactivin) is a biomarker of progressive renal injury across species. *Kidney International*. 2011 May;79(10):1138-48.
94. Tanaka K, Sugiyama H, Yamanari T, Mise K, Morinaga H, Kitagawa M, Onishi A, Ogawa-Akiyama A, Tanabe K, Eguchi J, Ohmoto Y, Shikata K, Wada J. Renal expression of trefoil factor 3 mRNA in association with tubulointerstitial fibrosis in IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2018 Sep;23(9):855-862.
95. Tian F, Gu C, Zhao Z, Li L, Lu S, Li Z. Urinary Emmprin, matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as potential biomarkers in children with ureteropelvic junction narrowing on conservative treatment. *Nephrology (Carlton)*. 2015 Mar;20(3):194-200.
96. Yilmaz A, Bilge I, Kiyak A, Gedikbasi A, Sucu A, Aksu B, Emre S, Sirin A. Matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in vesicoureteral reflux. *Pediatric Nephrology*. 2012 Mar;27(3):435-41.
97. Rosenberg ME, Girton R, Finkel D, Chmielewski D, Barrie A 3rd, Witte DP, Zhu G, Bissler JJ, Harmony JA, Aronow BJ. Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging. *Molecular and Cellular Biology*. 2002 Mar;22(6):1893-902.
98. Wu CY, Yang HY, Chien HP, Tseng MH, Huang JL. Urinary clusterin-a novel urinary biomarker associated with pediatric lupus renal histopathologic features and renal survival. *Pediatric Nephrology*. 2018 Jul;33(7):1189-1198.
99. Saeidi B, Koralkar R, Griffin RL, Halloran B, Ambalavanan N, Askenazi DJ. Impact of gestational age, sex, and postnatal age on urine biomarkers in premature neonates. *Pediatric Nephrology*. 2015; 30(11):2037.
100. Askenazi DJ, Koralkar R, Patil N, Halloran B, Ambalavanan N, Griffin R. Acute Kidney Injury Urine Biomarkers in Very Low-Birth-Weight Infants. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 2016 Sep 7;11(9):1527-35.
101. Sellmer A, Bech BH, Bjerre JV, Schmidt MR, Hjortdal VE, Esberg G, Rittig S, Henriksen TB. Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin in the evaluation of

- Patent Ductus Arteriosus and AKI in Very Preterm Neonates: a cohort study. *BMC Pediatrics*. 2017 Jan 10;17(1):7.
102. Kostic D, Beozzo GPNS, do Couto SB, Kato AHT, Lima L, Palmeira P, Krebs VLJ, Bunduki V, Francisco RPV, Zugaib M, Dénes FT, de Carvalho WB, Koch VHK. The role of renal biomarkers to predict the need of surgery in congenital urinary tract obstruction in infants. *Journal of Pediatric Urology*. 2019 May;15(3):242.e1-242.e9.
 103. Hayashi T, Tokuriki S, Okuno T, Ohta G, Igarashi A, Ohshima Y. Urinary podocalyxin as a possible novel marker of intrauterine nephrogenesis and extrauterine podocyte injury. *Pediatric Nephrology*. 2017 Oct;32(10):1891-1896.
 104. Stefanov G, Puppala BL, Pais G, Gulati A. Endothelin-1 levels and renal function in newborns of various gestational ages. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*. 2016 May 19;9(2):145-52.
 105. Mercier K, McRitchie S, Pathmasiri W, Novokhatny A, Koralkar R, Askenazi D, Brophy PD, Sumner S. Preterm neonatal urinary renal developmental and acute kidney injury metabolomic profiling: an exploratory study. *Pediatric Nephrology*. 2017 Jan;32(1):151-161.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar biomarcadores urinários para a função renal tubular e glomerular em recém-nascidos prematuros saudáveis.

3.2. Objetivos específicos

1. Mensurar marcadores de função glomerular (Clusterina, Cistatina C, Osteopontina, α 1-Microglobulina, EGF, Lipocalina-2/NGAL, Albumina) e tubular (Calbindina, Osteoactivina, Renina, TFF-3, TIMP-1, Colágeno IV, FABP1, GST α , IP-10, KIM-1) em amostras de urina de RNs prematuros saudáveis;
2. Comparar as medidas das moléculas com 72 horas de vida e com 3 semanas de vida, em RNs prematuros saudáveis
3. Avaliar possíveis associações/correlações entre os biomarcadores estudados e desses biomarcadores com variáveis clínicas e laboratoriais.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento

Em estudo observacional prospectivo, previamente realizado por nosso grupo de pesquisa, foram coletadas amostras de urina de recém-nascidos prematuros saudáveis, com 28 a 34 semanas incompletas de idade gestacional que nasceram de Junho a Dezembro de 2014 em um hospital filantópico em Minas Gerais, Brasil [1]. Tais amostras se encontravam disponíveis no laboratório, congeladas a -80°C, em quantidade e qualidade adequadas para novas análises e foram coletadas com 72 horas e 3 semanas de vida dos recém-nascidos prematuros. O presente estudo utilizou essas amostras de urina dos 40 recém-nascidos prematuros saudáveis que foram coletadas na unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN) do Hospital para mensuração de marcadores de função glomerular e tubular.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão: recém-nascidos de 28 a 34 semanas de idade gestacional admitidos na UTIN e cujos responsáveis assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de exclusão: (i) escore de Apgar menor que 7 no quinto minuto de vida; (ii) diagnóstico de malformações congênitas, síndromes e/ou doenças associadas; (iii) presença de qualquer quadro agudo, incluindo sepse ou enterocolite necrotizante, em qualquer momento; (iv) morte dentro das primeiras três semanas de vida.

4.3. Variáveis clínicas e laboratoriais de interesse

As variáveis clínicas de interesse foram história materna, causa da prematuridade, idade gestacional e peso de nascimento, sexo, escore de Apgar, diagnóstico do recém-nascido à admissão na UTIN, condições associadas ao nascimento prematuro e exposição antenatal a glicocorticoides e resultados de exames laboratoriais de rotina aos quais os recém-nascidos prematuros tenham sido submetidos durante o período do estudo. Tais variáveis foram obtidas por meio de pesquisa em prontuário eletrônico do Hospital Sofia Feldman.

4.4. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Sofia Feldman sob o protocolo CAAE 30382114.9.0000.5149 (vide ANEXOS). O protocolo do estudo não interferiu em nenhuma recomendação médica ou no tratamento dos RNs prematuros na UTIN.

4.5. Procedimentos do estudo

4.5.1 Coleta e processamento do material biológico

As amostras de urina foram coletadas com coletor urinário neonatal, transferidas para tubos plásticos estéreis de 15 mL e imediatamente centrifugadas (3800rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos). O sobrenadante foi armazenado em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.5.2 Estudo de biomarcadores urinários em amostras biológicas

Neste estudo, foi realizada a mensuração das moléculas Calbindina, Colágeno IV, FABP1, GST α , IP-10, KIM-1, Osteoactivina, Renina, TFF-3, TIMP-1, α -1-Microglobulina, Albumina, Clusterina, Cistatina C, EGF, Lipocalina-2/NGAL, Osteopontina, por meio do método de multiplex, utilizando dois painéis de moléculas relacionadas à lesão renal - kidney injury panels 1 and 2 (Merck Milipore, MA, USA), conforme as recomendações do fabricante nas amostras de urina coletadas com 72 horas e 3 semanas de vida.

Resumidamente, microesferas de captura revestidas com anticorpos monoclonais específicos para cada analito foram adicionadas aos poços, junto com amostras de urina e padrões. Após incubação e lavagem, foi adicionada uma mistura de anticorpos biotinizados secundários. Em seguida, a estreptavidina conjugada à proteína fluorescente foi incubada por um breve período. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as microesferas foi ressuspensão em uma solução tampão. Os padrões e amostras foram adquiridos no analisador de microesferas MAGPIX (Luminex Corporation, Texas, EUA) e os resultados analisados no programa Milliplex Analyst (MilliporeSigma) e representados em pg / mL.

O ensaio de biomarcadores de lesão renal foi realizado em duplicatas. Esses ensaios foram realizados simultaneamente e com o mesmo lote de reagentes para evitar a variabilidade entre os ensaios.

4.6. Análise estatística

Os dados foram analisados pelos softwares GraphPad Prism versão 6.0 e SPSS versão 22. Os dados obtidos foram analisados quanto à distribuição normal ou não por meio do teste de Shapiro Wilk, sendo as variáveis não-paramétricas expressas em mediana com intervalo interquartil. Variáveis contínuas foram descritas utilizando medidas de tendência central e dispersão, e variáveis quantitativas foram expressas em frequência absoluta e percentual. Na análise pontual foi escolhido o teste de Friedman, e para as variáveis com valores $p < 0,05$ foi utilizado o teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para a análise de correlação. Os níveis dos biomarcadores foram também analisados em relação a possíveis associações e/ou correlações com as variáveis clínicas e laboratoriais. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4.7. Referências

1. Magalhães RC, Moreira JM, Vieira ELM, Rocha NP, Miranda DM, Simões e Silva AC Urinary Levels of IL-1 β and GDNF in Preterm Neonates as Potential Biomarkers of Motor Development: A Prospective Study. *Mediators of Inflammation* 2017; 2017 1-12

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO – ARTIGO ORIGINAL (aceito para publicação no Jornal de Pediatria - vide Anexo)

Original Article

**Biomarkers of renal function in preterm neonates at 72 hours
and 3 weeks of life**

L. Petri Correa ¹, A.C. Santos Marzano ¹, R. Silva Filha ¹, R. Coelho Magalhães ¹, A.C. Simões e Silva ¹

(1) Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, Pediatric Nephrology Unit, Faculty of Medicine, UFMG, Belo Horizonte – Brazil

KEY WORDS: Kidney function, Biological Markers, Preterm, Neonates

Acknowledgements. This study was partially supported by CNPq (Brazilian National Research Council) and FAPEMIG. GSE and PMM were recipients of CNPq fellowships. Dr. AC Simões e Silva and Dr MM Teixeira received a research grant from the Brazilian Research Council (CNPq).

Conflicts of interest: none

Correspondence:

Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD
Avenida Bernardo Monteiro 1300 / 1104
Belo Horizonte - Minas Gerais
Postal Code: 30150-281
E - mail: acssilva@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: The most used endogenous marker of renal function in clinical practice is serum creatinine concentration. However, especially for neonates, serum levels of creatinine are quite variable and suffer interference by the immature kidney and maternal creatinine concentration. In this context, the search for novel biomarkers is an important scientific goal, mainly for preterm neonates. Therefore, the aim of this study was to measure markers of glomerular and tubular function in healthy preterm neonates at 72 hours and 3 weeks of life. **Patients and Methods:** Urine samples were collected in 40 preterm neonates with 28 to 34 incomplete weeks of gestational age. None of the participants had comorbidities, malformations and infections. The samples were collected at 72 hours of life and at 3 weeks after birth. Measurements of Calbindin, Collagen IV, FABP1, GST α , IP-10, KIM-1, Osteoactivin, Renin, TFF-3, TIMP-1, α -1-Microglobulin, Albumin, Clusterin, Cystatin C, EGF, Lipocalin-2/NGAL and Osteopontin were performed using panels 1 and 2 of multiplex kits of kidney injury. Data were analyzed using the software GraphPad Prism version 6.0. **Results:** The preterm neonates included 55% of males with gestational age of 30 ± 1 weeks and birth weight of 1477 ± 428 grams. The most frequent maternal condition associated with preterm birth was preeclampsia (80%). Molecules related to glomerular function (albumin, EGF, clusterin, microglobulin and osteopontin) showed a significant increase in the concentrations obtained at 3 weeks of life compared to 72 hours of life. On the other hand, cystatin C did not change. Markers related to tubular injury (KIM-1 and NGAL) remained also unchanged at 72 hours and 3 weeks after birth. **Conclusion:** The elevation of molecules related to glomerular function indicates an intense increase of glomerular filtration rate from 72 hours until 3 weeks of life, which was not detected with the measurement of cystatin C.

KEY WORDS: Kidney function, Biological Markers, Preterm, Neonates

INTRODUCTION

Despite great advances in neonatal medicine over the past years, the accurate assessment of renal function in premature newborns remains challenging [1,2]. Nephrogenesis is usually completed between the 34th and 36th week of gestation [3]. In this way, infants born preterm before 36 weeks' gestation are in active nephrogenesis [4], which makes them susceptible to aggressions caused by the extra-uterine environment [5,6]. This may result in a reduction of the total number of functioning nephrons throughout a lifetime [7], which can lead to heart and kidney diseases in adult life [8].

The most used endogenous marker of renal function in clinical practice is serum creatinine concentration, especially to estimate glomerular filtration rate (GFR)[9] However, creatinine is unreliable in preterm infants due to its dependence on muscle mass, renal immaturity and interference of maternal creatinine [3,10]. After the first 72 hours of life, there is a reduction in circulating maternal creatinine. The rate of this decline depends on multiple variables, including weight and gestational age [11]. Thus, the measurement of serum creatinine levels is not considered accurate for the neonatal period in general, and even less for preterm neonates [12].

In this context, it is extremely important to study other biomarkers of renal function in preterm infants, as a better understanding of their applications and limitations might help to detect an acute kidney injury (AKI), allowing an early treatment and better outcome [13,14,15]. Preterm neonates are particularly vulnerable to having an AKI, as they are often at intensive care units being exposed to nephrotoxic drugs and having a higher risk of being infected [16].

Therefore, the aim of this study was to measure and analyze markers of glomerular and tubular function in healthy preterm neonates at 72 hours and 3 weeks of life.

PACIENTS AND METHODS

Study design and Ethics.

This was a prospective observational study of preterm neonates (PTN) with gestational age between 28 and 32 incomplete weeks who were born from June to December 2014 in a philanthropic hospital in Minas Gerais/Brazil. This hospital is one of the three biggest maternity hospitals of Brazil, which is fully funded by the public national health service. The hospital assists a mean of 900 births per month, 70% of those are vaginal births and about 200 newborns per month need neonatal care. The hospital has a broad area of population coverage,

most of them in the metropolitan area of Belo Horizonte, the capital of Minas Gerais. The infrastructure of the hospital consists of more than 85 obstetrics bed and about 100 bed for high-risk newborns progressive care. Infants who were admitted in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) and whose parents signed the free and informed consent were enrolled. Exclusion criteria were (i) 5-minutes Apgar score below 7 (ii) diagnosis of congenital malformations, syndromes and/or associated diseases; (iii) presence of an acute disorder, including sepsis or necrotizing enterocolitis, at any of the time-points, (iv) death within the first three weeks of life.

Gestational age and birth weight, gender, Apgar scores, infant's diagnosis at admission in the NICU, conditions associated with the premature birth and antenatal exposure to glucocorticoids were collected from hospital data.

The study was approved by the Ethics Committee of both the Federal University of Minas Gerais and the Sofia Feldman Hospital (protocol CAAE 30382114.9.0000.5149.), and did not interfere with medical recommendations or the infants' proposed treatment in NICU.

Subjects.

Sample size calculations were based on a previous study investigating the association of inflammatory marks of brain injury, neurotrophic factors and motor development in PTN [17]. Considering a sample error of 5% and 95% of reliability, we obtained a number of 40 PTN for this study.

Study protocol

All study participants had urine samples collected at two time-points: 72 hours of life (T1) and 3 weeks after birth (T2). These urine samples were obtained using a newborn urinary collector. Afterwards, these samples were transferred to 15 ml plastic tubes and immediately centrifuged (3800 rpm, 5 minutes, room temperature). The supernatant was collected and transferred to 1.5mL microtubes. Then, they were stored at a -80°C freezer until analysis.

Quantification of kidney injury biomarkers by immunoassay

The measurement of urinary levels of biomarkers of kidney injury, simultaneously, was performed using the Milliplex/Luminex xMAP platform, according to information from the manufacturer (Millipore Corporation, MA, USA). The Human Kidney Injury Magnetic Bead Panel 1 kits were used, which simultaneously quantifies the levels of calbindin, osteoactivin, α -

glutathione S-transferase (GST- α), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), kidney injury molecule 1 (KIM-1), protein induced by interferon (IP-10 / CXCL10), renin, fatty acid binding protein (FABP-1), collagen IV, trefoil factor 3 (TFF-3); and the Human Kidney Injury Magnetic Bead Panel 2, which simultaneously analyzes the levels of epidermal growth factor (EGF), lipocalin, albumin, clusterin, cystatin C, osteopontin (OPN), α -microglobulin.

Briefly, capture microspheres coated with specific monoclonal antibodies for each analyte are added to the wells, along with urine samples and standards. After incubation and washing, a mixture of secondary biotinylated antibodies is added. Then, streptavidin conjugated to the fluorescent protein is incubated for a brief period. After washing, the supernatant was discarded and the precipitate containing the microspheres was resuspended in a buffer solution. The standards and samples were acquired in the MAGPIX microsphere analyzer (Luminex Corporation, Texas, USA) and the results were analyzed using the Milliplex Analyst program (MilliporeSigma) and represented in pg/mL.

The kidney injury biomarkers assay were performed in single samples. These assays were performed simultaneously and with the same batch of reagents to avoid interassay variability.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism® version 6.0. Qualitative variables were expressed in absolute frequencies and percentages. Gaussian distribution of quantitative variables was verified using the Shapiro Wilk test. Non-parametric variables were shown as median and interquartile range (1st quartile – percentile 25 and 3rd quartile – percentile 75). Continuous variables were described using measures of central tendency and dispersion, and qualitative variables were expressed as absolute frequencies and percentages. In the time-point analysis the Friedman test was chosen, and for variables with values $p < 0.05$, Wilcoxon test with Bonferroni correction was utilized. The Spearman correlation coefficient was used for correlation analysis.

RESULTS

Population

A total of 42 preterm neonates was initially selected, however two families refusal to participate in study protocol. Therefore, this study evaluated 40 preterm neonates, in which

urine samples were properly collected and processed at 72 hours and 3 weeks of life. The study sample included 55% of males and 45% of females with gestational age of 30 ± 2 weeks and birth weight of 1477 ± 428 grams. All deliveries were by caesarean section, with 50% of mothers receiving magnesium sulfate and glucocorticoid as predelivery medication 24 hours before birth, and 42.5% were given only glucocorticoid, with a total of 92.5% of neonates exposed to antenatal glucocorticoids. Ten subjects had very low birth weight, and 4 had extremely low birth weight. None of PTN had any abnormalities detected before birth. Respiratory distress syndrome had an incidence of 60% of the PTN, requiring respiratory support as supplemental oxygen and/or continuous positive airway pressure (CPAP). Regarding maternal conditions, the most frequent one associated with premature birth was preeclampsia (80%), followed by other causes including premature placental abruption and rupture of the amniotic sac (20%). Table 1 shows the general characteristics of the preterm neonates included in the study.

Table 1

Biomarkers

Measures of tested biomarkers are displayed on table 2. Molecules related to glomerular and tubular function (Albumin, EGF, Clusterin, Microglobulin, OPN and Osteoactivin) showed a significant increase in the concentrations obtained at 3 weeks of life compared to 72 hours of life. Markers related to tubular injury (KIM-1 and NGAL) also showed an increase. Despite increased at 3 weeks of life if compared to 72 hours, Cystatin C levels did not reach statistical significant difference. In addition, Calbindin, GST α , TIMP-1, IP-10, FABP-1, Collagen IV, TRF-3 and Renin did not differ in urine samples collected at 72 hours and 3 weeks of life.

Table 2

To evaluate if gestacional age affected the urinary concentrations of the biomarkers, we compared levels in urine each molecule in two subgroups of preterm neonates according to the median of gestational age (GA): $GA < 31.43$ weeks versus $GA \geq 31.43$ weeks. These comparisons were made in both time-points: at 72 hours of life (Table 3) and at 3 weeks of life (Table 4). No differences were obtained for all comparisons in both time-points.

Table 3

Table 4

DISCUSSION

The general idea of the present study was to investigate dynamic changes on molecules related to glomerular and tubular dysfunction in healthy preterm neonates. To date, this is the first study in Brazil to analyze this group of biomarkers in this specific population of preterm neonates. We found that almost half of the molecules tested showed significant differences between the very beginning of the neonates' life (at 72 hours) and at three weeks of life. Among all of them, molecules related to glomerular function were the ones that stood out. In this regard, Cystatin C concentrations did not significantly change at both evaluated time-points. Studies have indicated that Cystatin C may cross the placenta at less intensity than creatinine and, because of that, this molecule might be a better marker of renal function for the initial postnatal period [12,18]. However, despite the increase in urinary concentrations of Cystatin C at 3 weeks of life, the difference with values at 72 hours of life did not reach statistical significance. There are some possibilities to explain the absence of difference. First, the relatively limited sample size and second, the use of urinary measurement of Cystatin C rather than serum levels of this molecule. Urinary levels might reflect some tubular dysfunction due to immaturity present in this age group, considering that Cystatin C is almost freely filtered by the glomerulus and almost completely reabsorbed and catabolized by the proximal tubule. Therefore, further evaluation and comparison with serum levels of Cystatin C would be complementary to investigate the role of this molecule as a biomarker of glomerular function in preterm neonates.

Considering all limitations in using serum creatinine concentration to evaluate renal function, which are even more relevant in preterm neonates [1,2,3,10,11,12], the search for novel biomarkers of renal function is of utmost importance. Furthermore, biomarkers that may allow early detection of changes in renal function, with accuracy and in a non-invasive way are the ideal goal of recent studies in this field [11,12,13,14,15].

The incidence of acute kidney injury (AKI) in very preterm neonates is estimated at 20-40%, with the vast majority of cases of pre-renal etiology, associated with hypovolemia or reduction of renal perfusion, whether or not they are related to the presence of infection [19]. This incidence can reach 56% in asphyxiated newborns. Prematurity, extreme low birth weight, congenital abnormalities of kidney and urinary tract, congenital heart diseases, sepsis and use of nephrotoxic drugs are factors that can lead to AKI [19,20].

In neonatal intensive care units (NICU), where most of the very preterm newborns are found, the renal impairment can be an important trigger of clinical decompensation and it is associated with significant morbidity and mortality of these patients. Even with appropriated

treatment, AKI is associated with 25-50% of mortality in neonates and is an independent risk factor for this outcome [19,20]. In addition, AKI can also cause long-term impairment of kidney function, leading to increased risk of chronic kidney disease in adulthood [19, 20]. Considering the great impact of AKI in preterm newborns, it assumes utmost importance to find assertive, less invasive and early biomarkers of kidney dysfunction in this age range [11,12,13,14,15].

Regarding AKI, Askenazi et al found significant changes of NGAL, OPN, clusterin, Cystatin C and alpha-GST in a cohort of 113 neonates with birth weight less than 1200g [21]. These molecules had 1.7 to 3.7 bigger values in neonates with AKI in contrast with those without this complication. Similar results were also found in other studies [19, 20, 22, 23, 24]. There were also found an inverse relation with EGF, being the levels of this molecule lower in preterm neonates with AKI [21, 22]. In our study, all of these molecules, except Cystatin C and α -GST, exhibited significant differences according to the time of urine collection. The α -GST is a proximal tubular cell molecule that is released in urine when there is cell damage. This molecule may increase in situations of tubular injury [25, 26]. In this case, as we did not identify any significant difference, we were not able to hypothesize the role of this biomarker for this population. Glomerular markers as OPN, clusterin and EGF and the tubular marker NGAL significantly increased from 72 hours to 3 weeks of life. Regarding microglobulin, albumin and osteoactivin, another recognized markers of glomerular function, we also found significant increase between the two evaluated time-points, but their role during injury is not yet established [21, 22, 24]. Dynamic changes of these molecules may not only reflect kidney injury but also the physiological maturation of renal function in healthy preterm neonates.

As occurred with NGAL, a marker of tubular function, our results showed that KIM-1 also had a significant increase from 72 hours to 3 weeks of life and might reflect the increase in tubular function during the first month after birth. Although, when tested as a marker of kidney injury, studies so far did not find sufficient evidence for the predictive role of these molecules in evaluating renal function physiological maturation [19, 20, 21, 24].

In contrast with other studies [18, 19, 20, 22, 23], this study had two samples of the same patient, a strict selection criterion to find health preterm infants and used panels with multiple biomarkers. As also observed in other studies, the relatively limited number of patients was a limitation of our study, suggesting that the need for further research in this area. The simultaneous analysis of serum creatinine and serum Cystatin C with these urinary biomarkers could also bring some light to better understand kidney function in preterm neonates, as well the analysis of these biomarkers in neonates with acute kidney injury. Another limitation was

the fact that we did not measure urinary creatinine in order to express the biomarkers in relation to creatinine. Unfortunately, the volume of collected urine was not sufficient to measure creatinine in all samples and at both time-points for the 40 preterm neonates. On the other hand, it should be mentioned that urinary creatinine concentrations are quite variable in preterm neonates secondary to tubular secretion [3, 10, 12]. Therefore, the relative quantification of each biomarker in relation to urinary creatinine might have also some limitations.

CONCLUSION

The evaluation of molecules related to glomerular function indicates an intense increase of glomerular filtration rate from 72 hours until 3 weeks of life, which was not possible to detect with the measurement of Cystatin C. On the other hand, molecules related to glomerular and tubular function significantly increased according to age, suggesting a possible physiological maturation of the kidneys of healthy preterm neonates. These results corroborate the potential of urinary biomarkers of renal function, and bring the possibility that, in the future, they might be used also as markers of kidney injury.

5.1.REFERENCES

1. Walker MW, Clark RH, Spitzer AR. Elevation in plasma creatinine and renal failure in premature neonates without major anomalies: terminology, occurrence and factors associated with increased risk. *J Perinatol* 2011; 31:199–205.
2. Thayyil S, Sheik S, Kempley ST, Sinha A. A gestation- and postnatal age-based reference chart for assessing renal function in extremely premature infants. *J Perinatol* 2008; 28:226–229.
3. Filler G, Kanan RG, Elias ACA. Assessment of glomerular filtration rate in the neonate: is creatinine the best tool? *Current Opinion in Pediatrics* 2016; 28(2):173-9.
4. Abitbol CL, DeFreitas MJ, Strauss J. Assessment of kidney function in preterm infants: lifelong implications. *Pediatr Nephrol* 2016; 31(12), 2213-2222.
5. Rodriguez M, Gomez A, Abitbol C, Chandar J, Duara S, Zilleruelo G. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7:17–25.
6. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Puddu M, Marinelli V, Zaffanello M, Fanos V. Marked interindividual variability in renal maturation of preterm infants: lessons from autopsy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23:129–133

7. Abitbol CL, Rodriguez MM. The long-term renal and cardiovascular consequences of prematurity. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8:265– 274
8. Ingelfinger JR. Disparities in renal endowment: causes and consequences. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008; 15:107–114
9. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006; 354:2473.
10. Guinard JP, Drukker A. Why do newborn infants have a high plasma creatinine? *Pediatrics* 1999; 103(4): e49.
11. Jetton G, Askenazi DJ. Update on acute kidney injury in the neonate. *Current Opinion in Pediatrics* 2012; vol. 24, no. 2, pp.191–196.
12. Kastl JT. Renan function in the fetus and neonate – The creatinine enigma. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2017; 22(2):83-89.
13. Selewski DT, Charlton JR, Jetton JG, Guillet R, Mhanna MJ, Askenazi DJ, Kent AL. Neonatal acute kidney injury. *Pediatrics* 2015; 136: e463–473
14. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Goldstein SL. Acute kidney injury in critically ill newborns: what do we know? What do we need to learn? *Pediatr Nephrol* 2009; 24:265–274
15. Jetton JG, Askenazi DJ. Acute kidney injury in the neonate. *Clin Perinatol* 2014; 41:487–502
16. Andreoli SP. Acute renal failure in the newborn, *Seminars in Perinatology* 2004; vol. 28, no. 2, pp. 112–123.
17. Magalhães RC, Moreira JM, Vieira ELM, Rocha NP, Miranda DM, Simões e Silva AC Urinary Levels of IL-1 β and GDNF in Preterm Neonates as Potential Biomarkers of Motor Development: A Prospective Study. *Mediators of Inflammation* 2017; 2017 1-12
18. Li Y, Fu C, Zhou X, Xiao Z, Zhu X, Jin M, Li X, Feng X. Urine interleukine-18 and cystatin-C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatric Nephrology* 2012; 27(5):851.
19. Marin T, Derossett B, Bhatia J. Urinary biomarkers to predict neonatal acute kidney injury. *The Journal of Perinatal and Neonatal Nursing* 2018; 32(3):266-274
20. Argyri I, Xanthos T, Varsami M, Aroni F, Papalosis A, Dontas I, Fanos V, Iacovidou N. The role of novel biomarkers in early diagnosis and prognosis of acute kidney injury in newborns. *American Journal of Perinatology* 2013;30(5):347-52.

21. Askenazi DJ, Koralkar R, Patil N, Halloran B, Ambalavanan N, Griffin R. Acute kidney injury urine biomarkers in very low-birth-weight infants. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2016; 11(9):1527-35
22. Hanna M, Brophy PD, Giannone PJ, Joshi MS, Bauer JA, Rao SR. Early urinary biomarkers of acute kidney injury in preterm infants. *Pediatric Research* 2016; 80(2):218-23
23. Shin SY, Ha JY, Lee SL, Lee WM, Park JH. Increased urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very-low-birth-weight infants with oliguria and normal serum creatinine. *Pediatric Nephrology* 2017; 32(6):1059-1065
24. Askenazi DJ, Montesanti A, Hunley H, Koralkar R, Awar P, Shuaib F, Liwo A, Deverajan P, Ambalavanan N. Urine biomarkers predict acute kidney injury and mortality in very low birth weight infants. *Journal of Pediatrics* 2011; 159(6):907.
25. Bieniaś B, Sikora P. Potential Novel Biomarkers of Obstructive Nephropathy in Children with Hydronephrosis. *Disease Markers*, vol. 2018, Article ID 1015726, 9 pages, 2018.
26. Bieniaś B, Zajączkowska M, Borzecka H, Sikora P, Wieczorkiewicz-Płaza A, Wilczynska B. Early Markers of Tubulointerstitial Fibrosis in Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome, Preliminary Report. *Medicine Observational Study* 2015; 94(42):e1746

Table 1- Demographic and clinical characteristics of the mothers and preterm neonates

Variables	Subjects (n=40)
Maternal cause of prematurity	
Preeclampsia	32 (80.0%)
Other causes	8 (20.0%)
Predelivery medication	
Magnesium sulfate + glucocorticoid	20 (50.0%)
Glucocorticoid	17 (42.5%)
None	3 (7.5%)
Infants	
Gestational age (weeks)*	30 ± 1
Sex – n (%)	
Female	18 (45.0%)
Male	22 (55.0%)
Birth weigh (grams)*	1477 ± 428
Apgar Scores*	
1-minute Apgar score	7 ± 1
5-minute Apgar score	9 ± 1
Respiratory distress	24 (60.0%)
Exposed to antenatal glucocorticoids	37 (92.5%)

*Values expressed as mean and standard deviation for continuous variables. Number of individuals and percentages were used for categorical variables.

Table 2 - Comparison between biomarkers of kidney injury collected at 72 hours of life and at 3 weeks of life in healthy preterm neonates

Molecules	72 hours	3 weeks	p value
Albumin	6921.00(0.01-30374.00)	21605 (4265-69074)	0.0239
EGF	1.89 (0.70-2.69)	2.97 (1.38 - 5.03)	0.0197
Microglobulin	562.80 (78.26-1697.00)	1535.00 (306.80-3994.00)	0.0114
Clusterin	834.40 (107.40-2511.00)	2103.00 (881.8-4804.00)	0.0023
OPN	93.45 (28.09-230.60)	195.60 (60.43-360.60)	0.0359
Osteoactivin	0.26 (0.16-0.39)	0.35 (0.25-0.54)	0.0482
KIM-1	0.12 (0.08-0.17)	0.15 (0.12-0.27)	0.0254
NGAL	22.14 (1.68-166.50)	197.00 (19.67-511.30)	0.0121
Cystatin C	17.18 (4.32 – 46.28)	37.23 (10.97 – 124.60)	0.0508
Calbindin	0.52 (0.14 – 1.53)	0.55 (0.16 – 59.36)	0.6801
αGST	0.03 (0.02- 0.04)	0.03 (0.02 – 0.05)	0.1757
TIMP-1	0.36 (0.22 – 0.58)	0.53 (0.24- 3.89)	0.2388
IP-10	0.01 (0.01 – 0.02)	0.01 (0.01 – 0.02)	0.9650
FABP-1	14.65 (9.92 – 18.10)	16.01 (13.64 – 25.38)	0.1252
Collagen IV	6.13 (0.83 – 71.42)	14.27 (0.95-171.20)	0.5239
TRF-3	21.72 (1.61 – 2417.00)	205.70 (2.63 – 26388.00)	0.1768
Renin	0.05 (0.03 – 0.10)	0.05 (0.04 – 0.23)	0.1231

Legend: EGF = endothelial growth factor; OPN = osteoprotegenin; KIM-1 = kidney injury molecule 1; NGAL = Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; αGST = alpha-Glutathione S-transferase; TIMP-1 = Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1; IP-10 = Interferon gamma-induced protein 10; FABP-1 = Fatty Acid- Binding Protein 1; TRF-3 = Trefoil factor 3. The values were quantified in pg/mL.

Table 3 - Comparison between biomarkers of kidney injury collected in healthy preterm neonates with gestational age (GA) lower than 31.43 weeks and higher or equal to 31.43 weeks at 72 hours of life.

Molecules	GA < 31.43 weeks	GA ≥ 31.43 weeks	p value
Albumin	7442 (3040 - 13323)	5958 (0.000 - 33565)	0.8722
EGF	1.79 (0.70 - 2.63)	1.92 (0.61 - 2.97)	0.9833
Microglobulin	949.3 (123.5 - 2053)	1268.4 (297.6 - 3252)	0.5247
Clusterin	667.1 (139.1 - 1568)	1370 (62.8 - 3943)	0.3099
OPN	48.89 (27.64 - 148.2)	151 (26.56 - 321.2)	0.1353
Osteoactivin	0.27 (0.17 - 0.37)	0.26 (0.16 - 0.53)	0.8788
KIM-1	0.12 (0.07 - 0.14)	0.13 (0.08 - 0.19)	0.4631
NGAL	20.48 (1.71-171.9)	24.45 (1.56 - 166.5)	0.6439
Cystatin C	12.41 (2.99 -24.41)	26.99 (5.09 - 118.3)	0.0817
Calbindin	0.53 (0.11 - 1.26)	0.50 (0.15 - 2.24)	0.8617
αGST	0.03 (0.02 - 0.04)	0.03 (0.02 - 0.05)	0.7322
TIMP-1	0.31 (0.19 - 0.50)	0.39 (0.24 - 1.08)	0.4807
IP-10	0.01 (0.01 - 0.02)	0.01 (0.01 - 0.02)	0.5763
FABP-1	14.65 (9.49 - 17.19)	12.58 (10.24 - 19.47)	0.8945
Collagen IV	4.35 (0.66 - 42.01)	6.33 (0.87 - 115.5)	0.5050
TFF-3	11.33 (1.70 - 3017)	26.22 (1.53 - 111.9)	0.9577
Renin	0.05 (0.03 - 0.10)	0.05 (0.03 - 0.10)	0.6737

Legend: EGF = endothelial growth factor; OPN = osteoprotegenin; KIM-1 = kidney injury molecule 1; NGAL = Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; αGST = alpha-Glutathione S-transferase; TIMP-1 = Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1; IP-10 = Interferon gamma-induced protein 10; FABP-1 = Fatty Acid- Binding Protein 1; TFF-3 = Trefoil factor 3. The values were quantified in pg/mL and (Percentile 25 - Percentile 75). P values were obtained by Mann Whitney test.

Table 4 - Comparison between biomarkers of kidney injury collected in healthy preterm neonates with gestational age (GA) lower than 31.43 weeks and higher or equal to 31.43 weeks at 3 weeks of life.

Molecules	GA < 31.43 weeks	GA ≥ 31.43 weeks	p value
Albumin	21093 (4656 - 64901)	25619 (216.8 - 71916)	0.8988
EGF	3.18 (1.07 - 5.06)	2.81 (2.15 - 5.04)	0.8147
Microglobulin	1201 (200.2 - 4752)	1929 (306.8 - 3721)	0.7758
Clusterin	1587 (499.8 - 5761)	3142 (1066 - 5008)	0.5965
OPN	181.1 (38.37 - 381.5)	232.5 (119.8 - 365.6)	0.4247
Osteoactivin	0.32 (0.25 - 0.50)	0.37 (0.25 - 0.57)	0.5634
KIM-1	0.16 (0.11 - 0.23)	0.15 (0.12 - 0.22)	0.6823
NGAL	192.3 (55.52 - 435.5)	317.1 (8.09 - 533.3)	0.8147
Cystatin C	21.49 (11.14 - 114.3)	52.57 (10.31 - 142.1)	0.4732
Calbindin	0.52 (0.15 - 1345)	0.63 (0.23 - 117)	0.4060
αGST	0.03 (0.02 - 0.06)	0.03 (0.03 - 0.05)	0.9757
TIMP-1	0.49 (0.22 - 1.00)	1.10 (0.24 - 5.44)	0.4154
IP-10	0.01 (0.01 - 0.03)	0.01 (0.01 - 0.02)	0.8755
FABP-1	15.73 (9.92 - 22.55)	16.50 (15.04 - 28.09)	0.2791
Collagen IV	13.26 (1.01 - 171.2)	18.22 (0.75 - 221.6)	0.9284
TFF-3	41.97 (2.18 - 48919)	281.4 (2.35 - 15751)	0.9778
Renin	0.05 (0.04 - 0.35)	0.05 (0.04 - 0.22)	0.5374

Legend: EGF = endothelial growth factor; OPN = osteoprotegenin; KIM-1 = kidney injury molecule 1; NGAL = Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; αGST = alpha-Glutathione S-transferase; TIMP-1 = Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1; IP-10 = Interferon gamma-induced protein 10; FABP-1 = Fatty Acid- Binding Protein 1; TFF-3 = Trefoil factor 3. The values were quantified in pg/mL and (Percentile 25 - Percentile 75). P values were obtained by Mann Whitney test.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prematuridade têm apresentado uma incidência em elevação nas últimas décadas, atualmente correspondendo a dezenas de milhões de nascimentos por ano no mundo. Esse aumento está muito relacionado aos avanços nos cuidados intensivos neonatais [1, 2]. Com isso, todas as peculiaridades ainda pouco esclarecidas sobre o impacto de um parto prematuro têm-se tornado alvo dos mais diversos estudos.

Nesse contexto, é muito interessante que sejam feitas investigações sobre o funcionamento renal nessa faixa etária, um órgão que ainda está em desenvolvimento e que será sujeito a maior risco de injúria aguda com possíveis impactos em longo prazo [3, 4, 5]. Os marcadores de função e disfunção renal atuais, mesmo na população adulta, devem ser analisados com diversas ressalvas em RNs prematuros. Dessa forma, encontrar moléculas que possam ser mais assertivas, sensíveis e específicas como marcadores de função renal é um grande objetivo científico [6, 7, 8, 9, 10, 11].

A função renal pode ser grosseiramente dividida em funções de filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular. Diferentes marcadores podem trazer informações específicas sobre cada uma dessas funções dos néfrons. A cistatina C tem sido explorada como um novo marcador de filtração glomerular, enquanto NGAL e KIM-1 estariam mais relacionados a alterações tubulares [5, 12, 13, 14, 15, 16].

O presente estudo avaliou o comportamento de 17 moléculas urinárias em RNs prematuros saudáveis com 72 horas e 3 semanas de vida extra-uterina e também relacionou esses marcadores com parâmetros clínicos. Foram detectadas elevações significativas de albumina, alfa-1-microglobulina, EGF, clusterina, OPN, osteoactivina, NGAL e KIM-1 na 3ª semana de vida em relação às 72 horas.

A NGAL é uma proteína que faz parte do sistema imune inato ativando neutrófilos e é excretada pelas células do túbulo proximal em resposta à LRA por nefrotoxicidade ou por lesão isquêmica, com resultados ainda controversos em neonatos, crianças e adultos quanto ao seu potencial como marcador de lesão tubular [5, 12, 13]. Encontramos uma tendência de elevação de seus níveis urinários ao comparar o valores de 72h com 3 semanas de vida nos prematuros saudáveis. Estudo de Saeidi et al demonstraram relação significativa dos seus níveis com a IG, enquanto estudos de Gubhaju et al e Miklaszweska et al encontraram uma tendência de redução dos níveis urinários com o avançar da IG e idade pós-natal.

A KIM-1, uma glicoproteína transmembrana, não é encontrada na urina em condições normais, mas é eliminada pelas células tubulares em níveis elevados após lesão renal isquêmica ou tóxica, também foi avaliada como marcador de lesão tubular em variados populações [12, 13, 15, 19] e nossos resultados foram semelhantes ao encontrados por Miklaszweska et al e Capelli et al. Os outros possíveis marcadores tubulares e talvez glomerulares, OPN, EGF, clusterina e osteoactivina foram esporadicamente explorados em estudos com prematuros, com resultados ainda controversos e escassos. Saeidi et al encontrou variação significativa por IG para OPN, osteoactivina e OPN, assim como encontrou Capelli et al para OPN e EGF, enquanto Miklaszwska et al encontrou uma relação inversamente proporcional entre o peso de nascimento e os valores urinários de OPN. Assim, são observadas resultados isolados e dificilmente comparáveis entre os estudos que buscavam desfechos diversos.

No que se refere aos marcadores glomerulares, encontramos resultados significativos para albumina e alfa-1-microglobulina, que é uma pequena proteína plasmática globular, com função antioxidante e aglutinante de heme livre [5,20]. Ainda não é claro até que ponto a proteinúria encontrada em prematuros e neonatos está relacionada somente a uma imaturidade renal ou também a um grau de lesão residual, como argumentaram Kandasamy et al. Nossos resultados também não permitem afirmar qual a etiologia dessa alteração encontrada.

A Cistatina C é uma moléculas que já foi mais amplamente explorada, inclusive em prematuros, e já possui propostas de fórmulas que utilizam seu níveis para cálculo de RFG [5, 6, 12, 13, 21, 22, 23]. Curiosamente, apesar de identificada uma tendência de elevação dos níveis urinários de Cistatina C, essa elevação não foi estatisticamente significativa no nosso estudo. Considerando que nossa amostra era considerada saudável e sem acometimento renal, esse resultado pode estar relacionado ao fato dessa molécula ser totalmente reabsorvida pelos túbulos renais saudáveis após filtração livre pelos glomérulos. Assim esse resultado poderia corroborar que nossos prematuros realmente não possuíam alterações renais significativas no período avaliado.

Sabemos de limitações do nosso estudo, principalmente em relação ao tamanho da amostra e por não ter sido feita a correção pela creatinina urinária nem a comparação com a creatinina sérica, mesmo sabendo das especificidades da creatinina para essa população, esse marcador ainda é o mais difundido e utilizado atualmente. Além disso, a escassez de estudos que avaliaram estes marcadores em neonatos prematuros sem acometimento renal tornou mais restrita a comparação que poderia ser feita com aqueles que avaliaram essas moléculas como marcadores de LRA. Acreditamos que, além de testes dessas moléculas como diagnósticas para

LRA, seria interessante termos mais conhecimento sobre o comportamento dessas moléculas em prematuros saudáveis. Dessa forma, o fato de termos avaliado um painel com diversos marcadores pode ser considerado um ponto forte do nosso estudo.

Por fim, o presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa que avalia o papel potencial de marcadores no desenvolvimento e nas doenças renais, com o intuito de trazer informações que possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de evolução dessas doenças. Dentro dessa perspectiva, novos estudos poderão ser realizados para avaliar o comportamento dessas moléculas em longo prazo, em diferentes populações (prematuros criticamente enfermos, sépticos, asfixiados, etc), determinando o seu real potencial como biomarcadores de função e disfunção renal.

REFERÊNCIAS:

1. Kandasamy Y, Smith R, Wright IM. Oligonephropaty of prematurity. *American Journal of Perinatology*. 2012; 29:115-120.
2. Kandasamy Y, Rudd D, Smith R, Lumbers ER, Wright IM. Extra uterine development of preterm kidneys. *Pediatric Nephrology*. 2018; 33:1007-1012.
3. Nada A, Bonachea EM, Askenazi DJ. Acute kidney injury in the fetus and neonate. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2017 Apr;22(2):90-97.
4. Jetton JG, Boohaker LJ, Sethi SK, Wazir S, Rohatgi S, Soranno DE, Chishti AS, Woroniecki R, Mammen C, Swanson JR, Sridhar S, Wong CS, Kupferman JC, Griffin RL, Askenazi DJ; Neonatal Kidney Collaborative (NKC). Incidence and outcomes of neonatal acute kidney injury (AWAKEN): a multicentre, multinational, observational cohort study. *The Lancet: Child & Adolescent Health*. 2017 Nov;1(3):184-194.
5. Libório AB, Branco KM, Torres de Melo Bezerra C. Acute kidney injury in neonates: from urine output to new biomarkers. *Biomed Research International*. 2014;2014:601568.
6. Abitbol CL, DeFreitas MJ, Strauss J. Assessment of kidney function in preterm infants: lifelong implications. *Pediatr Nephrol* 2016; 31(12), 2213-2222.
7. Kastl, JT. Renan function in the fetus and neonate – The creatinine enigma. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2017; 22(2):83-89.
8. Otukesh H, Hoseini R, Rahimzadeh N, Hosseini S. Glomerular function in neonates. *Iran Journal of Kidney Diseases*. 2012 May;6(3):166-72.

9. Filler G, Bhayana V, Schott C, Díaz-González de Ferris ME. How should we assess renal function in neonates and infants? *Acta Paediatrica*. 2020 Aug; 00:1-8.
10. Kandasamy Y, Rudd D, Smith R. The relationship between body weight, cystatin C and serum creatinine in neonates. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*. 2017;10(4):419-423.
11. Wilhelm-Bals A, Combescure C, Chehade H, Daali Y, Parvex P. Variables of interest to predict glomerular filtration rate in preterm newborns in the first days of life. *Pediatric Nephrology*. 2020 Apr;35(4):703-712.
12. Argyri I, Xanthos T, Varsami M, Aroni F, Papalosis A, Dontas I, Fanos V, Iacovidou N. The role of novel biomarkers in early diagnosis and prognosis of acute kidney injury in newborns. *American Journal of Perinatology* 2013;30(5):347-52.
13. van Donge T, Welzel T, Atkinson A, van den Anker J, Pfister M. Age-Dependent Changes of Kidney Injury Biomarkers in Pediatrics. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2019 Sep;59 Suppl 1:S21-S32.
14. Li Y, Fu C, Zhou X, Xiao Z, Zhu X, Jin M, Li X, Feng X. Urine interleukine-18 and cystatin-C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatric Nephrology* 2012; 27(5):851.
15. Genc G, Ozkaya O, Avci B, Aygun C, Kucukoduk S. Kidney injury molecule-1 as a promising biomarker for acute kidney injury in premature babies. *American Journal of Perinatology*. 2013 Mar;30(3):245-52.
16. Capelli I, Vitali F, Zappulo F, Martini S, Donadei C, Cappuccilli M, Leonardi L, Girardi A, Aiello V, Galletti S, Faldella G, Poluzzi E, DE Ponti F, Gaetano M. Biomarkers of Kidney Injury in Very-low-birth-weight Preterm Infants: Influence of Maternal and Neonatal Factors. *In Vivo*. 2020 May-Jun;34(3):1333-1339.
17. Saeidi B, Koralkar R, Griffin RL, Halloran B, Ambalavanan N, Askenazi DJ. Impact of gestational age, sex, and postnatal age on urine biomarkers in premature neonates. *Pediatric Nephrology*. 2015; 30(11):2037.
18. Gubhaju L, Sutherland MR, Horne RSC, Medhurst A, Kent AL, Ramsden A, Moore L, Singh G, Hoy WE, Black MJ. Assessment of renal functional maturation and injury in preterm neonates during the first month of life. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014; 307(2):F149.
19. Miklaszewska M, Korohoda P, Drożdż D, Zachwieja K, Tomasik T, Moczulska A, Korzeniecka-Kozerska A, Kwinta P. eGFR values and selected renal urine biomarkers

- in preterm neonates with uncomplicated clinical course. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2019 Dec;28(12):1657-1666.
20. Zager RA. Alpha 1 Microglobulin: A Potentially Paradoxical Anti-Oxidant Agent. *Advanced Techniques in Biology and Medicine*. 2017 Aug;5(3):238.
 21. Allegaert K, Mekahli D, van den Anker J. Cystatin C in newborns: a promising renal biomarker in search for standardization and validation. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2015;28(15):1833-8.
 22. Marin T, Derossett B, Bhatia J. Urinary biomarkers to predict neonatal acute kidney injury. *The Journal of Perinatal and Neonatal Nursing* 2018; 32(3):266-274
 23. Sweetman DU, Onwuneme C, Watson WR, O'Neill A, Murphy JF, Molloy EJ. Renal function and novel urinary biomarkers in infants with neonatal encephalopathy. *Acta Paediatrica*. 2016 Nov;105(11):e513-e519.

7. ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER COEP/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da asfíxia perinatal e da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-
termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações
no desenvolvimento motor.

Pesquisador: Ana Cristina Simões e Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30382114.9.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 656.859

Data da Relatoria: 23/05/2014

Apresentação do Projeto:

De acordo com o projeto em tela, o parto prematuro ocorre em 12,5% de todos os nascimentos e 40% desses recém-nascidos são de risco para mortalidade perinatal e morbidades. A lesão cerebral precoce é uma das principais complicações do período perinatal e possui também um potencial para alterações do neurodesenvolvimento em longo prazo. Não há uma etiologia única para a lesão cerebral precoce, mas uma multiplicidade de causas potenciais com complexos mecanismos de interação que ainda não são completamente conhecidos. Os principais mecanismos patogênicos são a hipóxia/isquemia e a infamação. Várias linhas de evidência sugerem que as lesões neuronais relacionadas com a inflamação podem induzir uma cascata de respostas imunes que estão envolvidos na patogênese da lesão cerebral precoce. Entretanto, até recentemente, o cérebro no período fetal-neonatal era visto como um órgão que apresentava até certo resistência aos mecanismos de agressão imune.

O presente estudo pretende avaliar o impacto de intervenções terapêuticas no sentido de minimizar complicações e reduzir morbi-mortalidade. Visa avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional. As amostras de sangue e urina coletadas serão analisadas por citometria de fluxo através da técnica

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3405-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 656.859

de cytometric bead array (CBA) e por meio de Ensaio Imuno-enzimático (ELISA). Serão analisados os níveis das citocinas IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , IL-10, das quimiocinas IL-8, MCP-1, RANTES e dos fatores neurotróficos NT3, NT4/5, BDNF e NGF. Tais mensurações serão realizadas e comparadas nos dois grupos de pacientes (APGAR de 5, 6 e 7) e nos quatro tempos de coleta (nascimento, 48 horas, 72 horas, 3 semanas). Para mensurar o desenvolvimento motor será aplicado o Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP) em todos RNs participantes da pesquisa ao atingirem, no mínimo, 34 semanas de IGC e já terem as amostras de fluidos coletadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional.

Objetivo Secundário:

- Comparar o nível de citocinas presentes nos fluidos corporais de recém-nascido com APGAR de 5 e >7;
- Estudar o processo inflamatório do nascimento até a terceira semana de vida do bebê por meio da mensuração de mediadores imuno-inflamatórios e fatores neurotróficos;
- Avaliar possíveis associações entre perfil Imuno-Inflamatório e fatores neurotróficos: -Relacionar o perfil dos mediadores imuno-inflamatórios e os fatores neurotróficos com as condições de nascimento e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Segundo os pesquisadores em tela, será garantida a preservação da identidade e integridade dos participantes sem comprometimento à assistência ao recém-nascido. Não haverá ônus para os mesmos e os responsáveis que aceitarem participar do estudo serão informados sobre o procedimento a ser realizado e deverão assinar o TCLE, podendo desistir quando quiserem. A coleta dos fluidos será realizada por profissionais graduados em enfermagem ou medicina, capacitados para tal procedimento, durante a rotina de assistência da UTIN. Assim, os riscos da coleta de amostras ao RN's são os mesmos que os da assistência prestada uma vez que a coleta desses materiais já fazem parte da rotina da UTIN. A aplicação do TIMP não envolve risco considerável para o RN por se tratar de uma escala observacional e de movimentos eliciados.

Benefícios:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad. Sl 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 556.850

De acordo com os pesquisadores, os participantes da pesquisa poderão ser diretamente beneficiados por ter seu desenvolvimento acompanhado. Caso sejam detectadas qualquer anormalidade no desenvolvimento medidas preventivas serão tomadas a fim de garantir melhor conduta no cuidado clínico com o paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho é exequível, está bem fundamentado e bem delineado. Poderá contribuir para avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Folha de rosto.
- Parecer consubstanciado com aprovação do Departamento de Pediatría da Faculdade de Medicina da UFMG.
- Anuência do Hospital Sofia Feldman, onde pretende-se realizar a pesquisa.
- Anuência do Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (Faculdade de Medicina da UFMG).
- TCLE.

Recomendações:

No TCLE:

- Consta os nomes e sobrenomes dos pesquisadores, com telefones e endereço dos mesmos (físico e eletrônico).
- Informado que não haverá ressarcimento pela participação no estudo.
- Linguagem adequada para os responsáveis legais pelos participantes da pesquisa, o que é a escala APGAR.

Explicitado quais os riscos pertinentes à presente pesquisa no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos pela aprovação do projeto "Avaliação da asfíxia perinatal e da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor." da pesquisadora Ana Cristina Simões e Silva

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31 270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** ccep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 656.859

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 22 de Maio de 2014

Assinado por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

ANEXO 2 – PARECER CEP/HSF

HOSPITAL SOFIA FELDEMAN/
FUNDAÇÃO DE ASSISTENCIAL
INTEGRAL À SAÚDE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da asfíxia perinatal e da resposta Imuno-Inflamatória em neonatos pré-
termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações
no desenvolvimento motor.

Pesquisador: Ana Cristina Simões e Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30382114.9.3001.5132

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 670.318

Data da Relatoria: 29/05/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa para obtenção do título de Mestre que se propõe a avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional. Serão utilizadas amostras de sangue e urina dos recém-nascidos participantes do estudo que serão analisadas por citometria de fluxo através da técnica de cytometric bead array (CBA) e por meio de Ensaio imunoenzimático (ELISA). Serão analisados os níveis das citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e IL-12p70), das quimiocinas (IL-8, MCP-1, RANTES, IP-10, MIF-1) e dos fatores neurotróficos (NT3, NT4/5, BDNF e NGF). Tais mensurações serão realizadas e comparadas nos dois grupos de pacientes (APGAR de 5' 6 e 7) e nos quatro tempos de coleta (nascimento, 48 horas, 72 horas, 3 semanas). Além disso, nos RN's, ao atingirem 34 semanas de IGC após a coleta dos fluidos corporais, será aplicado o Teste de Desempenho Motor Infantil (TIMP). Participarão do estudo as crianças nascidas com idade gestacional de 28 a 34 semanas, após os responsáveis concordarem em participar deste estudo. Serão excluídas os recém-nascidos que apresentarem alguma das situações a seguir: possuir má-formação congênita, síndromes e patologias associadas; distúrbios agudos no momento da coleta; neonatos que evoluam para óbito em três semanas. Os dados obtidos serão digitados em banco de

Endereço: Rua Antônio Bandeira, 1050

Bairro: Tupi

CEP: 31.844-130

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3400-2249

Fax: (31)3408 2218

E-mail: lep@sofiinfeldman.org.br

HOSPITAL SOFIA FELDEMAN/
FUNDAÇÃO DE ASSISTENCIAL
INTEGRAL À SAÚDE



Continuação do Parecer: 670.318

dados desenvolvido no programa SPSS versão 18.0 e os resultados descritivos serão obtidos através da listagem e frequência das características das diversas variáveis e do cruzamento de algumas características através de tabelas de contingência. Serão obtidos dados demográficos e clínicos dos recém-nascidos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a associação entre a resposta inflamatória, a condição de nascimento do recém-nascido e a presença ou não de alteração no desenvolvimento motor em neonatos pré-termo de 28 a 34 semanas de idade gestacional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Será assegurada a garantia do anonimato e a decisão de participar ou não do estudo sem prejuízo para a assistência recebida na instituição. Os riscos para a coleta de material serão os mesmos aos quais os recém-nascidos estarão sujeitos na assistência. Em relação à escala não há risco uma vez que envolve observação e manuseios específicos realizados por profissional capacitado e treinado para tal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho encontra-se bem fundamentado e com metodologia adequada ao objetivo do estudo. O delineamento da pesquisa permite a sua execução conforme previsto pelos pesquisadores

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE encontra-se adequado conforme a legislação que regulamenta a pesquisa com seres humanos.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto em condições de ser aprovado pelo CEP/ HSF

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer de Relator 26/2014 CAAE: 30382114.9.3001.5132

Endereço: Rua Antônio Bandeira, 1060

Bairro: Tupi

CEP: 31.844-130

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3408-2249

Fax: (31)3408-2218

E-mail: lcp@sofiafeldman.org.br

HOSPITAL SOFIA FELDEMAN/
FUNDAÇÃO DE ASSISTENCIAL
INTEGRAL À SAÚDE



Continuação do Parecer: 670.318

(favor citar esse número em suas comunicações com o CEP/HSF)

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sofia Feldman (CEP/HSF) analisou em plenaria realizada no dia 29 de maio de 2014, o Projeto de Pesquisa intitulado: "Avaliação da asfixia perinatal e da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor" dos Pesquisadores Ana Cristina Simões e Silva e Rafael Coelho Magalhães e o considerou APROVADO como Insituição Co-participante.

Reafirmamos que o relatório final deverá ser encaminhado ao CEP/HSF ao término do estudo, para fins de conclusão do processo.

Atenciosamente.

Atenciosamente.

Dra. Tatiana Coelho Lopes
Coordenadora do CEP/HSF

Belo Horizonte, 02 de Junho de 2014.

Endereço: Rua Antônio Bandeira, 1060

Bairro: Tupi

CEP: 31.844-130

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3400-2249

Fax: (31)3408 2218

E-mail: lep@sofiafeldman.org.br

ANEXO 3 – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO ORIGINAL PELO JPED

Decision on submission to Jornal de Pediatria - JPEDIATRIA-D-20-00164R1

Jornal de Pediatria <em@editorialmanager.com>

Qui, 26/11/2020 19:18

Para: Ana Cristina Simões e Silva <acssilva@hotmail.com>

📎 2 anexos (383 KB)

renamed_858cb.docx; Title page-revised.docx;

Manuscript Number: JPEDIATRIA-D-20-00164R1

Biomarkers of renal function in preterm neonates at 72 hours and 3 weeks of life

Prezada Professora Ana Cristina Simões e Silva,

Informamos com satisfação que seu artigo foi aceito para publicação e está programado para a edição nº 6 (Nov/Dez), ano de 2021, Volume 97 do Jornal de Pediatria. Essa programação ainda pode ser alterada de acordo com a necessidade da Editora, entretanto, o artigo será publicado "no prelo" bem antes desta data. Seguem abaixo algumas informações finais:

- Este é um bom momento para que os autores revisem as informações constantes na página de rosto, para evitar erros.

- Confirmar o número de anexos, pois na página de rosto está a informação de que são 2 anexos, porém no artigo existem 4 tabelas.

-Solicitamos aos autores enviarem o Termo de Cessão de Direitos, anexo, assinado (e escaneado) por um dos autores para jped@jped.com.br, juntamente com o arquivo de texto corrigido até o dia 26/12.

-O artigo ainda passará por diversas revisões de formato, linguagem e tradução. Talvez ainda seja necessário pedir algumas informações aos autores, por isso pedimos manter seu e-mail atualizado, também para o envio das provas em PDF, posteriormente.

-TAXA DE PUBLICAÇÃO

Os artigos submetidos, se aceitos para publicação no Jornal de Pediatria, estão sujeitos a uma taxa para que tenham sua publicação garantida. Para o pagamento da taxa, acesse www.jpedpaypal.com.br. Ao submeterem o manuscrito a este jornal, os autores concordam com esses termos.

Valores:

Há desconto na taxa se um dos autores for associado quite com a Sociedade Brasileira de Pediatria.

Se qualquer um dos autores for associado quite com a SBP: R\$ 1.500,00 por manuscrito aceito

Se nenhum dos autores for associado à SBP: R\$ 2.200,00 por manuscrito aceito

Autor estrangeiro: USD 1.000,00 por manuscrito aceito.

-Prazo: O artigo aceito somente será publicado após a comprovação do pagamento da taxa de publicação. Após serem informados do aceite na revista, os autores devem enviar o comprovante de pagamento e os dados do pagador (nome, CPF e endereço) para jped@jped.com.br até 30 dias do envio desta mensagem (26/12). A partir da nossa confirmação, o artigo é enviado para editoração e publicação

-NF: Para a emissão da NF, informe o nome completo, endereço, e-mail e CPF do pagador. A modalidade de pagamento empenho não é aceita.

Para mais informações, entre em contato conosco.

Agradecemos a submissão de seu artigo ao Jornal de Pediatria.

Atenciosamente,

Maria de Fátima Machado
Assessora Editorial

Renato S. Prociandy, PhD, MD
Editor-chefe
Jornal de Pediatria
jped@jped.com.br

More information and support

FAQ: When and how will I receive the proofs of my article?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/8007/p/10592/supporthub/publishing/related/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub:

<https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site:

<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS LEGAIS

Você está sendo convidada a participar do trabalho de pesquisa denominado **“Avaliação da resposta imuno-inflamatória em neonatos pré-termos de 28 a 34 semanas de idade gestacional como fatores preditivos de alterações no desenvolvimento motor”**, conduzido pela Dra Ana Cristina Simões e Silva e pelo terapeuta ocupacional Rafael Coelho Magalhães.

Este estudo quer medir algumas substâncias que podem estar no sangue de seu (ua) filho (a) e podem ter relação com problemas do desenvolvimento do cérebro após o nascimento. Para realizar este estudo serão avaliadas crianças nascidas no Hospital Sofia Feldman com idade gestacional entre 28 e 34 semanas e divididas em dois grupos de acordo com as condições de nascimento e a pontuação obtida em uma escala chamada de APGAR. Esta escala de APGAR mostra a avaliação feita pelo pediatra logo após o nascimento de seu (ua) filho (a) ainda na sala de parto. A escala de APGAR indica como seu (ua) filho (a) nasceu, ou seja, se estava passando bem, com a pele rosada, ativo, se chorou rapidamente ou estava com dificuldade de respirar, com a pele muito branca ou de cor roxa e mexendo muito pouco.

Caso você aceite que seu (ua) filho (a) participe deste estudo serão feitos os seguintes procedimentos:

- 1 – Será coletado sangue do cordão umbilical após o nascimento;
- 2- Serão coletadas amostras de 1 ml de sangue da veia quando seu (ua) filho (a) completar um dia de vida, 3 dias de vida e três semanas de vida. Estas coletas serão feitas juntamente com outras coletas de sangue que são feitas de rotina em bebês prematuros.
- 3- Serão realizados exames de rotina para avaliação do desenvolvimento de seu (ua) filho (a) que incluem: Ultrassom Transfontanela, Ecocardiograma, Exame de Fundo de Olho, Triagem Auditiva e Teste de Desenvolvimento Motor (TIMP).

Você foi convidada para participar dessa pesquisa porque o seu filho nasceu com idade gestacional entre 28 e 34 semanas, está em acompanhamento no Hospital Sofia Feldman e a sua participação só poderá acontecer de forma voluntária sem nenhuma compensação financeira. Você tem o direito de recusar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, sem prejuízo para você e/ou para seu filho, junto ao Hospital Sofia Feldman.

Todas as informações da pesquisa são confidenciais, não havendo nenhuma identificação sua e/ou de seu (ua) filho (a). Seu nome não será escrito em nenhum protocolo. Para identificação de cada bebê que participará do estudo será utilizado um número entre 0 e 100. Após o estudo os resultados serão divulgados para fins científicos. .

Há riscos mínimos para seu filho que são relacionados à coleta de sangue, sendo eles dor durante a coleta e hematomas após as mesmas. É importante ressaltar que esses riscos serão minimizados, pois as coletas serão realizadas por profissionais devidamente capacitados, durante procedimentos rotineiros com as crianças internadas e com todos os cuidados necessários.

Se tiver alguma dúvida, você poderá esclarecê-la com um dos pesquisadores responsáveis ou junto ao comitê de ética da UFMG ou do Hospital Sofia Feldman a qualquer momento.

Assinei e recebi uma cópia desta autorização.

Belo Horizonte, ___/___/____

Nome (Responsável): _____

Assinatura (responsável): _____

Pesquisadores responsáveis:

Ana Cristina Simões e Silva – Médica: Avenida Professor Alfredo Balena, 190/sala 281 - Centro, Belo Horizonte - MG, 30130-100 – acsilva@hotmail.com Fone: (31) 34098073

Rafael Coelho Magalhães – Terapeuta Ocupacional – Rua Industrial José Costa 261/204, Nova Granada, Belo Horizonte – MG, 30431-330. E-mail: rafa_to@hotmail.com Fone: (31) 84551767

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa (UFMG) Fone: (31) 3409-4592; Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil, CEP 31270-901. E-mail: coep@prpq.ufmg.br

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa (HSF) Fone: (31)3408-2242; Endereço: Rua Antônio Bandeira 1060, Tupi – Belo Horizonte/MG; CEP:31844-130. E-mail: lep@sofiafeldman.org.br