

MÁRCIA EMÍLIA FRANCISCO SHIDA

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO ANTÍGENO CARBOIDRATO CA19-9 COMO BIOMARCADOR EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO PARCIAL DO TRATO URINÁRIO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciências.

São Paulo

2021

MÁRCIA EMÍLIA FRANCISCO SHIDA

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO ANTÍGENO CARBOIDRATO CA19-9 COMO BIOMARCADOR EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO PARCIAL DO TRATO URINÁRIO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Silva Queiroz

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Dellê

São Paulo

2021

Shida, Marcia Emilia Francisco.

Avaliação da efetividade do antígeno carboidrato CA 19-9 como biomarcador em modelo experimental de obstrução parcial do trato urinário. / Márcia Emilia Francisco Shida. 2021.

88 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a Márcia Silva Queiroz.

Coorientador (a): Prof. Dr Humberto Dellê.

- 1. Obstrução parcial do trato urinário. 2. Antígeno CA 19-9. 3. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (Ngal). 4. Ratos Wistar.**

I. Queiroz, Márcia Silva. II. Dellê, Humberto. III. Título

CDU 616



Mestrado e Doutorado
em Medicina

São Paulo 18 de novembro de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **MÁRCIA EMÍLIA FRANCISCO SHIDA**

Titulo da tese: **AValiação DO PAPEL DO BIOMARCADOR ANTÍGENO CARBOIDRATO CA 19-9 SÉRICO E URINÁRIO, PARA DIAGNÓSTICO, SEGUIMENTO E ÍNDICE DE GRAVIDADE NA OBSTRUÇÃO URINÁRIA PARCIAL, URETERAL E INFRAVESICAL EM RATAS.**

Presidente: PROFA. DRA. MÁRCIA SILVA QUEIROZ

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ

Membro: PROFA. DRA. CAMILA GIRARDI FACHIN

Membro: PROFA. DRA. MILA TORII CORREA LEITE

Dedico esse trabalho para meus amores.....

Deus,

meus pais, Maria e Abel

meu marido, Jorge

meus filhos, João e Luísa

.....são a minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora **Dra. Márcia Silva Queiroz**, minha orientadora, pela paciência, disponibilidade e o carinho nas correções deste trabalho.

Agradeço ao Professor **Dr. Humberto Dêlle** pelos conselhos, orientações e comentários sempre pertinentes e encorajadores.

Agradeço aos **professores e colegas** de turma da Pós-Graduação em Medicina da UNINOVE. O curso organizado com discussões científicas primorosas, multidisciplinares e colaborativas contribuiu muito para a conclusão deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao meu grande amigo e professor de cirurgia pediátrica, **Dr. Renato Frota de Albuquerque Maranhão** (*in memoriam*). Acompanhar sua dedicação à correção de malformações urinárias graves foi o exemplo responsável pela escolha do meu caminho na cirurgia pediátrica urológica. Saudades!

Agradeço ao meu amigo e companheiro de aulas, Professor **Dr. Sérgio Tomaz Schettini** pelos conselhos e aprendizado. Como é bom trabalhar ao seu lado!

Agradeço à Professora **Dra. Mila Torii Correa Leite**, minha amiga e companheira de angústias e alegrias na urologia pediátrica, pelo estímulo à execução desse trabalho.

Agradeço à Professora **Dra. Maria do Carmo A. Queiroz**, médica patologista, pela orientação na avaliação imuno-histoquímica.

Agradeço à Dra. **Nurya Bustamante**, médica veterinária, pelos ensinamentos na utilização do biotério: as boas práticas com os animais e o auxílio incondicional aos procedimentos cirúrgicos e ao pós-operatório. A convivência com você durante as cirurgias foi uma grande alegria, obrigada!

Agradeço à **Vanessa Fernandes Silva**, Técnica do Biotério da UNINOVE, pela disponibilidade para as coletas de material, adequação de horário e salas, auxílio cirúrgico, cuidados pós-operatórios e, sobretudo, ao bom humor contagiante já nas primeiras horas da manhã. Enfim, sem você, este trabalho não existiria!

Agradeço à **Núbia Christine Nóbrega**, técnica do laboratório de pesquisa da UNINOVE, pelos ensinamentos na utilização dos materiais do laboratório, além de muita paciência em responder todas minhas dúvidas.

Agradeço ao João Shida, meu filho, pelos conselhos e revisões de inglês e à **Luísa Shida**, minha filha, que participou ativamente deste trabalho através de auxílio cirúrgico, digitação, revisão da língua portuguesa e muito, muito incentivo.

*“Na convivência, o tempo não importa.
Se for um minuto, uma hora, uma vida.
O que importa é o que ficou deste minuto,
desta hora, desta vida...
Lembra que o que importa
é tudo que semeares colherás.
Por isso, marca a tua passagem,
deixa algo de ti...
do teu minuto,
da tua hora,
do teu dia,
da tua vida.”*

Mario Quintana

RESUMO

Introdução: A nefropatia obstrutiva, decorrente da obstrução do trato urinário durante o desenvolvimento fetal, representa a causa mais comum de insuficiência renal em bebês e crianças. Apesar do diagnóstico precoce intrauterino, realizado pela ultrassonografia pré-natal, a determinação do prognóstico da gravidade da lesão renal ainda não é bem estabelecida. Portanto, a identificação de marcadores sanguíneos e/ou urinários para definição da progressão do dano renal teria papel de importância na decisão de intervenções terapêuticas mais precoces e efetivas. A elevação do antígeno carboidrato CA19-9 (originalmente um marcador tumoral) tem sido descrita na obstrução urinária benigna. **Objetivo:** Este trabalho avaliou, de forma experimental, um biomarcador (CA19-9) de fácil análise, disponível na rotina da maioria dos laboratórios de análise clínicas e que poderia auxiliar no diagnóstico mais precoce, principalmente em casos duvidosos, de uropatias obstrutivas com potencial dano renal. Utilizamos, como comparador, outro biomarcador, a Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (Ngal), relacionado à gravidade da obstrução. **Material e método:** Quarenta e seis ratas da linhagem Wistar foram divididas em cinco grupos, com diferentes padrões de obstrução parcial do trato urinário: **grupo controle;** **grupo OIV:** obstrução infravesical; **grupo OIVd:** obstrução infravesical com reversão e alívio da obstrução no 7º dia pós-operatório; **grupo OUu:** obstrução ureteral unilateral direita; **grupo OUb:** obstrução ureteral bilateral. A determinação basal do CA19-9, Ngal e da creatinina, na urina e no sangue, foi feita nas cobaias dos grupos previamente a cirurgia (T0). Intervenções cirúrgicas promoveram obstrução parcial dependendo do grupo. Após 13 e 14 dias novas medidas (T1) dos marcadores foram realizadas e comparadas aos valores basais. O grupo **OIVd** foi submetido a uma colheita intermediária prévia a desobstrução (Ti). **Resultados:** Houve aumento da concentração urinária do CA19-9 em todos os animais obstruídos. Nos grupos **OIV, OUb e OIVd** a elevação em T1 e Ti, respectivamente, atingiu significância estatística em relação ao valor de T0 ($p \leq 0,05$). As mudanças do CA19-9 urinário foram mais expressivas no grupo com obstrução infravesical **OIV** (AUC=0,81). O alívio da obstrução no grupo **OIVd** promoveu importante redução dos valores urinários do CA 19-9 na avaliação final com AUC=0,73. Não houve correlação positiva entre os grupos obstruídos e os

níveis séricos de CA 19-9. **CONCLUSÕES:** A concentração urinária do CA19-9 elevou-se na presença de obstrução do trato urinário; o desempenho do CA19-9 urinário como marcador foi superior nas obstruções infravesicais (baixas) e houve um declínio da concentração urinária do CA19-9 após a desobstrução infravesical.

Palavras-chave: Obstrução parcial do trato urinário. Antígeno CA19-9. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (Ngal). Ratas Wistar.

ABSTRACT

Introduction: Obstructive nephropathy, resulting from urinary tract obstruction during fetal development, represents the most common cause of kidney failure in infants and children. Despite the early intrauterine diagnosis, performed by prenatal ultrasound, the determination of the prognosis of the severity of the kidney injury is not well established yet. Therefore, the identification of blood and/or urinary markers to define the progression of renal damage would play an important role in deciding on earlier and more effective therapeutic interventions. Elevated carbohydrate antigen CA19-9 (originally a tumor marker) has been described in benign urinary obstruction. **Aim:** This study evaluated to which extent this easy-analysis biomarker could help in the earlier diagnosis, especially in doubtful cases, of obstructive uropathies with potential renal damage. We compared it to another biomarker, Lipocalin associated with neutrophil gelatinase (Ngal), related to the severity of the obstruction. **Material and method:** Forty-six female Wistar rats were divided into 5 groups, with different patterns of urinary tract obstruction: **group control**; **group OIV**: infravesical obstruction; **group OIVd**: infravesical obstruction with reversion, relief of the obstruction on the 7th postoperative day; **group OUu**: unilateral ureteral obstruction; **group OUb**: bilateral ureteral obstruction. The determination of CA 19-9, Ngal and creatinine basal in urine and blood was performed in the rats of the groups prior to surgery (T0). Surgical interventions promoted partial obstruction depending on the group. After 13 and 14 days, new measurements (T1) of the markers were taken and compared to baseline values. Group **OIVd** underwent an intermediate (Ti) collection before clearance. **Results:** There was an increase in the urinary concentration of CA19-9 in all obstructed animals. In groups **OIV**, **OUb** and **OIVd**, the elevation at T1 and Ti, respectively, reached statistical significance in relation to the T0 value ($p \leq 0,05$). Changes in urinary CA19-9 were expressive in groups with infravesical obstruction. Relief of obstruction in group **OIVd** promoted a significant reduction in urinary CA19-9 values in the final evaluation with AUC=0.73. There was no positive correlation between the obstructed groups and serum CA19-9 levels. **Conclusions:** The urinary concentration of CA19-9 increased in the presence of partial urinary tract obstruction and there was a decline in urinary CA19-9 concentration after infravesical clearance.

Keywords: Partial obstruction of the urinary tract. CA19-9 antigen. Lipocalin associated with neutrophil gelatinase (Ngal). Wistar rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fisiopatologia da Nefropatia Obstrutiva	26
Figura 2	Ultrassonografia apresentando acentuada dilatação pielocalicial e redução do parênquima renal em paciente com Obstrução Ureteropielíca.....	28
Figura 3	Ultrassonografia mostrando bexiga espessada e uretra posterior dilatada secundária a válvula de uretra posterior.	29
Figura 4	Sequência de eventos realizados nos animais dos grupos: Controle, Obstrução Infravesical, Obstrução Ureteral unilateral e bilateral.....	36
Figura 5	Sequência de eventos realizados nos animais do grupo Obstrução Infravesical com desobstrução.....	37
Figura 6	Laparotomia com manipulação de alças e trato urinário no grupo control	38
Figura 7	Exposição da bexiga com visualização da junção ureterovesical (A) seguida de obstrução da região infravesical sobre um cateter 20 G para evitar oclusão completa (B)	39
Figura 8	Grupo Obstrução Infravesical e desobstrução: reabertura da parede abdominal inferior, identificado fio de nylon (seta), a ser retirado, preso no subcutâneo do animal (A); bexiga distendida (B) com ponto no colo vesical (seta) (C).....	39
Figura 9	Modelo de obstrução ureteral parcial unilateral	40
Figura 10	Obstrução ureteral parcial unilateral. A: músculo psoas (mp) envolvendo ureter (u); B: fechamento do músculo sobre o ureter e um cateter venoso 20G (seta) para evitar oclusão completa	40
Figura 11	Obstrução ureteral parcial bilateral: setas apontando para ureteres dilatados e a letra “p” indica a região obstruída com pontos de prolene 5-0.....	41

Figura 12	Ratas alocadas em gaiolas metabólicas individuais	42
Figura 13	Coleta de sangue do plexo gengival (seta) após anestesia geral da rata	43
Figura 14	Diferenças macroscópicas do trato urinário parcialmente obstruído comparado ao grupo controle. A: rim e ureter da rata sem obstrução (ureter ao lado de uma agulha de insulina 24G); B: ureter e pelve renal dilatados após OUu; C: rim direito (RD) do grupo OUu, maior que o rim esquerdo (RE); D: evidente dilatação pielocalicial do rim direito (RD) em relação ao rim esquerdo (RE); E: bexiga à esquerda do grupo controle (C) e a direita, do grupo com obstrução infravesical (OIV).....	47
Figura 15	Grupo Obstrução Infravesical: (A) laparotomia após 14 dias de obstrução infravesical parcial, observa-se bexiga distendida (seta); (B) ureteres (u) dilatados; (C) após retirada da bexiga, passagem de cateter pelo colo vesical (22 G) demonstrando que a obstrução foi parcial, mas promoveu grande aumento vesical.....	48
Figura 16	Grupo Obstrução Infravesical e desobstrução: (A) observa-se distensão vesical e (B) bexiga exposta para retirada do fio que envolve o colo vesical (seta)	49
Figura 17	Comparação de cortes histológicos de rins e bexigas nos diferentes grupos. A: rim controle; B: rim com obstrução ureteral unilateral (OUu); C; rim com obstrução ureteral bilateral (OUb); D: bexiga controle; E: bexiga com obstrução infravesical (OIV); F: bexiga com obstrução infravesical e desobstrução (OIVd). Coloração: hematoxilina-eosina.....	51

Figura 18	Comparação dos valores urinários absolutos do CA19-9, iniciais e após o procedimento cirúrgico nos grupos: Controle, Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical seguida de desobstrução (OIVd), Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral bilateral (OUb).....	53
Figura 19	Comparação dos valores urinários do CA19-9 basal (0) e final (1) nos grupos Obstrução Infravesical e Obstrução Ureteral bilateral.....	53
Figura 20	Comparação dos valores urinários do CA19-9, inicial (0), intermediário (i) e após desobstrução (1), no grupo obstrução infravesical e desobstrução.....	54
Figura 21	Comparação dos valores urinários do CA19-9, após a obstrução nos grupos: Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd), Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral bilateral (OUb), no tempo final (1) e intermediário (i), comparados ao tempo final (1) do grupo Controle...	55
Figura 22	Curvas ROC da concentração do CA19-9 urinário nos grupos Obstrução Infravesical, Obstrução Infravesical e desobstrução (obstrução e queda após desobstrução) e Obstrução Ureteral bilateral.....	56
Figura 23	Curvas ROC da concentração do CA19-9 urinário nos grupos Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd), e Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral Bilateral (OUb) comparados ao tempo inicial (1) do grupo Controle...	57
Figura 24	Comparação dos valores urinários do CA19-9/creatinina urinária, iniciais e após procedimento cirúrgico, em cada grupo.....	59

Figura 25	Comparação dos valores urinários do CA19-9/creatinina urinária no tempo final (1) e no tempo intermediário (i) entre o grupo Controle e os grupos obstruídos.....	59
Figura 26	Comparação dos valores urinários do CA19-9/creatinina urinária inicial (0) e final (1) e intermediário (i) nos grupos Obstrução Infravesical, Obstrução Infravesical e desobstrução (queda), e Obstrução Ureteral bilateral.....	60
Figura 27	Curvas ROC da elevação da concentração do CA19-9/creatinina urinária nos grupos Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Ureteral bilateral (OUb) e Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd) queda.....	61
Figura 28	Curvas ROC do CA 19-9/creatinina urinária dos grupos obstruídos: Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral bilateral (OUb), nos tempos finais (T1) comparados ao grupo Controle.....	61
Figura 29	Comparação dos valores urinários absolutos da Ngal, inicial e após o procedimento cirúrgico, em cada grupo	63
Figura 30	Curva ROC do valor absoluto da uNgal do grupo Obstrução Infravesical.....	63
Figura 31	Comparação dos valores absolutos da uNgal após a obstrução nos grupos: Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd), Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral bilateral (OUb), no tempo final (1) e no tempo intermediário (i), comparados ao grupo Controle.....	64
Figura 32	Curva ROC da elevação absoluta da uNgal no grupo Obstrução Ureteral bilateral e Obstrução Infravesical e desobstrução versus Controle.....	65
Figura 33	Comparação dos valores urinários da Ngal/creatinina urinária, basal e após o procedimento cirúrgico em cada grupo.....	67

Figura 34	Curva ROC da elevação da uNgal/creatinina urinária no grupo Obstrução Ureteral bilateral.....	67
Figura 35	Expressão imuno-histoquímica do CA19-9 nos rins e bexigas.....	71
Figura 36	Imuno-histoquímica de túbulo renal e bexiga. A: expressão do CA19-9 (cor amarronzada) nas células tubulares renais (100X) e (B) na lâmina própria vesical (40X)	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios da anatomia macroscópica do grupo Controle comparado aos observados nos grupos Obstrução Infravesical e Obstrução Infravesical e desobstrução	49
Tabela 2	Valores médios da anatomia macroscópica do grupo Controle comparados aos grupos Obstrução Ureteral unilateral e bilateral	50
Tabela 3	Comparação entre os tempos de coleta nos grupos Obstrução Infravesical e Obstrução Infravesical e desobstrução dos valores urinários, absolutos, de CA19-9 (IU/mL)	52
Tabela 4	Comparação entre os tempos de coletas nos grupos: Obstrução ureteral unilateral e Obstrução ureteral bilateral, dos valores urinários, absolutos, do CA 19-9 (IU/mL)	52
Tabela 5	Comparação dos valores urinários, absolutos, de CA19-9 (IU/mL) entre os grupos obstruídos e o grupo controle em Tempo 1 e Tempo intermediário.....	54
Tabela 6	Comparação dos valores CA19-9/creatinina urinária (IU/mL) em cada grupo em T0, T1 e Ti.....	58
Tabela 7	Comparação dos valores CA19-9/creatinina urinária (IU/mL) entre os grupos obstruídos e o grupo controle.....	58
Tabela 8	Comparação dos valores absolutos de uNgal (pg/mL) inicial (T0), intermediário (Ti) e final (T1) em cada grupo	62
Tabela 9	Comparação dos valores absolutos de uNgal (pg/mL) intermediário (Ti) e final (T1) dos grupos obstruídos e final T1 do grupo controle	64
Tabela 10	Comparação dos valores ajustados de uNgal (pg/mL) iniciais (T0), intermediário (Ti) e final (T1)	66

Tabela11	Comparação dos valores ajustados de uNgal (pg/mL) entre os tempos intermediários (Ti) e final (T1) com o Tempo 1 do grupo controle.....	66
Tabela12	Comparação dos valores de creatinina (mg/dL) inicial (T0), intermediário (Ti) e final (T1)	68
Tabela 13	Comparação dos valores de CA19-9 sérico (IU/mL) inicial (T0), final (T1) e intermediário (Ti).....	69
Tabela 14	Comparação dos valores de Ngal sérico (pg/mL) inicial (T0), final (T1) e intermediário (Ti)	69
Tabela 15	Comparação dos valores de creatinina sérica (mg/dL) entre grupos, nos tempos: inicial (T0), final (T1) e intermediário (Ti)	70
Tabela 16	Avaliação imuno-histoquímica de rins em porcentagens de positividade e negatividade para o CA19-9	71
Tabela 17	Avaliação imuno-histoquímica de bexigas em porcentagens de positividade e negatividade para o CA19-9	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância múltipla
AUC	<i>Area under the ROC Curve</i> (area sob a curva ROC)
CA19-9	Antígeno Carboidrato 19-9
CAKUT	Anomalias Congênitas do Trato Urinário (do inglês, <i>Congenital anomalies of the kidneys and the urinary tract</i>)
DMSA	Ácido dimercaptossuccínico
DO	Densidade óptica
DRC	Doença renal crônica
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
ECM	Matriz Extracelular
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EJUP	Estenose da junção ureteropielica
EJUV	Estenose da junção ureterovesical
EADR	Estágio Avançado da Doença Renal
HRP	Peroxidase do rábano silvestre
IFN γ	Interferon Gama
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IRA	Insuficiência renal aguda
ITU	Insuficiência renal aguda
LUTO	Obstrução do Trato Urinário Inferior (do inglês, <i>Lower urinary tract obstruction</i>)
MCP-1	Proteína do monócito quimioatraente
Ngal	Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica
NO	Nefropatia obstrutiva
OCTU	Obstrução congênita do trato urinário
OIV	Obstrução infravesical
OIVd	Obstrução infravesical com desobstrução

OJUP	Obstrução da junção ureteropélvica
OJUV	Obstrução da junção ureterovesical
USG	Ultrassonografia
OTU	Obstrução do trato urinário
OU	Obstrução urinária
OUB	Obstrução ureteral bilateral
OUn	Obstrução ureteral unilateral
RN	recém-nascido
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor (do inglês, <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
T 0	Tempo zero
T1	Tempo um
T i	Tempo intermediário
TGF	Taxa de filtração glomerular
TGF-β1	Fator de crescimento transformador Beta 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRS	Terapia renal substitutiva
uNgal	Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica urinária
UO	Uropatia obstrutiva
VUP	Válvula de uretra posterior
α -sma	alfa-actina de músculo liso

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau centígrado ou Celsius
cm	centímetro
dL	decilitro
DO	Densidade Óptica
g	grama
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
pg	picograma
rpm	rotações por minuto
IU	Unidade Internacional
U	unidade

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SIMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Definições e epidemiologia	24
1.2 Fisiopatologia da Nefropatia Obstrutiva	25
1.3 Diagnóstico das obstruções congênitas do trato urinário (OCTU)	27
1.3.1 Dilatação do trato urinário superior	27
1.3.2 Dilatação do trato urinário inferior	28
1.3.3 Diagnóstico pós-natal da OCTU	29
1.4 Progressão de lesões secundárias a OCTU	30
1.5 Biomarcadores na obstrução do trato urinário	30
1.5.1 Antígeno Carboidrato: CA19-9	31
1.5.2 Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos (Ngal)	32
1.6 Justificativa do estudo	33
1.7 Objetivos	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Bioética	35
2.2 Instalações	35
2.3 Animais	35
2.4 Anestesia	37
2.5 Técnica Cirúrgica	37
2.6 Cuidados pós-operatórios	41
2.7 Coleta de amostras	42
2.7.1 Urina	42

2.7.2 Soro	43
2.8 Estudo anatomopatológico dos rins, ureteres e bexiga	44
2.9 Estudo imuno-histoquímico	44
2.10 Análise laboratorial	44
2.11 Análise estatística	45
3. RESULTADOS	47
3.1 Anatomia Patológica	48
3.2 Análise Laboratorial	51
3.2.1 Urina	51
3.2.1.1 Antígeno Carboidrato CA19-9 urinário	51
3.2.1.1.1 Valores absolutos (sem ajuste com a creatinina urinária)	51
3.2.1.1.2 Valores ajustados à creatinina urinária	57
3.2.1.2 Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrófila (Ngal) urinária	62
3.2.1.2.1 Valores absolutos	62
3.2.1.2.2 Valores ajustados à creatinina urinária	65
3.2.1.3 Creatinina Urinária	68
3.2.2 Sangue	68
3.2.2.1 Antígeno Carboidrato CA 19-9 sérico	68
3.2.2.2 Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrófila sérica	69
3.2.2.3 Creatinina Sérica	70
3.3 Análise imuno-histoquímica	70
4. DISCUSSÃO	73
5. CONCLUSÃO	78
6. ANEXOS	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definições e epidemiologia

As obstruções do trato urinário (OTU) ou uropatias obstrutivas (UO) são definidas como alterações estruturais ou funcionais em qualquer ponto do trato urinário, que impedem o fluxo normal de urina e causam dilatação a montante, bem como podem desencadear doença ou dano renal (nefropatia obstrutiva) (GIRARDI M e MARTIN, 2015). As OTU são classificadas de acordo com vários parâmetros: 1) duração: aguda ou crônica; 2) grau de obstrução: completa ou parcial; 3) localização: aparelho urinário superior ou inferior e 4) natureza da obstrução: congênita ou adquirida, intrínseca ou extrínseca. (MONTEIRO e CARILHO, 2006).

As anomalias congênitas dos rins e do trato urinário (CAKUT, do inglês *congenital anomalies of the urinary tract*) incluem agenesia renal, hipoplasia renal, displasia renal, rins supranumerários, ectópicos ou fundidos, duplicidade *ureteral*, refluxo vesico-ureteral e obstrução congênita do trato urinário (OCTU). As CAKUT são responsáveis pela maioria das doenças renais crônicas (DRC) em crianças. (JAIN e CHEN, 2019), dentre as quais a OCTU é a principal causa de estágio avançado da doença renal (EADR) na faixa etária pediátrica. (CHEVALIER, 2015).

Aproximadamente 60% das uropatias diagnosticadas durante o período pré-natal são devidas à OCTU alta, como a obstrução da junção ureteropélvica (OJUP) e ureterovesical (OJUV). A OJUP possui maior incidência, acomete 1 em cada 5000 nascidos vivos e em 21% a 36% dos casos sua ocorrência é bilateral (MACEDO *et al*, 2003). A obstrução do trato urinário baixo (LUTO, do inglês *lower urinary tract obstruction*) ou OCTU baixa, tem como principal causa a válvula de uretra posterior (VUP), 64% dos casos, enquanto atresia uretral e a síndrome da barriga de ameixa (Síndrome de Prune Belly) são outras causas menos frequentes (MALIN *et al*, 2012). A OCTU baixa e a bexiga neurogênica, decorrente de defeitos do tubo neural, são doenças congênitas que causam obstrução ao fluxo de urina, com potencial evolução para nefropatia obstrutiva (NO) e doença renal crônica (DRC) (INGRAHAM e McHUGH, 2011).

Nas crianças a DRC é devastadora, com alta taxa de mortalidade no estágio avançado com necessidade de terapia renal substitutiva (TRS) entre 30 e 150 vezes maior que a da população pediátrica geral, justificando o diagnóstico e a abordagem precoce do paciente com CAKUT, com intuito de evitar desfechos desfavoráveis, enfatizar a prevenção primária e o tratamento específico e adequado do defeito congênito (WARADY e CHADHA, 2007).

1.2 Fisiopatologia da Nefropatia Obstrutiva

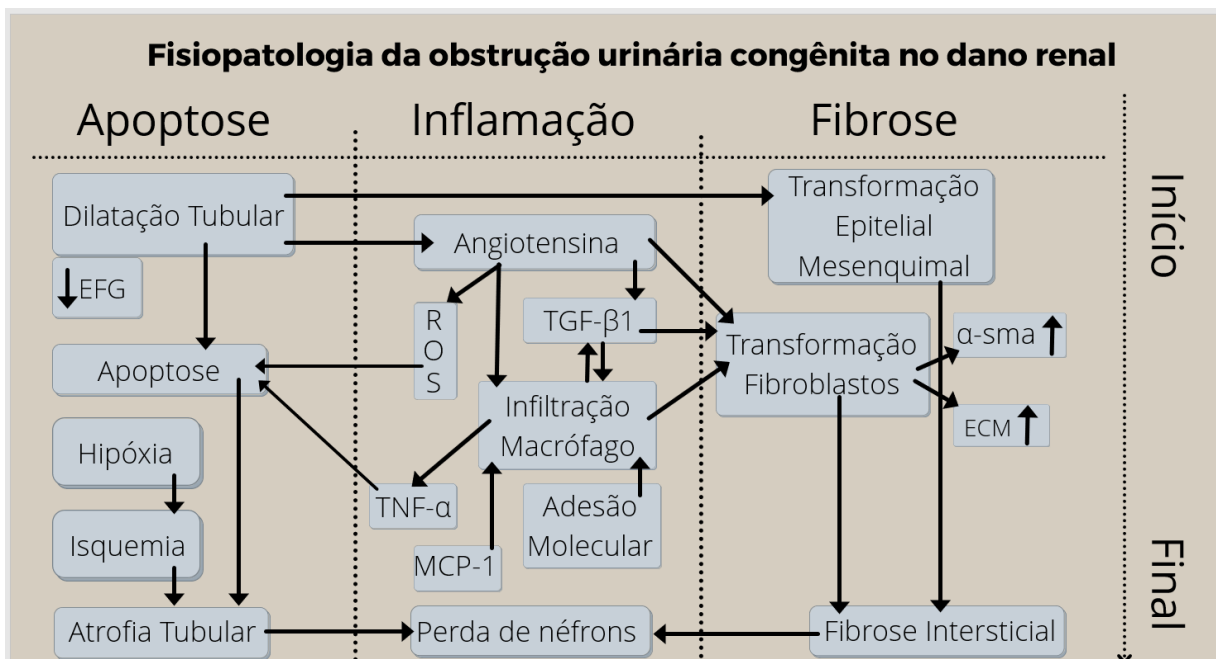
A NO, decorrente da UO, caracteriza-se por fibrose tubulointersticial progressiva, que leva à esclerose glomerular e ao comprometimento da função renal (CHEVALIER, 2009). Estudos em modelos animais de UO demonstraram que a atrofia tubular e fibrose intersticial se desenvolvem antes da dilatação significativa do trato urinário, e a presença de obstrução ureteral parcial, com 70% de oclusão, reduz em 60% o crescimento renal e em 50% número de glomérulos (THORNILL *et al*, 2007). Assim, as alterações renais progressivas e crônicas promovem o desenvolvimento de displasia renal, hipoplasia medular, interrupção na indução do néfron com diminuição do tamanho do rim e do número de néfrons, alterações tubulointersticiais e remodelação do epitélio do ducto coletor (MATSELL *et al*, 2002).

Por sua vez, a lesão tubular renal resulta do estiramento mecânico do epitélio tubular, hipóxia e exposição a radicais livres de oxigênio decorrentes do aumento da pressão hidrostática, redução do fluxo sanguíneo e aumento do estresse oxidativo. (LUCARELLI *et al*, 2014). Estas alterações iniciam uma sequência de eventos, incluindo: 1) dilatação tubular, transição fenotípica celular e apoptose celular; 2) inflamação intersticial e 3) lesão glomerulotubular com progressiva fibrose intersticial. (CHEVALIER, 2010). As células tubulares e intersticiais renais são mais suscetíveis a apoptose. Após 4 dias de OTU, inicia-se apoptose de células tubulares, atingindo o pico com 15 dias, enquanto nas células intersticiais renais este processo é progressivo ao longo da obstrução renal. As células glomerulares parecem ser mais resistentes a apoptose induzida por obstrução (CHOI *et al*, 2000).

A lesão e morte das células epiteliais tubulares regula negativamente o fator de crescimento epidérmico (EGF) e ativa o sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) local, que estimula a expressão do fator de crescimento transformador- β 1

(TGF- β 1) e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Isso leva ao recrutamento de macrófagos intersticiais e a geração de monócitos proteína quimioatraente-1 (MCP-1), moléculas de adesão e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Estas citocinas amplificam a lesão por contribuírem para apoptose de células epiteliais, endoteliais e podócitos, levando à hipóxia renal e isquemia (VIANNA *et al*, 2011). Esta sequência de eventos resulta na perda de capilares peritubulares e glomérulos, bem como na ruptura tubular proximal, glomérulos atubulares e atrofia tubular. As células endoteliais e epiteliais sofrem transformação fenotípica e tornam-se fibroblastos, que por sua vez se desenvolvem em miofibroblastos e expressam alfa-actina de músculo liso (α -sma). Há expansão da matriz extracelular (ECM), com progressiva fibrose intersticial. O resultado final é a perda gradativa de todos os componentes do néfron (MISSERI *et al*, 2004; CHEVALIER, 2010). A figura 1 resume esse processo.

Figura 1 - Fisiopatologia da nefropatia obstrutiva.



Legenda: EFG: fator de crescimento epidérmico; ROS: espécies reativas de oxigênio; TGF- β 1: fator de crescimento transformador beta-1; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; MCP-1: proteína do monócito quimioatraente; α -SMA: alfa-actina de músculo liso; ECM: matriz extracelular (Adaptado de Chevalier, 2010).

Segundo Miranda e colaboradores, a maioria das OTU são parciais; portanto, os eventos descritos acima ocorreriam de forma gradual, para os quais a função basal renal, o grau e o tempo de obstrução seriam fatores determinantes da recuperação da função renal, após o alívio da obstrução (MIRANDA *et al*,2016).

1.3 Diagnóstico das obstruções congênitas do trato urinário

O aprimoramento dos aparelhos e técnicas de ultrassonografia (USG), principalmente a partir da década de 80, tornou esse método uma ferramenta imprescindível na assistência à gestante e proporcionou o diagnóstico precoce de CAKUT (PEREIRA *et al*, 2000), uma vez que passou a identificar fetos assintomáticos com hidronefrose leve a grave, com potencial de evolução bastante variável (YIEE e WILCOX, 2008). A hidronefrose pré-natal, é relatada em aproximadamente 1–5% de todas as gestações (NGUYEN *et al*, 2010) (AULBERT e KEMPER, 2016), nestes casos o exame ultrassonográfico identifica o local da obstrução, alta ou baixa, permite o diagnóstico provável do processo obstrutivo e a avaliação do parênquima renal.

1.3.1 Dilatação do trato urinário superior

O comprometimento parcial do fluxo urinário por OJUP, e menos frequentemente por OJUV, são as principais causas de dilatação do trato urinário superior (DIAS *et al*, 2014.). A imagem ultrassonográfica da OJUP revela dilatação da pelve renal, com bexiga normal e ureter não identificado e, com a persistência da obstrução, o córtex renal torna-se adelgado, hiperecogênico e propicia o aparecimento de cistos corticais (BASSANENSE *et al*, 2013) (Figura 2).

Na USG pré-natal, a medida da pelve renal é útil para diferenciar fetos com OJUP, e necessidade de abordagem de cirurgia, daqueles com dilatação pielocalicial sem significado clínico específico. RADMAYR e colaboradores, concluíram que 90% dos fetos com medida de pelve renal entre 30 e 40 mm, e potencialmente todos aqueles com pelve renal maior a 40 mm, progredirão com disfunção do trato urinário; no entanto, entre os com hidronefrose e pelve menor que 20 mm ao nascimento, apenas 11 % necessitarão desobstrução cirúrgica. Os indivíduos com medidas entre 20 e 30 mm são classificados na “zona cinza”; ou seja, sem previsibilidade definida,

pois 40% dos casos podem eventualmente piorar, como também, melhorar espontaneamente (RADMAYR, 2015; JACKSON *et al*, 2017).

A OJUV pode ser identificada na USG pré-natal como megaureter, com diâmetro superior a 10 mm, pelve renal dilatada e bexiga de aparência normal. O principal diagnóstico diferencial é com refluxo vesicoureteral (LIU *et al*, 1994).

Figura 2 - Ultrassonografia mostrando acentuada dilatação pielocalicial e redução do parênquima renal por obstrução da junção ureteropélvica.



Fonte –acervo pessoal do autor

1.3.2 Dilatação do trato urinário inferior

O primeiro sinal ultrassonográfico de LUTO é a distensão da bexiga fetal (*megacistis*), diagnosticada a partir de 11 semanas de vida intrauterina, outros achados incluem a uretero-hidronefrose bilateral, bexiga espessada e uretra posterior dilatada, esses últimos dois sinais correlacionam-se fortemente com a VUP, juntos compõem o *Sinal do Buraco de Fechadura* (Figura 3) (DIAS *et al*, 2014). Por outro lado, as anormalidades do parênquima renal como: aumento da ecogenicidade, presença de estruturas císticas e afilamento, sugerem gravidade na LUTO, principalmente quando associadas ao oligoâmnio (RUANO *et al*, 2017).

Figura 3 - Ultrassonografia mostrando bexiga espessada e uretra posterior dilatada secundária à válvula de uretra posterior.



Fonte - Jian Gao, 2017.

1.3.3 Diagnóstico pós-natal da OCTU

No período pós-natal, a avaliação clínica e de imagens seriadas por USG, uretrocistografia miccional, ressonância nuclear magnética (RNM), renograma estático com ácido dimercaptossucínico (DMSA) e/ou dinâmico com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) são úteis para diagnosticar padrões obstrutivos significativos de OCTU. A combinação de parâmetros clínicos e de imagem são empregados para estimar a gravidade e o prognóstico da dilatação do trato urinário, bem como para acompanhar o desenvolvimento e progressão da lesão renal e a necessidade de intervenção cirúrgica (KOSTIC *et al*, 2019). No entanto, esses métodos não são perfeitos para diagnosticar a obstrução de forma precisa e oportuna, e com isto a estratificação de risco e a tomada de decisões só podem ser embasadas em parâmetros subjetivos (OZCUVANJI *et al*, 2020).

No intuito de tornar mais acurada a condução de pacientes com OCTU, medidas seriadas de biomarcadores urinários e ou sanguíneos têm sido estudadas para auxiliar nas decisões relacionadas à manutenção do tratamento conservador ou indicação cirúrgica e no seguimento pós-operatório da correção da obstrução (PARABOSCHI *et al*, 2020).

1.4 Progressão de lesões secundárias a OCTU

O desenvolvimento de insuficiência renal na OCTU pode ocorrer em qualquer momento da infância ou mesmo na idade adulta, com grande oscilação entre os pacientes. A variabilidade dos desfechos renais suscita a importância da estratificação de risco e do cuidado individualizado. Em crianças com lesão renal basal graduada como moderada, potenciais insultos seriados durante a infância relacionados à própria obstrução, infecções urinárias de repetição (ITUs) ou outros eventos, podem prejudicar e acelerar a lesão renal. Assim, marcadores que possam ser medidos no primeiro momento, e seguidos ao longo do tempo são necessários para melhor identificar o risco de piora da função renal e permitir o acompanhamento adequado e o tratamento específico para cada caso (McLEOD *et al*, 2019).

1.5 Biomarcadores na obstrução do trato urinário

Define-se como biomarcador qualquer substância, estrutura ou processo, que possa ser medido no corpo ou em seus fluidos e seja capaz de influenciar ou prever a incidência de resultados ou doenças, efeitos de tratamentos e/ou intervenções (STRIMBU e TAVEL, 2010). Amostras biológicas de fácil acesso, como plasma, soro ou urina, são fontes valiosas de biomarcadores; particularmente a urina, por disponibilizar a coleta de volumes maiores, de forma não invasiva e menos complexa comparada a outros materiais biológicos, como por exemplo, o plasma (DECRAMER *et al*, 2008; MAGALHÃES *et al*, 2016). Neste sentido, o biomarcador ideal da OCTU seria aquele obtido a partir de amostras biológicas facilmente acessíveis, mensurável por técnica padronizada e em laboratório clínico de rotina (MADSEN *et al*, 2011).

O melhor entendimento do mecanismo de lesão renal na OTU indica que os biomarcadores liberados pelo estiramento epitelial tubular podem fornecer informações valiosas sobre a lesão obstrutiva durante a infância (WASHINO *et al*, 2020; McLEOD *et al*, 2020). Por meio de revisão da literatura sobre marcadores na OTU, evidenciamos a expressão imuno-histoquímica do biomarcador Antígeno Carboidrato 19-9 (CA19-9) no citoplasma de células tubulares renais e sua elevação tem sido descrita em pacientes com OJUP (LOPES *et al*, 2015) e mais recentemente em gestações de crianças com VUP (KAJBAFZADEH *et al*, 2019). Outro biomarcador, a lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (Ngal), sintetizada na porção

ascendente espessa da alça de Henle, tem sua expressão aumentada em resposta à lesão tubular renal; por isso ganhou destaque em estudos relacionados à insuficiência renal aguda (IRA). Como a Ngal também está elevada em pacientes com hidronefrose, poderia fornecer uma previsão mais precisa das crianças que potencialmente evoluirão para DRC resultante de OTU (FOSTER *et al*, 2017).

1.5.1 Antígeno Carboidrato 19-9

O glicopeptídeo CA19-9, ou antígeno de Lewis, foi descrito pela primeira vez em 1979, por Koprowsky e colaboradores (KOPROWSKI *et al*, 1979). Apesar de presente no epitélio do aparelho excretor normal, o CA19-9 tem sido utilizado como um marcador tumoral, pois sua concentração está aumentada em neoplasias, principalmente em tumores do trato gastrointestinal, uma vez que é liberado na superfície da célula cancerosa e penetra na corrente sanguínea, onde pode ser detectado. No entanto, na literatura médica existem relatos da elevação desse marcador em condições benignas relacionadas à dilatação do trato urinário, como a hidronefrose secundária à calculose renal (NAKAHARA *et al*, 1992; ITO *et al*, 1994; KAMAI *et al*, 1995). Em um estudo prospectivo caso controle, o CA19-9 mostrou-se eficaz como marcador urinário nas obstruções, com aumento significativo em pacientes com hidronefrose benigna. A partir desse estudo, observou-se que a presença de hidronefrose poderia gerar resultado falso-positivo para doença maligna, caso o rastreio para malignidade fosse baseado na dosagem de CA19-9 (SUZUKI *et al*, 2002).

MEYER e colaboradores, evidenciaram aumento acentuado na expressão imuno-histoquímica do CA19-9 em células epiteliais tubulares e pelve renal em rim hidronefrótico. O mecanismo exato desta intensificação de expressão não foi completamente definido, mas os autores atribuíram este efeito ao aumento de produção pelas células epiteliais e a diminuição da depuração devido à oclusão do trato urinário superior (MEYER *et al*, 2004).

A maioria dos trabalhos publicados sobre hidronefrose e elevação de CA19-9 são relacionados a OJUP ou a litíase ureteral. Este investimento na pesquisa de biomarcadores para as OJUP se justifica, pois não há um exame de imagem considerado padrão ouro, que assegure a correta indicação ou não de intervenção

cirúrgica, especialmente, em casos de dilatação moderada. O CA19-9 podem ser um marcador de baixo custo e fácil acesso, ideal para esse propósito (KAJBAFZADEH *et al*, 2010).

Um estudo caso-controle, envolvendo 27 pacientes com hidronefrose benigna e sem outras comorbidades, mostrou elevação significativa do CA19-9 sérico e urinário no grupo obstruído em relação ao grupo controle e, especificamente em pacientes com OJUP, identificou-se decréscimo nas dosagens do CA19-9, tanto no sangue como na urina, após 3 meses de desobstrução do trato urinário (KAJBAFZADEH *et al*, 2010). Por sua vez, ALIZADEH e colaboradores estudaram a razão CA19-9/creatinina urinária em 30 crianças com OJUP e relataram resultados superiores a avaliação do CA19-9 urinário isolado. Concluíram que a relação CA19-9/creatinina urinária seria um marcador não invasivo, útil para o diagnóstico e acompanhamento em longo prazo de crianças portadoras de OJUP (ALIZADEH, 2018). O aumento do CA19-9 foi demonstrado recentemente na urina de mães com fetos portadores de VUP e em gestações de fetos com hidronefroses acentuadas (KAJBAFZADEH *et al*, 2019; AKBAS *et al*, 2020).

Diante da consistente elevação do CA19-9 na UTO, com queda tanto da concentração sérica quanto urinária após desobstrução, associado à dosagem laboratorial bem estabelecida e de fácil execução, o CA19-9 tem se mostrado como potencial marcador nas OCTU (MIRANDA *et al*, 2016). No entanto, há necessidade de mais avaliações, e casuística mais robusta, para o emprego do CA19-9 na prática clínica, como marcador de OTU. Neste sentido, estudos em modelos experimentais podem contribuir para comparar mudanças na concentração sérica e urinária de CA19-9, em diferentes níveis de OTU; bem como, seu comportamento após a desobstrução, correlação com a gravidade da lesão renal e como marcador auxiliar no diagnóstico precoce, principalmente em casos duvidosos de OCTU.

1.5.2 Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos

A lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (Ngal, do inglês *neutrophil gelatinase associated lipocalin*) é uma glicoproteína isolada originalmente em grânulos específicos dos neutrófilos humanos, presente na forma de monômero de 25 kD, ou como um homodímero ligado por dissulfeto de 45 kD, e covalentemente conjugado à

gelatinase dos neutrófilos (LINJUN *et al*, 2010; CAI *et al*, 2010). O aumento de expressão da Ngal ocorre após evento lesivo em diversas regiões do corpo, como pulmão, fígado, estômago, cólon e especialmente no trato geniturinário (AZEVEDO, 2011).

A Ngal tem efeito bacteriostático e renoprotetor, liga-se a sideróforos bacterianos, reduzindo o ferro disponível, com isto inibe o crescimento bacteriano e controla as concentrações intracelulares de ferro (KOHL *et al*, 2020). Em condições fisiológicas, a Ngal circulante é filtrada livremente pelos glomérulos e reabsorvida pelo túbulo proximal; portanto, na ausência de afecção renal, os valores plasmáticos de Ngal são baixos. Frente a agentes agressores renais, a expressão da Ngal é induzida nas células epiteliais do túbulo proximal e distal, com aumento da concentração plasmática e urinária (NISHIDA *et al*, 2010; WATANABE *et al*, 2014).

Alguns estudos sugeriram que a alta sensibilidade da Ngal para demonstrar lesão tubular poderia ser útil como marcador para danos renais por OCTU (COST *et al*, 2013). Os resultados publicados por Wasilewska e colaboradores, evidenciaram aumento da Ngal urinária (uNgal) em crianças com hidronefrose grave por OJUP quando comparadas a um grupo controle (WASILEWSKA *et al*, 2011). Achados semelhantes foram descritos por Kostic e colaboradores, em recém-nascidos (RNs) portadores de LUTO quando comparados com RNs normais (KOSTIC *et al*, 2019). Apesar desses relatos animadores na literatura, a Ngal não é utilizada de rotina na investigação e acompanhamento das OCTU.

Devida a especificidade de uNgal para danos tubulares, aventa-se a possibilidade de ser útil para distinguir crianças com hidronefrose benigna, que potencialmente evoluem com a auto resolução da hidronefrose, daquelas com a forma persistente ou progressiva e necessidade de intervenção cirúrgica (PAVLAKI *et al*, 2020).

1.6. Justificativa do estudo

Nas OCTUs, os indicadores clássicos de progressão da lesão renal e desenvolvimento de DRC são a taxa de filtração glomerular (TGF), concentração sérica de creatinina e proteinúria. (MATSELL *et al*, 2016). A estratificação de risco

baseada nesses critérios não é suficiente para prever o desfecho da função renal em grande parte dos pacientes com evolução variável (MCLEOD *et al*, 2019).

O CA19-9 é um marcador de fácil coleta e dosagem laboratorial bem padronizada e, na literatura, tem-se mostrado promissor como marcador de gravidade em obstruções ureterais principalmente relacionados a OJUP, mas ainda pouco estudado nas obstruções infravesicais. Após extensa revisão bibliográfica, não encontramos nenhum trabalho publicado sobre o estudo em modelo experimental de obstrução infravesical e CA19-9, por isso, este estudo de intervenção foi desenhado para comparar valores urinários e séricos do CA19-9 em obstruções urinárias parciais altas e baixas, e seu comportamento após desobstrução infravesical. Um segundo marcador, a Ngal, relacionado à lesão renal e utilizado na monitorização da insuficiência renal aguda, será utilizado como comparador ao CA 19-9.

1.7. Objetivos

Os objetivos desse projeto visaram responder às seguintes dúvidas:

1. A concentração sérica e/ou urinária do antígeno CA19-9 e/ou Ngal estão elevadas na obstrução parcial do trato urinário, de forma a contribuir para o diagnóstico das UO?
2. Existe correlação entre os valores séricos e/ou urinários do antígeno CA19-9 e/ou Ngal em relação ao nível da obstrução do trato urinário, ou seja, entre UO altas e baixas?
3. A dosagem de CA19-9 e/ou Ngal tem relação com a duração da UO e podem ser marcadores precoces da UO.
4. CA19-9 e/ou Ngal podem ser marcadores da resolução da obstrução urinária?

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Bioética

O estudo experimental foi realizado na Universidade Nove de Julho, no período de maio de 2020 a dezembro de 2020. O Projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA UNINOVE, número 6575031019) em 27 de novembro de 2019. (Anexo)

2.2 Instalações

Para realização dos procedimentos cirúrgicos e seguimento pós-operatório foi utilizado o biotério da Universidade Nove de Julho, que conta com equipe técnica competente e humanizada para a cirurgia e manutenção dos animais. Para armazenamento de amostras e peças anatômicas foi utilizado o laboratório de pesquisa da UNINOVE.

2.3 Animais

Um total de 46 ratas adultas da linhagem Wistar, com pesos entre 230-270 mg, foram divididas em 5 grupos:

Controle (9 ratas): abertura e fechamento da parede abdominal;

OIV (9 ratas): obstrução infravesical parcial durante 14 dias;

OIVd (10 ratas): obstrução infravesical parcial durante 7 dias e posteriormente alívio da obstrução;

OUu (9 ratas): obstrução ureteral parcial, alta e unilateral à direita por 14 dias;

OUB (9 ratas): obstrução ureteral parcial, alta e bilateral por 14 dias.

A programação inicial do projeto envolvia 53 animais; no entanto, 1 rata do grupo OUB e duas no grupo OIV morreram no pós-operatório (1º, 6º e 9º dias pós-

operatório, respectivamente) e outros 4 animais foram retirados do estudo, pois no momento da eutanásia não observamos a dilatação esperada do trato urinário (2 ratas no grupo OIV, 1 rata grupo OUu e 1 rata grupo OUb). Esta redução no número de animais não comprometeu o término do estudo, nem a análise estatística.

Os animais ficaram em gaiolas coletivas, separados segundo os grupos descritos acima, com condições adequadas de alimentação, água, 11 horas de claro e 13 horas de escuro, além de temperatura regulada e constante.

Todos os grupos ficaram 12h em gaiola metabólica previamente ao início do estudo para determinação do valor médio urinário basal de CA19-9, Ngal e creatinina. Os procedimentos realizados são descritos nas figuras 4 e 5.

Figura 4 - Sequência de eventos realizados nos animais dos grupos: Controle, Obstrução Infravesical, Obstrução Ureteral unilateral e Obstrução ureteral bilateral.


DIA (D) 0:	GAIOLA METABÓLICA COLETA DE URINA	
D 1:	ANESTESIA COLETA DE SANGUE PLEXO GENGIVAL PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	
D 13:	GAIOLA METABÓLICA COLETA DE URINA	
D 14:	ANESTESIA COLETA DE SANGUE DA VEIA CAVA CAUDAL EUTANÁSIA POR EXSANGUINAÇÃO RETIRADA DO TRATO URINÁRIO	

Figura 5 – Sequência de eventos realizados nos animais do grupo Obstrução Infravesical com desobstrução.

DIA (D) 0:	GAIOLA METABÓLICA COLETA DE URINA	
D 1:	ANESTESIA COLETA DE SANGUE PLEXO GENGIVAL PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	
D 6:	GAIOLA METABÓLICA COLETA DE URINA	
D 7:	ANESTESIA LAPAROTOMIA PARA DESOBSTRUÇÃO COLETA DE SANGUE	
D 13:	GAIOLA METABÓLICA COLETA DE URINA	
D 14:	ANESTESIA COLETA DE SANGUE DA VEIA CAVA CAUDAL EUTANÁSIA POR EXSANGUINAÇÃO RETIRADA DO TRATO URINÁRIO	

2.4 Anestesia

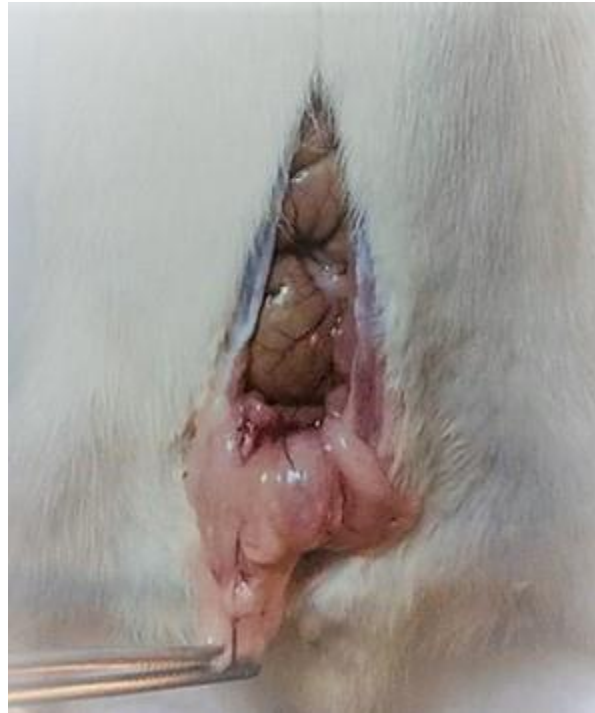
Para o procedimento cirúrgico os animais foram submetidos a anestesia intraperitoneal, sem sedação prévia, com Cetamina / Xilazina 60-90mg/Kg e 6-10mg/Kg do peso da rata, respectivamente. A punção e injeção do anestésico foram realizadas na fossa ilíaca direita com agulha de insulina (26G 13x0,45 mm).

2.5 Técnica Cirúrgica

Após a anestesia, os animais foram dispostos em mesa cirúrgica e fixados por meio de ataduras em seus membros. Feita tricotomia da região abdominal seguida de antissepsia com digliconato de clorexidina 2% e solução alcoólica.

Os animais do grupo controle foram submetidos à laparotomia mediana com manipulação de alças intestinais, bexiga e ureteres, seguido pelo fechamento da incisão cirúrgica em dois planos, aponeurose com sutura contínua com fio de nylon 5-0 e pele com pontos separados de nylon 5-0 (Figura 6).

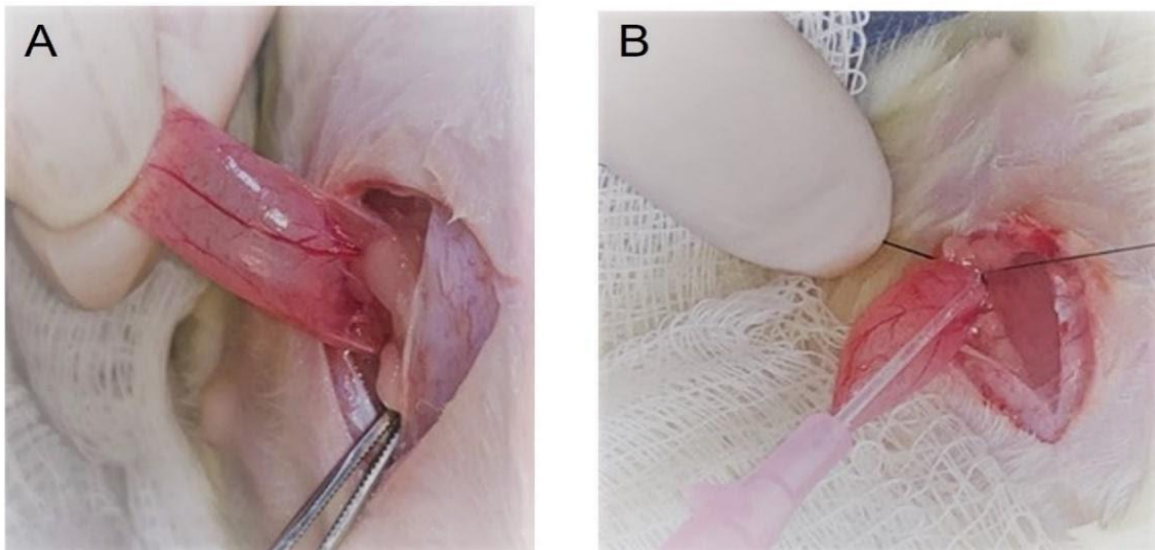
Figura 6 - Laparotomia com manipulação de alças e trato urinário no grupo controle.



Fonte: acervo do autor.

A obstrução infravesical (OIV) seguiu o modelo proposto por Long-Hu Jin *et al*, ou seja, após laparotomia mediana longitudinal inferior, a bexiga foi exposta cuidadosamente até o colo vesical, com a visualização da junção ureterovesical e uretra (JIN *et al*, 2011) (Figura 7A). Um fio de nylon 5-0 foi passado posteriormente à bexiga, sobre um cateter de intravenoso 20G (1,1 x 32 mm), e amarrado com o nó na face anterior da região infravesical. (Figura 7B). A seguir, o do cateter era retirado e verificávamos a oclusão parcial da bexiga com compressão da mesma e saída de urina via uretral.

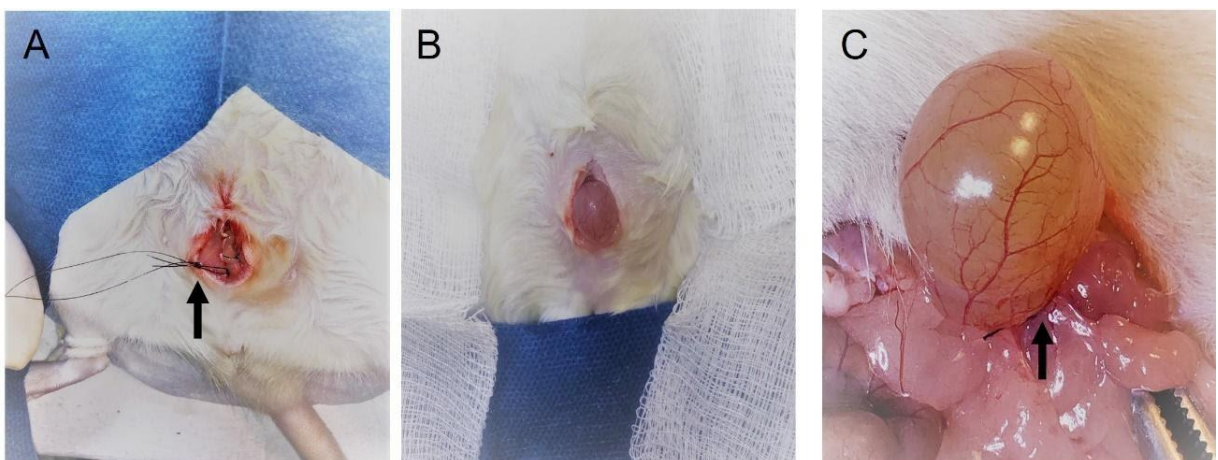
Figura 7 - Exposição da bexiga com visualização da junção ureterovesical (A) seguida de obstrução da região infravesical sobre um cateter 20 G para evitar oclusão completa (B).



Fonte: acervo do autor.

A obstrução infravesical seguida de desobstrução (OIVd) após 7 dias foi realizada como descrito para OIV, com a particularidade de manter uma alça do fio, que promoveu a obstrução, presa ao subcutâneo para facilitar a identificação posterior (Figura 8A). No 7º dia pós-operatório os animais foram novamente anestesiados e submetidos a laparotomia inferior com retirada do fio de nylon que envolvia a bexiga e a parede abdominal novamente fechada (Figura 8 B e C).

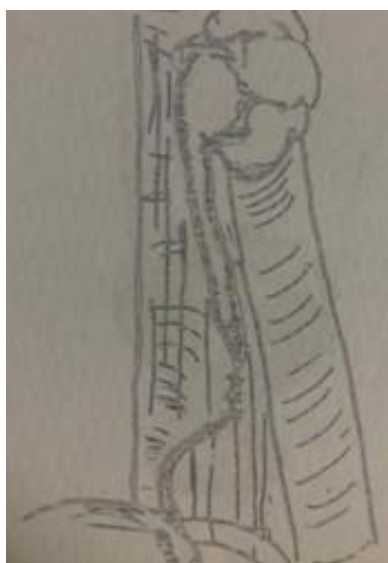
Figura 8 - Obstrução infravesical seguida de desobstrução: reabertura da parede abdominal inferior, identificado o fio de nylon (seta) a ser retirado, preso no subcutâneo do animal (A); bexiga distendida (B) com ponto no colo vesical (seta) (C).



Fonte: acervo do autor.

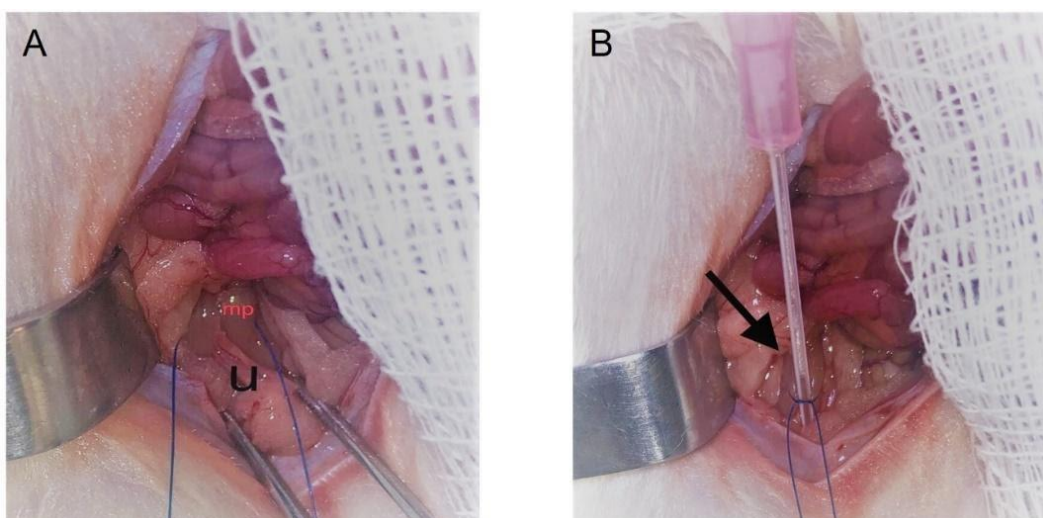
A obstrução ureteral parcial unilateral (OUu) seguiu o modelo proposto por ULM e MILLER (1962) modificada por outros autores (ULM e MILLER, em 1962; JOSEPHSON *et al*, 1983; STENBERG *et al*, 1988; THORNHILL *et al*, 2007) (Figura 9). Após laparotomia mediana identificamos rim, ureter direito e músculo psoas e logo abaixo da veia lombar inferior, o ureter foi envolvido pelo músculo psoas por meio de sutura simples com fio de prolene 5-0, sobre um cateter venoso 20G, promovendo obstrução parcial do ureter (Figura 10-A e B).

Figura 9 – Modelo de obstrução ureteral parcial unilateral.



Fonte: Ulm and Miller, 1962.

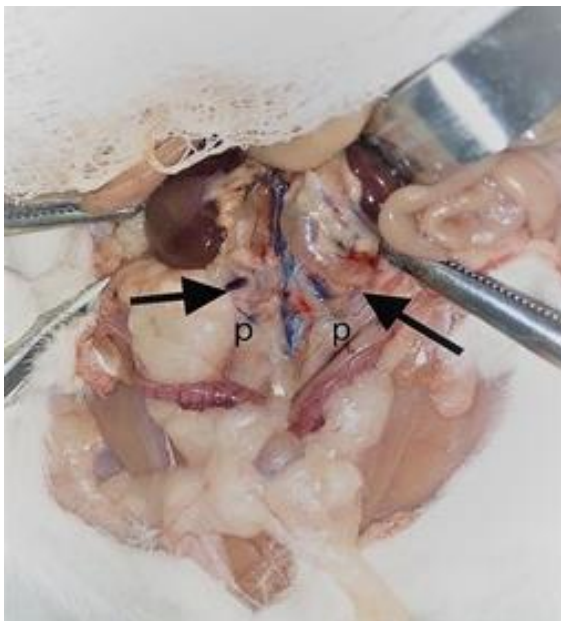
Figura 10 - Obstrução ureteral parcial unilateral. A: músculo psoas (mp) envolvendo ureter (u); B: fechamento do músculo sobre o ureter e um cateter venoso 20G (seta) para evitar oclusão completa.



Fonte: acervo do autor.

Nas ratas do grupo de obstrução ureteral parcial bilateral (OUb) realizamos a mesma técnica descrita para os animais do grupo OUu, que foi empregada tanto na obstrução do ureter direito, quanto do ureter esquerdo (Figura 11).

Figura 11 - Obstrução ureteral parcial bilateral: setas apontando para ureteres dilatados e a letra “p” indica a região obstruída com pontos de prolene 5-0.



Fonte: acervo do autor.

2.6 Cuidados pós-operatórios

Ao término do procedimento cirúrgico (primeira laparotomia) todos os animais receberam penicilina benzatina 40.000U por quilograma, intramuscular, em membro inferior esquerdo.

Após a recuperação anestésica, os animais voltaram para gaiolas coletivas separados conforme os grupos, com comida e água em livre demanda. Diariamente a cicatriz cirúrgica era avaliada para identificação de complicações. A atividade, a resposta a estímulos e o nível de dor de cada animal também foi observado durante todo período pós-operatório.

No 14º pós-operatório, os animais foram novamente anestesiados e submetidos a laparotomia com retirada do trato urinário com prévia visualização da veia cava caudal e colheita de 3 a 5 mL de sangue, em seguida todos os animais

sofreram eutanásia por exsanguinação da veia cava caudal. O descarte das carcaças seguiu as regras estabelecidas pelo biotério da UNINOVE.

2.7 Coleta de amostras

2.7.1 Urina

Antes do primeiro procedimento cirúrgico todos os grupos foram alocados em gaiolas metabólicas individuais (Figura 12) por 12 horas (tempo permitido pelo CEUA-UNINOVE), sem dieta e livre demanda de água, para coleta de urina (Tempo 0). No grupo OIVd houve uma segunda coleta de urina, seguindo o mesmo protocolo, no 6º pós-operatório, um dia antes da desobstrução (Tempo intermediário). Nova coleta de urina foi realizada no 13º pós-operatório nos grupos controle, OIV, OUu, OUb e, também no OIVd, com a individualização dos animais em gaiolas metabólicas, como descrito acima (Tempo 1). As amostras de urina foram armazenadas em tubos *ependorfs* de 1,5mL, centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm e a seguir congeladas em freezer a 80 graus Celsius negativos.

Figura 12 - Ratas alocadas em gaiolas metabólicas individuais.



Fonte: acervo do autor.

2.7.2 Soro

A primeira amostra sanguínea foi coletada do plexo gengival, após a anestesia do animal para o procedimento cirúrgico (Figura 13). Optou-se por este sítio de coleta na tentativa de obter quantidade de sangue suficiente para a dosagem dos três marcadores propostos para o estudo.

Figura 13 - Coleta de sangue do plexo gengival (seta) após anestesia geral da rata.



Fonte: acervo do autor.

A segunda coleta de sangue foi realizada por punção da veia cava caudal durante a laparotomia para exérese do trato urinário, no 14^o pós-operatório, com exceção do grupo OIVd, no qual a segunda coleta aconteceu durante a cirurgia de desobstrução (7^o pós-operatório), via plexo gengival e a terceira coleta foi realizada na cirurgia final da mesma forma que para os outros grupos.

Para as coletas de sangue, utilizamos tubos sem anticoagulantes, com posterior centrifugação das amostras a 10.000 rpm por 15 minutos. O soro foi aspirado e dividido em tubos *ependorfs* de 1,5 mL, os quais foram armazenados a menos 80 graus Celsius.

Todas as dosagens, tanto na urina como soro, foram realizadas ao mesmo tempo, após o fim das coletas, para diminuir a variação do método e otimizar a utilização dos kits.

2.8 Estudo anatomopatológico dos rins, ureteres e bexiga

Após exérese do trato urinário, rins e bexiga foram pesados (gramas). Os rins medidos longitudinalmente (milímetros) e a bexiga medida do colo vesical a cúpula vesical (milímetros). Após fixação em formol a 10%, as peças foram encaminhadas para o laboratório de histologia para análise da espessura do parênquima renal (milímetros) e a espessura do detrusor (milímetros).

Para o estudo macroscópico incluímos: a) todo trato urinário dos grupos controle, OIV e OIVd; b) rim e ureter direito (obstruído) no grupo OUu; c) rins e ureteres (bilaterais) no grupo OUb.

2.9 Estudo imuno-histoquímico

Realizamos estudo imuno-histoquímico em 29 rins e 13 bexigas com o objetivo de demonstrar a expressão do CA19-9 e seu local de produção, para tanto utilizamos o anticorpo primário CA19-9 (clone: 1116-NS-19-9, *Dako Corporation AS*, Califórnia, EUA). O tecido hepático foi usado como controle positivo. O laboratório APC-Apoio em Patologia Cirúrgica (São Paulo, Brasil) montou as lâminas e a leitura foi realizada com o apoio do laboratório de histologia da UNINOVE.

2.10 Análise laboratorial

Empregou-se o teste ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) na dosagem urinária e sanguínea de CA19-9 (Rat CA19-9, *Elabscience Biotechnology*, Houston, Texas, EUA) e Ngal (Ngal, *Elabscience Biotechnology*, Houston, Texas, EUA). As análises realizadas pelo Laboratório Especializado em Análises Científicas (LEAC LAB, São Paulo, Brasil) envolveram os seguintes passos: 1) a placa de microtubulação do kit foi pré-revestida com um anticorpo específico para Ngal ou CA 19-9 de rato; 2) as amostras foram adicionadas aos poços da placa e combinados como anticorpo específico; 3) após incubação por uma hora, em temperatura ambiente, as placas foram lavadas com água destilada; 4) em seguida, anticorpos de detecção biotinados específicos para Ngal/CA19-9 de rato e peroxidase de rábano-avidina (HRP) conjugados foram adicionados sucessivamente a cada poço da

microplaca. Os poços que continham Ngal/CA19-9 de rato, anticorpos de detecção biotinado e o conjugado HRP, apareceram na cor azul; 5) para finalização da reação, aplicou-se a solução de parada (stop solution) com modificação da coloração para cor amarela; 6) foi medida a densidade óptica (DO) por espectrofotometria em um comprimento de onda de $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. O valor de DO é proporcional à concentração quantitativa de Ngal/CA19-9 de rato; 7) calculado a concentração de Rat Ngal/CA19-9 das amostras, comparando a DO das amostras com a curva padrão.

A dosagem de creatinina urinária e sérica seguiu protocolos de rotina do ensaio colorimétrico (*Sarcosine Oxidase Method*, empresa Elabscience Biotechnology, Houston, Texas, EUA), realizados pelo laboratório de pesquisa científica LEAC LAB (São Paulo, Brasil).

2.11 Análise estatística

Os dados de anatomia patológica, imuno-histoquímica e os valores dos marcadores (CA19-9, Ngal e creatinina) foram tabulados para cada grupo de ratas.

A análise estatística foi realizada com pacote de software SPSS versão 26.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL) e GraphPad Prism 9.2.0 (Califórnia, EUA). A distribuição dos dados e a avaliação de normalidade foram realizadas com o Teste de Shapiro-Wilk. A análise descritiva das variáveis quantitativas com dados paramétricos foi feita com média e desvio padrão e comparadas com o teste T de Student. Quando a avaliação de mais de duas amostras foi incluída, utilizamos o teste de variância ANOVA com pós-teste de Tukey ou de Bonferroni. Os dados não paramétricos foram descritos como mediana e intervalo interquartil e tratados com os testes de Mann Whitney quando comparamos dois grupos ou de Kruskal-Wallis na análise de mais de dois grupos com pós-teste de Dunnet. O teste de Wilcoxon foi empregado para determinar a diferença pré-operatória e pós-operatória dos parâmetros. A análise das curvas de Características de Operação do Receptor (curvas ROC) foi utilizada para avaliar a acurácia diagnóstica dos biomarcadores com melhor sensibilidade e especificidade. A determinação do valor de corte foi realizada com o índice de Younden (YOUNDEN,1950). A área sob a curva (AUC) foi considerada satisfatória acima de 0,70.

Os valores médios do peso renal e vesical, comprimento renal e vesical, e espessura do parênquima renal foram comparados entre os grupos e analisados com o teste de variância ANOVA. A imunoeexpressão do CA19-9 foi tabulada e descrita como positiva ou negativa em rins e bexiga e tratada com o teste do Qui-quadrado.

Os níveis dos marcadores foram comparados, dentro do mesmo grupo, em relação aos valores urinários (absolutos e ajustados à creatinina urinária) e séricos nos seguintes momentos: inicial (antes do procedimento cirúrgico, denominado de tempo 0); final (após 13 dias para a urina e 14 dias para o sangue em relação a obstrução cirúrgica, denominado tempo 1) e intermediário, no grupo OIVd (coleta de urina após 6 dias e sangue após 7 dias da obstrução). Também comparamos os resultados obtidos nos grupos OIV, OIVd, OUu e OUb com o grupo controle.

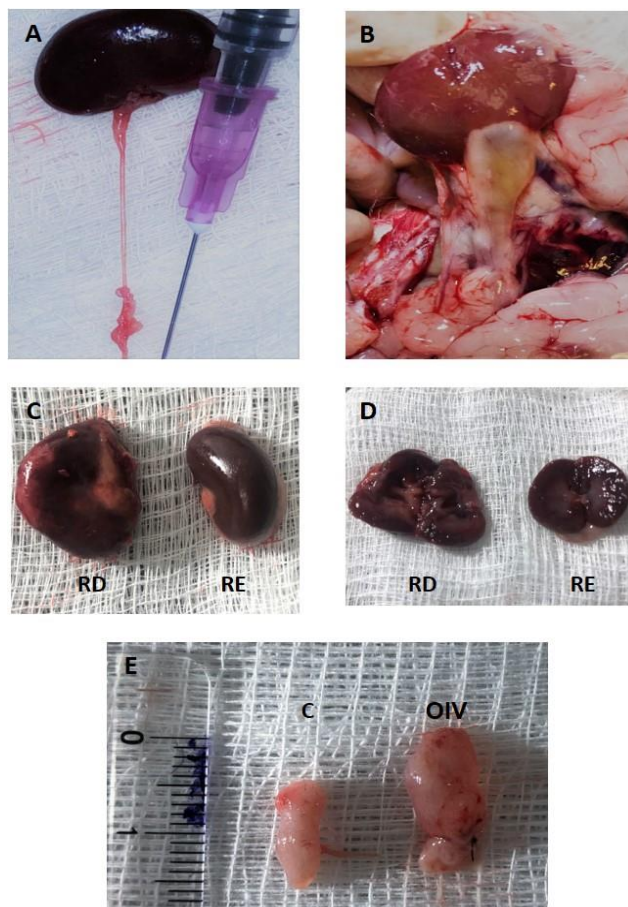
Valores de p igual ou menor que 0,05 ($p \leq 0,05$) foram considerados significativos.

O número de animais necessário para cada grupo foi calculado pelo programa G-power 3.1.9^a (Statistical Power Analyses for Windows and Mac encontrado no site <http://www.gpower.hhu.de/>) e método estatístico ANOVA, para intervalo de confiança de 80% e erro alfa de 5%.

3. RESULTADOS

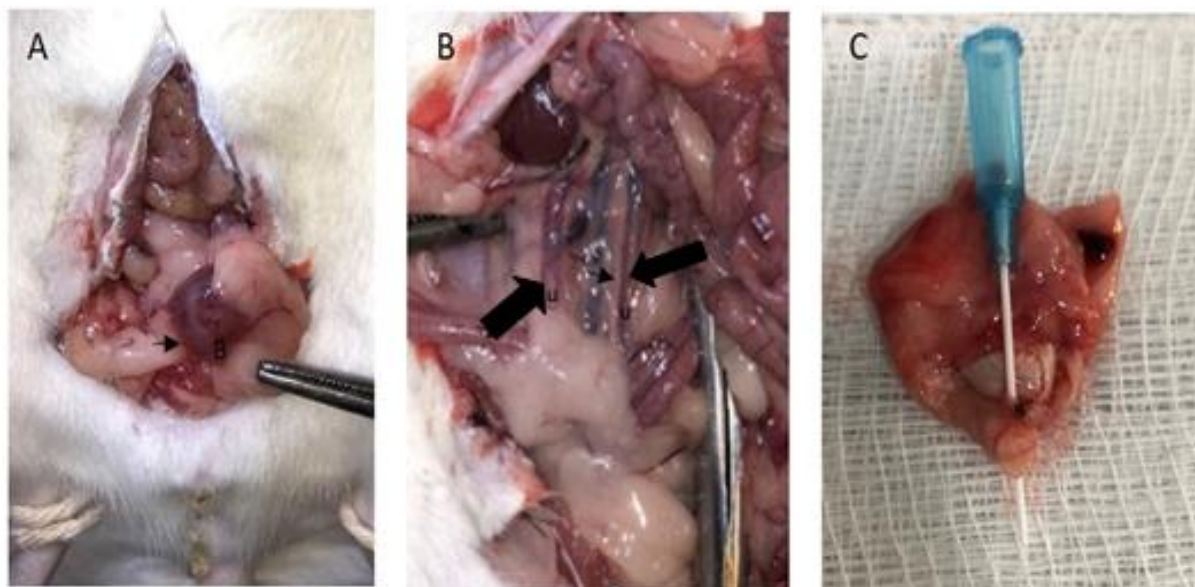
O estudo foi finalizado com 46 ratas com evidente dilatação do aparelho urinário à laparotomia (Figuras 14 A – E e 15).

Figura 14 - Diferenças macroscópicas do trato urinário parcialmente obstruído comparado ao grupo controle. A: rim e ureter da rata sem obstrução (ureter ao lado de uma agulha de insulina 24G); B: ureter e pelve renal dilatados após OUu; C: rim direito (RD) do grupo OUu, maior que o rim esquerdo (RE); D: evidente dilatação pielocalicial do rim direito (RD) em relação ao rim esquerdo (RE); E: bexiga à esquerda do grupo controle (C) e a direita, do grupo com obstrução infravesical (OIV).



Fonte: acervo do autor.

Figura 15 - Grupo OIV. Exame macroscópico durante laparotomia nos animais após 14 dias de obstrução infravesical. A: bexiga (B) distendida (seta); B: ureteres (u) dilatados (setas); C: exérese da bexiga e passagem de cateter (22 G) pelo colo vesical, demonstrando que a obstrução, apesar de parcial, promoveu grande aumento vesical.



Fonte: acervo do autor.

3.1 Anatomia Patológica

Na avaliação macroscópica do aparelho urinário consideramos as seguintes medidas: tamanho longitudinal do rim, distância entre o colo vesical e a cúpula da bexiga, espessura dos parênquimas renais e do detrusor e o peso dos rins e bexiga. Os resultados referentes aos grupos controles, OIV e OIVd são mostrados na Tabela 1.

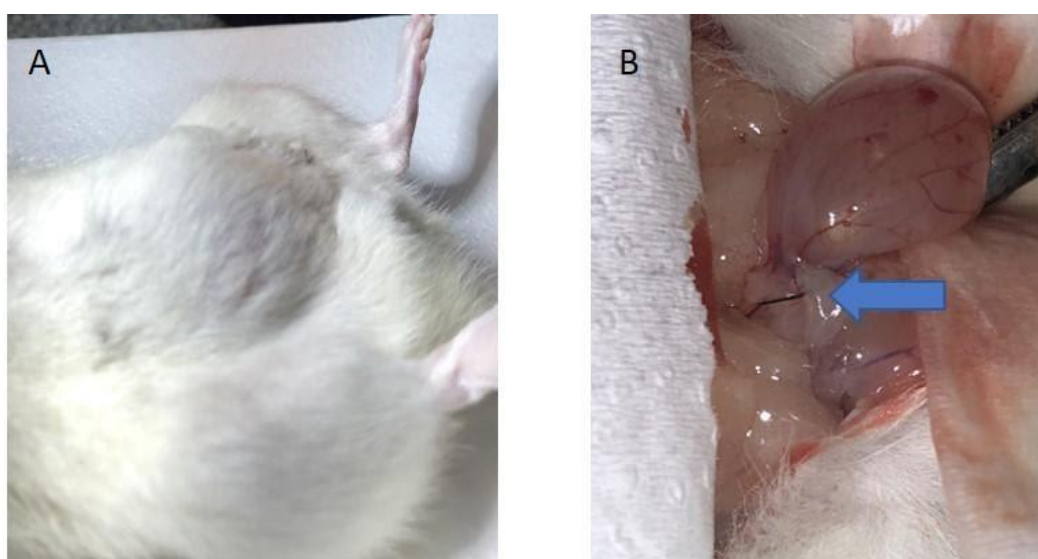
Tabela 1 - Valores médios da anatomia macroscópica do grupo Controle comparados aos observados nos grupos OIV e OIVd.

Grupo	Tamanho Longitudinal (mm)			Peso (g)			Parênquima (mm)		Detrusor (mm)
	RD	RE	Bx	RD	RE	Bx	RD	RE	Bx
Controle	16,2±1,3	15,5±1,7	9,7±2,1	1,1±0,1	1,0±0,1	0,1±0,0	4,2±1,0	3,8±0,8	0,8±0,3
OIV	17,5±3,2	17,5±2,1	18,1±7,2*	1,2±0,2	1,0±0,1	0,8±0,7*	4,7±1,1	3,2±0,5	1,4±1,6
OIVd	17,8±2,2	17,2±1,8	14,1±3,6*	1,1±0,8	1,0±0,1	0,3±0,2*	4,2±1,1	4,8±1,3	0,9±0,5

Legenda: OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical seguida por desobstrução; RD: rim direito; RE: rim esquerdo; Bex: bexiga, distância do colo vesical a cúpula da bexiga; mm; g: gramas; mm: milímetros. (*) $p \leq 0,05$.

No grupo OIV, observamos no momento da laparotomia para eutanásia, a dilatação de todo trato urinário, mas as alterações mais evidentes em relação ao grupo controle foram o tamanho ($p \leq 0,05$) e peso ($p \leq 0,05$) da bexiga. No grupo OIVd, mesmo com menor tempo de obstrução infravesical (7 dias), seguido por desobstrução, o tamanho e o peso vesical foram significativamente maiores quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$, para ambos, tamanho e peso) (Figura 16).

Figura 16 - Grupo obstrução infravesical com desobstrução. A: observa-se distensão vesical e B: bexiga exposta durante laparotomia para retirada do fio que envolve o colo vesical (seta).



Fonte: acervo do autor.

Nos grupos com OUu a direita, o peso e o tamanho do rim direito foram significativamente maiores que do grupo controle ($p \leq 0,05$). Enquanto na OUb, o tamanho renal foi maior que o controle tanto a direita como a esquerda ($p \leq 0,05$), e o peso foi significativamente maior a esquerda ($p \leq 0,05$) (Tabela 2).

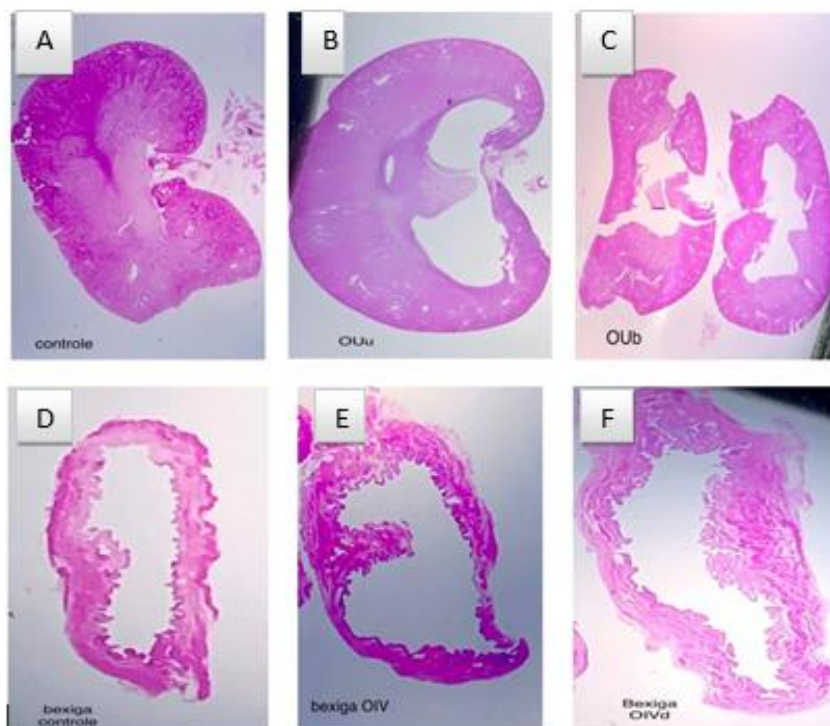
Tabela 2 - Valores médios da anatomia macroscópica do grupo Controle comparados aos grupos Obstrução Ureteral unilateral e Obstrução Ureteral bilateral.

Grupo	Tamanho longitudinal (mm)		Peso (g)		Parênquima (mm)	
	RD	RE	RD	RE	RD	RE
Controle	16,2 ±1,3	15,5±1,7	1,1±0,1	1,0±0,1	4,2±1,0	3,8±0,2
OUu	19,3±2,9*		1,3±0,1*		5,1±1,5	
OUB	18,5±2,2*	18,6±2,2*	1,1±0,1	1,1±0,2*	4,3±1,0	4,0±0,6

Legenda: OUu: obstrução ureteral unilateral; OUB: obstrução ureteral bilateral; RD: rim direito; RE: rim esquerdo; g: gramas; mm: milímetros;(*) $p \leq 0,05$.

A Figura 17 (painel superior) mostra os cortes histológicos dos rins dos grupos OUu e OUb com evidente dilatação da pelve renal em comparação com o grupo controle. Histologicamente, as bexigas obstruídas mostram maior distensão em comparação com as bexigas controle (painel inferior).

Figura 17 - Comparação de cortes histológicos de rins e bexigas nos diferentes grupos. A: rim controle; B: rim com obstrução ureteral unilateral (OUu); C; rim com obstrução ureteral bilateral (OUB); D: bexiga controle; E: bexiga com obstrução infravesical (OIV); F: bexiga com obstrução infravesical e desobstrução (OIVd). Coloração: hematoxilina-eosina.



Fonte: acervo do autor.

3.2 Análise Laboratorial

3.2.1 Urina

3.2.1.1 Antígeno Carboidrato CA19-9

3.2.1.1.1 Valores Absolutos (sem ajuste com a creatinina urinária)

A comparação entre os valores urinários do marcador CA19-9 foi realizada no tempo inicial ou basal (tempo 0 ou T0) e final (tempo 1 ou T1), sendo que no grupo OIVd obtivemos um valor intermediário (Ti) antes da desobstrução. A Tabela 3 e 4 e a Figura 18 mostram os valores do CA19-9 urinário para os grupos: controle, OIV, OIVd, OUu e OUb. Observamos significância estatística no aumento do CA19-9 entre T0 e T1 nos grupos OIV ($p \leq 0,05$) e OUb ($p \leq 0,05$), destacado na Figura 19.

No grupo OIVd houve do aumento significativo entre T0 e Ti ($p \leq 0,05$), e queda expressiva após a desobstrução do trato urinário, ou seja, entre Ti e T1 ($p \leq 0,05$), evidenciado na Figura 20. No grupo OUu, apesar da elevação no valor médio em T1, não encontramos significância ($p \leq 0,05$).

Comparamos ainda os grupos obstruídos com o grupo controle nos tempos T1 e Ti e observamos significância estatística no aumento do valor do marcador em todos os grupos obstruídos ($p \leq 0,05$) (Tabela 5 e Figura 21).

Tabela 3 - Comparação entre os tempos de coleta nos grupos: Controle, Obstrução infravesical e Obstrução Infravesical seguida de desobstrução, dos valores urinários, absolutos, de CA19-9(IU/mL).

	Controle		OIV		OIVd		
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1
Mediana	2,63	1,43	1,80	5,23*	1,60	3,51*	1,37**
IQ	4,20	1,44	1,57	81,88	1,94	50,35	1,87

Legenda: IQ: intervalo interquartilico; OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical seguida de desobstrução; T0: tempo basal; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário; * $p \leq 0,05$ na comparação de aumento do marcador em relação ao tempo basal; ** $p \leq 0,05$ na comparação de queda do marcador após a desobstrução.

Tabela 4 -Comparação entre os tempos de coleta nos grupos: Obstrução Ureteral unilateral e Obstrução Ureteral bilateral, dos valores urinários, absolutos, de CA19-9 (IU/mL).

	OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1
Média	2,34	6,35	2,57	8,06*
DP	1,13	5,15	1,93	6,56

Legenda: DP: desvio padrão; OUu (obstrução ureteral unilateral) e OUb (obstrução ureteral bilateral); T0: tempo basal; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário; * $p \leq 0,05$ na comparação de aumento do marcador em relação ao tempo basal.

Figura 18 - Comparação dos valores urinários absolutos do CA19-9, iniciais e após o procedimento cirúrgico nos grupos: Controle, Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical seguida de desobstrução (OIVd), Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral bilateral (OUb).

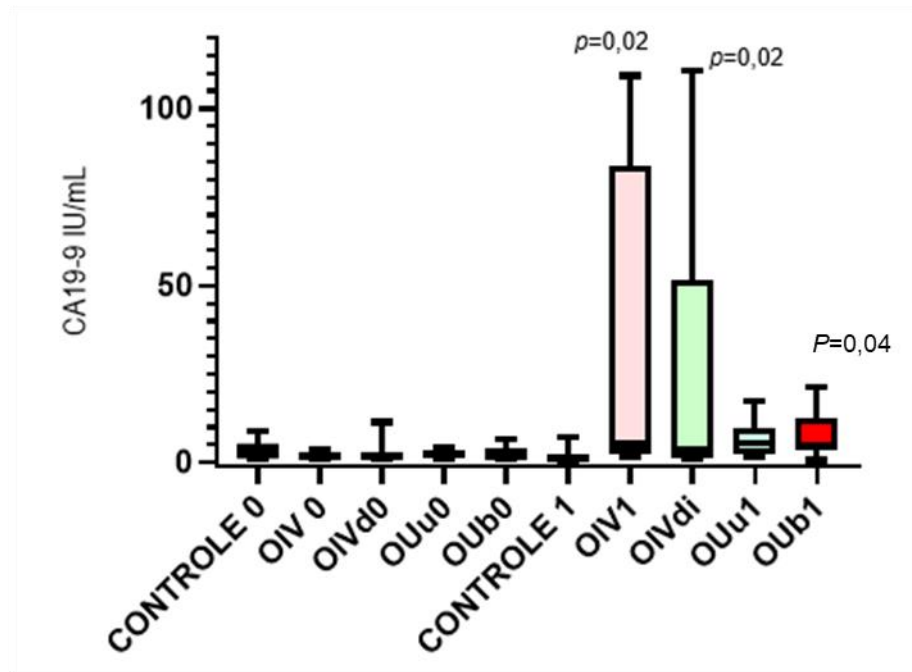


Figura 19 - Comparação dos valores urinários do CA19-9 basal (0) e final (1) nos grupos obstrução infravesical (OIV) e obstrução ureteral bilateral (OUb).

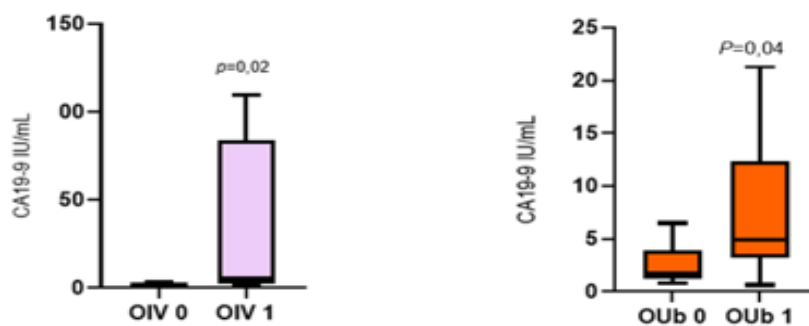


Figura 20 - Comparação dos valores urinários do CA19-9, inicial (0), intermediário(i) e após desobstrução (1) no grupo obstrução infravesical seguida de desobstrução (OIVd).

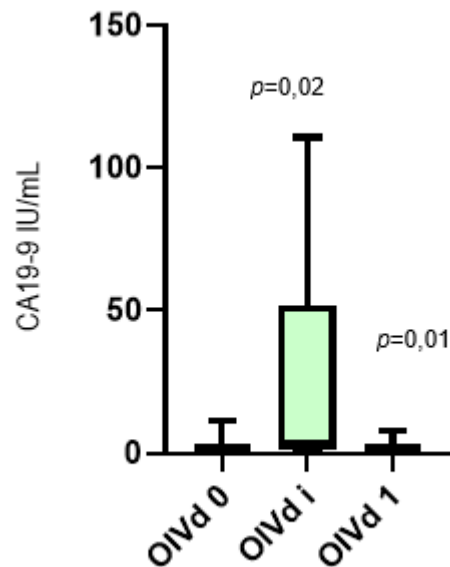
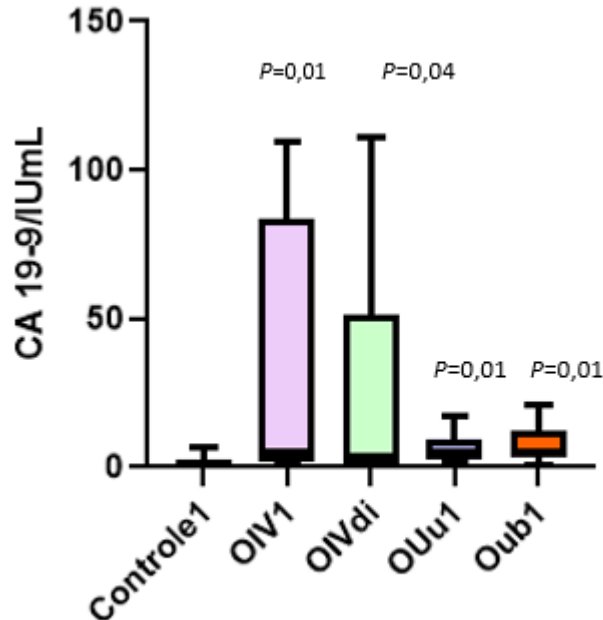


Tabela 5 – Comparação dos valores urinários, absolutos, de CA19-9 (IU/mL) entre os grupos obstruídos e o grupo controle em T1 e Ti.

	Controle T1	OIV T1	OIVd Ti	OUn T1	OUn T1
Mediana	1,43	5,23*	3,51*	5,55*	4,88*
IQ	1,44	81,88	50,35	7,39	9,19

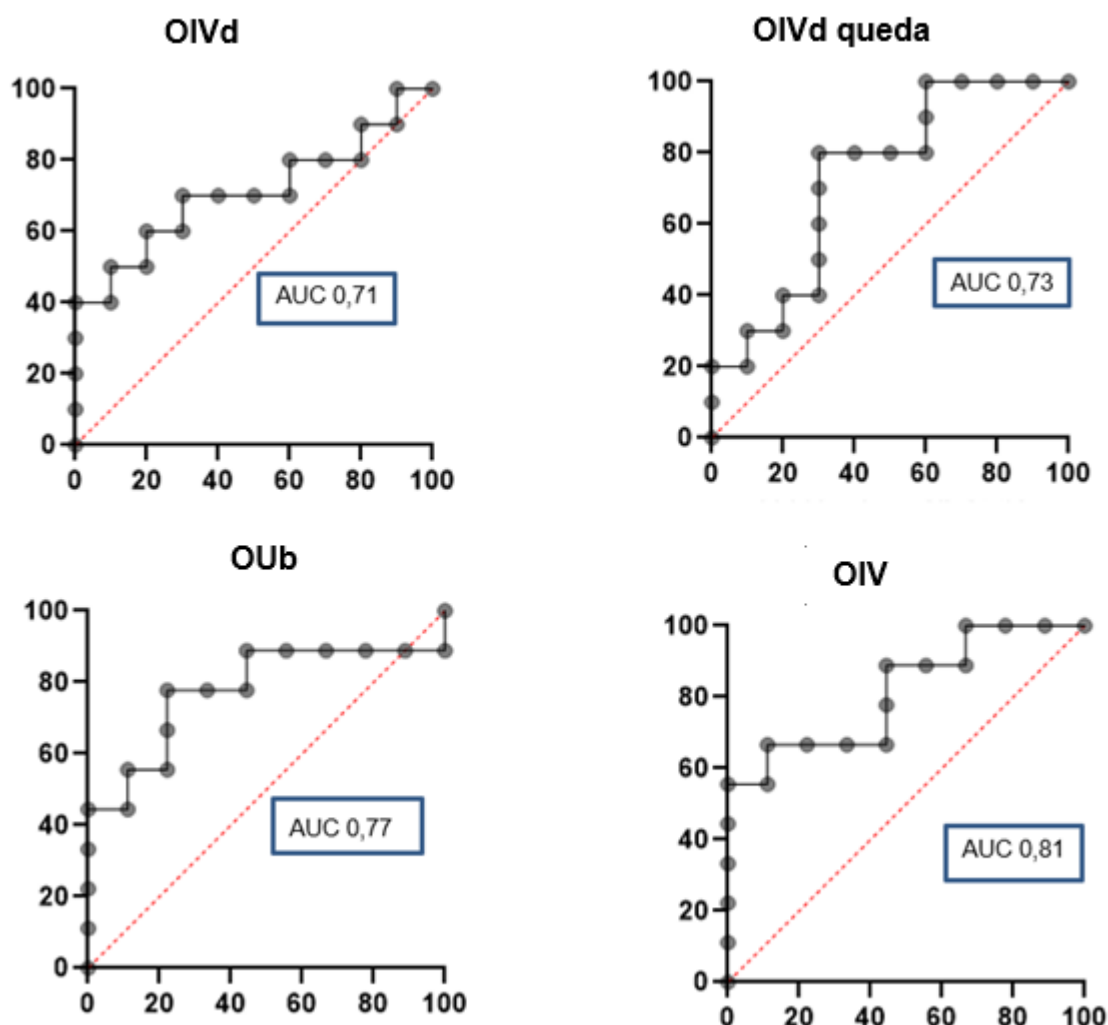
Legenda: Valores das concentrações urinárias de CA19-9 em IU/mL expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ). OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUn: obstrução ureteral unilateral, OUn: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo basal; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário; * $p \leq 0,05$ comparando grupos obstruídos com o controle.

Figura 21 - Comparação dos valores urinários do CA19-9, após a obstrução nos grupos: Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd), Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral bilateral (OUb), no tempo final (1) e intermediário (i), comparados ao tempo final (1) do grupo Controle.



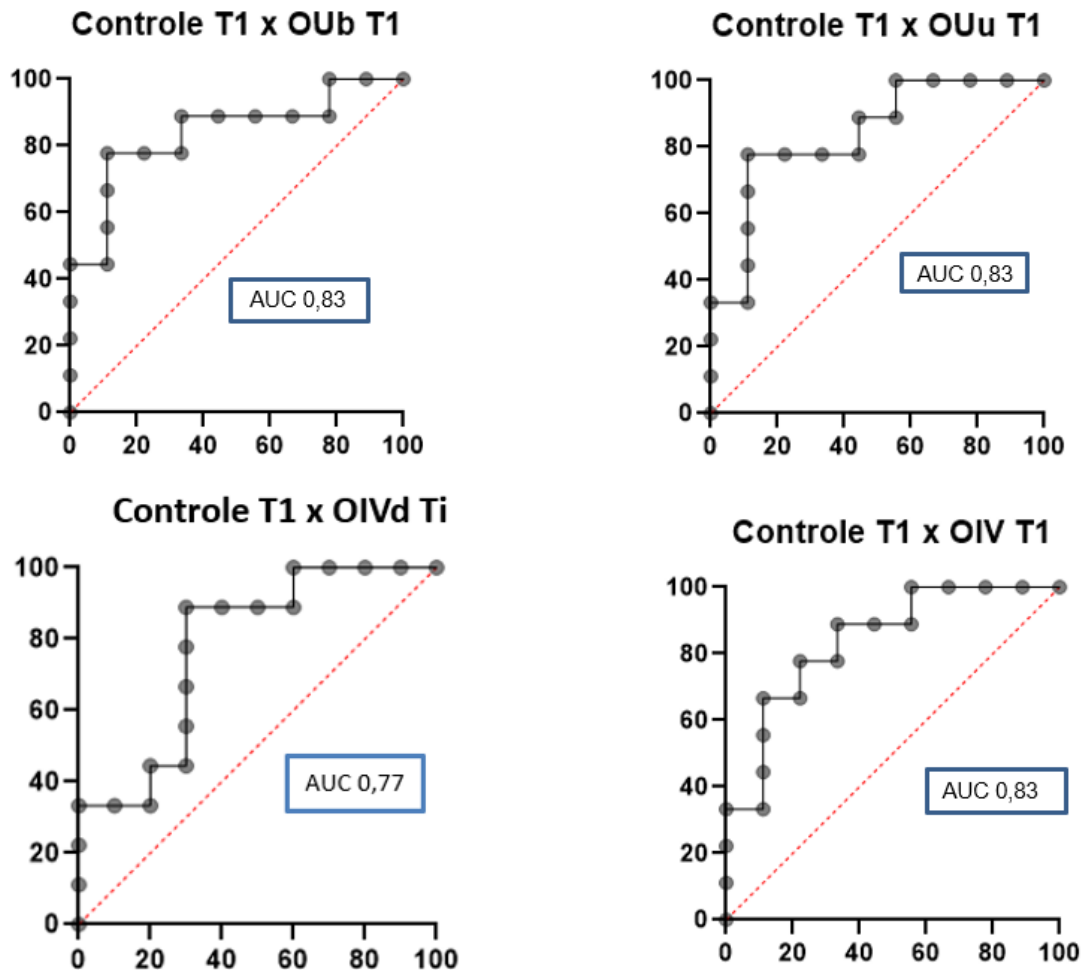
As curvas Características de Operação do Receptor, curvas ROC, foram desenhadas com o objetivo de avaliar as propriedades diagnósticas do CA19-9 urinário nos grupos estudados, nos quais houve significância na elevação e/ou queda dentro do mesmo grupo. No grupo OIV a área sob a curva (AUC) foi de 0,81 (95% do intervalo de confiança de 0,61 a 1) e valor de corte de 2,67 IU/mL. No grupo OIVd a curva ROC que retrata a elevação 6 dias após a obstrução mostrou AUC de 0,71 (95% IC 0,47 a 0,94) e valor de corte de 2,79 IU/mL. A curva ROC após desobstrução do grupo OIVd apresentou AUC de 0,73 (95% de IC 0,50 a 0,95) e valor de corte de 2,53 IU/mL. A avaliação da curva ROC para o grupo OUb atingiu AUC de 0,77 (95% de IC 0,54 a 1) e valor de corte de 3,68 IU/mL (Figura 22).

Figura 22 - Curvas ROC da concentração do CA19-9 urinário nos grupos Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd) durante a obstrução e a queda após a desobstrução e grupo Obstrução Ureteral Bilateral (OUb).



Na comparação com o grupo controle o valor urinário do CA19-9 aumentou significativamente em todos os grupos, inclusive no grupo OUu (Figura 23). Os resultados das curvas ROC dessa análise foram para: o grupo OIV com AUC 0,83 (95% IC 0,65 a 1) e valor de corte de 2,82 IU/mL; grupo OIVd com AUC 0,77 (95% IC 0,56 a 0,99) e valor de corte de 2,56 IU/mL; grupo OUu com AUC 0,83 (95% IC 0,65 a 1) e valor de corte de 2,67 IU/mL; grupo OUb com AUC 0,83 (95% IC 0,64 a 1) e valor de corte 3,32 IU/mL (Figura 23).

Figura 23 - Curvas ROC da concentração do CA19-9 urinário nos grupos Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd), e Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral Bilateral (OUB) comparados ao tempo inicial (1) do grupo Controle.



3.2.1.1.2 Valores ajustados à creatinina urinária

Os valores de biomarcadores urinários ajustados à creatinina urinária têm sido largamente utilizados na literatura para padronização e diminuição do impacto da hidratação nessas medidas. Os resultados obtidos nas comparações da relação CA 19-9/creatinina urinária entre os grupos e entre o grupo controle e os animais obstruídos são mostrados nas tabelas 6 e 7, com significância ($p \leq 0,05$) nos grupos OIV, e OUB e na queda do marcador após desobstrução do grupo OIVd. Apesar da

elevação do CA19-9 ajustado no Ti do grupo OIVd esse valor não foi significativo. Os gráficos referentes a essa análise compõem as Figuras 24, 25 e 26.

Tabela 6 - Comparação dos valores do CA19-9/creatinina urinária (IU/mg) em cada grupo em T0, T1 e Ti.

	Controle		OIV		OIVd			OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1	T0	T1	T0	T1
Mediana	0,24	0,08	0,10	0,21*	0,12	0,50	0,04**	0,09	0,20	0,08	0,32*
IQ	0,42	0,25	0,15	3,94	0,36	1,76	0,13	0,19	3,75	0,16	0,47

Legenda: OIV: obstrução infravesical; OIVd (obstrução infravesical seguida de desobstrução); OUu (obstrução ureteral unilateral) e OUb (obstrução ureteral bilateral); T0: tempo inicial; Ti: tempo intermediário; T1: tempo final; * $p \leq 0,05$ na comparação de aumento do marcador em relação ao tempo basal; ** $p \leq 0,05$ na comparação de queda do marcador após a desobstrução.

Tabela 7 - Comparação dos valores CA19-9/creatinina urinária (IU/mg) entre os grupos obstruídos e o grupo controle.

	Controle	OIV	OIVd	OUu	OUb
	T1	T1	Ti	T1	T1
Mediana	0,08	0,21*	0,50	0,20*	0,32*
IQ	0,25	3,94	1,76	3,75	0,47

Legenda: OIV (obstrução infravesical); OIVd (obstrução infravesical seguida de desobstrução); OUu (obstrução ureteral unilateral) e OUb (obstrução ureteral bilateral); T0: tempo inicial; Ti: tempo intermediário; T1: tempo final; * $p \leq 0,05$ na comparação de aumento do marcador em relação ao grupo controle.

Figura 24 - Comparação dos valores urinários do CA19-9/creatinina urinária, iniciais e após procedimento cirúrgico, em cada grupo.

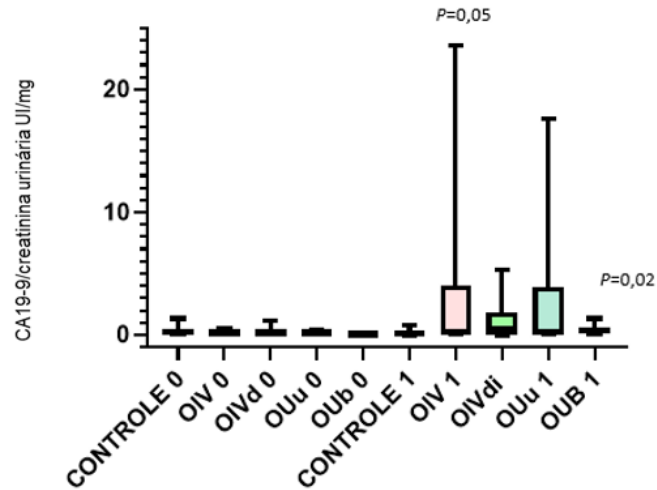


Figura 25 - Comparação dos valores urinários do CA19-9/creatinina urinária no tempo final (1) e no tempo intermediário (i) entre o grupo Controle e os grupos obstruídos.

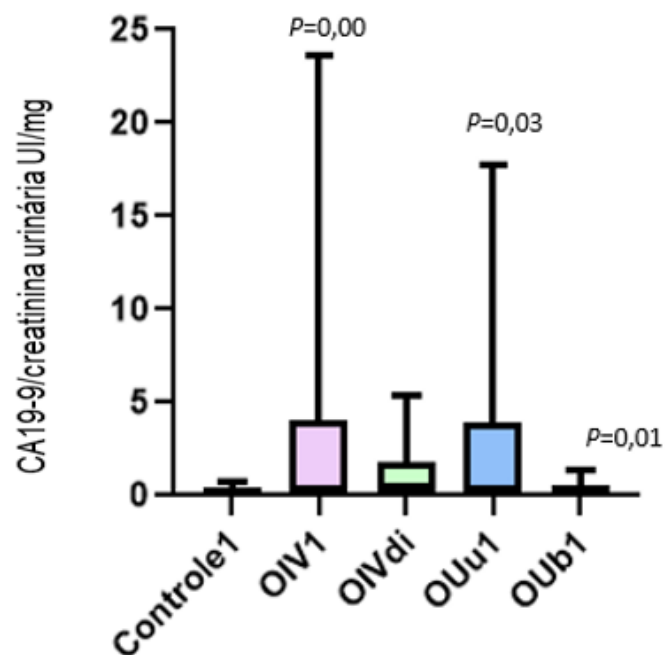
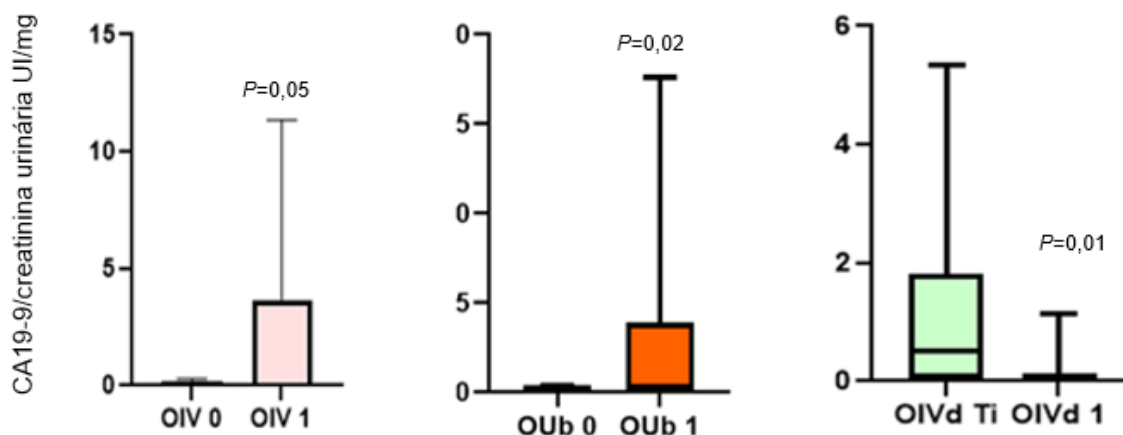


Figura 26 - Comparação dos valores urinários do CA19-9/creatinina urinária inicial (0), final (1) e intermediário (i) nos grupos Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução OIVd (queda) e Obstrução Ureteral bilateral (OUB).



As curvas ROC dos grupos com bom desempenho são representadas na figura 27. No grupo OIV a AUC foi de 0,81 (95% IC 0,60 a 1) com valor de corte de 0,13 IU/mg. No grupo OIVd a diminuição do valor ajustado do CA19-9 obteve AUC de 0,75 (95%IC 0,53 a 0,97) e valor de corte de 0,05 IU/mg. No grupo OUu a AUC foi de 0,77 (95% IC 0,53 a 1) e valor de corte 0,13 IU/mg. Por fim, o valor da AUC no grupo OUB foi 0,83 (95% IC 0,65 a 1) e valor de corte de 0,25 IU/mg.

Na comparação do CA19-9 ajustado entre o grupo controle e os grupos obstruídos em T1 observamos os seguintes resultados das curvas ROC: grupo OIV a AUC foi de 0,81 (95% IC 0,60 a 1) com valor de corte de 0,13 IU/mg. O grupo OUu a AUC foi de 0,80 (95% IC 0,58 a 1) e valor de corte 0,13 IU/mg. Finalmente, o valor da AUC no grupo OUB foi 0,77 (95% IC 0,55 a 1) e valor de corte de 0,09IU/mg (Figura 28).

Figura 27 - Curvas ROC da elevação da concentração do CA19-9/creatinina urinária nos grupos Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução OIVd (queda) e Obstrução Ureteral bilateral (OUB).

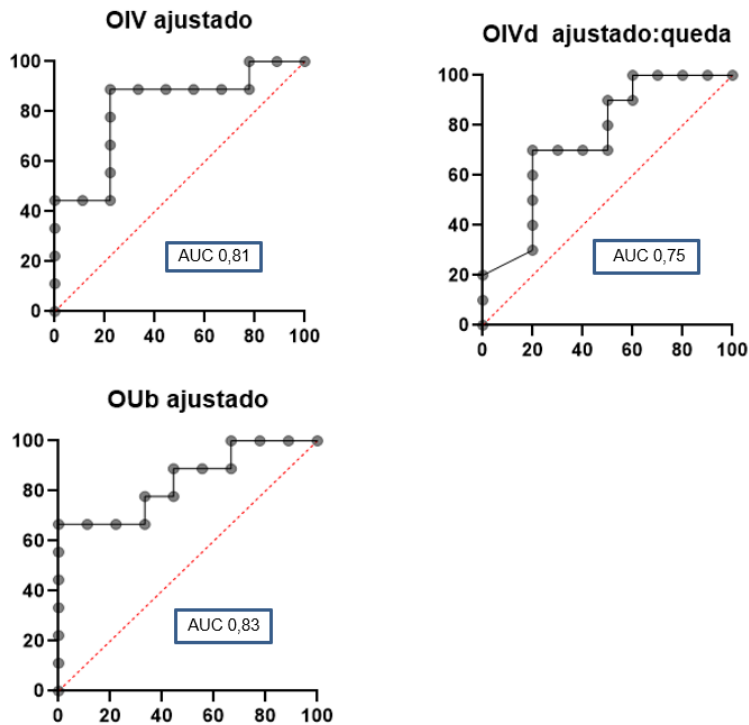
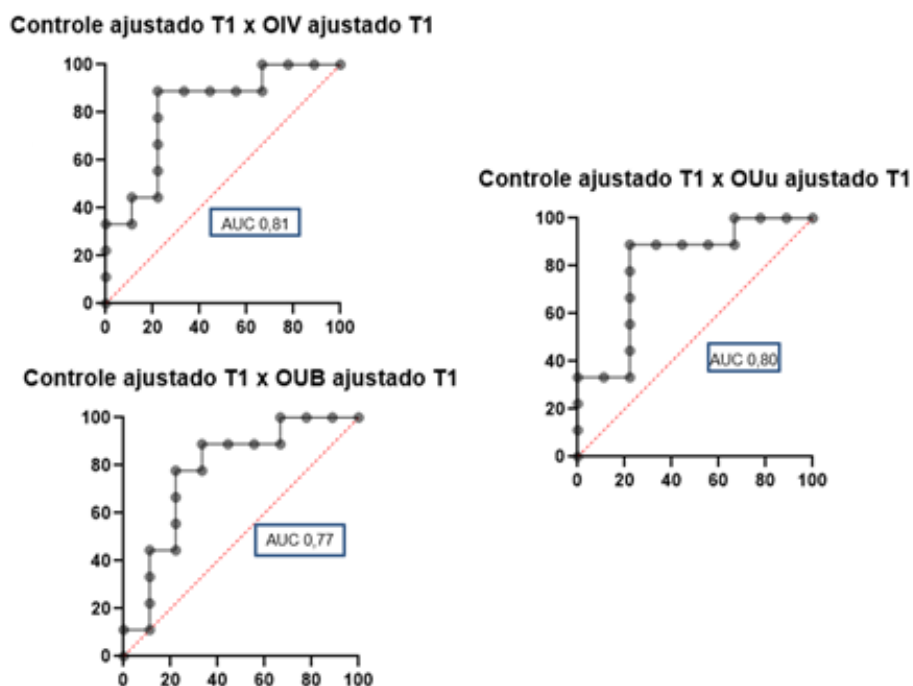


Figura 28 - Curvas ROC do CA 19-9/creatinina urinária dos grupos obstruídos: Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Ureteral unilateral (OUu) e Obstrução Ureteral bilateral (OUB), nos tempos finais (T1) comparados ao grupo Controle.



3.2.1.2 Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrófila (Ngal)

3.2.1.2.1 Valores absolutos

Da mesma forma que o CA19-9, os valores do marcador uNgal foram comparados entre os animais do mesmo grupo nos tempos já descritos. Observamos redução no valor médio final da uNgal no grupo controle e no grupo OUu, nos demais grupos houve aumento da uNgal após o procedimento de obstrução do trato urinário. Encontramos significância estatística no grupo OIV ($p \leq 0,05$). Apesar de o maior valor médio final nos grupos OIVd e OUb e da queda do uNgal após a desobstrução do grupo OIVd, estes achados não foram significativos. Os resultados são apresentados na Tabela 8 e Figura 29.

Realizamos a curva ROC do uNgal no grupo OIV que apresentou melhor desempenho, a qual foi considerada satisfatória, com valor da AUC de 0,72 (95% IC 0,48 a 0,96) e valor de corte de 1101,68 pg/mL (Figura 30).

Tabela 8 - Comparação dos valores absolutos de uNgal (pg/m) inicial (T0), intermediário (Ti) e final (T1) em cada grupo.

	Controle		OIV		OIVd			OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1	T0	T1	T0	T1
Média	1288,12	1222,67	1173,94	1683,42*	1560,63	1710,86	1392,11	1569,09	1468,66	1405,75	1725,44
DP	347,35	283,62	595,70	627,12	447,78	659,95	579,57	441,62	497,92	258,17	401,03

Legenda: DP: desvio padrão; OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUu: obstrução ureteral unilateral; OUb: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo inicial; T1: tempo final; *aumento considerando significativo, $p \leq 0,05$.

Figura 29 - Comparação dos valores urinários absolutos da Ngal, inicial e após o procedimento cirúrgico, em cada grupo.

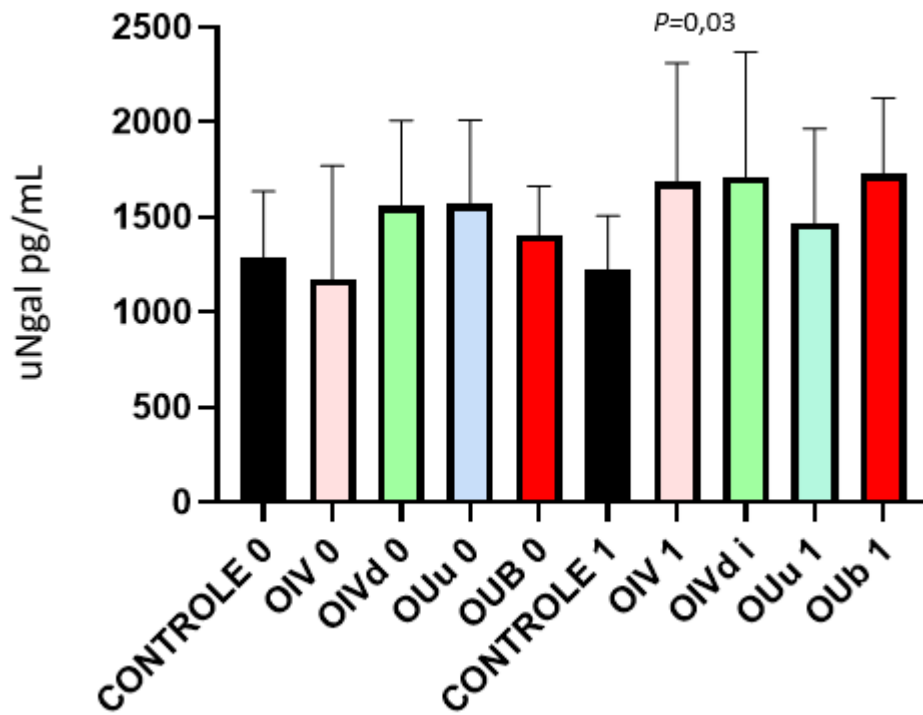
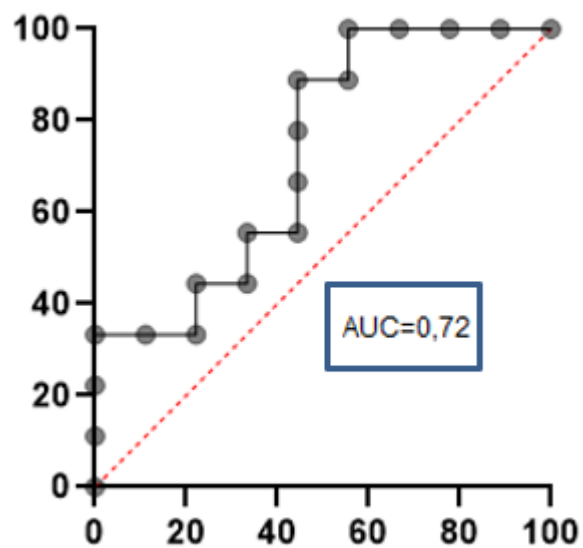


Figura 30 - Curva ROC do valor absoluto da uNgal do grupo Obstrução Infravesical (OIV).



A comparação dos valores da uNgal entre os grupos obstruídos e o grupo controle mostrou que o grupo OIVd, em Ti, e o grupo OUb obtiveram uma elevação significativa ($p \leq 0,05$) com AUC satisfatória para o OIV de 0,73 (95% IC 0,47 a 0,98) e valor de corte de 1521,75 pg/mL e para OUb de 0,85 (95 % IC 0,66 a 1), valor de corte de 1662,64 pg/mL (Tabela 9 e Figuras 31 e 32).

Tabela 9 - Comparação dos valores absolutos de uNgal (pg/mL) no tempo Ti eT1 dos grupos obstruídos com T1 do grupo controle.

	Controle T1	OIV T1	OIVd Ti	OUn T1	OOb T1
Média	1222,67	1683,42	1710,86*	1468,66	1725,44*
DP	283,62	627,12	659,95	497,92	401,03

Legenda: DP: desvio padrão; OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUn: obstrução ureteral unilateral; OOb: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo basal; T1: tempo final; * aumento considerando significante, $p \leq 0,05$.

Figura 31 - Comparação dos valores absolutos da uNgal, após a obstrução nos grupos: Obstrução Infravesical (OIV), Obstrução Infravesical e desobstrução (OIVd), Obstrução Ureteral unilateral (OUn) e Obstrução Ureteral bilateral (OOb), no tempo final (1) e no tempo intermediário (i), comparados ao grupo Controle

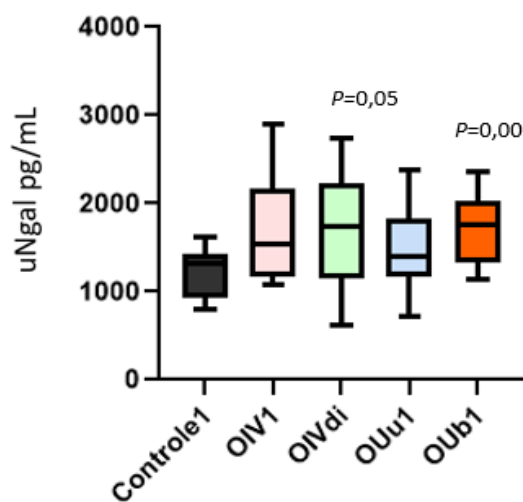
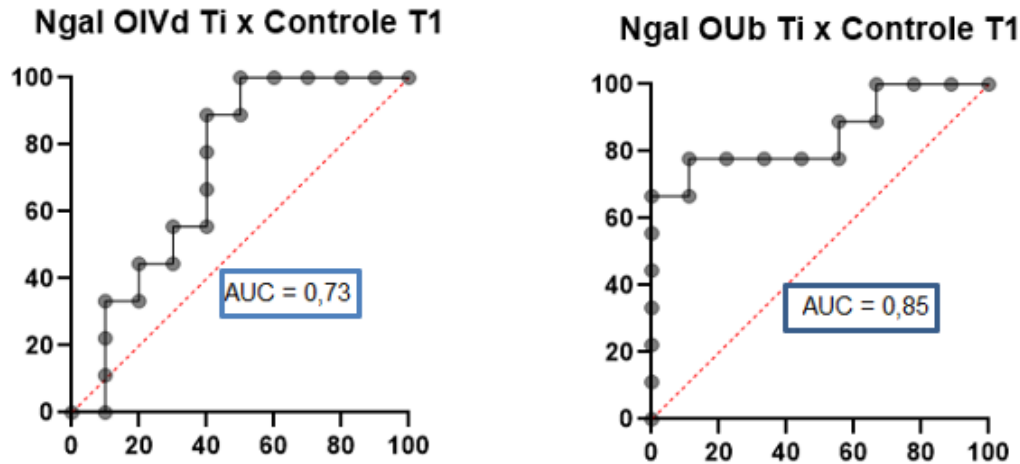


Figura 32 - Curvas ROC da elevação da uNgal no grupo Obstrução Ureteral bilateral (OUB) e Obstrução infravesical e desobstrução (OIVd) no tempo inicial (1) e no tempo intermediário (i) em relação ao grupo Controle.



3.2.1.2.2 Valores ajustados da uNgal à creatinina urinária

Semelhante ao CA19-9, realizamos o estudo do valor da uNgal ajustada à creatinina urinária. Diferentemente dos valores absolutos, observamos significância estatística apenas na comparação entre T0 e T1 no grupo OUB ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos são descritos na Tabela 10. A curva ROC desse grupo apresentou AUC 0,86 (95% IC 0,68 a 1) e valor de corte de 60,37 pg/mL (Figuras 33 e 34). Os resultados, comparando os valores encontrados, nos grupos obstruídos em T1 e Ti e os valores de T1 no grupo controle não mostraram significância (Tabela 11).

Tabela 10 - Comparação dos valores de uNgal/creatinina urinária (pg/mg) entre os tempos T0, Ti e T1.

	Controle		OIV		OIVd			OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1	T0	T1	T0	T1
Mediana	47,13	55,89	42,05	105,01	117,57	54,99	54,11	80,21	137,68	51,93	83,75 *
IQ	179,23	162,98	171,09	188,83	296,38	49,52	106,05	42,83	770,19	23,19	55,64

Legenda: Valores das concentrações urinárias de uNgal/creatinina urinária, expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ). OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUu: obstrução ureteral unilateral, OUb: obstrução ureter bilateral; T0: tempo inicial; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário; *consideramos significância com $p \leq 0,05$.

Tabela 11 - Comparação dos valores de uNgal/creatinina urinária (pg/mg) entre os tempos T0 e T1 com T1 do grupo controle.

	Controle	OIV	OIVd	OUu	OUb
	T1	T1	Ti	T1	T1
Mediana	55,89	105,01	54,99	137,68	83,75
IQ	162,98	188,83	49,52	770,19	55,64

Legenda: Valores das concentrações urinárias de uNgal/creatinina urinária, expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ). OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUu: obstrução ureteral unilateral, OUb: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo inicial; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário.

Figura 33 - Comparação dos valores da uNgal/creatinina urinária, inicial e após o procedimento cirúrgico, em cada grupo.

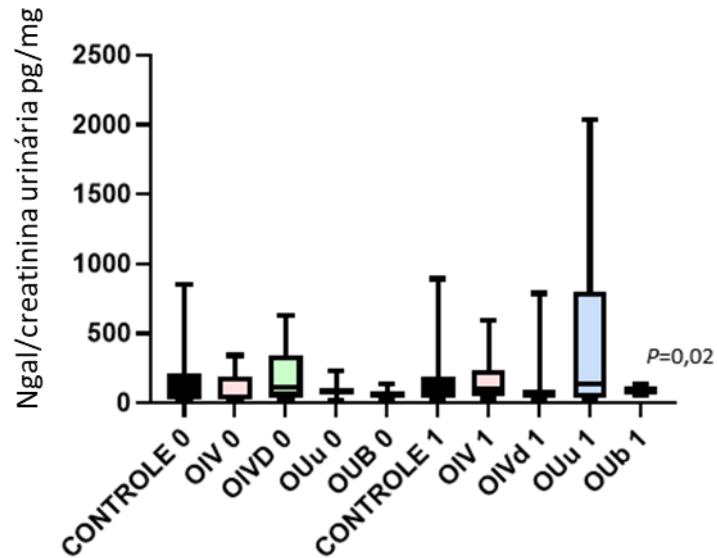
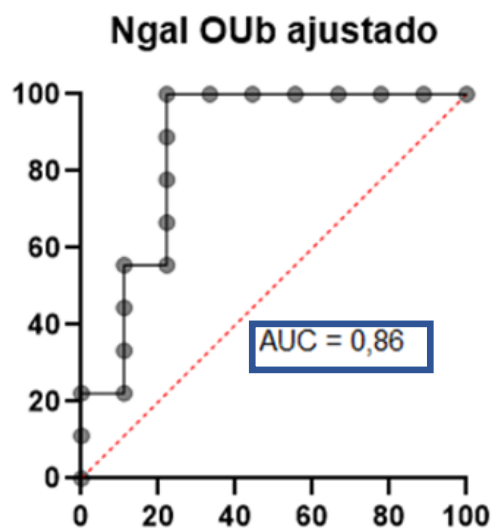


Figura 34 - Curva ROC da elevação da uNgal/creatinina no grupo Obstrução Ureteral Bilateral (OUB).



3.2.1.3 Creatinina Urinária

Realizamos a comparação dos valores urinários da creatinina entre os animais do mesmo grupo nos 3 tempos padrões. Observamos aumento não significativo da creatinina urinária no 13^o dia pós-operatório nos grupos: controle, OIV e OUu, enquanto no grupo OUb houve redução no valor de creatinina urinária neste período. No grupo OIVd, a creatinina urinária aumentou significativamente após 6 dias de obstrução infravesical ($p \leq 0,05$) e permaneceu elevada mesmo após a desobstrução. Os dados são descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Comparação dos valores de creatinina urinária (mg/dL) em T0, T1 e Ti.

	Controle		OIV		OIVd			OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1	T0	T1	T0	T1
Média	19,79	24,39	19,78	20,61	16,06	31,07*	31,09	20,11	21,24	24,93	20,18
DP	11,81	16,83	9,72	13,96	10,63	15,55	18,87	6,48	20,52	2,10	2,68

Legenda: DP: desvio padrão; OIV: obstrução infravesical; OUu: obstrução ureteral unilateral; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUb: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo basal; Ti: tempo intermediário; T1: tempo final.; * considerando $p \leq 0,05$.

3.2.2 Sangue

3.2.2.1 Antígeno Carboidrato CA19-9 Sérico

Os valores séricos do marcador CA19-9 foram comparados entre os animais do mesmo grupo nos 3 tempos estudados. Os dados são apresentados na Tabela 13. Nos grupos OIV e OUb, houve aumento do CA19-9 no tempo 1 em relação ao valor basal, mas não atingiu diferença significativa. Nos demais grupos, observamos diminuição dos valores séricos desse marcador após os procedimentos cirúrgicos.

Tabela 13 - Comparação dos valores de CA19-9 sérico (IU/mL) em T0, T1 e Ti.

	Controle		OIV		OIVd			OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1	T0	T1	T0	T1
Mediana	40,14	18,15	13,01	13,77	18,43	10,18	13,23	27,72	22,47	20,35	23,87
IQ	22,29	12,31	16,60	20,57	29,32	11,44	22,60	40,66	9,41	23,30	14,66

Legenda: Valores das concentrações séricas de CA 19-9 são expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ). OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUu: obstrução ureteral unilateral, OUb: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo basal; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário.

3.2.2.2 Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos sérica

Adotamos o mesmo critério na avaliação sérica do marcador Ngal. Os dados são apresentados na Tabela 14. Com exceção do grupo OIV, que mostrou discreto aumento não significativo da Ngal sérica após a obstrução, os demais grupos evoluíram com redução da Ngal após a obstrução comparada ao valor inicial.

Tabela 14 - Comparação dos valores de Ngal sérica (pg/mL) em T0, T1 e Ti.

	Controle		OIV		OIVd			OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1	T0	T1	T0	T1
Mediana	758,73	350,10	207,52	259,32	603,10	118,32	137,28	1458,01	190,38	311,87	307,09
IQ	1023,83	338,43	315,43	248,15	2141,56	418,01	107,98	3476,79	321,09	1034,62	252,54

Legenda: Valores das concentrações séricas de Ngal são expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ). OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUu: obstrução ureteral unilateral, OUb: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo basal; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário.

3.2.2.3 Creatinina Sérica

A dosagem sérica da creatinina foi analisada entre os animais do mesmo grupo nos 3 tempos pré-determinados (Tabela 15). Observamos aumento da creatinina sérica nos grupos controle, OIV, OUu e OUb após 14 dias de pós-operatório, porém sem significância estatística. No grupo OIVd, houve elevação da creatinina sérica nos tempos intermediário e final; no entanto, a diferença entre os valores não foi significativa estatisticamente.

Tabela 15 - Comparação dos valores de creatinina sérica entre grupos nos tempos em T0, T1 e Ti.

	Controle		OIV		OIVd			OUu		OUb	
	T0	T1	T0	T1	T0	Ti	T1	T0	T1	T0	T1
Mediana	0,72	1,78	0,68	1,44	0,76	0,96	1,05	0,82	0,76	1,04	0,85
IQ	0,63	1,39	0,86	1,42	0,94	0,37	1,76	1,21	1,08	1,42	1,29

Legenda: Valores das concentrações séricas de creatinina são expressos em mediana e intervalo interquartil (IQ). OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUu: obstrução ureteral unilateral, OUb: obstrução ureteral bilateral; T0: tempo basal; T1: tempo final; Ti: tempo intermediário.

3.3 Análise imuno-histoquímica

O estudo imuno-histoquímico com anticorpos anti-CA19-9 foi realizado em 29 unidades renais e 13 bexigas, nos grupos obstruídos e controle. A imunoexpressão foi classificada como positiva ou negativa; assim, a positividade nos rins variou de 62,5% (grupo OUb) a 100% (grupos OIVd e OUu) e na bexiga de 25% (OUb) a 100% (controle e OIV). A expressão qualitativa positiva do CA19-9 variou significativamente ($p \leq 0,05$) para as unidades renais e vesicais ($p \leq 0,05$), como mostrado na Figura 35 e nas Tabelas 16 e 17.

Figura 35 - Expressão imuno-histoquímica do CA19-9 nos rins e bexigas.

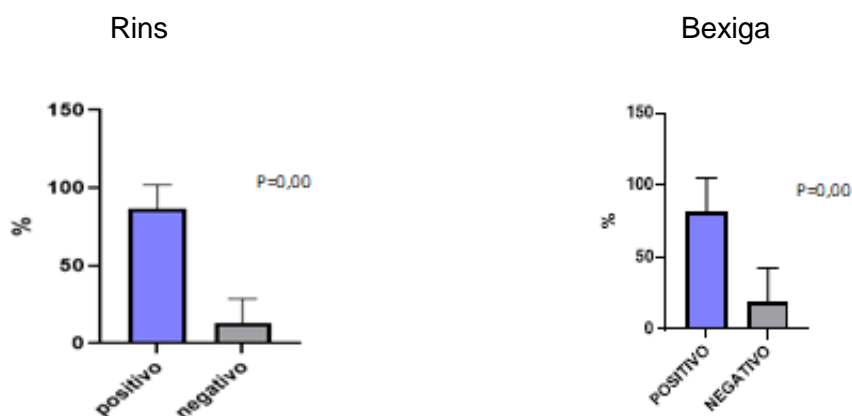


Tabela 16 - Avaliação imuno-histoquímica de rins em porcentagens de positividade e negatividade para o CA19-9.

GRUPO	POSITIVO	NEGATIVO
CONTROLE (n=6)	83,3%	16,7%
OIV (n=8)	87,5%	12,5%
OIVd (n=4)	100%	0
OYu (n=3)	100%	0
OYb (n=8)	62,5%	37,5%

Legenda: OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OYu: obstrução ureteral unilateral, OYb: obstrução ureteral bilateral. n: número de peças anatômicas analisadas.

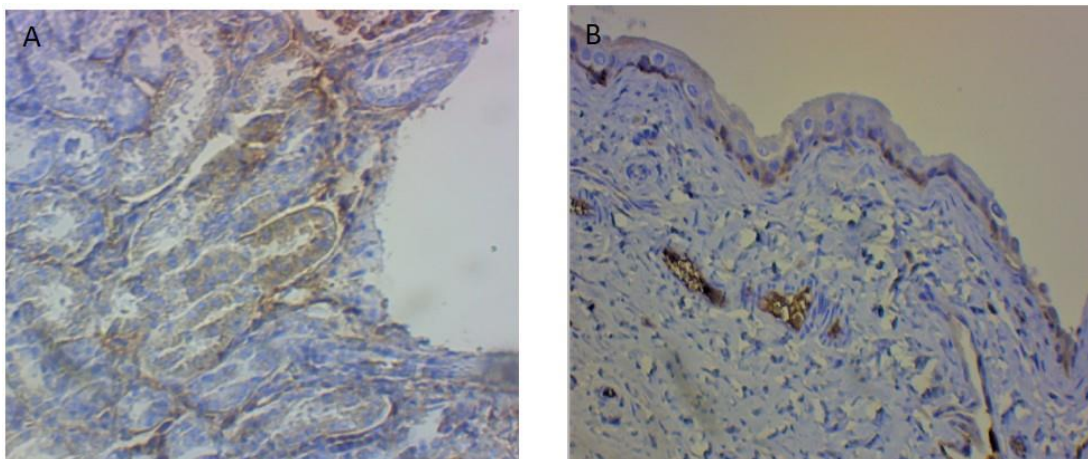
Tabela 17 - Avaliação imuno-histoquímica de bexigas em porcentagens de positividade e negatividade para o CA19-9.

GRUPO	POSITIVO	NEGATIVO
CONTROLE (n=3)	100%	0
OIV (n=4)	100%	0
OIVd (n=2)	50%	50%
OUB (n=4)	75%	25%

Legenda: OIV: obstrução infravesical; OIVd: obstrução infravesical com desobstrução; OUu: obstrução ureteral unilateral, OUb: obstrução ureteral bilateral. n:número de peças analisadas.

A imunoposição do CA19-9 foi identificada no citoplasma das células tubulares e na lâmina própria da mucosa vesical (Figura 36).

Figura 36 – Imuno-histoquímica de túbulo renal e bexiga. A: expressão do CA19-9 (cor amarronzada) nas células tubulares renais (aumento de 100X) e (B) na lâmina própria vesical (aumento de 40X).



Fonte: acervo pessoal do autor

4. DISCUSSÃO

Os modelos experimentais de UO têm permitido o melhor entendimento da patogênese da nefropatia obstrutiva congênita, uma vez que possibilita o controle do tempo, da gravidade das lesões renais, uniformidade nas mudanças estruturais, sem a interferência de fatores de confusão como comorbidades ou toxinas, além de viabilizar a remoção da causa inicial (obstrução) em diferentes intervalos de tempo (JOSEPHSON *et al*, 1980; CHEVALIER *et al*, 2009). Estes modelos foram utilizados na investigação de potenciais biomarcadores, como interleucinas (IL), TNF- α e interferon-gama (IFN- γ), entre outros, reconhecidos como mediadores de eventos celulares e moleculares na OCTU (MAGALHÃES *et al*, 2016).

Experimentalmente, a obstrução ureteral ou uretral completa por ligadura simples do ureter ou da uretra é de fácil reprodutibilidade (TROUNG *et al*, 2011), diferente do observado na obstrução parcial, que tem técnica operatória elaborada e mais difícil de ser replicada. No entanto, o método empregado para obstrução ureteral parcial e infravesical, no qual um cateter de 0,9 mm foi alocado adjacente ao ureter, antes da ligadura do músculo psoas ou sobre o colo vesical durante o nó cirúrgico do fio que envolvia a região e retirado a seguir, mostrou-se adequado para evitar a oclusão total (KIM *et al*, 2019; JIN *et al*, 2011). Segundo Ozturk e colaboradores, 14 dias de obstrução são suficientes para desencadear processo inflamatório na parede vesical e hipertrofia detrusora moderada, com elevação de mediadores inflamatórios e glicoproteínas encontradas no urotélio na primeira e segunda semana pós-obstrução (OZTURK *et al*, 2020). Outro estudo, em modelo experimental, evidenciou significativa capacidade de recuperação funcional da bexiga, após reversão do processo obstrutivo infravesical em período inferior a 4 semanas; o mesmo, não foi observado com alívio da obstrução depois de 6 e 8 semanas (KUO, 1996). Como a intenção deste projeto consistia em investigar a rápida resposta dos marcadores diante do processo obstrutivo, os animais foram mantidos obstruídos por um período curto de 7 dias no grupo de obstrução infravesical, para ser reavaliado após desobstrução, e 2 semanas para os demais grupos. Evidenciamos, no trato urinário, alterações macroscópicas secundárias a obstrução ao fluxo de urina, caracterizadas por distensão vesical e uretero-hidronefrose, bem como maior tamanho e peso vesical nos animais do grupo OIV e OIVd comparado ao grupo controle. O peso e tamanho longitudinal renal das

cobaias com obstrução ureteral também foi significativamente maior em relação ao grupo controle. Desta forma, demonstramos a efetividade dos modelos experimentais empregados, pois parâmetros semelhantes foram utilizados por Tucci, na descrição de eficiência da obstrução do colo vesical experimental em ratos (TUCCI *et al*, 2011).

O CA19-9 foi identificado em túbulos renais e na mucosa da pelve renal e sua elevação sérica e urinária tem sido descrita, principalmente, na presença de litíase e OJUP e na displasia cística renal (KHORRAMIROUZ *et al*, 2014). Três possíveis mecanismos foram aventados para justificar sua elevação nas dilatações do trato urinário: 1) por anormalidade de síntese em diferentes locais dos rins; 2) nos órgãos gastrointestinais próximos aos rins e induzida por compressão da hidronefrose e 3) secundária a inflamação na mucosa da pelve renal (SHUDO *et al*, 1999). Estes relatos, associados à técnica laboratorial para dosagem sérica e urinária bem estabelecida, nos estimulou a avaliar o CA19-9 como um biomarcador de lesões obstrutivas do trato urinário.

Na comparação entre as cobaias obstruídas com os animais controle notamos incremento expressivo no valor absoluto do CA19-9 em todos os grupos submetidos à obstrução ($p \leq 0,05$). Observamos aumento significativo entre o valor inicial e final nos grupos OIV e OUb, enquanto no grupo OIVd houve elevação precoce, entre T0 e Ti, com queda expressiva após a desobstrução. Também, avaliamos a sensibilidade e especificidade desse marcador, por meio de curvas ROC, para os grupos OIV e OUb a AUC foi de 0,81 e 0,77, respectivamente. No grupo OIVd, obtivemos AUC de 0,71 no Ti e 0,73 no tempo final, após alívio da obstrução. Portanto, o valor absoluto do CA19-9 urinário mostrou boa precisão como teste diagnóstico para OTU, como não encontramos evidências de compressão de outras estruturas abdominais no momento da eutanásia, a produção excessiva do CA19-9 provavelmente seja oriunda do próprio trato urinário, secundária ao processo obstrutivo.

Existe na literatura uma discussão quanto a melhor forma de quantificar o CA19-9 urinário; ou seja, como valor absoluto ou ajustado à creatinina urinária (CA19-9/creatinina urinária). Como Alizadeh e colaboradores, relataram melhor sensibilidade utilizando a relação CA19-9/creatinina urinária em pacientes com OJUP (Alizadeh *et al* em 2018), optamos, neste trabalho, por expressar os resultados nas duas formas. A variação da relação CA19-9/creatinina urinária dentro do mesmo grupo, entre T0 e

T1, alcançou significância estatística nos grupos OIV e OUb ($p \leq 0,05$); no grupo OIVd, apesar da elevação entre T0 e Ti, houve diferença estatisticamente significativa apenas após desobstrução, entre Ti e T1. As curvas ROC indicaram efetividade nesta forma de avaliação, com AUC nos grupos OIV e OUb de 0,81 e 0,83, respectivamente, e de 0,75 no grupo OIVd para queda pós-desobstrução. A interpretação dos resultados, em conjunto, aponta para efetividade semelhante nas formas de expressar o CA19-9; no entanto, o valor absoluto do CA19-9 no grupo OIVd conseguiu identificar significância e efetividade na elevação inicial, após 6 dias de obstrução, mostrando-se importante como marcador de precocidade. Além disso, poucos trabalhos investigaram a possível correlação entre CA19-9 e LUTO, um estudo dosou o CA19-9 urinário em gestantes com fetos portadores de VUP e identificou incremento significativo comparado às gestantes controle, o qual se relacionou com maior diâmetro anteroposterior da pelve renal fetal (KAJBAFZADEH *et al*, 2019). Em outro estudo com casuística pequena, apenas 7 casos, os valores de CA19-9 estavam elevados na urina de fetos com VUP, comparados aos de fetos normais (KAJBAFZADEH *et al*, 2010). O grupo OIV, neste projeto, simulou a VUP e os resultados obtidos com elevação expressiva do CA19-9 com a obstrução, seguida por queda após desobstrução, são encorajadores para pesquisas envolvendo esse biomarcador para uso clínico em pacientes com LUTO.

Em estudo prospectivo envolvendo crianças com OJUP, o CA19-9 e o maior diâmetro anteroposterior da pelve foram preditores independentes para necessidade de cirurgia durante tratamento conservador. Os autores encontraram sensibilidade de 92,0% e especificidade de 70,9% do CA19-9 urinário como preditor de falha do manejo não operatório (NABAVIDEH *et al*, 2019), sugerindo que as obstruções mais graves, com aumento do diâmetro pélvico, contribuam para maior expressão e produção de CA 19-9. Simulamos a OJUP, promovendo a obstrução ureteral uni ou bilateral; nos animais com OUu não houve incremento significativo nos valores do CA19-9, mas no grupo OUb observamos elevação da concentração urinária do CA19-9, com diferença estatística significativa, tanto na medida absoluta (AUC 0,77) quanto na ajustada (AUC 0,83); desta forma entendemos que a obstrução bilateral, por ser mais grave, causa maior aumento nos valores urinários do CA19-9.

A expressão imuno-histoquímica do CA19-9 foi visualizada em tecidos normais de pâncreas, vesícula biliar, estômago, cólon, árvore brônquica, endométrio, glândulas salivares, rim e próstata (ROY *et al* 2013); porém, não há descrição de expressão em bexiga normal. Na análise imuno-histoquímica dos tecidos do aparelho urinário, identificamos a presença do CA19-9 em bexigas de ratas controle e dos grupos OIV, OIVd e OUb. Desta forma, se considerarmos a bexiga um local de provável produção do CA19-9, além dos túbulos renais e mucosa da pelve renal já conhecidos, podemos explicar a boa sensibilidade desse marcador nas obstruções vesicais observadas nesse estudo.

A Ngal foi descrita previamente como marcador de hidronefrose por OJUP em crianças e o declínio da concentração urinária relacionado à resolução da obstrução ureteral. Esse marcador mostrou-se capaz de prever a progressão para insuficiência renal de forma mais precoce que a creatinina sérica em várias publicações, uma vez que sua elevação é detectável 3 h após a lesão renal, com o pico em 6 a 12 horas, persistindo por até 5 dias, dependendo da gravidade do insulto renal (NOYAN *et al*, 2015; MUSSAP M *et al*, 2010; MADSEN *et al*, 2012). No entanto, ao avaliarmos a uNgal como marcador comparador, observamos seu aumento após o procedimento de obstrução do trato urinário, com significância estatística no grupo OIV ($p \leq 0,05$) e, apesar do maior valor médio final nos grupos OIVd e OUb e da queda do uNgal após a desobstrução do grupo OIVd, estes achados não foram significativos. Algumas limitações da Ngal como biomarcador de lesão renal foram descritas para obstruções do trato urinário superior, como pior desempenho preditivo em adultos, valores séricos e urinários influenciados por outras condições como hipertensão crônica, infecção sistêmica, inflamação, anemia, hipóxia ou malignidade, e a origem da Ngal por diversas fontes dificultaria a identificação da patologia subjacente (WASHINO *et al*, 2020). Diante do exposto, se considerarmos a distensão dos túbulos renais como a alteração fisiopatológica inicial da NO e o CA19-9 um marcador de lesão tubular, o aumento da excreção urinária do CA19-9 pode representar a disfunção tubular prévia à instalação da lesão renal (ATAR *et al*, 2015); portanto, o CA19-9 representaria um marcador mais precoce na obstrução urinária que a uNgal, como demonstrado pelos resultados deste estudo.

As dosagens séricas dos marcadores têm resultados dispares na literatura, pois o CA19-9 sérico foi descrito como significativamente elevado em OTU; entretanto, não se mostrou alterado no sangue de pacientes com hidronefrose (AYBEK *et al*, 2006; ATAR, 2015). Os nossos resultados não identificaram diferença nos valores sanguíneos de CA19-9 e Ngal, antes e após a obstrução, entre os diferentes grupos e na avaliação com o grupo controle. No entanto, inicialmente a concentração sérica elevada CA19-9 em doenças urológicas benignas foi relatada na presença de grande massa abdominal, secundária a hidronefrose gigante, com mais de 1000 mL de urina na pelve renal. (ITO *et al*, 1994; INOUE *et al*, 1995; STIRLIG, 1939). Como nossos animais permaneceram obstruídos por um período relativamente curto, sem dilatação tão intensa, talvez isto tenha contribuído para a não alteração sérica do CA19-9 e da Ngal.

As informações colhidas, neste trabalho, sobre o comportamento do CA19-9 urinário, especialmente na obstrução infravesical, abrem oportunidades para estudos prospectivos em humanos na investigação deste biomarcador como ferramenta auxiliar na tomada de decisão de condutas expectantes ou para intervenção cirúrgica precoce nas UO; contribuir na definição de sucesso ou não do alívio da obstrução, ou como critério na indicação de intervenções fetais na presença de OCTU.

5. CONCLUSÕES

O modelo experimental utilizado neste trabalho possibilitou concluir que:

1. A concentração urinária do CA19-9 eleva-se na presença de obstrução do trato urinário; portanto poderá auxiliar no diagnóstico e seguimento das UO com sensibilidade superior a Ngal urinária.
2. O desempenho do CA19-9 urinário como marcador foi superior nas obstruções baixas e nas obstruções ureterais bilaterais.
3. A elevação urinária do CA19-9 foi evidenciada precocemente, com seis dias de obstrução infravesical.
4. Houve um declínio da concentração urinária do CA19-9 após a desobstrução infravesical, que pode ser importante para acompanhamento clínico e/ou pós-operatório das UO.

Além disso, identificamos a presença de expressão imuno-histoquímica do CA19-9 na mucosa vesical de ratas sem e com obstrução.

6. ANEXOS

1. Aprovação do estudo na Comissão de Ética no Uso de Animais.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel do biomarcador CA 19-9 sérico,urinário, histoquímico e histológico no diagnóstico e definição da gravidade das obstruções urinárias em ratos.", protocolada sob o CEUA nº 6575031019 (ID 000201), sob a responsabilidade de **Márcia Emília Francisco Shida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 27/11/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the role of the serum, urinary, histochemical and histological CA 19-9 biomarker in the diagnosis and definition of the severity of urinary obstructions in rats.", utilizing 50 Heterogenics rats (50 females), protocol number CEUA 6575031019 (ID 000201), under the responsibility of **Márcia Emília Francisco Shida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 11/27/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2020 a 08/2020 Área: Medicina

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 8 a 20 semanas

N: 50

Linhagem: Wistar

Peso: 250 a 400 g

Local do experimento: BIOTÉRIO VERGUEIRO UNINOVE

São Paulo, 13 de outubro de 2020



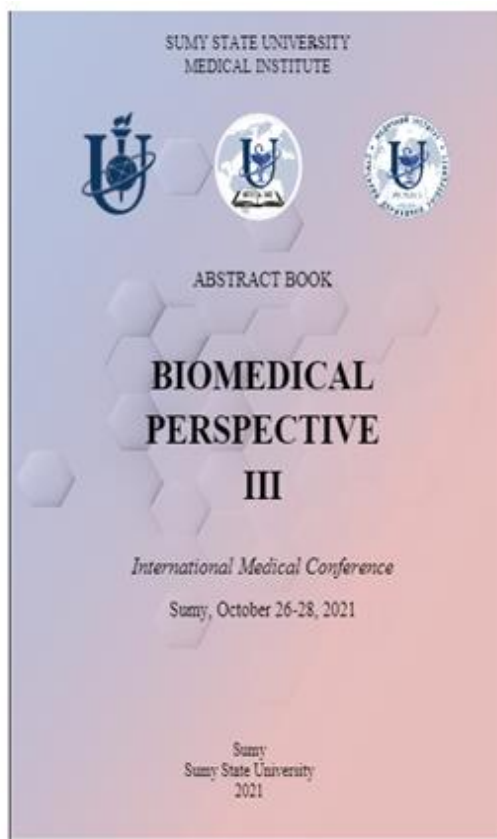
Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho



Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho

2. A pesquisa inicial deste trabalho foi apresentado e está no *Abstract Book* da III Conferência de Perspctivas biomédicas, Ucrânia.

Link de acesso: <https://sc-conf.med.sumdu.edu.ua/>



104

CAN THE CA 19-9 ANTIGEN BE A USEFUL AND EFFICIENT BIOMARKER IN URINARY TRACT OBSTRUCTION?

Shida M

Research adviser: Prof. Mírcia Queiroz,
Graduate Medicine Course University Nove de Julho, São Paulo, Brazil

Introduction. Obstructive nephropathy, resulting from urinary tract obstruction during fetal development, represents the most common cause of kidney failure in infants and children. Despite an early intrauterine diagnosis through prenatal ultrasound, the determination of the prognosis of the kidney injury's severity is not well established yet. Therefore, the identification of blood and/or urinary markers to define the progression of renal damage would play an important role in deciding on earlier and more effective therapeutic interventions. Elevated carbohydrate antigen CA19-9 (originally a tumor marker) levels have been described in benign urinary obstruction.

Aim. This study evaluated to which extent this easy-analysis biomarker could help in the earlier diagnosis, especially in doubtful cases, of obstructive uropathies with potential renal damage. We compared it to another biomarker, NGAL, related to the severity of the obstruction.

Material and methods: Forty-six female Wistar rats were divided into five groups, each with different patterns of partial urinary tract obstruction: Control group; OIV group: infravesical obstruction; group OIVd: infravesical obstruction with reversal and relief of the obstruction on the 7th postoperative day; group OUb: right unilateral ureteral obstruction; group OUb: bilateral ureteral obstruction. Baseline determination of CA 19-9, NGAL, and creatinine in urine and blood was performed in the rats prior to surgery (T0). Surgical interventions promoted partial obstruction depending on the group. After 14 days, new measurements (T1) of the markers were taken and compared to baseline values. The OIVd group underwent an intermediate collection after clearance (T1).

Results. There was an increase in the urinary concentration of CA19-9 in all obstructed animals. In the OIV, OUb and OIVd groups, the elevation in T1 and T1, respectively, reached statistical significance in relation to the T0 value. The changes in urinary CA19-9 were more expressive in the groups OIVd (AUC = 0.71), OIV (AUC = 0.81) and OUb (AUC = 0.77). Relief of obstruction in the OIVd group promoted significant reduction in urinary CA 19-9 values in the final evaluation, with AUC = 0.73. There was no positive correlation between the obstructed groups and serum CA 19-9 levels.

Conclusions. The urinary concentration of CA19-9 increased in the presence of urinary tract obstruction; the performance of urinary CA19-9 as a marker was similar in infravesical (low) and ureteral (high) obstructions, and there was a decline in urinary CA19-9 concentration after clearance.

E-mail for correspondence: dramshida@gmail.com

3. Um segmento desta pesquisa foi apresentada e está no *Abstract Book* da Revista Argentina de Terapia Intensiva, novembro 2021.

0085 ¿PUEDE EL BIOMARCADOR DEL ANTÍGENO CA 19-9 SER ÚTIL
Y EFICAZ PARA PREVENIR LA NEFROPATÍA OBSTRUCTIVA?
M SHIDA, M QUEIROZ

Suplemento 1 - Año 2021

RESÚMENES



REVISTA ARGENTINA
DE TERAPIA INTENSIVA

ÓRGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE TERAPIA INTENSIVA

ISSN 2591-3387

**31° Congreso Argentino e Internacional de
Terapia Intensiva - eSATI**

16 al 19 de noviembre de 2021

"Honrando a los profesionales de la salud que con solidaridad reescriben la historia"

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADEH F, TAEFNIA AM, HAGHDANI S. Urinary carbohydrate antigen 19-9/creatinine ratio: A non-invasive marker for follow-up of unilateral ureteropelvic junction obstruction in children. **Journal of Pediatric Urology**, v. 14, n. 1, p. 62.e1-62.e4, 2018.

AKBAS M, KOYUNCU FM, ULKUMEN BA, TANELI F, OZDEMIR H. Can maternal urinary and serum carbohydrate antigen 19-9 concentrations be utilized in the diagnosis of fetal hydronephrosis? **J Turk Ger Gynecol Assoc**, v. 6;21, n.1, p. 41-45, mar. 2020.

ATAR A, OKTAR T, KUCUKGERGIN C, KALELIOGLU I, SECKIN S, ANDER H, ZIYLAN O, KADIOGLU TC The roles of serum and urinary carbohydrate antigen 19-9 in the management of patients with antenatal hydronephrosis. **Journal of Pediatric Urology**, v. 11, p. 131-133, 2015.

AULBERT W, KEMPER M K. Severe antenatally diagnosed renal disorders: background, prognosis and practical approach. **Pediatric Nephrology**, v. 31, n. 4, abr. 2016.

AYBEK H, AYBEK Z, SINIK Z, DEMIR S, SANCAK B, TUNCAY L. Elevation of serum and urinary carbohydrate antigen 19-9 in benign hydronephrosis. **International Journal of Urology**, v. 13, p. 1380-1384, 2006.

AZEVEDO VLF. NGAL como marcador precoce de lesão renal em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia geral balanceada. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia - UNESP, São Paulo, p. 76, 2011.

BASSANESE G, TRAVAN L, D'OTTAVIO G. et al. Prenatal anteroposterior pelvic diameter cutoffs for postnatal referral for isolated pyelectasis and hydronephrosis: more is not always better. **Journal of Urology**, v. 190, n. 5, p. 1858-1863, nov. 2013.

CAI L, RUBIN J, HAN W, VENGE P, XU S. A origem de múltiplas formas moleculares na urina de HNL / NGAL. **Clinical Journal of American Society of Nephrology**, v. 5, n. 12, p. 2229-2235, dez. 2010.

CHEVALIER RL, PETERS CA. Obstructive Uropathy. **Pediatric Nephrology**, Sixth Edition, p 1337-1377, 2009.

CHEVALIER RL, THORNHILL BA, FORBES MS, KILEY SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. **Pediatric Nephrology**, v. 25, n. 4, p. 687-97, abril 2010.

CHEVALIER RL. Congenital urinary tract obstruction: the long view. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 22, n. 4, p. 312-319, jul. 2015.

CHOI YJ, BARANOWSKA-DACA E, NGUYEN V, KOJI T, BALLANTYNE CM, SHEIKH-HAMAD D, SUKI, WN, TRUONG LD. Mechanism of chronic obstructive uropathy: Increased expression of apoptosis-promoting molecules. **Kidney International**, v. 58, p. 1481-1491, 2000.

COST NG, NOH PH, DEVARAJAN P, IVANCIC V, REDDY PP, MINEVICH E, BENNET M, HAFFNER C, SCHULTE M, DEFOOR JR WR. Urinary NGAL levels correlate with differential renal function in patients with ureteropelvic junction obstruction undergoing pyeloplasty. **Journal of Urology**, v. 190, p. 1462-1467, jun. 2013.

DECRAMER S, ZURBIG P, WITTKKE S, MISCHAK H, BASCANDS JL, SCHANSTRA JP. Identification of Urinary Biomarkers by Proteomics in Newborns: Use in Obstructive Nephropathy. **Contributions to Nephrology**, v. 160, p. 127-141, 2008..

DIAS T, SAIRAM S, KUMARASIRI S. Ultrasound diagnosis of fetal renal abnormalities. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 3, p. 403-415, abr. 2014.

FOSTER S, JOHNSON K, PATEL V, WAX R, NANCY R, BARASH J, BACHUR R, LEE RS. Urinary **NGAL** deficiency in recurrent urinary tract infections. **Pediatric Nephrology**, v. 32, p. 1077–1080, 2017.

GIRARDI M, MARTIN N. Obstructive Uropathy. **Early Hum Dev**, p. 82, n. 1, p. 15-22, jan. 2015.

INGRAHAM SE, MCHUGH KM. Current perspectives on congenital obstructive nephropathy. **Pediatric Nephrology**, v. 26, n. 9, p. 1453-1461, set. 2011.

INOUE S, KAJIWARA T, ITAKURA H, MUNAKATA A, SHINOHARA M, KINOSHITA K. Hydronephrosis with high level CA19-9 in serum: A case report. **Hinyoki Geka**, v. 8, p. 651-653, 1995.

ITO S, NISHIKAWA K, GOTO T, TSUJITA M, TAKEGAKI Y, KISHIMOTO T. A case of hydronephrosis caused by renal stones with elevated serum levels of CA19-9 and CA-125. **Hinyokika Kiyo**, v. 40, p. 885-888, 1994.

JACKSON L, WOODWARD M, COWARD RJ. The molecular biology of pelvi-ureteric junction obstruction. **Pediatric Nephrology**, v. 33, n. 4, p. 553-571, mar. 2017.

JAIN S, CHEN C. Developmental pathology of congenital kidney and urinary tract anomalies. **Clinical Kidney Journal**, v. 12, n. 3, p. 382-399, dec. 2019.

JIN LH, ANDERSSON K, LEE T. Persistent detrusor overactivity in rats after relief of partial urethral obstruction. **American Journal of Physiology Regulatory**, v.301, n. 4, p. 896-904, oct. 2011.

JOSEPHSON S. Experimental Obstructive Hydronephrosis in Newborn Rats: III. Long-Term Effects on Renal Function. **The Journal of Urology**, v. 129, n. 2, p. 396-400, fev. 1983.

KAJBAFZADEH AM, SABETKISH,S; SABETKISH N.Prognostic significance of maternal urinary carbohydrate antigen 19-9 for antenatal diagnosis of posterior urethral valve associated with fetal hydronephrosis.**Int Urol Nephrol**,51(6):909-915, 2019.

KAJBAFZADEH, AM, ELMI A, TALAB SS, ABDARESFAHANI S. Fetal Urinary New Biomarker for Prediction of Renal and Pulmonary Function in Posterior Urethral Valves. **Journal of Pediatric Urology**, v. 6. n. 1, p. 46–7, 2010.

KAMAI T, TOUMA T, MASUDA H, ISHIWATA D. A case of severe hydronephrosis with significantly elevated serum CA19-9. **Rinsho Hinyokika**, v. 49, p. 855-857, 1995.

KOPROWSKI, H et al. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. **Somatic Cell Genetics**, v. 5, n. 6, p. 957–71, nov. 1979.

KOHL K, HERZOG E, DICKNEITE G, PESTEL S. Evaluation of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury in a rat nephropathy model. **Journal Pharmacological Toxicological Methods**, v. 105, n. 106901, set.2020.

KHORRAMIROUZ R, EBADI M, SHERBAF FR, KAJBAFZADEH AM. Persistent High Level of Urinary Tumor Marker Carbohydrate Antigen 19-9 in Prenatally Diagnosed Dysplastic Kidney. **Case Reports in Urology**, v. 2014, n. 5, 2014.

KIM SD, CHO KJ, KIMJC. Expression of cannabinoid 1 and 2 receptors and the effects of cannabinoid 1 and 2 receptor agonists on detrusor overactivity associated with bladder outlet obstruction in rats. **BMC Urology**, v. 17, p. 121, dez. 2019.

KOSTIC D, BEOZZO GPNS, COUTO SB, KATO AHT, LIMA L, PALMEIRA P, KREBS VLJ, BUNDUKI V, FRANCISCO RPV, ZUGAIB M, DÉNES FT, 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**, v. 15, n. 3, p. 242.e1-242.e9, mai. 2019.

KUO HC. Recovery of bladder function after relief of mild outlet obstructions of different durations in rabbits. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 95, p. 469-473, jun. 1996.

LINJUN C, RUBIN J, HAN W, VENGE P, XU S. The Origin of Multiple Molecular Forms in Urine of HNL/NGAL. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, p. 2229-2235, dez. 2010.

LIU HK, DHILLON HK, YEUNG CK, et al. Clinical Outcome and Management of Prenatally Diagnosed Primary Megaureters. **Journal of Urology**, v. 152, p. 614-617, 1994.

LUCARELLI G, MANCINI V, GALLEGGIANTE V, UTIGLIANO M, VAVALLO A, BATTAGLIA M, DITONNO P. Emerging urinary markers of renal injury in obstructive nephropathy. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LOPES RI, DÉNES FT, BARTOLAMEI MG, REIS S, SANCHES TR, LEITE K, SROUGI M, SEGURO AC. Serum and Urinary Values of CA 19-9 and TGF β 1 in a Rat Model of Partial or Complete Ureteral Obstruction. **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 25(6),jan. 2015.

MACEDO MLS, CONSONNI M, BORGES VTM, CALDERON IMP, RUDGE MVC. Resultado Perinatal de Fetos com Malformações do Trato Urinário. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 10, p. 275-730, 2003.

MADSEN MG, NORREGAARD R, PALMFELDT J, et al. Urinary NGAL, cystatin C, [beta]2-microglobulin, and osteopontin significance in hydronephrotic children. **Pediatric Nephrology**, v. 27, p. 2099-2106, nov. 2012.

MADSEN MG, NORREGAARD R, FROKIAER J, JORGENSEN TM. Urinary biomarkers in prenatally diagnosed unilateral hydronephrosis. **Journal of Pediatric Urology**, v. 7, n. 2, p. 105-112, 2011.

MAGALHÃES P, SCHANSTRA JP, CARRICK E, MISCHAK H, ZURBIG P. Urinary biomarkers for renal tract malformations. **Expert Review of Proteomics**, v. 13, p. 1121-1129, nov 2016.

MALIN G, TONKS AM, MORRIS RK, GARDOSI J, KILBY MD. Congenital lower urinary tract obstruction: a population-based epidemiological study. **The British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 119, p. 1455-1464, ago. 2012.

MATSELL DG, TARANTAL AF. Experimental models of fetal obstructive nephropathy. **Pediatric Nephrology**, v. 17, p. 470-476, 2002.

MATSELL DG, YU S, MORRISON SJ. Antenatal determinants of long-term kidney outcome in boys with posterior urethral valves. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 39, n. 3, p. 214-221, set. 2016.

MCLEOD DJ, SEBASTIÃO YV, CHING CB, GREENBERG JH, FURTH SL, BECKNELL B, MCHUGH KM. Common clinical markers predict end-stage renal disease in children with obstructive uropathy. **Pediatric Nephrology**, v. 34, p. 443-448, 2019.

MCLEOD DJ, SEBASTIÃO YV, CHING CB, GREENBERG JH, FURTH SL, BECKNELL B. Longitudinal kidney injury biomarker trajectories in children with obstructive uropathy. **Pediatric Nephrology**, v. 35, n. 10, p 1907-1914, out. 2020.

MEYER A, KAUSCH I, KRUGER S, FETSCHER S, BOHLE A, JOCHAM D. Elevation of CA 19-9 in giant hydronephrosis induced by a renal calculus. **Urology**, v. 63, n. 2, p. 381-382, 2004.

MIRANDA EP. **Avaliação dos biomarcadores urinários no controle do tratamento da estenose da junção ureteropélvica em adultos**. Tese (doutorado em ciências), Programa de Urologia, Universidade de São Paulo, p.103. 2016.

MISSERI R, RINK RC, MEDLRUM DR, MELDRUM KK. Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury. **Journal of Surgical Research**, v. 119, n. 2, p. 149-159, jun. 2004.

MONTEIRO PG, CARRILHO P. Uropatia e Nefropatia Obstrutivas – Revisão de conceitos fisiopatológicos. **Acta Urológica**, v. 23, n. 2, p. 17-20, 2006.

MUSSAP M, DEGRANDI R, FRAVEGA M, FANOS V. Acute kidney injury in critically ill infants: the role of urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). **Journal Matern Fetal Neonatal Med**, v. 23, n. 3, p. 70-2, oct. 2010.

NABAVIZADEH B, KHORRAMIROUZ R, AMINI E, PISHGAR F, HOJJAT A, KAJBAFZADEH AM. Value of urinary carbohydrate antigen 19-9 to predict failure of conservative management in children with ureteropelvic junction obstruction. **J Pediatr Surg**, v.54, n.8, p. 1650-1653, aug. 2019.

NAKAHARA Y, et al. A case of transient sharp elevation of blood CA19-9 after percutaneous nephrostomy for hydronephrosis due to ureter stone. *Iryo*, v. 46, p. 844-848, 1992.

NISHIDA M, KAWAKATSU H, OKUMURA Y, HAMAOKA K. Serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in children with chronic renal diseases. *Pediatric International*, v. 52, n. 4, p. 563-568, ago. 2010.

NGUYEN HT, HERNDON CD, COOPER C, GATTI J, KIRSCH A, KOKOROWSKIP, LEE R, PEREZ-BRAYFIELD M, METCALFE P, YERKES E, CENDRON M, CAMPBELL JB. The Society for Fetal Urology consensus statement on the evaluation and management of antenatal hydronephrosis. **Journal Pediatric Urology**, v. 6, n. 3, p. 212-31, Jun.2010.

NOYAN, A; PARMAKSIS, G; DURSUN, H; EZER, SS; ANARAT, R; CENGIZ, N. Urinary NGAL, KIM-1 and L-FABP concentrations in antenatal hydronephrosis. **J Pediatr Urol**, 11(5):249.e1-6, OCT.2015.

OZKUVANCI U, DONMEZ MI, ZIYLAN O, OKTAR T, KUÇUKGERGIN C, ÇETIN B, ERDEM S, SEÇKIN S. Can urinary biomarkers detect obstruction defined by renal functional loss in prenatal hydronephrosis? **Journal of Pediatric Urology**, v. 16, n. 6, p. 844.e1-844.e7, dez. 2020.

OZTURK H, CETINKAYA A, DUZCU SE, YIS OM. Expression of NGF, MCP-1, uroplakin III, and NOS in bladder urothelium after partial urethral obstruction in rats. **Journal of Pediatric Urology**, v. 16, n. 6, p. 806, dez. 2020.

PARABOSCHI I, MANTICA G, DALTON NR, TURNER C, GARRIBOLI M. Urinary biomarkers in pelvic-ureteric junction obstruction: a systematic review. **Translational Andrology and Urology**, v. 9, n. 2, p. 722-742, 2020.

PAVLAKI A, PRINTZA N, FARMAKI E, STBOULI S, TAPARKOU A, STERPI M, DOTIS J, PAPACHRISTOU F. The role of urinary NGAL and serum cystatin C in assessing the severity of ureteropelvic junction obstruction in infants. **Pediatric Nephrology**, v. 35, n. 1, p. 163-170, jan.2020.

PEREIRA AK, OLIVEIRA EA, LEITE HV, CABRAL ACV. Correlation Between Pre- and Postnatal Morphologic Diagnosis of Fetal Nephrouropathies. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, n. 6, p. 365-371, 2000.

RADMAYR C. Congenital obstructive uropathy – Diagnostics for optimal treatment. **African Journal of Urology**, v. 21, n. 2, p. 87-95, June 2015.

ROY S, DASGUPTA A, KAR K. Comparação de CA 19-9 urinário e sérico como marcadores de carcinoma urotelial em estágio inicial. **International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 5, set./out. 2013.

RUANO R, DUNN T, BRAUN MC, ANGELO JR, SAFDAR A. Lower urinary tract obstruction: fetal intervention based on prenatal staging. **Pediatric Nephrology**, v. 32, n. 10, p. 1871-1878, out. 2017.

SHUDO R, SAITO T, TAKAHASHI K, HORITA K, WAKU K, HONMA I, SATO T. Giant Hydronephrosis due to a Ureteral Stone, and Elevated Serum Levels of CA 19-9. **Internal Medicine**, v. 38, n. 11, p. 887-891, 1999.

STENBERG A, OLSEN L, ENGSTRAND U, PERSSON AEG. Pressure and flow measurements in the partially obstructed ureter of the rat. **Scand J Urol Nephrol**, v. 22, p. 279-288, 1988.

STRIMBU K, TAVEL JA. O que são biomarcadores? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463-466, nov. 2010.

STIRLIG WC. Massive hydronephrosis complicated by hydroureter. Report of three cases. **Journal of Urology**, v. 42, n. 4, p. 520–533, 1939.

SUZUKI K, MURASHI O, TOKUE A. The correlation of serum carbohydrate antigen 19-9 with benign hydronephrosis. **Journal Urology**, v. 167, n. 1, p. 16-20, Jan.2002.

THORNHILL BA, FORBES MS, MARCINKO ES, CHEVALIER RL. Glomerotubular disconnection in neonatal mice after relief of partial ureteral obstruction. **Kidney International**, v. 72, p. 1103-1112, 2007.

TRUONG LD, GABER L, EKNOYAN G. Obstructive Uropathy. **Experimental Models for Renal Diseases: Pathogenesis and Diagnosis**, v. 169, p. 311-326, 2011.

TUCCI SR, MOLINA CAF, CASSINI MF, ANDRADE MF, LIMA GJ, MARTINS ACP. Chronic partial urethral obstruction in female rats: description of an experimental model and initial results. **Acta Cir. Bras**, v.26, n. 2, 2011.

ULM AH, MILLER F. An operation to produce experimental reversible hydronephrosis in dogs. **Journal Urology**, v. 88, p. 337-41, sep. 1962.

VIANNA HR, SOARES CMBM, TAVARES MS, TEIXEIRA MM, SILVA ACS. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Brazilian Journal of Nephrology**, São Paulo, v. 33, n. 3, set. 2011.

WARADY BA, CHADHA V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. **Pediatric Nephrology**, v. 22, n. 12, p. 1999-2009, fev. 2007.

WASHINO S, HOSOHATA K, MIYAGAWA T. Roles Played by Biomarkers of Kidney Injury in Patients with Upper Urinary Tract Obstruction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5490, jul 2020.

WASILEWSKA A, TARANTA-JANUSZ K, DEBEK W, ZOCH-ZWIERZ W, KUROCZYCKA-SANIUTYCZ E. KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy. **Pediatric Nephrology**, v. 26, p. 579-586, abr. 2011.

WATANABE M, SILVA, GF, DA FONSECA CD, VATTIMO MFF. Ngal urinária em pacientes sem e com lesão renal aguda em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 347-354, dec. 2014.

YIEE J, WILCOX D. Management of fetal hydronephrosis. **Pediatric Nephrology**, v.23(3), p.347-53, 2008.

YOU DEN WJ. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, n. 1, p. 32-35, 1950.