

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DE
NEUTRÓFILOS COMO BIOMARCADOR DE LESÃO
TUBULAR ATIVA EM CÃES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA NATURALMENTE ADQUIRIDA**

Marcelo Augusto Moraes Koury Alves
Médico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DE
NEUTRÓFILOS COMO BIOMARCADOR DE LESÃO
TUBULAR ATIVA EM CÃES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA NATURALMENTE ADQUIRIDA**

Marcelo Augusto Moraes Koury Alves

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marileda Bonafim Carvalho

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de doutor em Medicina
Veterinária, área de Clínica Médica
Veterinária.**

2017

A474l Alves, Marcelo Augusto Moraes Koury
Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos como biomarcador de lesão tubular ativa em cães com doença renal crônica naturalmente adquirida / Marcelo Augusto Moraes Koury Alves. – – Jaboticabal, 2017
xix,68 p.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Marileda Bonafim Carvalho

Banca examinadora: Alceu Afonso Jordão Júnior, Márcia Mery Kogika, Mirela Tinucci Costa, Thiago Demarchi Munhoz

Bibliografia

1. Lipocalina. 2. Gelatinase. 3. Neutrófilos. 4. Cão. 5. Função renal.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

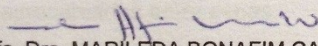
CDU 619:612.466:636.7

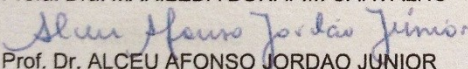
Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

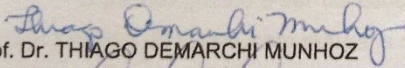
e-mail: marcelo_koury_vet@hotmail.com

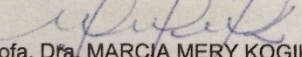
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCELO AUGUSTO MORAES KOURY ALVES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS - CÂMPUS DE JABOTICABAL.

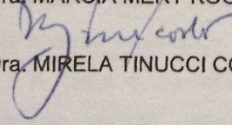
Aos 03 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 08:00 horas, no(a) Anfiteatro do Hospital Veterinário, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO - Orientador(a) do(a) Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal, Prof. Dr. ALCEU AFONSO JORDAO JUNIOR do(a) Departamento de Clínica Médica / USP - Ribeirão Preto, SP, Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ do(a) Departamento de Clínica Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto, SP, Profa. Dra. MÁRCIA MERY KOGIKA do(a) Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP - São Paulo, SP, Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA do(a) Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de MARCELO AUGUSTO MORAES KOURY ALVES, intitulada **LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DE NEUTRÓFILOS COMO BIOMARCADOR DE LESÃO TUBULAR ATIVA EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NATURALMENTE ADQUIRIDA**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO


Prof. Dr. ALCEU AFONSO JORDAO JUNIOR


Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ


Profa. Dra. MÁRCIA MERY KOGIKA


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCELO AUGUSTO MORAES KOURY ALVES – nascido em Belém-PA, no dia cinco de outubro do ano de 1983, filho de José Antonio Koury Alves e Isis Moraes Koury Alves. Em abril de 2008, graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) em Belém-PA. Nos anos de 2009 e 2010 participou do programa de Residência em Clínica Médica de Pequenos Animais, oferecido pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista (Unesp), *campus* de Jaboticabal, no período de 1 de fevereiro de 2009 a 31 de janeiro de 2011, perfazendo 3.520 horas de atividades, sob orientação da Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho. Em fevereiro de 2013, obteve o título de Mestre na área de Clínica Médica, do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *campus* de Jaboticabal-SP. Em março de 2013, ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – área de Clínica Médica, da mesma Instituição de Ensino Superior. Atualmente é integrante do Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Urologia Veterinária – GPNUV da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *campus* de Jaboticabal-SP, docente do Curso de Pós-graduação *lato sensu* de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais do Instituto Qualittas.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações”

(Ana Vilella, Trem-Bala)

Dedico esta Tese a todos os pacientes que a tornaram possível, sou eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Meishusama por tudo que passei e passo. Aprendi que nada é por acaso.

Aos meus pais José Antônio Koury Alves e Isis Moraes Koury Alves, e ao meu irmão José Antônio Koury Alves Jr, o amor de vocês me traz paz e confiança. Não há como mensurar o quanto os amo.

Aos amigos, atual família-irmãos (Amanda; Bruno; Débora; Fabio; Fernando; Franco; Gabriel; Gustavo; Guilherme; Pedro; Mauricio; Rafael; Sabrina; Thiago; Thais) e a uma amiga-mãe (Sandrinha), obrigado por toda paciência, cuidado e zelo. Tenho gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha orientadora Marileda Bonafim Carvalho, obrigado por todos os oito anos de apoio, cuidado e paciência, sou muito grato pela chance de crescer não só em minha vida profissional, como pessoal. Levarei e propagarei seus ensinamentos para que outros possam ajudar o maior número de animais.

Ao professor Alceu Afonso Jordão Júnior, responsável pelo Laboratório de Nutrição e Metabolismo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de SP, pela disponibilidade em realizar uma das partes mais importantes do meu experimento.

Aos professores Bruno Watanabe Minto, Mirela Tinucci Costa e Thiago Demarchi Munhoz, pela colaboração com suas sugestões apresentadas por ocasião do Exame de Qualificação, que foram muito relevantes para a forma que aqui se apresenta.

Ao técnico Matheus do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *campus* de Jaboticabal-SP e à técnica Paula Payão Ovídio do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de SP. O apoio e conhecimento de vocês, sem dúvida, foram imprescindíveis ao desenvolvimento do projeto.

Por último e não menos importante, aos animais e seus proprietários, que possibilitaram o desenvolver deste estudo. Não tenho como mensurar minha gratidão a vocês.

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de Bolsa de estudo, que viabilizou parte das atividades acadêmicas e o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1.INTRODUÇÃO.....	1
Objetivos.....	3
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1.Laboratórios.....	13
3.2.Pacientes.....	13
3.2.1. Elegibilidade dos pacientes (critérios para inclusão).....	13
3.2.2. Critérios de exclusão.....	14
3.3.Avaliação preliminar e constituição dos grupos.....	14
3.4.Protocolo experimental.....	15
3.5.Metodologia das avaliações.....	16
3.5.1.Considerações gerais sobre a obtenção e preparo das amostras.....	16
3.5.2.Análises laboratoriais.....	16
3.5.2.1.Hemograma.....	16
3.5.2.2.Análises bioquímicas séricas e urinárias.....	17
3.5.2.3.Avaliação da proteinúria.....	17
3.5.2.4.Excreção Fracionada de Sódio (EFNa).....	17
3.5.2.5.Ensaio para dosagem da NGAL.....	18
3.5.2.5.1.Ajuste do uNGAL de acordo com a concentração urinária.....	18
3.6.Análise estatística dos resultados.....	18
4.RESULTADOS.....	20
5.DISSCUSSÃO.....	45
6.REFERÊNCIAS.....	57


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação de marcadores de lesão tubular em cães com doença renal crônica naturalmente adquirida**", protocolo nº 11.144/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Marileda Bonafim Carvalho, 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) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "Ad-referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP – CÂMPUS DE JABOTICABAL – SP.

Vigência do Projeto	20/08/2016 a 20/09/2016
Espécie / Linhagem	Cão doméstico (<i>Canis familiaris</i>)
Nº de animais	60
Peso / Idade	Variáveis
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Pacientes do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV UNESP – Jaboticabal), encaminhados para o Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária (SNUV) e para os serviços de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais.

Jaboticabal, 01 de agosto de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
 Coordenadora - CEUA

LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DE NEUTRÓFILOS COMO BIOMARCADOR DE LESÃO TUBULAR ATIVA EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NATURALMENTE ADQUIRIDA

RESUMO – A doença renal crônica (DRC) apresenta caráter progressivo e irreversível e muitos dos fatores envolvidos na sua progressão, comprometem primariamente os túbulos renais. Com finalidade de detectar precocemente as lesões tubulares, novos biomarcadores têm sido pesquisados. Dentre estes, destaca-se a Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos (NGAL). Este estudo teve por objetivo avaliar a excreção urinária de NGAL com o propósito de identificar a ocorrência de lesão tubular ativa (LTA) em cães com DRC naturalmente adquirida. Foram estudados 87 cães adultos, sem distinção de gênero ou de raça (15 sadios, 18 em risco de desenvolver DRC e 54 com DRC nos estádios 1, 2, 3 e 4 – *IRIS staging of CKD - 2015*), atendidos no Hospital Veterinário - Unesp – *campus* de Jaboticabal. Foram avaliados biomarcadores tradicionais e as concentrações de NGAL urinária (uNGAL) e sérica (sNGAL). Os resultados de uNGAL foram ajustados pelos respectivos fatores de concentração urinária (uNGAL.FCU). Os resultados foram inicialmente analisados considerando os seis grupos e posteriormente para comparação entre os 15 sadios, os 41 DRC e os 13 DRC com uNGAL.FCU sugestivo de LTA (LTA_{DRC}). Os resultados indicaram que a uNGAL ajustada (uNGAL.FCU), pode servir como indicador de agravamento das lesões renais precocemente em relação à concentração sérica de creatinina, que é o mais utilizado dentre os biomarcadores tradicionais. Quanto à sNGAL, houve aumento gradativo relacionado à progressão da DRC em oposição à uNGAL.FCU, que diminuiu. Assim, a sNGAL parece ser mais relevante como um indicador do agravamento das complicações extrarrenais associadas à uremia crônica grave. Pacientes com uNGAL.FCU muito aumentada (grupo LTA_{DRC}), em comparação aos DRC (uNGAL.FCU com variação não significativa), se destacam pela maior ocorrência de proteinúria intensa e de hipertensão, sem aumentos relevantes de outros indicadores ou biomarcadores de DRC. Estes achados reforçam a importância da proteinúria e da hipertensão no agravamento das lesões renais, sem descartar outras causas de LTA na DRC.

Palavras chave: NGAL urinária, NGAL sérica, doença renal, nefropatia crônica, cão.

NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN AS A BIOMARKER OF TUBULAR ACTIVE INJURY IN DOGS WITH NATURALLY ACQUIRED CHRONIC KIDNEY DISEASE

ABSTRACT – Chronic kidney disease (CKD) is a progressive and irreversible condition, and many of the factors involved in its progression, primarily compromise the renal tubules. To detect tubular injury, new early biomarkers have been investigated. Among them, Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) stands out. The aim of this study was to evaluate the urinary excretion of NGAL, to identify the occurrence of active tubular injury (ATI) in dogs with naturally acquired CKD. A total of 87 adult dogs, regardless of gender or breed (15 healthy, 18 at risk of developing CKD and 54 with CKD stages 1, 2, 3 or 4 – IRIS staging of CKD - 2015), were studied at the Veterinary Hospital - Unesp - Jaboticabal campus. Traditional biomarkers and NGAL concentrations in urine (uNGAL) and serum (sNGAL) were evaluated. The results of uNGAL were adjusted by the respective urinary concentration factors (uNGAL.UCF). The results were initially analyzed considering the six groups, and later for comparison between the 15 healthy, 41 DRC and 13 DRC with uNGAL.UCF suggestive of ATI (ATI_{CKD}). The results indicated that adjusted uNGAL (uNGAL.UCF) may serve as an indicator of aggravation of renal damage early in relation to serum creatinine concentration, which is the most used among the traditional biomarkers. Regarding sNGAL, there was a gradual increase related to the progression of CKD, in opposition to uNGAL.UCF, which decreased. Thus, sNGAL appears to be more relevant as an indicator of the extrarenal complications associated with severe chronic uremia. Patients with increased uNGAL.UCF (ATI_{CKD} group), compared to CKD group (non-significant changes in uNGAL.UCF), are notable for the higher occurrence of severe proteinuria and hypertension, without significant increases in other indicators or biomarkers of CKD. These findings reinforce the importance of proteinuria and hypertension in aggravating renal lesions, without ruling out other causes of ATI on CKD.

Keywords: urinary NGAL, serum NGAL, kidney disease, chronic nephropathy, dog.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
CEUA	- Comissão de ética no uso de animais
DRC	- Doença renal crônica
Epo	- Eritropoietina
EFNa	- Excreção fracionada de sódio
ET-1	- Endotelina-1
GGT	- Gama glutamil transpeptidase
GPNUV	- Grupo de pesquisa em nefrologia e urologia veterinária
IL-1 β	- Interleucina1- β
IL-1 α	- Interleucina1- α
IL-8	- Interleucina 8
IL-10	- Interleucina-10
IRA	- Insuficiência renal aguda
IRIS	- International renal interest society
IECAs	- Inibidores da enzima conversora de angiotensina
KIM-1	- Kidney injury molecule-1
LDL	- Lipoproteínas de baixa densidade
LRA	- Lesão renal aguda
LTA	Lesão tubular ativa
MCP-1	- Proteína quimioatrativa de monócitos-1
NAG	- N-acetil β glicosaminidase
NF-kB	- Fator nuclear kappa b
NGAL	- Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos
PAS	- Pressão arterial sistólica
PDGFRB	- Receptor beta do fator de crescimento derivado das plaquetas
pNGAL	- N-acetil β glicosaminidase plasmática
RANTES	- Regulada sob ativação, expressa e secretada por células t normais
sCr	- Creatinina sérica
sK	- Potássio sérico
sNa	- Sódio sérico
sNGAL	- N-acetil β glicosaminidase sérica
sP	- Fosfato sérico
sUr	- Ureia sérica
TFG	- Taxa de filtração glomerular
TGF- β	- Fator de necrose tumoral- β
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α
TPC	- Túbulo contornado proximal
uCr	- Creatinina urinária
uNa	- Sódio urinário
uNGAL	- Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos urinária
UP/C	- Razão proteína/creatinina urinária
uPt	- Proteína urinária

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sumário da composição dos grupos de cães sadios (Sadio), sob risco de desenvolver DRC (Risco) ou com doença renal crônica (DRC) nos diferentes estádios (<i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	15
Tabela 2. Características físicas dos 87 cães avaliados, distribuídos em seis grupos – sadios (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	21
Tabela 3. Dados das análises (estatística descritiva) da massa corporal e idade de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	22
Tabela 4. Dados referentes às análises das concentrações séricas de creatinina (sCr) e de ureia (sUreia) de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	24
Tabela 5. Dados referentes às análises das concentrações séricas de fosfato (sP) e da razão proteína/creatinina urinária (UP/C) de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	25
Tabela 6. Dados referentes às análises da densidade urinária (DU) e excreção fracionada de sódio (EFNa) de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	27
Tabela 7. Dados referentes às análises das concentrações de NGAL* urinário (uNGAL) e NGAL urinário ajustado pelos respectivos fatores de concentração urinária (uNGAL.FCU), de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios ((DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	28
Tabela 8. Dados referentes às análises das concentrações séricas de proteína total (sPt) e albumina (sAlb), de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD - 2015</i>).	30

Tabela 9.	Dados referentes às análises da pressão arterial sistólica (PAS) e da concentração sérica de NGAL* (sNGAL) de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD</i> - 2015).	31
Tabela 10.	Dados referentes às análises do número de hemácias (He) e do valor de hematócrito (Ht), de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD</i> - 2015).	33
Tabela 11.	Dados referentes às análises dos números de leucócitos (Le) e de neutrófilos segmentados (Ns), de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD</i> - 2015).	34
Tabela 12.	Dados referentes às análises das concentrações de NGAL* urinário (uNGAL) ajustadas pelos respectivos fatores de concentração urinária (uNGAL.FCU), e do NGAL sérico (sNGAL), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA _{DRC}).	39
Tabela 13.	Dados referentes às análises das concentrações séricas de creatinina (sCr) e de ureia (sUreia), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LT _{ADRC}).	39
Tabela 14.	Dados referentes às análises de densidade urinária (DU) e excreção fracionadas de sódio (EFNa), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA _{DRC}).	40
Tabela 15.	Dados referentes às análises dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) e das razões proteína/creatinina urinária (UP/C), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA _{DRC}).	40
Tabela 16.	Dados referentes às análises das concentrações urinárias de NGAL e concentração sérica de fosfato (sP), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA _{DRC}).	42
Tabela 17.	Dados referentes às análises das concentrações séricas de proteína total (sPt) e albumina (sAlb), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA _{DRC}).	42

- Tabela 18.** Dados referentes às análises dos números de hemácias (He) e do hematócrito (Ht), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}). **43**
- Tabela 19.** Dados referentes às análises dos números de leucócitos (Le) e neutrófilos segmentados (Ns), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}). **43**

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) dos parâmetros idade e massa corporal de 87 cães saudáveis (Sadio), com doença renal crônica (DRC*) ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 saudáveis; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. * <i>IRIS staging of CKD</i> , 2015.	23
Figura 2.	Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros relativos às funções glomerulares de cães saudáveis (Sadio), com doença renal crônica (DRC*) ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 saudáveis; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. A. Concentração sérica de creatinina (sCr mg/dL). B. Concentração sérica de ureia (sUreia mg/dL). C. Concentração sérica de fosfato (sFosfato mg/dL). D. Razão proteína/creatinina urinária (UP/C). * <i>IRIS staging of CKD</i> , 2015.	26
Figura 3.	Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros relativos às funções túbulo-intersticiais de cães saudáveis (Sadio), com doença renal crônica (DRC*) ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 saudáveis; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. A. Densidade urinária. B. Excreção fracionada de sódio (EFNa). C. Concentração urinária de NGAL** (uNGAL). D. Concentração urinária de NGAL ajustado pelo fator de concentração urinária (uNGAL.FCU). * <i>IRIS staging of CKD</i> , 2015. ** Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos.	29
Figura 4.	Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros relativos a aspectos sistêmicos implicados na doença renal crônica (DRC*) de cães saudáveis (Sadio), com DRC ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 saudáveis; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. A. Concentração sérica de proteínas totais (sPt). B. Concentrações séricas de albumina (sAlb). C. Pressão arterial sistólica (PAS). D. Concentração sérica de NGAL** (sNGAL). * * <i>IRIS staging of CKD</i> , 2015. ** Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos.	32

- Figura 5.** Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros hematológicos implicados na doença renal crônica (DRC*) de cães saudáveis (Sadio), com DRC ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 saudáveis; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. A. Concentração de hemácias. B. Hematócrito. C. Concentração total de leucócitos. D. Concentração de neutrófilos segmentados. * *IRIS staging of CKD*, 2015. **35**
- Figura 6.** Representação gráfica da distribuição dos resultados de concentração sérica de creatinina, dispostos em ordem crescente dentro de cada grupo (sCr - linha com pontos laranja), e pareados com os respectivos valores de excreção urinária de NGAL* ajustado pelo fator de concentração urinária (uNGAL.FCU - pontos verdes e triângulos), de cães saudáveis (Sadio), em risco de desenvolver DRC** (Risco) ou com DRC. Os valores de uNGAL.FCU >20.000 pg/mL estão destacados por triângulos (roxo para pacientes em risco e vermelho para os com DRC). * Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos. ** DRC 1, 2, 3 e 4 - *IRIS staging of CKD*, 2015. **38**
- Figura 7.** Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros, direta ou indiretamente, implicados na doença renal crônica (DRC) de cães saudáveis ou com DRC: 15 saudáveis (S), 41 com DRC e outros 13 com DRC e sinal de lesão tubular ativa (LTA_{DRC}) presumida em função da intensidade da excreção urinária de NGAL* (uNGAL.FCU >20000 pg/mL). A. Concentrações de NGAL urinária e sérica (uNGAL.FCU e sNGAL, respetivamente). B. Concentrações séricas de creatinina (sCr) e ureia (sUreia). C. Densidade urinária (DU) e excreção fracionada de sódio (EFNa). D. Razão proteína/creatinina urinária (UP/C) e pressão arterial sistólica (PAS). * Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos. **41**
- Figura 8.** Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros, direta ou indiretamente, implicados na doença renal crônica (DRC) de cães saudáveis ou com DRC: 15 saudáveis (S), 41 com DRC e outros 13 com DRC e sinal de lesão tubular ativa (LTA_{DRC}) presumida em função da intensidade da excreção urinária de NGAL* (uNGAL.FCU >20000 pg/mL). A. Concentrações de NGAL urinária (uNGAL) e de fosfato sérico (sP). B. Concentrações séricas de proteína total (sPt) e albumina (sAlb). C. Número de hemácias e valor de hematócrito. D. Números de leucócito e neutrófilo segmentado. * Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos. **44**

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é a afecção renal mais diagnosticada em cães e gatos, principalmente os de idade mais avançada (GRAUER, 2005; POLZIN, 2011a). O termo DRC descreve alterações heterogêneas que afetam a estrutura e funcionalidade dos rins. A expressão da condição é variável dependendo do tipo e da gravidade da doença de base que originou o processo, assim como, da taxa de progressão (LEVEY et al., 2003, LEVEY et al., 2005).

Pelo menos inicialmente, a redução da função renal é uma consequência da doença primária do paciente (POLZIN, 2011a). Entretanto, se um número significativo de lesões já tiver ocorrido, a DRC pode se tornar autoperpetuante (LEES, 2004), ou seja, a progressão das lesões não dependerá da causa inicial (BRENNER; MEYER; HOSTETTER, 1982; HOSTETTER et al., 2001). Como descrito por Polzin (2011b), este processo pode ser denominado “progressão espontânea da DRC”.

A perda progressiva da função renal dos pacientes com DRC pode resultar de diminuição linear ou da alternância de períodos de estabilidade e quedas íngremes, até que a doença evolua para fase terminal (LEES, 2004; POLZIN, 2011a).

Muitos fatores podem estar envolvidos na progressão da DRC. Dentre eles destacam-se a doença renal aguda sobre a crônica e as lesões secundárias à proteinúria glomerular. Em ambos os casos, as lesões comprometem primariamente os túbulos renais (LIEBERTHAL; LEVINSKY, 1992; POLZIN; OSBORNE, 1995; COWGILL; FRANCEY, 2005; GRAUER, 2007; CARVALHO, 2015).

Com finalidade de detectar precocemente as lesões tubulares, a busca por biomarcadores tem sido objetivo de muitas pesquisas. Diversos novos biomarcadores para diagnóstico de lesão renal aguda (LRA) estão sendo avaliados em humanos (PRICE, 2002; BONOMINI et al., 2010; GARG et al., 2015) e em cães (SEGEV et al., 2013; STEINBACH et al., 2014; ZHOU et al., 2014; PRESSLER, 2015; NENTWIG et al., 2016). Embora a aplicabilidade dos marcadores de lesão tubular tenha sido voltada, inicialmente, para o diagnóstico precoce de LRA, a possibilidade de diagnosticar lesão tubular ativa (LTA) na DRC também vem sendo estudada em humanos (BONOMINI et al., 2010; SHRESTHA et al., 2012) e em cães (NABITY et al., 2012; AHN; HYUN, 2013; SEGEV et al., 2013; STEINBACH et al.,

2014; CARVALHO; ALVES; VASCONCELLOS, 2016; HOKAMP et al., 2016; NENTWIG et al., 2016).

Os primeiros biomarcadores descritos foram KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*), NGAL (*Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin*), L-FABP (*Liver-type Fatty Acid Binding Protein*) e IL-18 (Interleucina-18) (BONOMINI et al., 2010; DEVARAJAN, 2011; DEDE et al., 2015). Citam-se, ainda, IL-1 β (Interleucina1- β), IL-1 α (Interleucina1- α), IL-8 (Interleucina 8), IL-10 (Interleucina-10), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α), TGF- β (Fator de Necrose Tumoral- β), (NENTWIG et al., 2016), NAG (N-acetil β Glicosaminidase), microglobulinas α_1 e β_2 , GGT (Gama Glutamil Transpeptidase), Vanina-1, bem como fatores inflamatórios excretados na urina, tais como IgG urinária, Proteína C e Tromboxano B₂ (DEVARAJAN, 2011; DEDE et al., 2015). Dentre todos, a Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos (NGAL) tem sido reconhecida como biomarcador precoce útil, acurado, sensível e promissor para o diagnóstico da LRA em humanos e cães em fase inicial da doença e também na LTA descrita na DRC (SHEMIN; DWORKIN, 2011; LEE et al., 2012; NABITY et al., 2012; AHN; HYUN, 2013; DAURE et al., 2013; SEGEV et al., 2013; HSU et al., 2014a; STEINBACH et al., 2014; WATANABE et al., 2014; ROCHA et al., 2015; CARVALHO; ALVES; VASCONCELLOS, 2016; PALM et al., 2016).

Ainda assim, os estudos para avaliar o papel dos novos biomarcadores na DRC são escassos. Embora já existam pesquisas assertivas, muitas outras serão necessárias tanto na medicina quanto na medicina veterinária. Os estudos que envolvem o biomarcador de lesão tubular, NGAL, vem sendo considerados como um dos mais específicos e promissores na medicina. Na nefrologia veterinária, os primeiros resultados, divulgados na literatura científica – incluindo apresentação de resultados preliminares do presente estudos (CARVALHO; ALVES; VASCONCELLOS, 2016) – indicam a mesma performance para avaliação de cães com LRA ou com LTA na DRC. Entretanto, apesar dos estudos já realizados, ainda não há valores de referência para o biomarcador. Assim, justifica-se o presente estudo.

Nosso grupo de pesquisa coordenado pela professora Marileda Bonafim Carvalho vem, durante anos, desenvolvendo diversas pesquisas em nefrologia veterinária com enfoque na DRC na espécie canina. Voltados para o foco de

explorar áreas atuais do conhecimento, e obter novas informações úteis na medicina veterinária, atualmente, estamos alinhados à avaliação do biomarcador precoce de lesão tubular, NGAL, em pacientes com DRC em suas diversas fases de evolução.

Por fim, temos por hipótese, que o biomarcador de lesão tubular, NGAL, possa de forma antecipada, em relação aos biomarcadores tradicionais, detectar períodos de LTA que cursam com piora do quadro clínico de pacientes com DRC em suas diversas fases.

Objetivos

Geral

Avaliar a excreção urinária de NGAL em cães com DRC naturalmente adquirida, com o propósito de identificar a ocorrência de lesão tubular ativa

Específicos

1. Avaliar a relação existente entre os valores de urinária e de NGAL e a progressão da DRC de acordo com o estadiamento proposto pela *International Renal Interest Society (IRIS staging of CKD - 2015)*¹.
2. Avaliar a relação existente entre a concentração sérica de NGAL e a progressão da DRC de acordo com o estadiamento proposto pela *International Renal Interest Society (IRIS staging of CKD - 2015)*.
3. Avaliar a possibilidade de que a excreção urinária de NGAL possa sinalizar a existência de lesão tubular ativa precocemente em relação ao biomarcador tradicional em cães com DRC.
4. Avaliar as possíveis relações entre os resultados de NGAL e os dos demais parâmetros rotineiramente avaliados em cães com DRC.

¹. <http://www.iris-kidney.com/pdf/staging-of-ckd.pdf>

2. REVISÃO DE LITERATURA

A DRC, a enfermidade renal mais diagnosticada em cães e gatos (LEES, 2004, HALL et al., 2016), é caracterizada por anormalidades estruturais e funcionais, presentes por no mínimo três meses, que culminam na redução contínua do número de néfrons funcionantes (POLZIN, 2011a). A doença, irreversível e progressiva, tem como desfecho a insuficiência renal crônica (IRC) e, finalmente, falência renal (POLZIN; OSBORNE; ROSS, 2005).

Pelo menos inicialmente, a redução da função renal é uma consequência da doença renal primária (POLZIN, 2011a), que se origina em um dos quatro componentes principais dos rins – glomérulos, túbulos, interstício ou vasculatura renal (LEES, 2004; GRAUER, 2005). Dentre as causas primárias de lesão renal, envolvendo especificamente os glomérulos, são citadas glomerulopatia familiar e, mais frequentemente, as doenças infecciosas, parasitárias, inflamatórias, metabólicas e endócrinas, além de neoplasias. Já as lesões túbulo-intersticiais podem ser parte das manifestações de algumas enfermidades infecciosas, principalmente a leptospirose, doença imunomediada ou, ainda, decorrer de reações de hipersensibilidade a medicamentos (VADEN, 2005; VADEN; GRAUER, 2011; CARVALHO, 2015).

Estudos indicam que a perda crítica de massa funcional renal resulta, invariavelmente, em lesões e disfunções dos néfrons remanescentes. Este processo é sugestivo de que a DRC pode progredir por meios que já não dependem da causa inicial (BRENNER; MEYER; HOSTETTER, 1982; HOSTETTER et al., 2001). E, independentemente do alvo inicial das lesões, os rins irão destruir-se gradualmente, por mecanismos que envolvem glomerulosclerose, lesões túbulo-intersticiais e fibrose (BRENNER, 2002; HARRIS; NIELSON, 2006).

Atualmente, diversas pesquisas e revisões de literatura têm sido realizadas visando ao entendimento dos meios pelos quais a progressão da DRC acontece (EDDY; NEILSON, 2006; HARRIS; NIELSON, 2006; ASADA et al., 2011; SOUMA et al., 2013; DUFFIELD, 2014; KRAMANN; TANAKA; HUMPHREYS, 2014). E grande relevância tem sido dada às lesões do túbulo contornado proximal (DOI et al., 2013; KUSABA et al., 2014; ENDO et al., 2015; KRAMANN et al., 2015; TAKAORI; YANAGITA, 2016)

Os mecanismos patogênicos da DRC, que causam a destruição renal progressiva, convergem para uma via túbulo-intersticial com expansão implacável do quadro de fibrose. A fibrose intersticial é um produto da interação de vários fatores – hiperfiltração glomerular, proteinúria persistente, lesão dos capilares peritubulares, inflamação e liberação local de substâncias que perturbam as relações estrutura-função entre os néfrons (EDDY; NEILSON, 2006).

Na DRC, assim como na LRA, são observados miofibroblastos de cicatrização responsáveis pelo quadro de fibrose apresentado. Entretanto, sua origem não está totalmente elucidada (TAKAORI et al., 2015). Recentemente, Kramann et al. (2015) demonstraram que pequena fração da população de células que participam da expressão do fator de crescimento beta derivado de plaquetas (PDGFR β +), prolifera após lesões nos rins e outros órgãos e tem por função gerar novos miofibroblastos. Diversos estudos demonstraram que os fibroblastos residentes e pericitos respondem ao microambiente formado, diferenciando-se em miofibroblastos (ASADA et al., 2011; SOUMA et al., 2013; DUFFIELD, 2014; TAKAORI et al., 2015).

Embora a fibrose do parênquima renal se apresente como evento característico da DRC e, portanto, seja um sinalizador importante para o diagnóstico clínico, o processo causal permanece como o evento fisiopatológico mais relevante. O conhecimento já existente revela parte dos diversos mecanismos que, provavelmente, determinem o processo.

Primeiramente, o tipo de doença renal que originou o estado de DRC pode ser muito relevante para os mecanismos determinantes da progressão das lesões, como pode ser o caso das glomerulopatias. Diversas pesquisas têm sido realizadas para melhor entendimento de como a proteinúria glomerular pode estar relacionada com a progressão da DRC (ISEKI et al., 2003; JACOB et al., 2005; ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006).

As doenças glomerulares são uma das principais causas de DRC e insuficiência renal em cães (McDOUGALL et al., 1986). Sua incidência, com ou sem sinais clínicos é alta, tendo sido observada variação de 43% a 90% (ROUSE; LEWIS, 1975; MULLER-PEDDINGHAUS; TRAUTWEIN, 1977). Caracteriza-se por quadro severo de proteinúria que culmina com a progressão da DRC para sua fase terminal (HARRIS; NIELSON, 2006), tanto em humanos quanto em outros animais

(ISEKI et al., 2003; JACOB et al., 2005; SYME et al., 2006). Mas ainda não está claro se a proteinúria contribui para a piora do quadro ou se funciona unicamente como um marcador de progressão da lesão renal (POLZIN, 2011a). Em estudo avaliando a relação entre proteinúria e progressão da doença renal, Jacob et al. (2005) observaram que animais com a razão proteína/creatinina urinária (UP/C) \geq 1,0, apresentavam maior risco de desenvolvimento de crises urêmicas, progressão da IRC e morte, reforçando a importância da UP/C como ferramenta na avaliação prognóstica de cães com IRC.

Evidências indicam que a proteinúria está envolvida em lesões nas células mesangiais glomerulares e do TCP (FINCO et al., 1999). Para que isto ocorra, diversos mecanismos são propostos incluindo a toxicidade mesangial, sobrecarga tubular, indução de moléculas pró-inflamatórias e toxicidade por proteínas específicas, como a transferrina (BURTON; HARRIS, 1996; MEYER, 2003).

As lesões das células mesangiais são atribuídas aos componentes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou aos seus produtos de oxidação, que podem causar aumento da produção de matriz mesangial, liberação de agentes quimioatrativos para os monócitos e aumento da geração de fatores de crescimento que levam à esclerose (FINCO et al., 1999; D'AMICO; BAZZI, 2003).

O excesso de proteína no filtrado glomerular, causa lesão túbulointersticial por meio de uma cascata de eventos intracelulares (MEYER, 2003; JACOB et al., 2005). Dentre os mecanismos desencadeantes, são propostos efeito tóxico, mediado por receptores, e sobrecarga lisossomal resultante da degradação de proteínas (FINCO et al., 1999; POLZIN, 2011a).

As lesões são mediadas pela ativação da transcrição do Fator nuclear kappa B (NF-kB) e da regulação de vários genes pró-inflamatórios e pró-fibrinóticos (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006). Outro processo importante é mediado pelo Fator de necrose tumoral- β (TGF- β), que na proteinúria está diretamente ligado à diferenciação de células epiteliais tubulares em miofibroblastos (YANG; LIU, 2001) e à síntese de matriz extracelular, um dos pontos chave no desenvolvimento da fibrose renal (OKUDA et al., 1990). Outros mediadores das lesões renais relatados em resposta à proteinúria incluem o peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1), que tem sua síntese induzida pelo excesso de proteínas como albumina, IgG e

transferrina (ZOJA et al., 1995; FINCO et al., 1999) e moléculas atrativas para monócitos/macrófagos, tais como a proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) e quimiocinas reguladas por ativação e expressadas por células T normais (WANG et al., 1997; ZOJA et al., 1998; SYME; ELLIOTT, 2011).

Além dos fatores de progressão inerentes ao tipo de lesão renal que deu origem à DRC, outras condições ou doenças renais podem se sobrepor. Por conseguinte, deve ser enfatizado que durante a progressão da DRC, os pacientes não estarão isentos de sofrer lesões novas em adição às que já fazem parte do processo. As causas mais frequentes de lesões adicionais incluem alterações imunomediadas, infecções sistêmicas, infecções do trato urinário, nefrolitíases, obstruções do trato urinário, reações a fármacos ou outras nefrotoxinas, hipertensão sistêmica e glomerular, hipoperfusão renal crônica e amiloidose (POLZIN, 2011a). Destaca-se nesse cenário, a ocorrência de doença renal aguda sobre a crônica (LIEBERTHAL; LEVINSKY, 1992; POLZIN; OSBORNE, 1995; COWGILL; FRANCEY, 2005; GRAUER, 2007; CARVALHO, 2015).

Assim, o processo de evolução da DRC pode ser acelerado pela sobreposição de condições prejudiciais eventuais (MEYER, 2003; EDDY; NEILSON, 2006; ISHANI et al., 2011; DOI et al., 2013; TAKAORI; YANAGITA, 2016). Dentre estas, grande atenção tem sido dada à LRA, que vem se apresentando como um problema clínico impactante e cada vez mais comum em seres humanos e animais, tanto como causa primária de DRC, quanto como fator de agravamento da condição crônica (ISHANI et al., 2011; THAKAR et al., 2011; GrGIC et al., 2012; DOI et al., 2013; TAKAORI; YANAGITA, 2016). As consequências da LRA, para os pacientes com DRC, dependem da gravidade das lesões e da frequência dos episódios (TAKAORI et al., 2015). Todavia, os mecanismos envolvidos ainda são pouco definidos (ISHANI et al., 2011; TAKAORI; YANAGITA., 2016).

As células do túbulo contornado proximal (TCP), alvos mais frequentes da LRA (GrGIC et al., 2012; DOI et al., 2013), podem se proliferar rapidamente para reparação tubular (KUSABA et al., 2014). Entretanto, a capacidade de regeneração pode ser insuficiente, o que resulta em encurtamento tubular, capacidade funcional inferior à dos TPC sadios ou fibrose intersticial. A limitação da regeneração tubular

explica-se, em parte, pela associação de atividade apoptótica intensa com proliferação celular insuficiente (ENDO et al., 2015).

A perda de capilares peritubulares é outro achado comum após a LRA. Kramann, Tanaka e Humphreys (2014), em estudo experimental, compararam o número e tamanho dos capilares peritubulares após quadro moderado ou grave de LRA, revelaram que o número de capilares diminui proporcionalmente ao grau da lesão. A perda dos capilares causa hipóxia, lesão tubular, ativação de células inflamatórias e fibroblastos, resultando em fibrose intersticial (TANAKA; TANAKA; NANGAKU, 2014).

Após estabelecimento de LRA, diversos tipos de células inflamatórias, incluindo monócitos/macrófagos, invadem os rins e contribuem para a reparação tecidual (BONVENTRE; YANG, 2011; MENG; PATERSON; HY, 2014). Os macrófagos são células que têm papel central na lesão renal e reparação. Em modelos animais, foram observados dois tipos de macrófagos que surgem em diferentes períodos pós-lesão. Macrófagos M1 que migram imediatamente e produzem moléculas pró-inflamatórias e macrófagos M2, que surgem na fase de recuperação da LRA e secretam citocinas pró-fibrinóticas, que auxiliam na proliferação celular e reparação do TCP na fase de resolução da LRA (LEE et al., 2011). Entretanto, se houver quadro inflamatório persistente, ocorre fibrose tecidual progressiva, o que caracteriza a DRC (MENG; PATERSON; HY, 2014).

As mudanças glomerulares após LRA também já foram foco de estudo. Takaori et al. (2015) observaram que um episódio severo, mas único de LRA, não cursa com alterações estruturais nos glomérulos, mas quando persistentes, levam ao desenvolvimento de esclerose glomerular.

Para a compreensão dos possíveis efeitos dos eventos adicionais (especificamente a proteinúria glomerular e a LRA) que podem promover ou agravar o processo de progressão da DRC, a detecção de tal condição é imperativa. Ambos os eventos adicionais destacados comprometem primariamente os túbulos renais (LIEBERTHAL; LEVINSKY, 1992; POLZIN; OSBORNE, 1995; COWGILL; FRANCEY, 2005; GRAUER, 2007; CARVALHO, 2015). Portanto, os biomarcadores de lesão tubular podem constituir ferramentas essenciais para o diagnóstico.

Na prática atual, os principais testes disponíveis para o diagnóstico de DRC em cães envolvem diversos achados clínicos e de exames complementares, dentre os quais destaca-se a concentração sérica de creatinina que é um biomarcador tradicional. Embora a creatinina sérica seja empregada como biomarcador para o estadiamento da DRC, segundo a classificação proposta pela IRIS, 2015, suas concentrações só aumentam quando a perda de massa renal funcional soma 65% a 75% do parênquima (LEFEBVRE, 2011). Conseqüentemente, há atraso substancial na identificação da DRC e na adoção de medidas precoces de tratamento (GRAUER, 2005).

Os biomarcadores são moléculas fisiológicas cuja concentração aumenta ou diminui em determinados processos teciduais/orgânicos (ATKINSONS et al., 2001). Com o propósito de detectar lesão renal, sua localização e gravidade, estudos têm sido elaborados para avaliação de biomarcadores precoces de lesão em humanos e animais (PRICE, 2002; NABITY et al., 2012; ZHOU et al., 2014; GARG et al., 2015).

Os biomarcadores urinários, dependendo da sua origem no rim, podem ser específicos de um sítio ou refletir uma função regional. Dentre esses podem ser citadas proteínas circulantes de alto e baixo pesos moleculares, proteínas lisossomais, enzimas da borda em escova do túbulo proximal, proteínas do túbulo distal, proteínas estruturais glomerulares e prostanóides (PRICE, 2002).

Enzimas urinárias e proteínas de baixo peso molecular podem ser utilizadas como biomarcadores de lesão renal, pois sua excreção urinária é precoce, possibilitando a detecção de pequenas alterações que comprometam a função das células tubulares. A presença dessas substâncias na urina pode decorrer de extravasamento de enzimas/microproteínas contidas nas células epiteliais tubulares, em quantidade proporcional à intensidade da lesão, ou à incapacidade tubular de reabsorção de substâncias normalmente filtradas pelos glomerulares (VIANNA, 2006).

Dentre os diversos biomarcadores estudados, dentre eles, a NGAL tem mostrado grande potencial para a avaliação precoce e sensível de lesões renais (KUWABARA et al., 2009; SEGEV et al., 2013). Há algum tempo essa glicoproteína vem sendo utilizada em pesquisas na medicina (COWLAND; BORREGAARD, 1997; MISHRA et al., 2004; OTTO et al., 2015; HELANOVA; SPNAR; PARENICA, 2014;

GOLDSTEIN, 2015) e, mais recentemente, na medicina veterinária (LEE et al., 2012; AHN; HYUN, 2013; SEGEV et al., 2013; STEINBACH et al., 2014; ZHOU et al., 2014; HSU et al., 2014b; CARVALHO; ALVES; VASCONCELLOS, 2016).

A NGAL, também conhecida como lipocalina-2, é uma glicoproteína de 25 kD, da superfamília das lipocalinas, composta de 178 aminoácidos, covalentemente ligada à gelatinase em neutrófilos. A expressão de NGAL ocorre em neutrófilos, monócitos, adipócitos e diversas células epiteliais (KJELDSEN et al., 1993; FLOWER, 1996; DAURE et al., 2013; SEGEV et al., 2013; HSU et al., 2014b; WATANABE et al., 2014; LIU et al., 2015). Em condições fisiológicas, baixa expressão desta proteína é observada nas células do cólon, pulmões, traqueia, útero, próstata, glândulas salivares, medula óssea, estômago, fígado e rins (COWLAND; BORREGAARD, 1997; BONOMINI et al., 2010).

Nos rins, a NGAL é uma proteína intracelular presente nos epitélios dos túbulos contornados proximal e distal, na alça de Henle e no duto coletor (BONOMINI et al., 2010; SHEMIN; DWORKIN, 2011; PRESSLER, 2015). A NGAL é liberada pelos túbulos renais lesados (KUWABARA et al., 2009; VALLE et al., 2011; NABITY et al., 2012) e, sua concentração urinária, aumenta substancialmente, logo nas fases iniciais da lesão (HSU et al., 2014a). Em quadros de LRA, esta enzima, ao que tudo indica, age como um importante atenuador de apoptose e intensificador da resposta proliferativa celular (MISHRA et al., 2004).

A molécula foi inicialmente purificada a partir de grânulos de neutrófilos – daí seu nome – durante quadros inflamatórios (KJELDSEN et al., 1993) e infecciosos, nos quais parece atuar como componente importante da imunidade inata contra infecções bacterianas (DAURE et al., 2013). Por ser um quelante sideróforo, a NGAL tem ação bacteriostática, uma vez que, tornando o ferro indisponível, inviabiliza a multiplicação dos microrganismos (DAURE et al., 2013; SEGEV et al., 2013).

A NGAL pode ser liberada no sangue e na urina em várias circunstâncias potencialmente prejudiciais aos rins (BONOMINI et al., 2010). Entretanto, os rins não são considerados fonte significativa de NGAL plasmático. Em um estudo experimental de isquemia renal unilateral, a NGAL não foi imediatamente identificada na circulação ou na veia renal, mas estava presente no ureter do rim isquêmico (SCHMIDT et al., 2007).

A NGAL plasmática tem como origem diversos órgãos (COWLAND; BORREGAARD, 1997). Por ser menor que a albumina, é facilmente filtrada pelos glomérulos e reabsorvida pelos túbulos proximais (KUWABARA et al., 2009; SHEMIN; DWORKIN, 2011). Conseqüentemente, sua concentração é inversamente proporcional à taxa de filtração glomerular (TFG); (BOLIGNANO et al., 2009; NABITY et al., 2012). Assim, o aumento da sua concentração plasmática é um bom indicador de redução da filtração glomerular, desde que não haja lesão em outros tecidos que possam lhe dar origem (SHEMIN; DWORKIN, 2011; AHN; HYUN, 2013).

A NGAL é facilmente detectada na urina, pois não é degradada ou metabolizada após sua síntese e secreção no lúmen tubular (BONOMINI et al., 2010; SHEMIN; DWORKIN, 2011). Fato este, que pode ser justificado, por sua resistência às proteases (MISHRA et al., 2003). Fisiologicamente, a excreção urinária de NGAL, que se deve a uma ínfima secreção no ramo ascendente da alça de Henle, é muito baixa (SHEMIN; DWORKIN, 2011). Entretanto, em condições patológicas como síndrome nefrótica, nefropatia diabética, nefropatia obstrutiva e nefrite intersticial, a concentração urinária do biomarcador pode aumentar rapidamente em decorrência de lesão dos túbulos contornados proximal e distal, por aumento da secreção tubular e diminuição da reabsorção da sNGAL filtrada (KUWABARA et al., 2009).

Em cães, a NGAL já foi alvo de experimentos envolvendo a avaliação de lesões renais agudas e crônicas (AHN; HYUN, 2013; SEGEV et al., 2013; ZHOU et al., 2014; HSU et al., 2014a), bem como para indicar a existência de LTA na DRC (SHRESTHA et al., 2012; CARVALHO; ALVES; VASCONCELLOS, 2016).

Na atualidade, ainda são escassos os estudos que investigam a NGAL em cães com DRC naturalmente adquirida (NABITY et al., 2012; AHN; HYUN 2013; HSU et al., 2014a; STEINBACH et al., 2014), e durante seu processo de progressão (NABITY et al., 2012; HSU et al., 2014a), bem como sua relação com os quatro estádios da classificação proposta pela *International Renal Interest Society*. Em um dos poucos estudos, Ahn e Hyun (2013) observaram valores da NGAL sérica (sNGAL) mais altos em pacientes nos últimos estádios da DRC (3 e 4) comparados aos valores de animais sadios.

Estudos também já avaliaram a relação entre o quadro proteinúrico e a produção da uNGAL. Uma abundante eliminação já foi observada em pacientes com síndrome nefrótica e, por este motivo, sugere-se a possibilidade de que ocorra lesão e mau funcionamento do TCP devido à sobrecarga de proteína (KUWABARA et al., 2009). Em estudo recente, avaliando ratos pré-diabéticos, foram encontradas concentrações urinárias de NGAL significativamente maiores nos animais que se tornaram albuminúricos (GARG et al., 2015).

Os resultados dos estudos já realizados em cães com doença renal compõem um conjunto de dados ainda incipiente, mas apropriado para indicar qualidades do NGAL com biomarcador precoce e sensível para detecção de lesão tubular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Laboratórios

O estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Nefrologia e Urologia do Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Urologia Veterinária (GPNUV) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *campus* de Jaboticabal-SP; e do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, ambos localizados no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *campus* de Jaboticabal-SP. As dosagens de NGAL foram realizadas nas dependências do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de SP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior.

3.2. Pacientes

Foram avaliados cães adultos, sem restrição quanto à raça ou ao gênero, atendidos pelo Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária (SNUV) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *campus* Jaboticabal (FCAV UNESP – Jaboticabal).

A utilização dos animais para o presente estudo foi aprovada pela CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da mesma instituição, protocolo nº 11.144/16. A inclusão dos pacientes foi feita sob consentimento livre e esclarecido, de cada proprietário.

3.2.1. Elegibilidade dos pacientes (critérios para inclusão).

Foram considerados elegíveis para o estudo, os pacientes aparentemente saudáveis encaminhados para check-up ou avaliação antes de procedimentos eletivos (ex. vacinação, castração, plástica corretiva ou reparadora) que não apresentassem qualquer tipo de alteração aos exames de rotina (laboratoriais e de imagem). Também foram considerados os pacientes em condição ou potencial para o desenvolvimento de DRC. Esta categoria de pacientes em risco incluiu os que apresentavam qualquer uma das doenças ou condições que sabidamente estão relacionadas ao desenvolvimento de lesão renal crônica e progressiva (doença renal aguda, doença extrarrenal que pode resultar em lesão nos rins ou idade avançada).

E os que apresentavam alterações clínicas e laboratoriais ou sinais sugestivos de DRC, tais como densidade urinária baixa sem causa extrarrenal identificável, alteração renal detectada ao exame de imagem ou azotemia. Assim, não havendo indícios imediatos para exclusão, os pacientes foram considerados para inclusão no estudo, à medida que deram entrada no SNUV.

3.2.2. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão dos pacientes foram (1) ocorrências de complicações clínicas, (2) diagnóstico de cistite, (3) diagnóstico clínico inconclusivo, (4) amostras de sangue ou urina impróprias para avaliação laboratorial sem a possibilidade de nova coleta e (4) desistência do proprietário.

3.3. Avaliação preliminar e constituição dos grupos

De acordo com a abordagem semiológica descrita por Carvalho (2014), as avaliações clínicas e laboratoriais específicas para o estudo compreenderam (1) resenha, histórico e exame físico geral e (2) avaliação clínica e laboratorial do trato urinário, exame ultrassonográfico e outros que foram indicados como complementares ou para fins de diagnóstico diferencial. Resultados documentados de exames já realizados por outras áreas de especialidades, como parte de check-up, foram utilizados para a conclusão diagnóstica de comorbidades.

No total, foram avaliados 235 pacientes, dos quais 26 eram sadios e 209 que já tinham ou estavam em risco de desenvolver DRC. Embora, na primeira abordagem, todos tivessem sido considerados elegíveis para o estudo, houve exclusões.

Assim, foram incluídos neste estudo, 15 sadios (Sadio), 18 sob risco de desenvolver DRC (Risco) e 54 com DRC 1, DRC 2; DRC 3 ou DRC-4, perfazendo um total de 87 cães (Tab. 1).

Tabela 1. Sumário da composição dos grupos de cães sadios (Sadio), sob risco de desenvolver DRC (Risco) ou com doença renal crônica (DRC) nos diferentes estádios (*IRIS staging of CKD - 2015*).

Grupo	n	Características
Sadio	15	Cães sadios
Risco	18	Pacientes em risco de desenvolver DRC (doença renal aguda ou recente, doença extrarrenal que pode resultar em lesão dos rins, e idade avançada).
DRC-1	6	<u>Estádio 1</u> – não azotêmico; creatinina sérica <1,4mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.
DRC-2	11	<u>Estádio 2</u> - azotemia renal leve; creatinina sérica 1,4 a 2,0mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.
DRC-3	26	<u>Estádio 3</u> - azotemia renal moderada; creatinina sérica 2,1 a 5,0mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.
DRC-4	11	<u>Estádio 4</u> - azotemia renal severa; creatinina sérica >5,0mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.

3.4. Protocolo experimental

Sendo elegíveis para compor os grupos, os pacientes foram submetidos à avaliação do trato urinário, incluindo aspectos anatômicos e funcionais, direta ou indiretamente relacionados. O rol de exames compreendeu: (1) anamnese, exame físico, aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e ultrassonografia do trato urinário; (2) hemograma, urinálise, concentrações séricas de ureia (sUr), creatinina (sCr), sódio (sNa), potássio (sK), fosfato (sP) proteína total (sPt) e albumina (sAlb); (3) excreção fracionada de sódio (EFNa); (4) razão proteína/creatinina da urina (UP/C); (5) determinações das concentrações de NGAL séricas (sNGAL) e urinárias (uNGAL).

Inicialmente, os pacientes foram avaliados por meio de exames de rotina de nefrologia e urologia como hemograma, urinálise, bioquímica sérica e urinária, pressão arterial sistólica e ultrassonografia do trato urinário.

Em função de não estarem se alimentando, os cães considerados em crise urêmica passaram por todas as coletas de amostra no primeiro dia de avaliação. Esta conduta permitiu início imediato do tratamento de urgência. Quando indicado, nos dias que se seguiram, foram feitos outros exames necessários para completar,

refinar ou confirmar o diagnóstico, tanto da condição renal, quanto de possível comorbidade.

No caso dos pacientes que estavam sendo alimentados regularmente, procederam-se as coletas de sangue e urina após jejum de 12 horas (sem restrição de água). Assim, foi evitada a influência da alimentação sobre os parâmetros analisados.

3.5. Metodologia das avaliações

3.5.1. Considerações sobre a obtenção e o preparo de amostras

Foram necessários 6mL de sangue, obtidos por meio da punção de veia jugular ou cefálica, distribuídos em diferentes recipientes, para a realização de hemograma e análises bioquímicas, para a avaliação inicial. Outros 3-5mL foram coletados, para as análises pós jejum de 12 horas, quando necessário.

Para o hemograma foi utilizada uma alíquota de 2mL de sangue em tubo contendo anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético a 10% - EDTA). Os 4mL restantes (em tubo sem anticoagulante) foram destinados às análises bioquímicas (sUr, sCr, sNa, sK, sP, sPt e sAlb) e dosagem de sNGAL (para pacientes já em jejum), realizadas a partir de soro obtido por centrifugação da amostra a 1800g por 5 minutos.

As amostras de urina (10-15mL) obtidas por cistocentese ou cateterização transuretral, foram encaminhadas para realização imediata de urinálise. O excedente de material (sobrenadante obtido por centrifugação a 1800g por 5 min.) foi destinado às dosagens bioquímicas (uCr, uPt, uNa) e dosagem de uNGAL (para pacientes já em jejum).

Amostras de soro e de sobrenadante de urina foram separadas em alíquotas e estocadas a -20°C , para eventual repetição de exame bioquímico e a -80°C para as dosagens de NGAL.

3.5.2. Análises laboratoriais

3.5.2.1. Hemograma

Os hemogramas foram realizados por método automatizado (contador automático COULTER[®] modelo ABC T8). Esfregaços sanguíneos corados com mistura de Metanol, May-Gruwald e Giemsa foram submetidos à microscopia óptica comum para recontagem de plaquetas, contagem diferencial de leucócitos e avaliação de morfologia celular. As amostras foram processadas no período máximo de uma hora após a coleta.

3.5.2.2. Análises bioquímicas séricas e urinárias

Nas amostras de soro foram dosadas ureia (Método da Urease), creatinina (Método Jaffé modificado), albumina (Método verde de Bromocresol), proteína total (método do biureto) e fósforo (Método fosfomolibdato). Nas amostras de urina foram dosadas creatinina (Método Jaffé modificado) e proteína (Método do vermelho de pirogalol). As análises bioquímicas foram feitas com os conjuntos de reagentes do sistema Labtest² para diagnóstico e para as leituras empregou-se espectrofotômetro³ semi-automático. As dosagens das concentrações séricas e urinárias de sódio foram feitas em aparelho automático pelo método eletrodo íon-seletivo⁴.

3.5.2.3. Avaliação da proteinúria

A proteinúria foi estimada pela razão proteína/creatinina urinária (UP/C), a partir dos valores de concentração de creatinina e de proteína obtidos na mesma amostra de urina, por meio da fórmula que se segue.

$$UPC = uProt/uCr$$

Onde:

UPC = razão proteína/creatinina urinária

uProt = concentração urinária de proteína

uCr = concentração urinária de creatinina

² LABTEST – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

³ LABQUEST-Labtest Diagnóstica S.A. – Lagoa Santa – MG.

⁴ Roche - método de eletrodos íon- seletivo – AVL 9180. Campinas- SP.

3.5.2.4. Excreção Fracionada de Sódio (EFNa)

Os cálculos da excreção fracionada de sódio foram obtidos a partir dos valores das concentrações séricas e urinárias de creatinina e sódio, por meio da fórmula que se segue.

$$\text{EFNa (\%)} = \frac{[\text{uNa} \times \text{sCr}]}{[\text{uCr} \times \text{sNa}]} \times 100$$

Onde:

EFNa = excreção fracionada de sódio

uNa = concentração urinária de sódio (mEq/L)

sCr = concentração sérica de creatinina (mg/dL)

uCr = concentração urinária de creatinina (mg/dL)

3.5.2.5. E sNa = concentração sérica de sódio (mEq/L)

Ensaio para dosagem da NGAL em amostras de soro e de urina

A NGAL foi mensurada usando *kit* específico para cães DOG NGAL ELISA⁵, (ensaio tipo sanduiche; com duplicatas de amostras) de acordo com as especificações do fabricante. Ao final do processo, as placas de ELISA foram lidas em leitor de microplaca SpectraMax M3⁶ utilizando comprimento de onda de 450nm. Os resultados obtidos foram expressados em pg/mL.

3.5.2.5.1. Ajuste da uNGAL de acordo com a concentração urinária

Para a avaliação dos resultados de uNGAL (pg/mL) e comparação entre indivíduos e entre os subgrupos, os dados originais foram ajustados em função da concentração urinária de cada paciente. Para tanto, foi calculado o fator de concentração urinária (FCU) de cada paciente, que indica quantas vezes o ultrafiltrado foi concentrado até a formação da urina final, com base nas concentrações, inicial e final, de creatinina. Obteve-se, então, o valor ajustado pela multiplicação de cada valor de uNGAL pelo respectivo FCU. Os cálculos foram feitos por meio da fórmula que se segue (CARVALHO; ALVES; LEAL, 2016).

$$\text{uNGAL.FCU (pg/mL)} = \text{uNGAL} \times (\text{uCr} / \text{sCr})$$

Onde:

uNGAL.FCU = uNGAL ajustada pelo fator de concentração urinária (FCU)

⁵ BioPorto Diagnostics A/S-Grusbakken 8 DK-2820 Gentofte Denmark

⁶ SpectraMax M3 - Molecular Devices

uNGAL = concentração urinária de NGAL (pg/mL)
uCr = concentração urinária de creatinina (mg/mL)
sCr = concentração sérica de creatinina (mg/mL)

3.6. Análise estatística dos resultados

O estudo seguiu delineamento em blocos casualizados. Os resultados foram avaliados por estatística descritiva e por análise de variância (*One-way ANOVA*) para dados não paramétricos (Kruskal-Wallis para a ANOVA e Dunn para a comparação múltipla de médias). Para avaliar a distribuição de gênero nos diferentes grupos empregou-se análise de variância (*Two-way ANOVA*) e comparação múltipla de Sidak, assumindo ausência de interação entre os fatores grupo e gênero. Para comparações, eventuais, das médias de dois grupos, foi utilizado o teste t não pareado e o teste F para comparação de variâncias. Foi adotado $\alpha=0,05$, para todas as análises.

A análise dos resultados compreendeu duas etapas distintas. Primeiramente foram analisados os dados do total de pacientes incluídos (87 cães), distribuídos em seis grupos, de acordo com o diagnóstico (15 sadios; 18 sob risco de desenvolver DRC; 6 com DRC-1; 11 com DRC-2; 26 com DRC-3 e 11 com DRC-4). Na sequência, foram discriminados os pacientes que apresentaram valores de uNGAL.FCU >20000 pg/dL, com a finalidade de estudar o comportamento da excreção urinária de NGAL na DRC. Para tanto, foram excluídos da segunda etapa de análises, os dados dos 18 pacientes em risco de desenvolver DRC. Após redistribuição dos 69 pacientes restantes, constituíram-se três grupos: 15 cães sadios, 41 com DRC com uNGAL.FCU <20000 pg/dL e 13 com uNGAL.FCU >20000 pg/dL.

As análises estatísticas e gráficos foram feitos por meio do *GraphPad Prism version 7.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, California USA*.

4. RESULTADOS

Dentre os 87 pacientes incluídos no estudo, havia 47 machos e 40 fêmeas distribuídos, de acordo com o diagnóstico, em seis grupos: 15 sadios; 18 em risco de desenvolver DRC; 6 com DRC-1; 11 com DRC2; 26 com DRC-3; 11 com DRC-4 (Tabela 2). Não houve efeito do fator grupo ($P=0,2275$) sobre a proporção entre machos e fêmeas e nem efeito do fator gênero ($P=0,5832$) sobre os grupos.

Dos 87 cães avaliados, 19 (21,8%) não tinham raça definida (SRD) e 68 eram de raças puras (25 raças distintas). As variedades e distribuição de raças, nos diferentes grupos, estão apresentadas na Tab. 2.

As análises dos dados de massa corporal não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos, embora no conjunto tenham variado entre 2,7kg e 60kg (Tabela 3 e Figura 1).

As idades variaram de 1 ano a 16 anos e as médias dos grupos DRC 2 e DRC 3 foram maiores ($P= 0,0221$; $P= 0,0086$, respectivamente) que a média dos sadios (Tabela 3 e Figura 1).

Considerando os parâmetros que constituem o foco principal do estudo, os resultados da primeira etapa de análises evidenciaram os perfis de distribuição de dados dentro de cada grupo (sadios, em risco de DRC ou com DRC 1, 2, 3 ou 4). Os dados da estatística estão dispostos na Tab. 4 (sCr e sUreia), Tab. 5 (sP e UP/C), Tab. 6 (DU e EFNa), Tab. 7 (uNGAL e uNGAL.FCU), Tab. 8 (sPt e sAlb), Tab. 9 (PAS e sNGAL), Tab. 10 (He e Ht) e Tab. 11 (Le e Ns).

As concentrações de sCr e sUreia apresentaram o mesmo perfil de variação; as médias dos grupos DRC 3 e 4 foram significativamente maiores do que as dos grupos Sadio, Risco e DRC 1, enquanto o grupo DRC 2 não diferiu significativamente dos demais (Figura 2 A e 2 B). A média de sFosfato do DRC4 não diferiu da média do DRC3, mas foi significativamente maior que as dos demais grupos (Figura 2 C). Quanto à UP/C, as médias dos grupos DRC não diferiram significativamente entre si, e foram todas significativamente maiores que a média do grupo Sadio (Figura 2 D).

A densidade urinária dos grupos DRC 3 e 4 tiveram médias significativamente menores que as dos pacientes Sadios e em Risco, enquanto a média de EFNa do

DRC 4 foi maior do que as dos pacientes saudáveis, em risco ou com DRC 1 e 2 (Figura 3 A e 3 B).

No ensaio para dosagem de NGAL, obteve-se curva padrão perfeitamente ajustada ($r^2=1,000$; $EC50=896,1$) e os coeficientes de variação intraensaio foram apropriados (<10%) – NGAL sérico: $CV=9,39\%$; NGAL urinário: $CV=7,34\%$. O biomarcador NGAL urinário, apresentado como valor original (uNGAL), teve as médias dos grupos Risco e DRC 2, 3 e 4 significativamente maiores que as dos pacientes saudáveis. Entretanto, quando ajustado pelo fator de concentração urinária (uNGAL.FCU), somente as médias dos grupos Risco e DRC 2 foram significativamente maiores que a do grupo Sadio (Figura 3 C e 3 D). Os parâmetros sPt, sAlb, PAS (Figura 4), leucócitos e neutrófilos segmentados (Figura 5), não apresentaram diferenças significativas entre as médias dos três grupos. Mas, as médias de sNGAL dos grupos DRC 3 e 4 foram significativamente maiores que as dos pacientes saudáveis (Figura 4 A), assim como foi observado com as médias relativas aos números de hemácias e aos valores de hematócrito (Figura 5 A e 5 B).

Tabela. 2. Características físicas dos 87 cães avaliados, distribuídos em seis grupos – saudáveis (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estágios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD - 2015*).

n	Raças	Grupo (n)	S (15)		Risco (18)		DRC1 (6)		DRC2 (11)		DRC3 (26)		DRC4 (11)	
			M (10)	F (5)	M (13)	F (5)	M (1)	F (5)	M (4)	F (7)	M (12)	F (14)	M (7)	F (4)
19	SRD		1	2	1	2		1	3	2	3	1	3	
8	Cocker Spaniel								2	2	2	1	1	
5	Bulldog Inglês				2			1		1		1		
5	Schnauzer									2	3			
4	Poodle				1	1		1		1				
4	Lhasa Apso							1			2	1		
4	Shih tzu				1					1	2			
3	York Shire Terrier		1						2					
3	Blue Hiller		1	2										
3	Maltês				1		1			1				
3	Boxer				2			1						
3	American Pit Bull				2					1				
3	Bull Terrier				1					1			1	
2	Teckel		1					1						
2	Dálmata		1						1					
2	Beagle		1		1									
2	Rottweiler		1					1						
2	Bernese				1	1								
2	Labrador					1					1			
2	Bulldog francês												2	
1	Golden Retriever		1											
1	Sharpei		1											
1	Dog Alemão		1											
1	Fox terrier brasileiro			1										
1	American Bully							1						

1 Dogue de Bordeau

1

M - macho; F - fêmea; SRD - sem raça definida

Tabela. 3. Dados das análises (estatística descritiva) da massa corporal e idade de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD - 2015*).

Estatística Descritiva	Massa corporal (kg)						Idade (anos)						
		S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4
	n	15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo		3,50	4,50	4,40	5,00	2,70	5,00	1	1	2	4	1	1
Percentil 25%		11,00	7,75	9,65	6,30	6,13	5,55	2	3	5	8	6,5	2
Mediana		19,30	23,15	19,00	9,60	10,45	12,50	4	8,5	8,5	10	12,5	7
Percentil 75%		25,00	30,93	32,90	19,50	19,88	20,46	6	9,3	12,3	14	13,3	13
Máximo		60,00	50,00	53,00	26,80	30,50	24,70	8	13	16	14	15	15
IC (95%)	Inferior	13,05	15,12	4,48	8,10	9,59	7,54	3,09	5,07	3,72	7,81	7,71	3,78
	Superior	30,15	28,13	39,9	18,70	16,48	18,53	5,44	8,82	13,62	12,73	11,83	11,68
CV (%)		71,5	60,5	76,0	58,8	65,5	58,9	49,7	54,4	54,5	35,7	52,1	76,1
Média		21,60	21,63	22,17	13,40	13,04	13,04	4,27	6,94	8,67	10,27	9,77	7,73
Erro padrão da média		3,99	3,08	6,88	2,38	1,67	2,43	0,55	0,89	1,93	1,10	1,00	1,77

IC: intervalo de confiança da mediana. CV: coeficiente de variação.

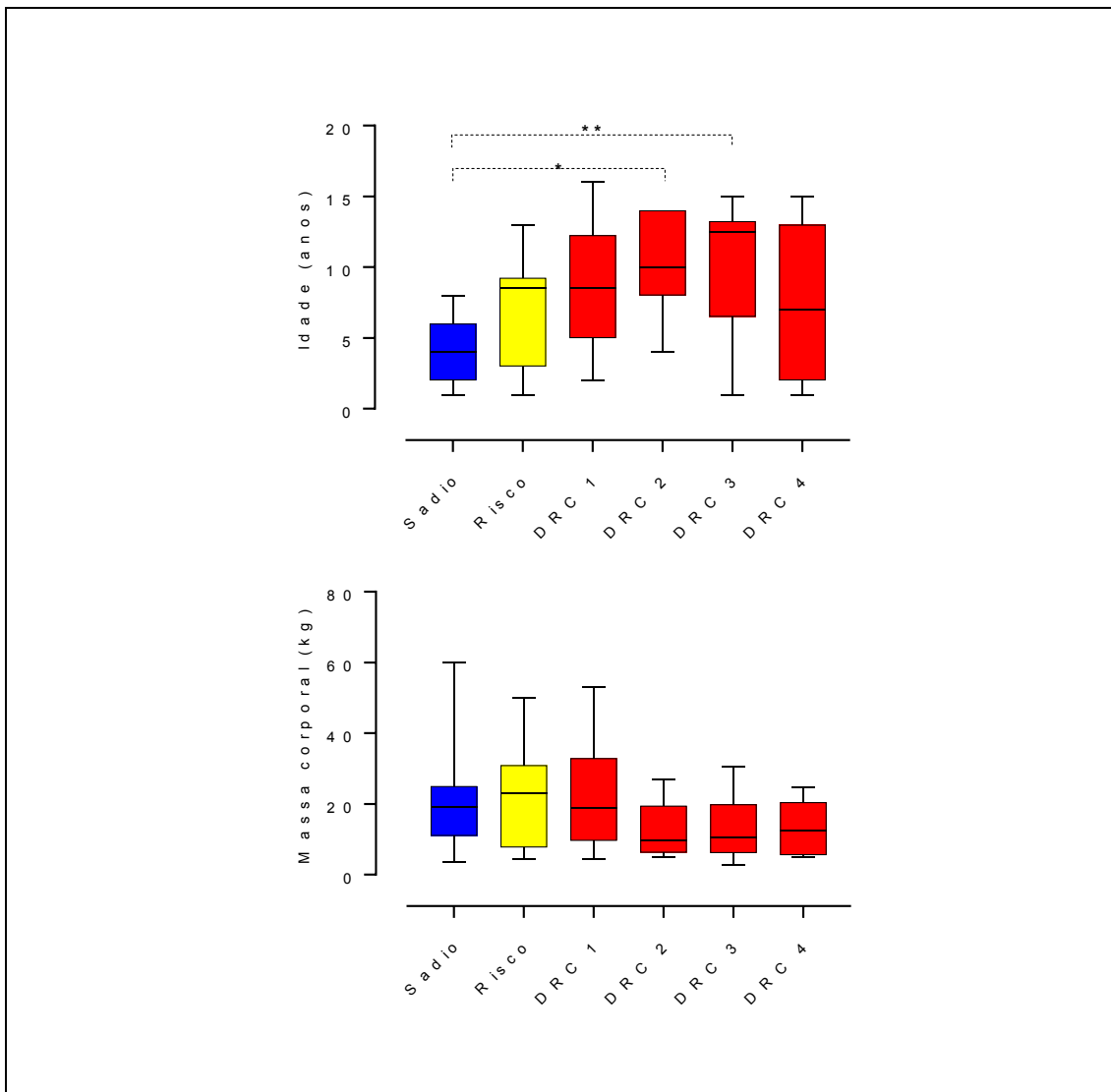


Figura 1. Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) dos parâmetros idade e massa corporal de 87 cães sadios (Sadio), com doença renal crônica (DRC*) ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 sadios; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. * *IRIS staging of CKD, 2015.*

Tabela 4. Dados referentes às análises das concentrações séricas de creatinina (sCr) e de ureia (sUreia) de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD - 2015*).

Estatística Descritiva	sCr (mg/dL)						sUreia (mg/dL)						
		S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4
	n	15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo		0,9	0,6	0,7	1,4	2,1	5,1	22,0	10,0	15,0	39,0	33,0	186,0
Percentil 25%		1,0	0,9	0,8	1,5	2,6	5,3	26,0	27,3	24,8	59,8	102,8	233,0
Mediana		1,2	1,4	1,1	1,7	2,8	7,0	38,0	40,5	31,0	77,5	148,0	297,0
Percentil 75%		1,3	1,6	1,2	1,7	3,9	7,8	42,0	50,8	61,5	90,5	192,8	336,0
Máximo		1,4	3,6	1,3	2,0	4,8	14,4	64,0	106,0	87,0	147,0	348,0	488,0
IC (95%)	Inferior	1,0	1,1	0,8	1,5	2,8	5,6	29,8	32,0	13,8	59,3	124,5	247,7
	Superior	1,2	1,7	1,3	1,8	3,5	9,2	42,8	59,6	67,9	103,5	182,3	362,6
CV (%)		16,8	48,0	23,4	11,2	24,9	36,6	32,4	60,7	63,1	38,0	46,6	28,0

IC: intervalo de confiança da mediana; CV: coeficiente de variação.

Tabela 5. Dados referentes às análises das concentrações séricas de fosfato (sP) e da razão proteína/creatinina urinária (UP/C) de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD - 2015*).

Estatística Descritiva	sP (mg/dL)						UP/C						
		S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4
	n	15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo		2,90	2,70	3,20	3,90	3,70	5,50	0,04	0,04	0,09	0,06	0,05	0,31
Percentil 25%		3,25	3,15	3,30	4,08	4,70	7,50	0,05	0,09	0,16	0,11	0,22	0,41
Mediana		4,30	3,95	3,90	4,35	5,30	9,00	0,07	0,24	0,56	0,48	0,74	0,70
Percentil 75%		4,95	4,40	4,80	5,85	6,80	12,50	0,13	1,09	5,92	1,43	1,87	2,31
Máximo		5,70	8,30	5,20	6,70	11,10	17,30	0,16	5,33	7,16	4,76	7,12	5,13
IC (95%)	Inferior	3,20	3,20	3,20	4,00	5,00	6,40	0,07	0,17	0,00	0,07	0,70	0,49
	Superior	5,00	4,40	5,20	6,00	6,60	16,90	0,11	1,52	5,64	1,93	2,18	2,74
CV (%)		22,5	33,8	20,1	20,4	33,6	36,7	46,2	161,1	134,1	138,5	127,4	103,5

IC: intervalo de confiança da mediana. CV: coeficiente de variação.

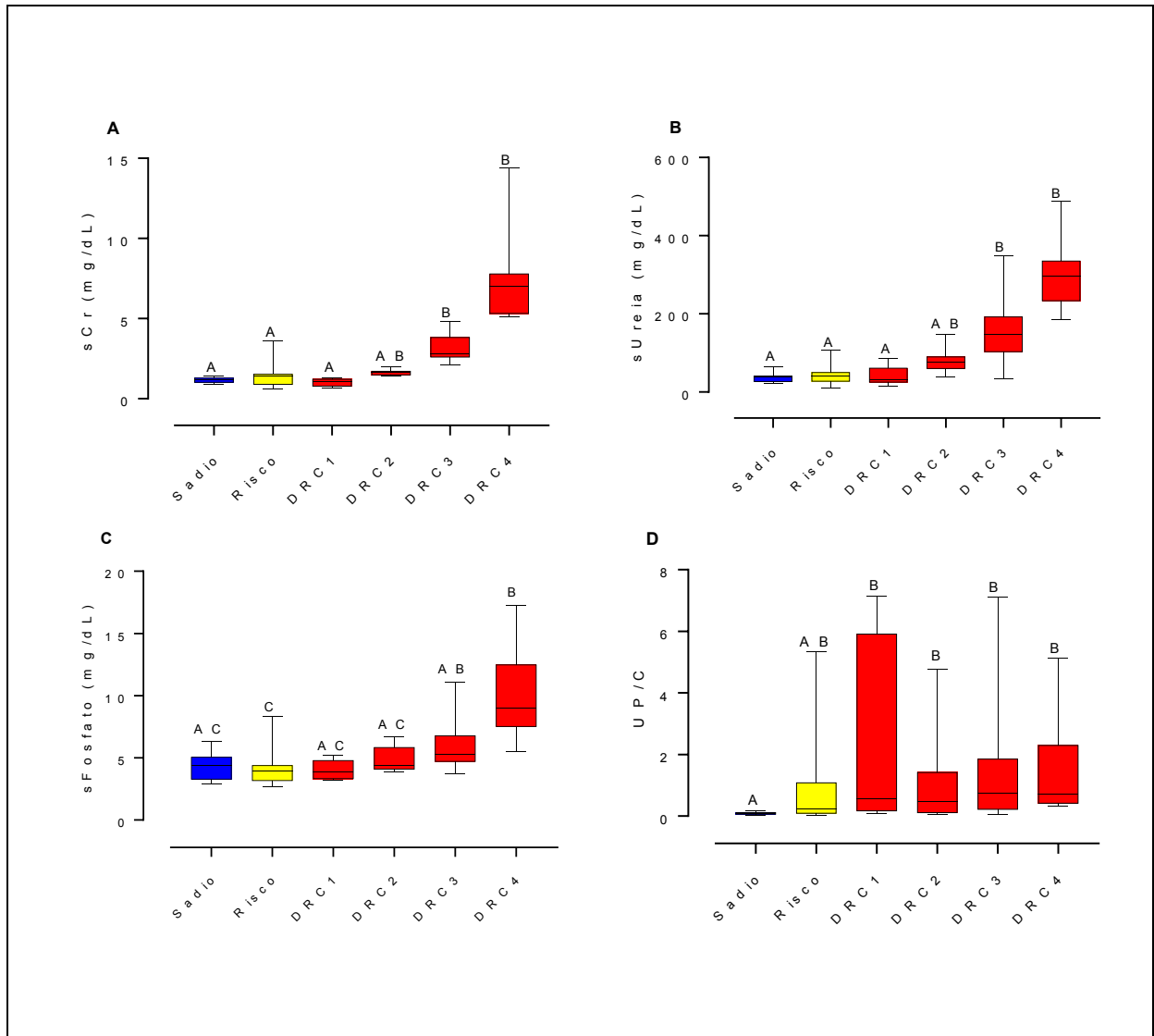


Figura 2. Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros relativos às funções glomerulares de cães sadios (Sadio), com doença renal crônica (DRC*) ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 sadios; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. **A.** Concentração sérica de creatinina (sCr mg/dL). **B.** Concentração sérica de ureia (sUreia mg/dL). **C.** Concentração sérica de fosfato (sFosfato mg/dL). **D.** Razão proteína/creatinina urinária (UP/C). * IRIS staging of CKD, 2015.

Tabela 6. Dados referentes às análises da densidade urinária (DU) e excreção fracionada de sódio (EFNa) de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD* - 2015).

Estatística Descritiva	DU						EFNa (%)						
	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	
	n	15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo	1,010	1,010	1,010	1,010	1,005	1,005	0,02	0,04	0,20	0,03	0,24	0,79	
Percentil 25%	1,030	1,019	1,010	1,015	1,010	1,010	0,06	0,22	0,31	0,19	0,42	2,35	
Mediana	1,035	1,033	1,015	1,020	1,010	1,010	0,11	0,51	0,57	0,37	1,39	3,05	
Percentil 75%	1,045	1,040	1,026	1,025	1,015	1,010	0,28	0,91	1,24	0,53	3,48	10,94	
Máximo	1,050	1,045	1,030	1,030	1,030	1,015	0,86	2,03	1,41	3,17	8,42	13,38	
IC (95%)	Inferior	1,028	1,024	1,009	1,016	1,011	1,008	0,06	0,31	0,28	0,00	1,25	2,48
	Superior	1,042	1,036	1,026	1,025	1,015	1,012	0,31	0,91	1,33	1,53	3,42	9,31
Coeficiente de variação (%)	1,2	1,2	0,8	0,6	0,5	0,2	118,1	88,6	67,5	150,7	104,7	81,0	

IC: intervalo de confiança da mediana.

Tabela 7. Dados referentes às análises das concentrações de NGAL* urinário (uNGAL) e NGAL urinário ajustado pelos respectivos fatores de concentração urinária (uNGAL.FCU), de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios ((DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD* - 2015).

Estatística Descritiva	uNGAL (pg/mL)						uNGAL.FCU (pg/mL)						
	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	
	n	15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo	2,42	8,08	1,54	75,63	18,26	84,80	247	527	192	3545	515	516	
Percentil 25%	4,17	30,50	8,00	129,00	148,30	418,60	922	3954	1139	7047	2929	2004	
Mediana	11,7	82,34	281,40	323,20	363,20	541,70	2669	13830	19043	18828	6243	4147	
Percentil 75%	22,26	627,20	713,60	502,80	727,20	723,40	5651	61231	65320	34265	13127	7435	
Máximo	69,39	871,00	965,20	614,20	940,80	951,40	13086	156910	111343	71948	73552	18489	
IC (95%)	Inferior	6,48	111,80	0,00	211,90	303,70	355,20	1846	13184	0,00	9019	6587	1844
	Superior	26,08	435,30	775,50	456,80	548,10	700,90	6716	69616	74411	38796	22898	8665
CV (%)	108,7	118,9	109,1	54,5	71,1	48,7	102,7	137,1	123,6	87,1	137,0	96,0	

* Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; IC: intervalo de confiança da mediana; CV: Coeficiente de variação.

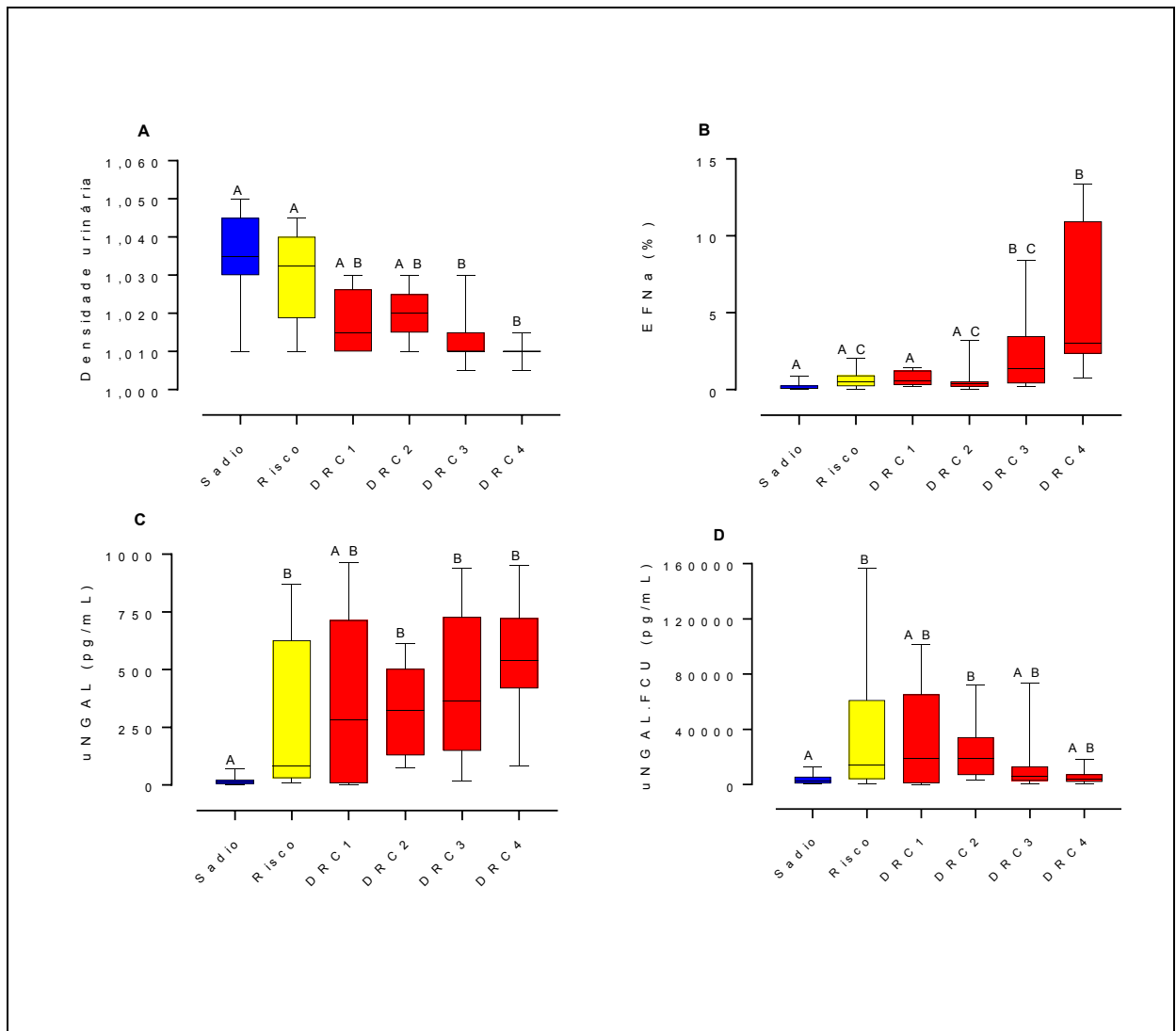


Figura 3. Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros relativos às funções túbulo-intersticiais de cães sadios (Sadio), com doença renal crônica (DRC*) ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 sadios; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. **A.** Densidade urinária. **B.** Excreção fracionada de sódio (EFNa). **C.** Concentração urinária de NGAL** (uNGAL). **D.** Concentração urinária de NGAL ajustado pelo fator de concentração urinária (uNGAL.FCU). * *IRIS staging of CKD*, 2015. ** Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos.

Tabela 8. Dados referentes às análises das concentrações séricas de proteína total (sPt) e albumina (sAlb), de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD* - 2015).

Estatística Descritiva	n	sPt (mg/dL)					sAlb (mg/dL)						
		S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4
		15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo		6,20	4,90	5,60	4,60	5,30	5,60	2,68	2,11	2,64	2,51	1,54	1,31
Percentil 25%		6,40	7,00	5,98	6,48	6,10	5,80	2,77	2,56	2,70	2,52	2,49	1,79
Mediana		6,80	7,45	6,50	7,35	6,70	6,30	3,03	3,17	2,81	3,65	2,82	3,73
Percentil 75%		7,60	8,13	8,53	8,08	7,70	7,28	3,68	3,53	3,40	3,98	3,09	3,18
Máximo		9,40	9,40	8,90	9,50	11,80	8,10	4,31	3,77	3,66	4,10	3,69	3,44
IC (95%)	Inferior	6,60	6,70	5,58	6,22	6,48	5,93	2,94	2,78	2,57	2,87	2,58	2,00
	Superior	7,64	7,93	8,42	8,22	7,57	7,17	3,52	3,33	3,41	3,85	2,99	3,02
CV (%)		13,2	17,0	19,3	19,4	18,8	13,2	16,2	18,0	13,5	20,5	17,8	30,1

IC: intervalo de confiança da mediana. CV: Coeficiente de variação

Tabela 9. Dados referentes às análises da pressão arterial sistólica (PAS) e da concentração sérica de NGAL* (sNGAL) de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD - 2015*).

Estatística Descritiva	PAS (mmHg)						sNGAL (pg/mL)						
	S	Risco	DRC1	DRC2	DRC3	DRC4	S	Risco	DRC1	DRC2	DRC3	DRC4	
	n	15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo	110	100	140	120	100	100	36,71	37,47	24,96	64,87	66,34	179,60	
Percentil 25%	125	120	140	140	135	120	80,83	64,03	48,37	87,65	141,70	260,10	
Mediana	130	140	140	150	150	180	118,80	118,90	111,80	172,10	222,80	411,00	
Percentil 75%	140	143	210	193	158	160	179,20	216,20	190,70	211,20	307,50	586,20	
Máximo	150	280	240	200	180	160	254,60	665,00	209,70	317,20	581,00	666,50	
IC (95%)	Inferior	126	122	114	139	135	122	93,12	82,63	38,30	115,50	195,20	314,90
	Superior	139	161	222	182	153	153	158,00	243,00	194,60	225,20	292,70	528,80
CV (%)		8,3	27,7	26,1	17,7	15,0	17,0	47,2	92,4	64,0	47,9	49,5	37,8

* Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; IC: intervalo de confiança da mediana; CV: Coeficiente de variação.

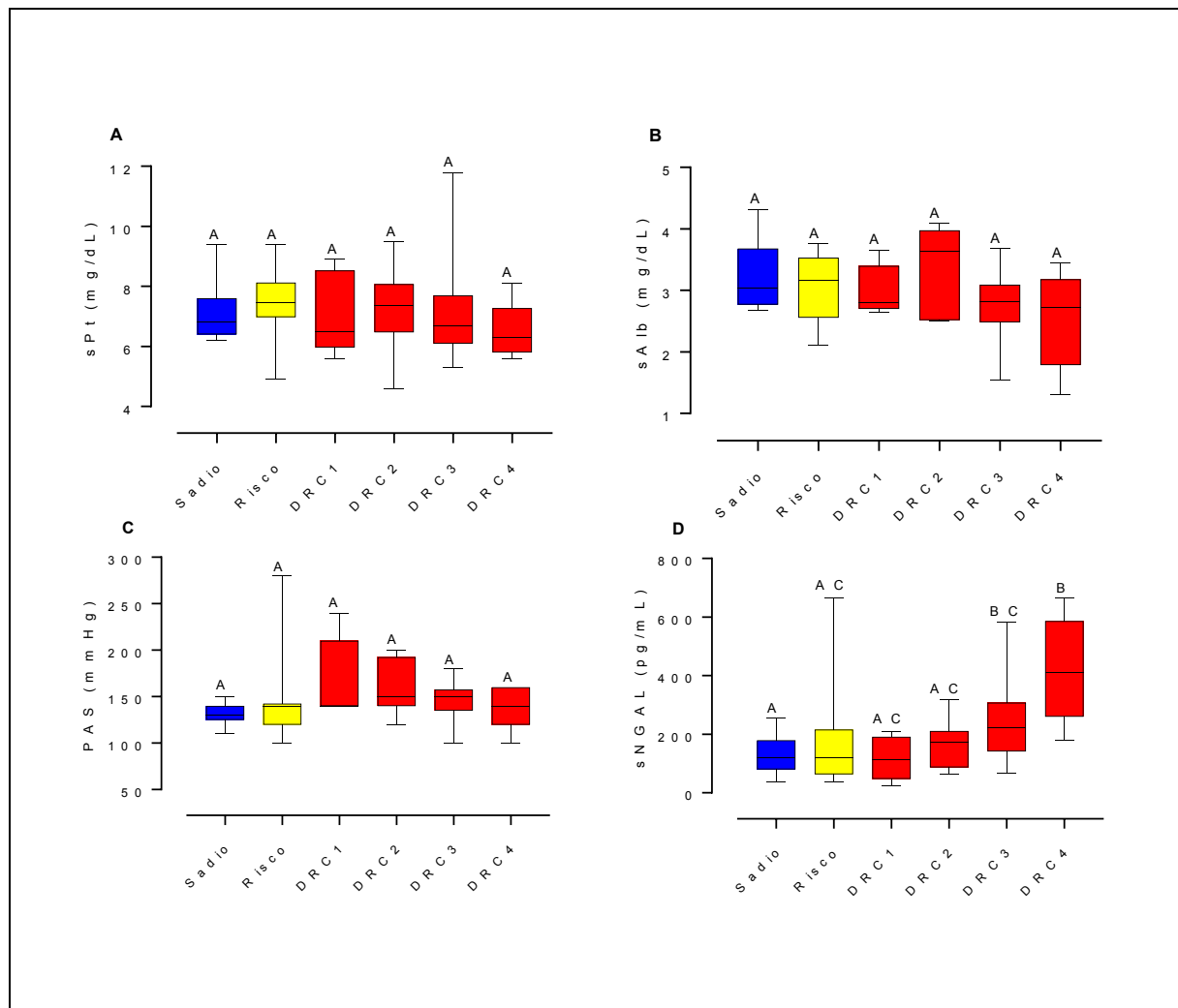


Figura 4. Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros relativos a aspectos sistêmicos implicados na doença renal crônica (DRC*) de cães sadios (Sadio), com DRC ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 sadios; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. **A.** Concentração sérica de proteínas totais (sPt). **B.** Concentrações séricas de albumina (sAlb). **C.** Pressão arterial sistólica (PAS). **D.** Concentração sérica de NGAL** (sNGAL). * *IRIS staging of CKD, 2015.* ** Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos.

Tabela 10. Dados referentes às análises do número de hemácias (He) e do valor de hematócrito (Ht), de 87 cães, distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD* - 2015).

Estatística Descritiva	n	He (cel/ μ L x 10 ⁻⁶)						Ht (%)					
		S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4
		15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo		5,52	2,47	5,58	2,65	2,69	1,56	38,0	16,3	39,8	22,5	20,8	11,2
Percentil 25%		6,70	4,47	5,72	4,81	3,67	2,10	46,7	30,6	39,9	33,7	25,4	15,6
Mediana		6,97	6,21	6,31	5,29	4,49	3,33	49,1	43,8	41,9	38,4	31,1	22,1
Percentil 75%		7,56	7,01	7,56	7,27	5,93	6,13	51,9	47,6	53,7	53,1	41,6	38,2
Máximo		8,88	7,89	7,74	8,52	8,01	6,65	60,4	55,7	55,3	56,5	54,0	42,8
IC (95%)	Inferior	6,64	4,95	5,58	4,63	4,36	2,73	46,2	34,0	37,9	33,4	30,4	19,1
	Superior	7,62	6,57	7,49	6,92	5,49	5,26	52,3	45,4	52,7	48,5	37,8	34,7
CV (%)		12,3	28,3	14,0	29,5	28,6	47,2	11,3	28,9	15,6	27,4	27,1	43,1

IC: intervalo de confiança da mediana; CV Coeficiente de variação.

Tabela 11. Dados referentes às análises dos números de leucócitos (Le) e de neutrófilos segmentados (Ns), de 87 cães distribuídos nos grupos: sadio (S), risco de doença renal crônica (Risco) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – *IRIS staging of CKD - 2015*).

Estatística Descritiva	Le (cel/ μ L x 10^{-3})						Ns (cel/ μ L x 10^{-3})						
		S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4	S	Risco	DRC 1	DRC 2	DRC 3	DRC 4
	n	15	18	6	11	26	11	15	18	6	11	26	11
Mínimo		4,70	5,80	6,70	5,20	4,00	3,60	3,38	3,36	5,23	3,33	3,04	2,44
Percentil 25%		7,00	7,95	6,78	6,60	5,50	5,20	3,90	5,61	5,44	4,21	3,93	4,42
Mediana		8,45	9,15	8,90	8,90	7,60	6,70	6,50	7,09	6,66	7,41	5,14	4,95
Percentil 75%		10,58	11,90	10,55	12,10	10,65	9,80	8,66	9,89	9,51	9,80	7,49	6,08
Máximo		12,50	40,40	11,00	19,10	28,00	19,20	25,76	34,34	10,45	16,62	24,19	17,66
IC (95%)	Inferior	7,27	7,40	6,78	6,94	7,09	5,26	4,54	5,59	5,04	5,15	5,22	3,51
	Superior	10,11	15,01	10,79	12,24	12,95	11,18	10,59	12,31	9,53	10,41	10,43	9,31
CV (%)		28,3	68,4	21,8	41,2	72,4	53,6	72,3	75,6	29,4	50,3	82,3	67,4

IC: intervalo de confiança da mediana; CV: Coeficiente de variação

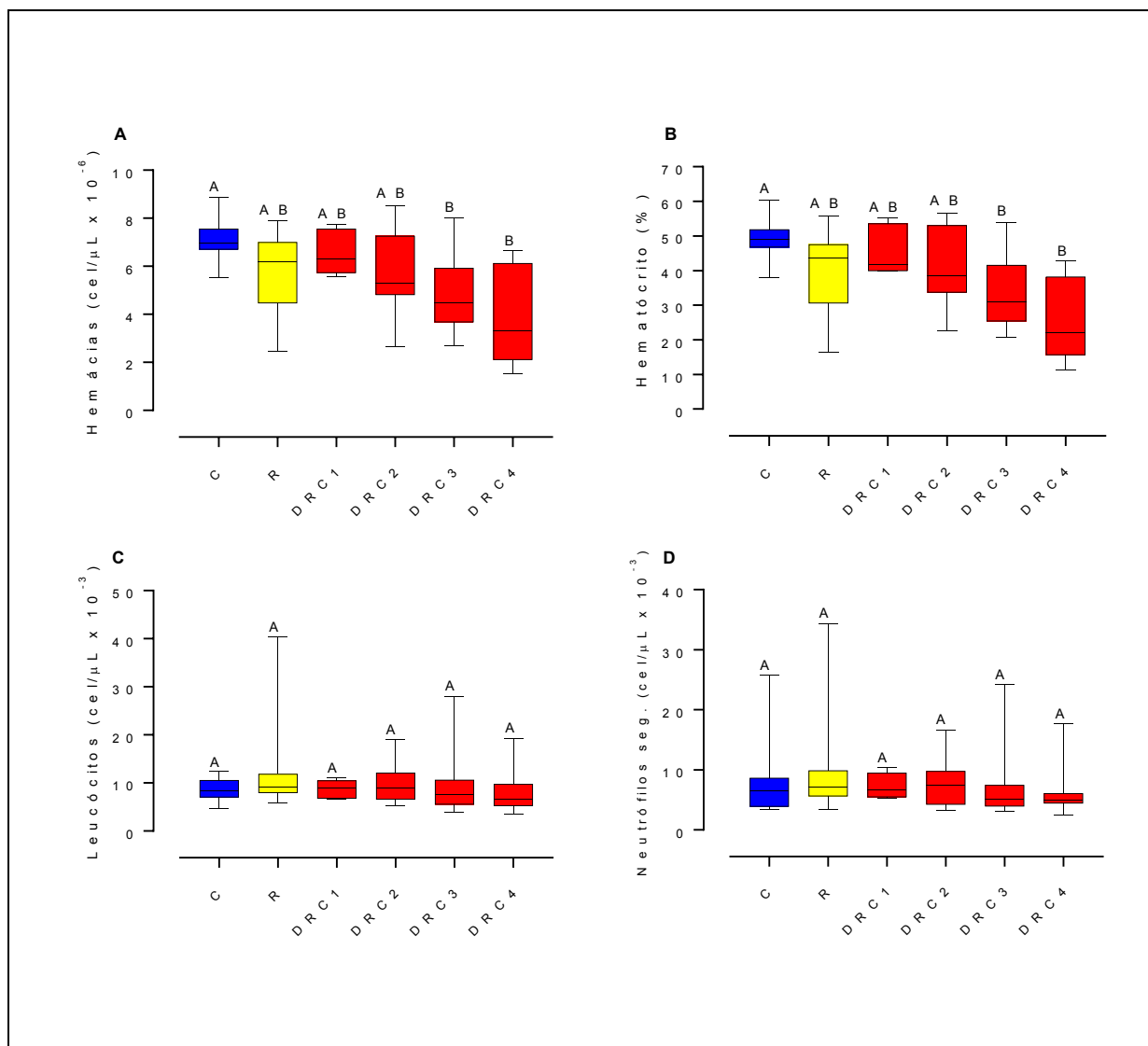


Figura 5. Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros hematológicos implicados na doença renal crônica (DRC*) de cães saudáveis (Sadio), com DRC ou em risco de desenvolver DRC (Risco): 15 saudáveis; 18 em Risco, 6 com DRC1, 11 com DRC2, 26 com DRC3 e 11 com DRC4. **A.** Concentração de hemácias. **B.** Hematócrito. **C.** Concentração total de leucócitos. **D.** Concentração de neutrófilos segmentados. * *IRIS staging of CKD, 2015.*

Para a segunda etapa de análise dos dados, foram identificados os pacientes com uNGAL.FCU >20.000 pg/mL. Para ilustrar o destaque destes casos, o gráfico com dados individuais de sCr, em ordem crescente dentro de cada grupo, e os dados de uNGAL.FCU pareados, está apresentado na Fig. 6. Foram encontrados valores altos em sete (39%) dos 18 pacientes do grupo Risco, três (50%) dos seis pacientes com DRC 1, cinco (46%) dos 11 pacientes com DRC 2 e cinco (19%) dos 26 pacientes do DRC 3. Tendo em vista o objetivo de avaliar os possíveis casos de lesão tubular ativa (LTA) manifestada em paciente com DRC (LTA_{DRC}), excluíram-se os dados dos 18 pacientes do grupo Risco.

Foram mantidos os 15 pacientes do grupo de cães saudáveis e os 54 pacientes com DRC, que foram separados em um grupo de 41 pacientes com uNGAL.FCU <20.000 pg/mL (grupo DRC) e outro com os 13 pacientes com uNGAL.FCU >20.000 pg/mL (grupo LTA_{DRC}). O diagnóstico presuntivo de LTA foi baseado exclusivamente nos valores de uNGAL.FCU dos pacientes com DRC.

Os resultados de estatística descritiva e de ANOVA, considerando os três grupos (Sadio, DRC e LTA_{DRC}), estão apresentados na Tab. 12 (uNGAL.FCU e sNGAL), Tab. 13 (sCr e sUreia), Tab. 14 (DU e EFNa), Tab. 15 (PAS e UP/C), Tab. 16 (uNGAL e sP), Tab. 17 (sPt e sAlb), Tab. 18 (He e Ht) e Tab. 19 (Le e Ns).

Como pode ser observado na Fig. 7 A, que representa os parâmetros principais para caracterização dos diagnósticos (sadios e DRC), a média de uNGAL.FCU do grupo LTA_{DRC} foi significativamente maior do que as dos outros dois grupos; consequência óbvia do fator determinante para a constituição dos grupos. Mas, a comparação das médias dos grupos S e DRC, entre si, revelou não haver diferença significativa entre elas, mesmo quando aplicado o teste t (P=0,289) e teste F (P=0,704).

Quando considerada a sNGAL, as médias do DRC e LTA_{DRC} não apresentaram diferença significativa entre si, mas ambas diferiram da média dos saudáveis (Figura 7 A). As médias das concentrações séricas de creatinina e ureia, maiores no grupo DRC, apresentaram diferença significativa em relação aos grupos S e LTA_{DRC} (Figura 7 B).

A média de densidade urinária, menor no grupo DRC, apresentou diferença significativa em relação aos grupos S e LTA_{DRC}, que por sua vez não diferiram entre

si, de forma significativa. Do mesmo modo, se destacou a média de EFNa do grupo DRC, que foi maior as dos outros dois grupos (Figura 7 C). Tanto a UP/C quanto a PAS apresentaram médias significativamente maiores no grupo LTA_{DRC}, em relação ao grupo de pacientes sadios, mas não diferiram de forma significativa em relação ao grupo DRC (Figura 7 D).

As concentrações séricas de fosfato foram maiores no grupo DRC, com diferença significativa entre sua média e as dos grupos S e LTA_{DRC} (Figura 8 A). Não houve diferença significativa entre as médias de sPt e sAlb dos três grupos (Figura 8 B). Tanto as médias de número de hemácias quanto as de hematócrito foram significativamente maiores que as dos grupos DRC e LTA_{DRC}, que não diferiram entre si (Figura 8 C).

Embora não tenha havido diferença significativa entre as médias de número de leucócito, a média de neutrófilos segmentados do grupo LTA_{DRC} foi significativamente maior que a média do grupo DRC (Figura 8 D).

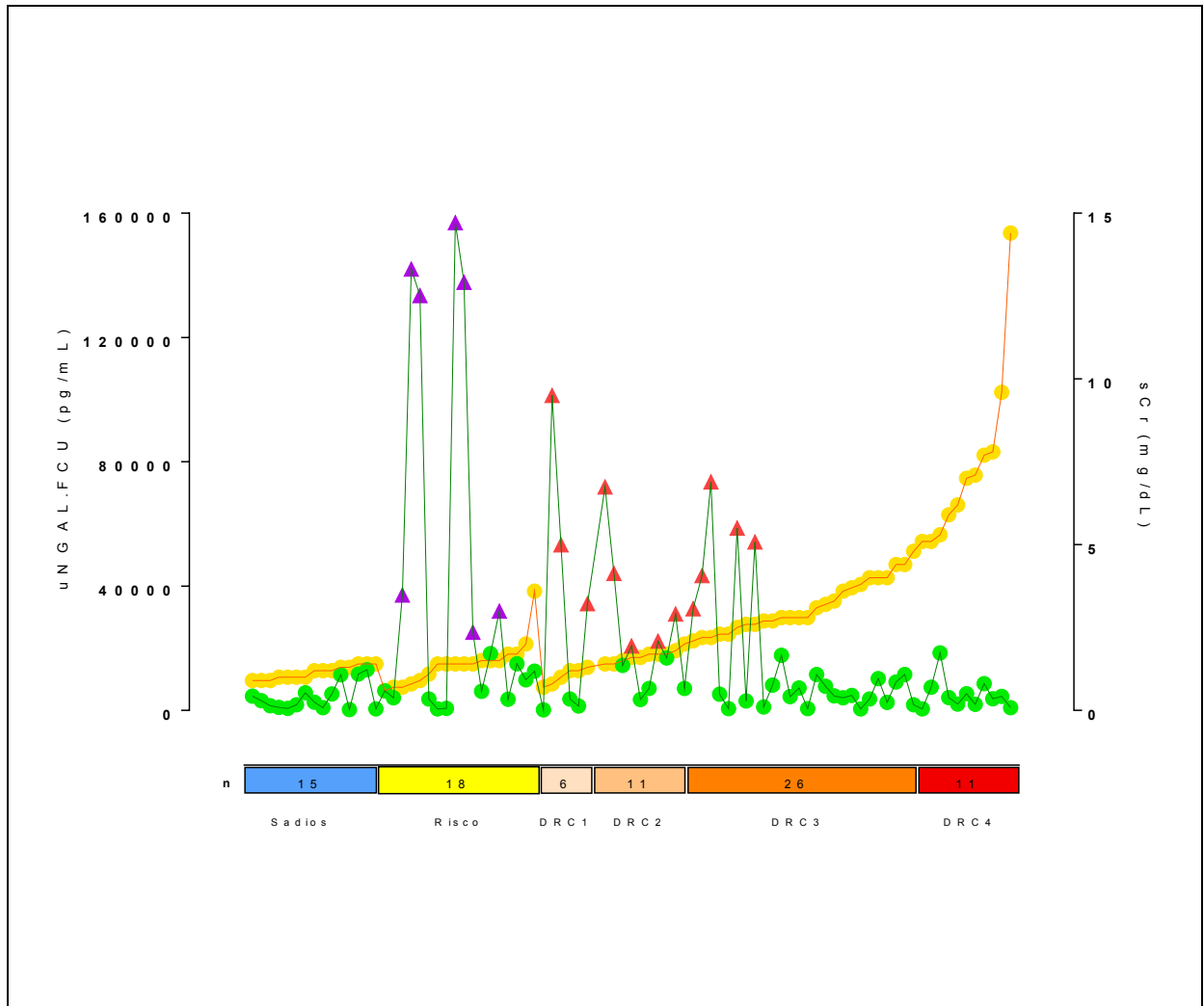


Figura 6. Representação gráfica da distribuição dos resultados de concentração sérica de creatinina, dispostos em ordem crescente dentro de cada grupo (sCr - linha com pontos laranja), e pareados com os respectivos valores de excreção urinária de NGAL* ajustado pelo fator de concentração urinária (uNGAL.FCU - pontos verdes e triângulos), de cães saudáveis (Sadio), em risco de desenvolver DRC** (Risco) ou com DRC. Os valores de uNGAL.FCU >20.000 pg/mL estão destacados por triângulos (roxo para pacientes em risco e vermelho para os com DRC). * Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos. ** DRC 1, 2, 3 e 4 - *IRIS staging of CKD*, 2015.

Tabela 12. Dados referentes às análises das concentrações de NGAL* urinário (uNGAL) ajustadas pelos respectivos fatores de concentração urinária (uNGAL.FCU), e do NGAL sérico (sNGAL), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva	n	uNGAL.FCU (pg/mL)			sNGAL (pg/mL)		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
		15	41	13	15	41	13
Mínimo		247	192	20738	37	25	65
Percentil 25%		922	2024	31863	81	138	159
Mediana		2669	4478	44071	119	205	211
Percentil 75%		5651	8041	65334	179	375	304
Máximo		13086	18489	101343	255	667	434
IC da mediana (95%)	Min.	1846	4465	35429	93	205	172
	Max.	6716	7380	63291	159	309	295
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P	Signif.	Valor de P		
Kruskal-Wallis		****	<0,0001	**	0,0043		
Comparação múltipla de Dunn							
S vs DRC		ns	>0,9999	**	0,0053		
S vs LTA _{DRC}		****	<0,0001	*	0,0211		
DRC vs LTA _{DRC}		****	<0,0001	ns	>0,9999		

* Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; IC intervalo de confiança.

Tabela 13. Dados referentes às análises das concentrações séricas de creatinina (sCr) e de ureia (sUreia), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva	n	sCr (mg/dL)			sUreia		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
		15	41	13	15	41	13
Mínimo		0,9	0,7	0,8	22	15	28
Percentil 25%		1,0	2,4	1,4	26	120	37
Mediana		1,2	3,5	1,7	38	164	59
Percentil 75%		1,3	5,1	2,2	42	246	77
Máximo		1,4	14,4	2,6	64	488	111
IC da mediana (95%)	Min.	1,0	3,2	1,4	30	158	45
	Max.	1,3	4,9	2,1	43	224	74
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P	Signif.	Valor de P		
Kruskal-Wallis		****	<0,0001	****	<0,0001		
Comparação múltipla de Dunn							
S vs DRC		****	<0,0001	****	<0,0001		
S vs LTA _{DRC}		ns	0,2367	ns	0,5513		
DRC vs LTA _{DRC}		**	0,0029	***	0,0003		

IC: intervalo de confiança; Signif.: variação das medianas.

Tabela 14. Dados referentes às análises de densidade urinária (DU) e excreção fracionadas de sódio (EFNa), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva	n	DU			EFNa (%)		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
Mínimo		1,010	1,005	1,010	0,02	0,24	0,03
Percentil 25%		1,030	1,010	1,015	0,06	0,79	0,20
Mediana		1,035	1,010	1,020	0,11	2,23	0,31
Percentil 75%		1,045	1,015	1,025	0,28	4,51	0,40
Máximo		1,050	1,030	1,030	0,86	13,38	1,38
IC da mediana (95%)	Min.	1,028	1,011	1,016	0,06	2,15	0,14
	Max.	1,042	1,014	1,024	0,32	4,64	0,62
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P		Signif.	Valor de P	
Kruskal-Wallis		****	<0,0001		****	<0,0001	
Comparação múltipla de Dunn							
S vs DRC		****	<0,0001		****	<0,0001	
S vs LTA _{DRC}		ns	0,1241		ns	0,8699	
DRC vs LTA _{DRC}		*	0,0117		***	0,0003	

IC: intervalo de confiança; Signif.: variação das medianas.

Tabela 15. Dados referentes às análises dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) e das razões proteína/creatinina urinária (UP/C), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva	n	PAS (mmHg)			UP/C		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
Mínimo		110	100	100	0,04	0,05	0,06
Percentil 25%		125	130	140	0,05	0,23	0,35
Mediana		130	140	160	0,07	0,66	1,29
Percentil 75%		140	155	185	0,13	1,54	6,01
Máximo		150	200	240	0,16	5,13	7,15
IC da mediana (95%)	Min.	126	136	140	0,07	0,70	0,96
	Max.	139	150	191	0,11	1,51	4,41
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P		Signif.	Valor de P	
Kruskal-Wallis		**	0,0075		****	<0,0001	
Comparação múltipla de Dunn							
S vs DRC		ns	0,0986		****	<0,0001	
S vs LTA _{DRC}		**	0,0057		****	<0,0001	
DRC vs LTA _{DRC}		ns	0,2547		ns	0,6559	

IC: intervalo de confiança; Signif.: variação das medianas.

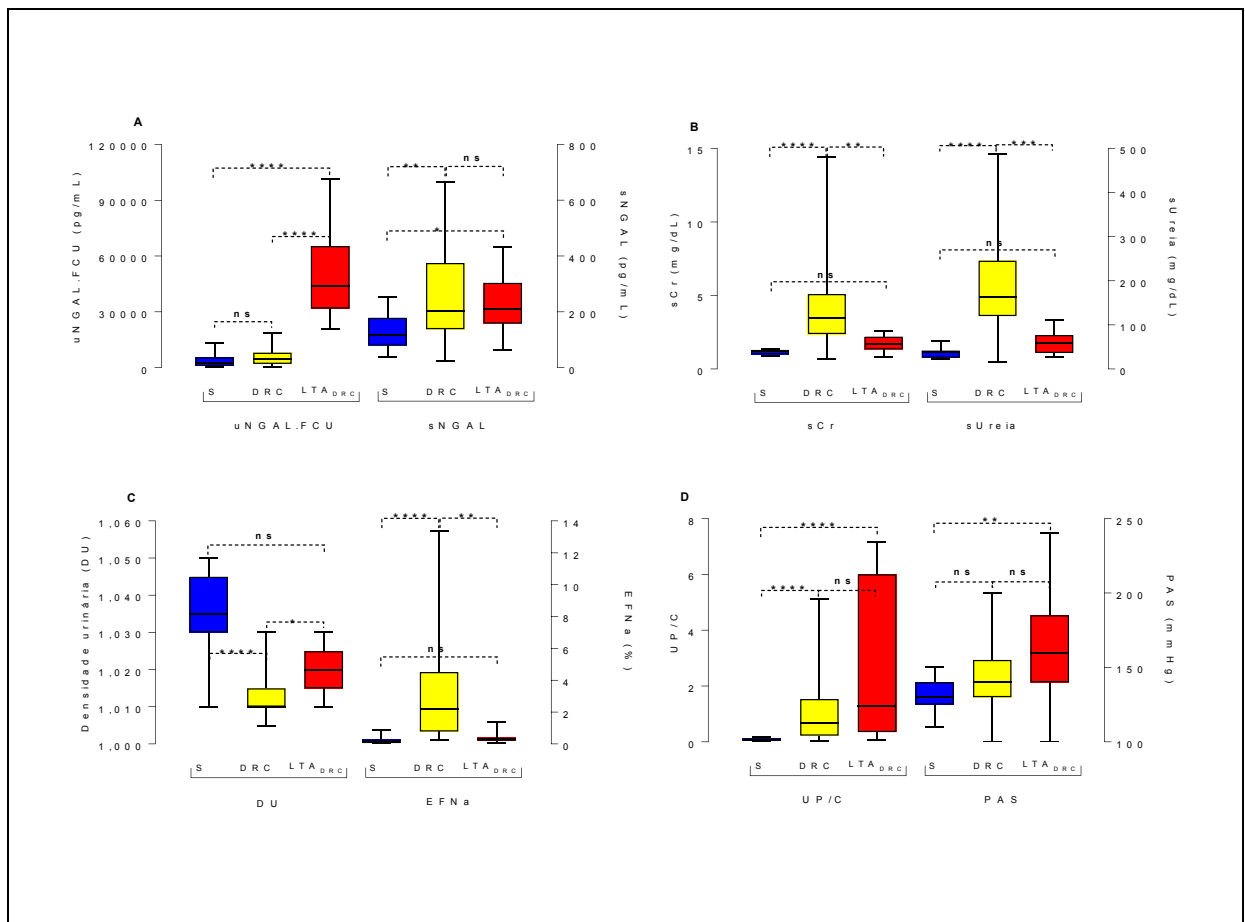


Figura 7. Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros, direta ou indiretamente, implicados na doença renal crônica (DRC) de cães saudáveis ou com DRC: 15 saudáveis (S), 41 com DRC e outros 13 com DRC e sinal de lesão tubular ativa (LTA_{DRC}) presumida em função da intensidade da excreção urinária de NGAL* (uNGAL.FCU >20000 pg/mL). **A.** Concentrações de NGAL urinária e sérica (uNGAL.FCU e sNGAL, respetivamente). **B.** Concentrações séricas de creatinina (sCr) e ureia (sUreia). **C.** Densidade urinária (DU) e excreção fracionada de sódio (EFNa). **D.** Razão proteína/creatinina urinária (UP/C) e pressão arterial sistólica (PAS). * Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos.

Tabela 16. Dados referentes às análises das concentrações urinárias de NGAL e concentração sérica de fosfato (sP), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva	n	uNGAL (pg/mL)			sP		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
Mínimo		2,42	1,54	129,00	2,9	3,7	3,2
Percentil 25%		4,17	100,80	446,20	3,3	4,9	4,1
Mediana		11,70	317,10	614,20	4,3	6,0	4,6
Percentil 75%		22,26	542,70	838,40	5,0	8,9	5,2
Máximo		69,39	951,40	965,20	5,7	17,3	6,7
IC da mediana (95%)	Min.	6,48	272,90	470,60	3,6	6,1	4,1
	Mx.	26,08	440,90	774,90	4,7	8,3	5,2
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P		Signif.	Valor de P	
Kruskal-Wallis		****	<0,0001		****	<0,0001	
Comparação múltipla de Dunn							
Svs DRC		****	<0,0001		***	0,0003	
S vs LTA _{DRC}		****	<0,0001		ns	>0,9999	
DRC vs LTA _{DRC}		ns	0,0543		*	0,0149	

IC: intervalo de confiança; Signif.: variação das medianas.

Tabela 17. Dados referentes às análises das concentrações séricas de proteína total (sPt) e albumina (sAlb), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva	n	sPt (g/L)			sAlb (g/L)		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
Mínimo		6,2	5,3	4,6	2,7	1,3	1,5
Percentil 25%		6,4	6,1	6,0	2,8	2,5	2,4
Mediana		6,8	6,7	7,0	3,0	2,9	2,8
Percentil 75%		7,6	7,8	7,8	3,7	3,2	3,8
Máximo		9,4	11,8	8,4	4,3	4,0	4,1
IC (95%)	Min.	6,6	6,6	6,1	2,9	2,7	2,4
	Max.	7,6	7,5	7,5	3,5	3,0	3,4
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P		Signif.	Valor de P	
Kruskal-Wallis		ns	0,7054		ns	0,1493	
Comparação múltipla de Dunn							
S vs DRC		ns	>0,9999		ns	0,1689	
S vs LTA _{DRC}		ns	>0,9999		ns	0,4715	
DRC vs LTA _{DRC}		ns	>0,9999		ns	>0,9999	

IC: intervalo de confiança.

Tabela 18. Dados referentes às análises dos números de hemácias (He) e do hematócrito (Ht), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva		He (cel/ μ L x 10^{-6})			Ht (%)		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
n		15	41	13	15	41	13
Mínimo		5,52	1,53	3,35	38	11	25
Percentil 25%		6,70	3,54	4,33	47	25	31
Mediana		6,97	5,36	5,10	49	36	38
Percentil 75%		7,56	6,53	6,23	52	43	41
Máximo		8,88	8,01	8,52	60	57	56
IC da mediana (95%)	Min.	6,64	4,44	4,52	46	31	32
	Max.	7,62	5,57	6,18	52	39	42
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P		Signif.	Valor de P	
Kruskal-Wallis		***	0,0001		***	0,0002	
Comparação múltipla de Dunn							
S vs DRC		***	0,0001		***	0,0001	
S vs LTA _{DRC}		**	0,0061		**	0,0093	
DRC vs LTA _{DRC}		ns	>0,9999		ns	>0,9999	

IC: intervalo de confiança; Signif.: variação das medianas.

Tabela 19. Dados referentes às análises dos números de leucócitos (Le) e neutrófilos segmentados (Ns), de 69 cães, referentes aos grupos: sadio (S), doença renal crônica (DRC) e lesão tubular ativa sobreposta à DRC (LTA_{DRC}).

Estatística Descritiva		Le (cel/ μ L x 10^{-3})			Ns (cel/ μ L x 10^{-3})		
		S	DRC	LTA _{DRC}	S	DRC	LTA _{DRC}
n		15	41	13	15	41	13
Mínimo		4,7	3,6	4,7	3,4	2,4	3,9
Percentil 25%		7,0	5,6	7,3	3,9	4,3	5,7
Mediana		8,5	7,5	9,5	6,1	5,1	7,7
Percentil 75%		10,6	9,6	16,0	8,4	6,8	14,2
Máximo		12,5	27,8	28,0	10,6	24,2	24,1
IC da mediana (95%)	Min.	7,3	7,0	7,7	5,0	5,2	6,4
	Max.	10,1	10,0	17,0	7,6	8,0	14,4
ANOVA ($\alpha=5\%$)		Signif.	Valor de P		Signif.	Valor de P	
Kruskal-Wallis		ns	0,1006		*	0,0351	
Comparação múltipla de Dunn							
S vs DRC		ns	0,9506		ns	>0,9999	
S vs LTA _{DRC}		ns	>0,9999		ns	0,3366	
DRC vs LTA _{DRC}		ns	0,1115		*	0,0290	

IC: intervalo de confiança; Signif.: variação das medianas.

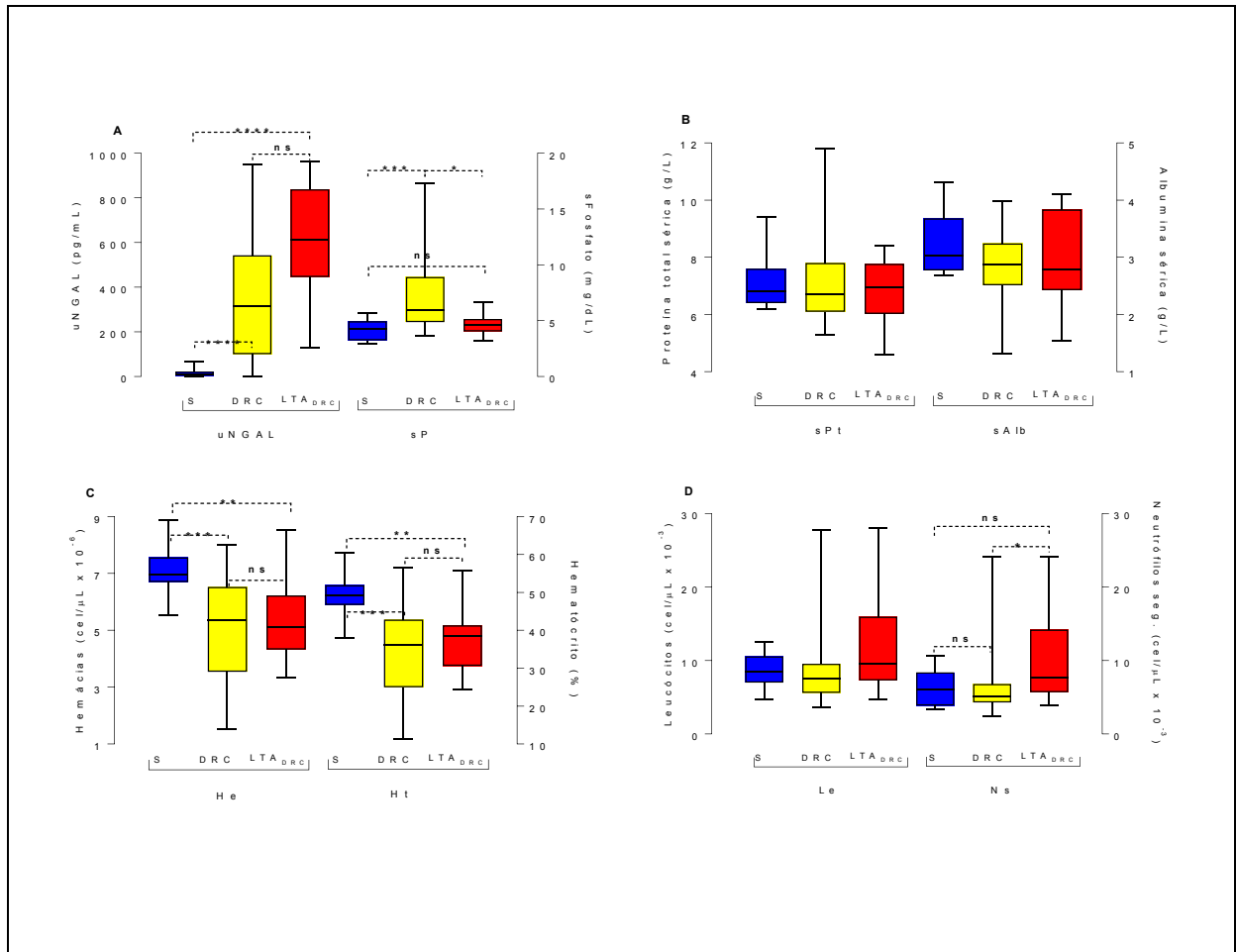


Figura 8. Representação gráfica dos resultados das análises (Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn e distribuição dos dados em quartis, com mediana, máximo e mínimo) de parâmetros, direta ou indiretamente, implicados na doença renal crônica (DRC) de cães saudáveis ou com DRC: 15 saudáveis (S), 41 com DRC e outros 13 com DRC e sinal de lesão tubular ativa (LTA_{DRC}) presumida em função da intensidade da excreção urinária de NGAL* (uNGAL.FCU >20000 pg/mL). **A.** Concentrações de NGAL urinária (uNGAL) e de fosfato sérico (sP). **B.** Concentrações séricas de proteína total (sPt) e albumina (sAlb). **C.** Número de hemácias e valor de hematócrito. **D.** Números de leucócito e neutrófilo segmentado. * Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos.

5. DISCUSSÃO

As características dos animais incluídos neste estudo não foram controladas, uma vez que se seguiu delineamento em blocos casualizados. Houve semelhança entre o número total de machos (47) e o de fêmeas (40), além de não ter sido detectado efeito da condição clínica (fator grupo) sobre a distribuição de gênero nos seis grupos. A preponderância relativa de cães SRD (21,8%) sobre as raças puras, que somaram 25, refletem a subpopulação canina atendida no local onde o estudo foi desenvolvido. Como consta da literatura, a DRC acomete os cães independentemente do gênero ou da raça (POLZIN; OSBORNE; ROSS, 2005).

No conjunto, a variação de massa corporal foi marcante (2,7 kg a 60 kg), mas não houve diferença significativa entre os grupos. A grande variação de massa corporal observada deveu-se às características próprias das raças, que incluíram desde cães miniatura até cães de raças gigantes. Embora a avaliação da condição corporal não tenha sido objeto de análise estatística no presente estudo, foram diagnosticadas perdas de massa corporal em pacientes com DRC mais avançada. Esses pacientes, além da perda por desidratação crônica, perdem massa muscular em decorrência de hipermetabolismo (POLZIN, 2011b). Acredita-se que possível interação entre fatores raciais e perda de massa corporal decorrente da DRC tenha contribuído para a distribuição semelhante, deste parâmetro, dentre os grupos de pacientes em risco e doentes renais crônicos.

Quanto à idade, os pacientes tinham entre 1 a 16. Entretanto, a idade máxima observada no grupo de cães saudáveis foi 8 anos, enquanto a dos cães em Risco ou com DRC, atingiu o dobro (16 anos). Embora as médias de idade dos grupos DRC 3 e 4 tenham sido significativamente maiores que a média dos saudáveis, foi registrado paciente com 1 ano de idade nos três grupos. Os perfis etários observados são condizentes com a afirmação de que a DRC é uma doença de animais idosos, mas ocorre com frequência variável em cães de todas as idades (BROWN, 2007; POLZIN, 2011b).

No presente estudo todos os dados coletados foram obtidos por meio de avaliação clínica e exames complementares minimamente invasivos. Assim, os diagnósticos foram baseados no histórico, exame físico, resultados de patologia

clínica e diagnóstico por imagem, além de monitoramento clínico dos doentes, como ocorre na rotina clínica veterinária e na medicina. A inclusão de um grupo de pacientes em risco de desenvolver DRC, que exigiram monitoramento prolongado, favoreceu não só a obtenção de dados peculiares a esta categoria, como também a possibilidade de detectar pacientes DRC 1 e traçar o diferencial entre doença renal aguda e DRC em estádios azotêmicos. O conjunto de dados apresentados, que incluíram os 87 pacientes (primeira etapa de avaliação) mostra resultados que testemunham a adequação dos diagnósticos clínicos em conformidade com o descrito na literatura (FINCO et al., 1995; POLZIN; OSBORNE, 1995; FINCO et al., 1999; POLZIN; OSBORNE; ROSS, 2005; EDDY; NEILSON, 2006; BURANAKARL et al., 2007; MCGROTTY, 2008; CORTADELLAS et al., 2010; POLZIN, 2011a; POLZIN, 2011b; PRESSLER, 2015). Em adição, o conjunto de dados possibilitou a distribuição dos pacientes nos grupos denominados Risco, DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4, de acordo com os preceitos estabelecidos pela *IRIS staging of CKD* (2015).

Os resultados das análises dos parâmetros básicos para os diagnósticos clínicos e estadiamento da DRC (sCr, sUreia, DU, EFNa) e os que evidenciam a progressão, as complicações e os agravamentos da DRC (UP/C, sP, PAS, He, Ht, Le, Ns, sPt, sAlb) apresentaram os perfis esperados. Considerando as condições clínicas, no sentido que parte dos pacientes sadios em direção à condição de maior gravidade (DRC 4), as concentrações séricas de creatinina, ureia, fosfato, assim como a EFNa resultaram em valores crescentes, enquanto os parâmetros DU, He e Ht decresceram gradativamente. Contudo, os valores de UP/C, sPt, sAlb e PAS não apresentaram variações significativas ou variaram de forma, aparentemente, aleatória, ou seja, independente do sequenciamento dos grupos (dos pacientes sadios em direção à condição de maior gravidade). Estes achados refletem a inclusão tanto de pacientes com doença renal predominantemente túbulointersticial, quanto pacientes com doenças glomerulares. A proteinúria constatada da doença túbulointersticial é, comumente de baixa intensidade, enquanto as glomerulopatias crônicas são caracterizadas por proteinúria moderada ou grave (McDOUGALL et al. 1986; FINCO; BROWN, 1995; VADEN, 2005; VADEN; GRAUER, 2011). Nos casos de perda intensa e persistente de proteínas por via urinária (UP/C >2), pode haver diminuição acentuada das concentrações séricas de albumina, acompanhada ou

não por diminuição da concentração sérica de proteína total e, frequentemente, ocorre hipertensão arterial sistêmica (BARTGES; WILLIS; POLZIN, 1996; D'AMICO; BAZZI, 2003; SYME; ELLIOTT, 2011; VADEN; GRAUER, 2011).

As médias de excreção urinária de NGAL foram maiores nos grupos Risco e DRC 2, 3 e 4 em comparação com a média dos pacientes saudáveis, como já observado em estudos anteriores (NABITY et al., 2012; AHN; HYUN, 2013; HSU et al., 2014a; STEINBACH et al., 2014). Quando consideradas as médias de uNGAL.FCU (valores ajustados pelo fator de concentração urinária), observou-se o mesmo comportamento da uNGAL (não ajustada) com relação à diferença significativa entre o grupo de cães saudáveis e o em risco. Entretanto, houve declínio gradativo das médias dos grupos DRC (Figura 3 C e 3 D). Mas as médias de sNGAL dos pacientes em risco ou com DRC aumentaram gradativamente culminando com médias significativamente maiores do que a dos pacientes saudáveis (Figura 4 D). Estes achados relativos às concentrações de sNGAL e ao uNGAL.FCU, sem precedentes na literatura, impulsionaram a decisão de realizar nova análise estatística dos dados, após a separação dos pacientes com DRC em dois grupos com base nos valores de uNGAL.FCU, como já descrito.

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos, de interesse médico e veterinário, sobre a ocorrência e detecção de lesão renal aguda em pacientes com DRC (DOI et al. 2013; STEINBACH et al., 2014; TANAKA; TANAKA; NANGAKU, 2014; TAKAORI; YANAGITA, 2016) tema já conhecido na nefrologia e abordado em diversos textos.

A doença renal aguda sobre a crônica e as lesões decorrentes da proteinúria glomerular podem contribuir para a progressão da DRC (LIEBERTHAL; LEVINSKY, 1992; POLZIN; OSBORNE, 1995; COWGILL; FRANCEY, 2005; GRAUER, 2007; CARVALHO, 2015). Em ambos os casos, os túbulos são alvo das lesões, e a renovação do interesse pelos biomarcadores, tem destacado a aplicabilidade do NGAL como molécula espécie-específica para sinalização de lesão tubular aguda (ATKINSONS et al., 2001; MISHRA et al. 2003; BOLIGNANO et al., 2009; BONOMINI et al., 2010; DEVARAJAN, 2011; LEE et al., 2012; SEGEV et al., 2013; HELANOVA; SPINAR; PARENICA, 2014; HSU et al. 2014b; WATANABE et al., 2014; ZHOU et al., 2014; DEDE et al. 2015; GARG et al., 2015; PALM et al., 2016).

O estudo conduzido por Nabity et al. (2012) teve como ponto alto a avaliação dos biomarcadores convencionais em associação com novos biomarcadores e biópsia renal seriada. Como destaque, os autores observaram correspondência entre os achados histopatológicos e os testes de função renal, incluindo os biomarcadores novos, dentre estes a uNGAL que refletiu, de forma não invasiva, as lesões observadas.

Com base neste conjunto de informações já fundamentadas, admitiu-se no presente estudo que os 13 pacientes DRC com concentrações de uNGAL.FCU, destacadamente elevadas, apresentavam processo de lesão tubular ativa. Nesta acepção, admitiu-se o diagnóstico presuntivo de lesão tubular ativa, pois não foram realizadas biópsias renais. Assim, foi constituído o grupo LTA_{DRC} , como um tipo diferenciado de doentes renais crônicos.

Até o presente momento, não foram estabelecidos valores referenciais para o uNGAL ou mesmo qualquer tipo de padronização para orientar minimamente os pesquisadores. Os poucos estudos publicados são divergentes quanto à unidade de concentração utilizada e o tipo de ajuste matemático de a ser feito, quando julgado pertinente. Conseqüentemente, não há número de observações suficientes para elaboração de ponto de corte para traçar um possível intervalo de variação normal.

A análise dos dados de NGAL urinário do grupo de cães sadios, obtidos neste estudo (Tabela 7), revelou CV = 108,7% para o uNGAL e CV = 102,7% para o uNGAL.FCU. As variações amplas são esperadas para vários marcadores de função tubular (ex. EFNa dos cães sadios teve CV = 118,1% - Tabela 6). Portanto, optou-se pela identificação dos valores destacados do conjunto, por meio de observação do comportamento do conjunto de dados e por análise estatística para identificação de *outliers*.

Os resultados das análises trouxeram informações adicionais relevantes para corroborar hipóteses já existentes sobre a fisiopatologia envolvida na progressão da DRC. Com a separação dos pacientes LTA_{DRC} , houve destaque para a proteinúria e PAS, elevadas neste grupo, apesar de não ter havido diferença significativa em relação às médias do grupo DRC (Figura 7 D). Nabity et al. (2012) observaram correlação significativa entre achados histopatológicos e a UP/C em estudo longitudinal prospectivo de cães com glomerulopatia hereditária. Como esperado, as

lesões glomerulares ocorreram antes das lesões túbulo intersticiais nos cães estudados, indicando que lesões glomerulares moderadas a graves foram associadas com lesões túbulointersticiais irreversíveis. Os achados também confirmaram forte relação entre as lesões marcantes de DRC progressiva, incluindo degeneração tubular/regeneração, fibrose intersticial e inflamação crônica intersticial.

Para as avaliações séricas de ureia, creatinina e fosfato pode-se observar um comportamento semelhante entre os três grupos (S, DRC e LTA_{DRC}). Os pacientes do grupo DRC, composto em sua maioria por cães em estágio mais avançado, apresentaram valores significativamente maiores para os três biomarcadores comparado aos demais. Segundo Polzin, 2011a, ureia, creatinina e outros compostos nitrogenados não proteicos no sangue, são amplamente excretados pela filtração glomerular. Portanto, declínio da filtração leva ao acúmulo de uma ampla variedade destes compostos e o quadro azotêmico agrava-se com o avanço da doença. O que corrobora os dados do presente estudo.

Para o fosfato sérico, os rins desempenham papel central para seu metabolismo, devido à excreção primariamente renal, onde é livremente filtrado pelos glomérulos e absorvido pelos túbulos. O declínio na taxa de filtração glomerular levará à retenção deste íon e, finalmente, à hiperfosfatemia. Entretanto, durante os estágios iniciais da DRC, as concentrações séricas de fosfato permanecem bem reguladas devido à diminuição compensatória na reabsorção tubular de fósforo (FINCO et al., 1992; BLOCK et al., 1998; KING et al., 2007; BOYD et al., 2008). Fato que justifica os valores significativamente mais altos no grupo DRC comparado aos animais do grupo LTA_{DRC}, composto em sua maioria por pacientes em fases iniciais da doença.

Para o biomarcador NGAL, já foi observado que cães azotêmicos (sCr >1,5 mg/dL) com DRC ou LRA apresentam valores séricos e urinários da NGAL, significativamente maiores se comparados aos de cães não azotêmicos. Assim, existe correlação entre aumento das concentrações de NGAL e de creatinina sérica (HSU et al., 2014a; STEINCACH et al., 2014). Nos presentes resultados, houve alguma semelhança ao relatado anteriormente, uma vez que os cães saudáveis não apresentaram os valores altos verificados nos pacientes doentes. Contudo, valores

semelhantes aos dos cães sadios foram observados, também, nos doentes. Por conseguinte, não foi possível constatar correlação significativa entre sCr e uNGAL ($P= 0,0063$; $r = 0,2926$, Pearson) ou entre sCr e sNGAL ($P<0.0001$; $r = 0,5606$, Pearson). Cabe ressaltar que embora em ambos os casos foram obtidos valores de P significativos, os resultados de r não alcançaram valores relevantes (no caso da sNGAL o r ficou em posição intermediária).

Para o biomarcador sNGAL, os grupos DRC 3 e 4 apresentaram valores significativamente mais altos que os do grupo sadio. Ahn e Hyun (2013) encontraram diferença significativa dos valores de sNGAL, quatro a dez vezes maiores em pacientes DRC 3 e 4, comparados aos do grupo sadio, com correlação direta com os valores de creatinina. Por este motivo, consideraram que a sNGAL é um bom indicador da severidade da DRC em cães, apesar da variação ampla. Comportamento semelhante da sNGAL foi observado no presente estudo, no qual o grupo DRC apresentou valores mais altos de sNGAL e creatinina, e ampla variação nos valores de sNGAL.

Hsu et al. (2014a) observaram que valores mais altos de sNGAL e creatinina estavam relacionados a maior risco de morte. A sNGAL tem como origem diversos órgãos (COWLAND; BORREGAARD, 1997), não estando limitada aos rins. Supõe-se que os valores mais altos de sNGAL no grupo DRC ocorreram por dois motivos. As repercussões sistêmicas relacionadas ao quadro urêmico, mais proeminente em fase final da DRC, e a diminuição da taxa de filtração glomerular. Pois em condições normais, a sNGAL é rapidamente filtrada pelos glomérulos (KUWABARA et al., 2009; SHEMIN; DWORKIN, 2011), sendo sua concentração sérica inversamente proporcional à TFG (NABITY et al., 2012). É fato que os pacientes do grupo DRC apresentavam a TFG mais baixa comparada ao grupo LTA_{DRC} , composto em sua maioria por pacientes em fase inicial da doença. Portanto era de se esperar valores mais altos de sNGAL neste grupo, pois a diminuição da TFG resultante de insuficiência renal, leva à diminuição da depuração renal da sNGAL e à subsequente acumulação sistêmica (HELANOVA; SPNAR; PARENICA, 2014). Entretanto, Bolignano et al. (2009) chegaram à conclusão que a sNGAL pode indicar alto risco de progressão da DRC independentemente da TFG.

Além da creatinina sérica e da sNGAL, foram encontrados valores significativamente mais altos no grupo DRC para o biomarcador EFNa comparado aos demais. Buranakarl et al. (2007) já relataram correlação positiva entre os níveis de azotemia de cães com DRC e a excreção fracionada dos eletrólitos, dentre estes o sódio, sugerindo que a excreção fracionada pode ser um bom indicador do grau de redução da TFG.

No presente experimento, os pacientes do grupo sadio apresentavam valores de EFNa dentro da normalidade (até 1%), o que é esperado em animais em jejum com função tubular normal (LEFEBVRE et al., 2008; LEFEBVRE, 2011). Fato também observado na grande maioria dos pacientes do grupo LTADRC, composto por animais em estádios iniciais da doença. Segundo Martínez e Carvalho (2010), os mecanismos compensatórios renais observados na doença renal crônica são suficientes para manter a homeostase de sódio e outros íons pelo menos durante os estádios iniciais da DRC, o que justifica a capacidade dos pacientes do grupo LTADRC em manter a EFNa dentro, ou próximo, dos valores de normalidade. Por outro lado, o grupo DRC, constituído em sua maioria por pacientes em fases avançadas da doença, apresentou valores mais altos de EFNa, refletindo o mecanismo de compensação para a diminuição acentuada da carga filtrada de sódio.

Apesar dos valores mais altos encontrados para creatinina sérica, sNGAL e EFNa, os valores significativamente mais baixos de densidade urinária foram observados no grupo DRC comparados aos demais. Os grupos Sadio e LTADRC não diferiram entre si, entretanto, pode-se observar uma tendência a valores mais altos no grupo sadio comparado a ambos os grupos de animais doentes. Segundo Lees (2004), a finalidade fisiológica principal dos rins é regular o volume e a composição do compartimento do líquido extracelular para manutenção da homeostase. Entretanto, esta pode ser quebrada na DRC em consequência da redução gradual do número de néfrons. O primeiro indício do comprometimento da função renal, no cão, é a perda da capacidade renal em concentrar a urina quando aproximadamente 2/3 do número de néfrons funcionantes é perdida, e tem como consequência a diminuição da densidade urinária com poliúria e polidipsia compensatória, sendo proporcional à magnitude do comprometimento das estruturas renais (LEES, 2004;

McGROTTY, 2008; CORTADELLAS, 2012). A diferença observada entre os subgrupos de pacientes com doença renal deve-se ao fato do grupo LTA_{DRC} ser composto por pacientes em estádios iniciais da doença, que ainda apresentam certa capacidade de manutenção da densidade urinária e, conseqüentemente, da volemia, capacidade esta, pouco observada em pacientes em fases avançadas, como a grande parte dos animais encontrados no grupo DRC.

Para pressão arterial sistólica pôde-se observar que o grupo LTA_{DRC} apresentou valor significativamente maior que o grupo sadio. Apesar de não haver diferença significativa entre os subgrupos de pacientes com DRC, pode-se observar valores mais altos no grupo LTA_{DRC} . Na doença renal, muitos fatores estão envolvidos na patogênese da hipertensão, incluindo diminuição da excreção de sódio e água, estímulo do sistema renina-angiotensina-aldosterona e supressão de substâncias vasodilatadoras como as prostaglandinas (BARTGES; WILLIS; POLZIN, 1996; BURANAKARL et al., 2007). É possível especular que no grupo LTA_{DRC} , a manutenção melhor da volemia e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona associada, culminaram, de forma sinérgica, em valores mais altos de pressão observados nos pacientes do grupo LTA_{DRC} .

A sNGAL é considerada como um bom indicador da gravidade da DRC naturalmente adquirida em cães, devido ao seu aumento ser diretamente proporcional às concentrações séricas de creatinina e ureia. Entretanto, em pacientes com lesões ativas, as concentrações de sNGAL podem ser mais baixas (AHN; HYUN, 2013). Fato que corrobora os dados encontrados no presente estudo, onde pacientes do grupo DRC apresentaram valores maiores de creatinina e sNGAL. Entretanto, os pacientes do grupo LTA_{DRC} , considerados com lesões ativa, apresentavam valores de sNGAL mais baixos e de uNGAL mais altos.

Segundo Lee et al. (2012) a uNGAL tem sido avaliada como um biomarcador precoce e específico para as lesões renais na LRA comparada à sNGAL. Os pacientes do presente estudo considerados com lesões tubulares ativas (LTA_{DRC}) apresentavam picos de uNGAL.FCU pareados aos valores mais baixos de sNGAL. A uNGAL tem sido considerada, em cães, como um importante marcador precoce de lesões renais em andamento na LRA (ZHOU et al., 2014) e da LRA sobreposta à

DRC em humanos e animais (ISHANI et al., 2011; DOI et al., 2013; TAKAORI; YANAGITA, 2016).

Em estudo avaliando pacientes com ITUI, DRC estável e quadros de LRA azotêmicos e não azotêmicos, foram observados valores significativamente mais altos da uNGAL/Cr no grupo de pacientes com LRA. Dentro deste grupo, pôde-se observar tendência a valores mais altos entre animais não azotêmicos. Foi concluído no estudo que a uNGAL é um biomarcador sensível e específico para formas azotêmicas e não zotemicas da LRA, antecipadamente aos métodos de diagnóstico convencionais como aumento da concentração sérica de creatinina, glicosúria e cilindrúria (SEGEV et al., 2013).

Apesar de diversos autores utilizarem a razão uNGAL/uCr, relatando bons resultados para avaliação precoce das lesões tubulares na LRA (SEGEV, et al., 2013; PALM et al., 2016), no presente estudo foi considerado o uNGAL.FCU como a melhor forma de avaliação da uNGAL. Onde pacientes com LTADRC (uNGAL >20.000), apresentaram grande margem de diferença de valores com os pacientes que apresentaram (uNGAL.FCU <20.000).

Os valores mais baixos de uNGAL observados no grupo DRC podem ter ocorrido devido ao grande número de pacientes nos estádios 3 e 4 da doença, com maior perda de néfrons, portanto, menor número de túbulos para a excreção da uNGAL (KUWABARA et al., 2009; VALLE et al., 2011; NABITY et al., 2012).

O fato de ter sido observado antecipadamente valores de uNGAL/Cr mais altos em pacientes não azotêmicos com LRA (SEGEV et al., 2013), dá suporte à hipótese de que valores de uNGAL.FCU >20.000 consigam antecipar o quadro lesão tubular antes do desenvolvimento do quadro clássico da LRA. Pois no presente estudo, 50% dos pacientes em estágio 1 (não azotêmicos) e 60% do estágio 2 (azotemia renal leve), apresentavam valores de uNGAL.FCU >20.000, antes que sinais comuns da LRA, tais como o aumento da creatinina sérica e glicosúria, fossem observados.

Valores mais altos da uNGAL antecipadamente ao aumento dos valores de creatinina também já foram observados na LRA isquêmica induzida em ratos (MISHRA et al., 2003), em pacientes humanos com LRA em unidade de terapia

intensiva (WATANABE et al., 2014) e em cães após procedimentos cirúrgicos de longa duração (LEE et al., 2012)

Segundo Hsu et al., 2014a, aumento severo da NGAL pode ser observado nos estádios iniciais das lesões renais, assim que ocorrem, diminuindo gradualmente com o tempo. Isto pode indicar que os valores significativamente maiores de uNGAL.FCU observados nos pacientes do grupo LTA_{DRC}, a possibilidade de que tenham sido detectados no momento exato em que a lesões aconteceram. Corroborando a possibilidade da LTA em pacientes com uNGAL.FCU >20.000. Entretanto, novos estudos com maior tempo de avaliação serão necessários para avaliar a taxa de diminuição do biomarcador.

A uNGAL também tem demonstrado potencial de fornecer informações sobre o reparo ativo dos rins. Palm et al., 2016 observaram que após a LRA o biomarcador apresentou diminuição antecipadamente aos valores de creatinina, que se mantinham estáticos. No presente estudo avaliou-se a uNGAL de forma pontual, o que impediu a observação de possível diminuição nos pacientes do grupo LTA_{DRC}.

Quanto à UP/C, foi observada diferença significativa entre o grupo sadio e os grupos de doentes (DRC e LTA_{DRC}) que apresentaram valores significativamente maiores, mas não diferiram entre si. Segundo Syme e Elliot (2011), cães e gatos com proteinúria provavelmente têm doença glomerular. Os pacientes DRC do presente estudo, em grande parte, foram considerados glomerulopatas, com base na gravidade da proteinúria, sem identificação de causas de proteinúria de pré-carga, e caracterização da condição de cronicidade, embora não tenha havido análise histopatológica. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos de doentes, foi observada tendência a valores mais altos de UP/C no grupo LTA_{DRC}. Segundo D'Amico e Bazzi (2003) a proteinúria de causa renal é consequência de dois mecanismos, passagem transglomerular anormal devido ao aumento da permeabilidade dos capilares glomerulares e posteriormente sua reabsorção prejudicada pelas lesões de células epiteliais do túbulo contornado proximal. Supôs-se, no presente estudo, que os pacientes do grupo LTA_{DRC} apresentaram valores mais altos de UP/C por três motivos, a glomerulopatia causadora de aumento de excesso de proteínas no filtrado glomerular, lesões de células tubulares causadas pelo excesso de oferta de proteína (FINCO et al., 1999) e incremento da dificuldade

pré-existente de reabsorção tubular decorrente de superposição de causas que determinam nova onda de lesão tubular. Então, pode ter ocorrido incremento das causas tubulares de proteinúria. Entretanto, não se sabe até que ponto o quadro severo de proteinúria influenciou a ocorrência de lesão tubular.

A associação entre os valores de UP/C e da uNGAL/Cr já foi estudada em cães com DRC causada por glomerulopatia hereditária, tendo sido observado aumento proporcional de vários biomarcadores urinários, antecipadamente ao aumento da creatinina sérica. Entretanto, o aumento da uNGAL só ocorreu após o desenvolvimento do quadro proteinúrico (NABITY et al., 2012).

O aumento da uNGAL também já foi associado a quadros proteinúricos observados na glomerulopatia causada por HIV (VALLE et al., 2011) e na avaliação experimental de ratos albuminúricos na nefropatia pré-diabética (GARG et al., 2015).

Por hipótese, o aumento da concentração de proteína no filtrado glomerular pode ter sido um fator importante na lesão dos túbulos proximais, que resultou em aumento acentuado da produção de uNGAL. Também pode ser considerado o fato de que a NGAL plasmática, uma proteína de baixo peso molecular, pode estar presente na urina devido ao aumento da competição pela reabsorção tubular secundária à oferta excessiva de proteína de origem glomerular (BOLIGNANO et al., 2009). Também é possível que ocorra déficit de reabsorção da sNGAL filtrada causado pelas lesões tubulares ativas, incrementando o aumento final da uNGAL, como já observado em pacientes humanos com síndrome nefrótica (KUWABARA et al., 2009).

Outro ponto importante que conecta o quadro proteinúrico a valores mais altos de uNGAL, reside nos efeitos pró-inflamatórios das proteínas que contribuem diretamente para as lesões túbulointersticiais. A proteinúria pode mediar a lesão renal por meio de ativação da transcrição de fatores pró-inflamatórios como o NF- κ B (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006). Que em avaliação experimental, tem a capacidade de induzir apoptose das células tubulares renais após lesão renal isquêmica (MELDRUM, 2002) e induzir secundariamente o aumento da uNGAL.

Outra observação interessante ocorreu com a os números de leucócitos totais e neutrófilos segmentados. Quanto aos números de leucócitos totais, não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos. Hsu et al., 2014a relatam que

apesar da NGAL ser liberada por neutrófilos, as concentrações de sNGAL nos cães avaliados não apresentaram correlação significativa com o número de leucócitos. Contudo, no presente estudo, também foram avaliados os valores absolutos de neutrófilos segmentados, que foram significativamente mais altos no grupo LTA_{DRC}, quando comparados aos do grupo DRC. Considera-se a hipótese de que o aumento de neutrófilos segmentados esteja relacionado aos valores de sNGAL observados do grupo LTA_{DRC}.

Conclusões

A uNGAL ajustada (uNGAL.FCU), pode servir como indicador de agravamento das lesões renais precocemente em relação à concentração sérica de creatinina, que é o mais utilizado dentre os biomarcadores tradicionais;

A sNGAL aumenta gradativamente na DRC em oposição à uNGAL.FCU, que tende a diminuir, e, portanto, pode ser um indicador do agravamento das complicações extrarrenais associadas à uremia crônica grave;

Pacientes com uNGAL.FCU muito aumentada (grupo LTA_{DRC}), em comparação aos DRC (uNGAL.FCU com variação não significativa), se destacam pela maior ocorrência de proteinúria intensa e de hipertensão, sem aumentos relevantes de outros indicadores ou biomarcadores de DRC. Estes achados reforçam a importância da proteinúria e da hipertensão no agravamento das lesões renais, sem descartar outras causas de LTA na DRC.

Perspectiva futura

O presente trabalho foi concebido como estudo transversal, que permitiu a elaboração de algumas hipóteses que poderão ser confirmadas por outros estudos com desenho longitudinal prospectivo.

Em função dos resultados já disponíveis e com os achados do presente estudo, no qual foi empregado cálculo para ajuste do NGAL urinário, para contemplar a diminuição da concentração urinária na DRC, é plausível acreditar que o biomarcador NGAL está entre os melhores recursos para estudar a fisiopatologia da DRC.

Outrossim, é possível que a disponibilização da dosagem de uNGAL para aplicação clínica venha a viabilizar novas abordagens terapêuticas e maior precisão prognóstica.

6. REFERÊNCIAS

ABBATE, M.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? **Journal of American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 17, n. 11, p. 2974-2984, 2006.

AHN, H. J.; HYUN, C. Evaluation of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) activity in dogs with chronic kidney disease. **The Veterinary Records**, London, v. 173, n. 18. p. 452-456, 2013.

ASADA, N.; TAKASE, M.; NAKAMURA, J.; OGUCHI, A.; ASADA, M.; SUZUKI, N.; YAMAMURA, K.; NAGOSHI, N.; SHIBATA, S.; RAO, T. N.; FEHLING, H. J.; FUKATSU, A.; MINEGISHI, N.; KITA, T.; KIMURA, T.; OKANO, H.; YAMAMOTO, M.; YANAGITA, M. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 121, n. 10. p. 3981-3990, 2011.

ATKINSONS, A.; COLBURN, W.; DE GRUTTOLA, V.; DEMETS, D.; DOWNING, G.; HOTH, D. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.

BARTGES, J. W.; WILLIS, A. M.; POLZIN, D. J.; Hypertension and renal disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 1331-1345, 1996.

BLOCK, G. A.; HULBERT-SHEARON, T. E.; LEVIN, N. W.; & PORT, F. K. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 607-617, 1998.

BOLIGNANO, D.; DONATO, V.; COPPOLINO, G.; CAMPO, S.; BUEMI, A.; LACQUANITI, A.; BUEMI, M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. **American Journal of Kidney Diseases**, Washington, v. 52, n. 3, p. 595-605, 2009.

BONOMINI, F.; FOGLIO, E.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Clinical biomarkers in kidney diseases. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 2, p. 591-615, 2010.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 121, n. 11, p. 4210-4221, 2011.

BOYD, L. M.; LANGSTON, C.; THOMPSON, K.; ZIVIN, K.; IMANISHI, M. Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000–2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 22, n. 5, p. 1111-1117, 2008.

BRENNER, B. M.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 307, n. 11. p. 652-659, 1982.

BRENNER, B. M. Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 110, n. 12, p. 1753-1758, 2002.

BROWN, S. A. Management of acute renal failure. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. **BSAVA Manual of canine and feline nephrology and urology**. 2. ed. Gloucester: British small animal veterinary association, 2007. cap. 17, p. 223-230.

BURANAKARL, C.; ANKANAPORN, K.; THAMMACHAROEN, S.; TRISIROJ, M.; MALEERATMONGKOL, T.; THONGCHAI, P.; PANASJAROEN, S. Relationships between degree of azotaemia and blood pressure, urinary protein: creatinine ratio and fractional excretion of electrolytes in dogs with renal azotaemia. **Veterinary research communications**. Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 245-257, 2007.

BURTON, C.; HARRIS, K. P. G. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. **American journal of kidney diseases**. Philadelphia, v. 27, n. 6, p. 765-775, 1996.

CARVALHO, M. B. Semiologia do sistema urinário. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária – A arte do diagnóstico**. 3. ed. São Paulo: Rocca, 2014. cap. 10, p. 351-366.

CARVALHO, M. B. Insuficiência renal aguda. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. cap.158, p.1364-1393.

CARVALHO, M. B.; ALVES, M. A. M. K.; VASCONCELLOS, A L. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin urinary concentration in healthy and ill dogs – New proposal for the interpretation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 1520-1551, 2016.

CORTADELLAS, O. R.; FERNANDEZ DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 24, n. 1, p. 73-79, 2010.

COWGILL, L. D.; FRANCEY, T. Acute uremia. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Veterinary internal medicine**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. cap. 258, p. 1731-1751.

COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. **Genomics**, San Diego, v. 45, n. 1, p. 17-23, 1997.

D'AMICO, G.; BAZZI, C. Pathophysiology of proteinuria. **Kidney International**, New York, v. 63, n. 3, p. 809-825, 2003.

DAURE, E.; BELANGER, M. C.; BEAUCHAMP, G.; LAPOINTE C. Elevation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in non-azotemic dogs with urinary tract infection. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, n. 3, p. 1181-1185, 2013.

DEDE, O.; DAGGULI, M.; UTANGAÇ, M.; YUKSEL, H.; BODAKCI, M. N.; HATIOĞLU, N. K.; SANCAKTUTAR, A. A.; PENBEGUL, N. Urinary expression of acute kidney injury biomarkers in patients after RIRS: it is a prospective, controlled study. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, Madison, v. 8, n. 5, p. 8147-8152, 2015.

DEVARAJAN, P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p.194-200, 2011.

DOI, K.; URATA, M.; KATAGIRI, D.; INAMORI, M.; MURATA, S.; HISAGI, M.; ONO, M.; MATSUBARA, T.; ISHII, T.; YAHAGI, N.; NANGAKU, M.; NOIRI, E. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury superimposed on chronic kidney disease after cardiac surgery: a multicenter prospective study. **Critical Care**, London, v. 17, n. 6, p. 1-12, 2013.

DUFFIELD, J. S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 124, n. 6, p. 2299-2306, 2014.

EDDY, A. A.; NEILSON, E. G. Chronic kidney disease progression. *Journal of the American Society of Nephrology*, Washington, v. 17, n. 11, p. 2964 –2966, 2006

ENDO, T.; NAKAMURA, J.; SATO, Y.; ASADA, M.; YAMADA, R.; TAKASE, M.; TAKAORI, K.; OGUCHI, A.; IGUCHI, T.; HIGASHI, A. Y.; OHBAYASHI, T.; NAKAMURA, T.; MUSO, E.; KIMURA, T.; YANAGITA, M. Exploring the origin and limitations of kidney regeneration. **The Journal of Pathology**, London, v. 236, n. 2, p. 251-263, 2015.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; DUNCAN, R. J.; BARSANTI, J. A.; BENNETT, S. E. Effects of dietary phosphorus and protein in dogs with chronic renal failure. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 53, n. 12, p. 2264-2271, 1992.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; VADEN, S. L.; FERGUSON, D. C. Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration rate in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford. v. 18, n. 6, p. 418-421, 1995.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; COOPER, T. A.; BARSANTI, J. A. Progression of chronic renal disease in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 6, p. 516-528, 1999.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **The Biochemical Journal**, London, v. 318, pt. 1, p. 1-14, 1996.

GARG, V.; KUMAR, M.; MAHAPATRA, H. S.; CHITKARA, A.; GADPAYLE, A. K.; SEKHAR, V. Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy. **Clinical and Experimental Nephrology**, Tokyo, v. 19, n. 5, p. 895-900, 2015.

GOLDSTEIN, S. L. Urinary NGAL to define AKI in asphyxiated infants. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 30, n. 7, p. 1047-1049, 2015.

GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 35, n. 3, p. 581-596, 2005.

GRAUER, G. F. Management of acute renal failure. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. **BSAVA Manual of canine and feline nephrology and urology**. 2. ed. Gloucester: British small animal veterinary association, 2007. cap. 17, p. 215-222.

GrGIC, I.; CAMPANHOLLE, G.; BIJOL, V.; WANG, C.; SABBISSETTI, V. S.; ICHIMURA, T.; HUMPHREYS, B. D.; BONVENTRE, J. V. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. **Kidney International**, New York, v. 82, n. 2, p. 172-183, 2012.

HALL, J. A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; ALMES, K.; JEWELL, D. E. Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in dogs with naturally occurring chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 794-802, 2016.

HARRIS, R. C.; NEILSON, G. E. Toward a unified theory of renal progression. **Annual Reviews of Medicine**, Palo Alto, v. 57, p. 365-380, 2006.

HELANOVA, K.; SPINAR, J.; PARENICA, J. Diagnostic and prognostic utility of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in patients with cardiovascular diseases-review. **Kidney & Blood Pressure Research**, Basel, v. 39, n. 6, p. 623-629, 2014.

HOKAMP, J. A.; CIANCIOLO, R. E.; BOGGESS, M.; LEES, G. E.; BENALI, S. L.; KOVARSKY, M.; NABITY, M. B. Correlation of urine and serum biomarkers with renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 2, p. 591-601, 2016.

HOSTETTER, T. H.; OLSON, J. L.; RENNKE, H. G.; VENKATACHALAM, M. A.; BRENNER, B. M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response

to renal ablation. **Journal of the American Society of nephrology**, Baltimore, v. 12, n. 6, p. 1315-1325, 2001.

HSU, W. L.; LIN, Y. S.; HU, Y. Y.; WONG, M. L.; LIN, F. Y.; LEE, Y. J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with naturally occurring renal diseases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 28, n. 2, p. 437-442, 2014a.

HSU, W. L.; CHIOU, H. C.; TUNG, K. C.; BELOT, G.; VIRILLI, A.; WONG, M. L.; LIN, F. Y.; LEE, Y. J. The different molecular forms of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin present in dogs with urinary diseases. **BMC Veterinary Research**, London, v. 10, p. 202-212, 2014b.

IRIS. International Renal Interest Society. **Staging Chronic Kidney Disease (CKD) 2015**. Disponível em: < <http://www.iris-kidney.com/pdf/staging-of-ckd.pdf>>. Acesso em 03 agos. 2016.

ISEKI, K.; IKEMIYA, Y.; ISEKI, C.; TAKISHITA, S. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. **Kidney International**, New York, v. 63, n. 4, p. 1468-1474, 2003.

ISHANI, A.; NELSON, D.; CLOTHIER, B.; SCHULT, T.; NUGENT, S.; GREER, N.; SLININ, Y.; ENSRUD, K. E. The magnitude of acute serum creatinine increase after cardiac surgery and the risk of chronic kidney disease, progression of kidney disease, and death. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 171, n. 3, p. 226-233, 2011.

JACOB, F.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; NEATON, J. D.; KIRK, C. A.; ALLEN, T. A.; SWANSON, L. L. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 226, n. 3, p. 393-400, 2005.

KING, J. N.; TASKER, S.; GUNN-MOORE, D. A.; & STREHLAU, G.; Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 21, n. 5, p. 906-916, 2007.

KJELDSEN, L.; JOHNSEN, A. H.; SENGELOV, H.; BORREGAARD, N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n.14, p.10425-10432, 1993.

KRAMANN, R.; TANAKA, M.; HUMPHREYS, D. Fluorescence microangiography for quantitative assessment of peritubular capillary changes after AKI in mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 25, n. 9, p. 1924-1931, 2014.

KRAMANN, R.; SCHNEIDER, R. K.; DiROCCO, D. P.; MACHADO, F.; FLEIG, S.; BONDZIE, P. A.; HENDERSON, J. M.; EBERT, B. L.; HUMPREYS, D. Perivascular

Gli1⁺progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 51-66, 2015.

KUSABA, T.; LALLI, M.; KRAMANN, R.; KOBAYASHI, A.; HUMPHREYS, B. D. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 4, p. 1527-1532, 2014.

KUWABARA, T.; MORI, K.; MUKOYAMA, M.; KASAHARA, M.; YOKOI, H.; SAITO, Y.; YOSHIOKA, T.; OGAWA, Y.; IMAMAKI, H.; KUSAKABE, T.; EBIHARA, K.; OMATA, M.; SATOH, N.; SUGAWARA, A.; BARASCH, J.; NAKAO, K. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. **Kidney International**, New York, v. 75, n. 3, p. 285-294, 2009.

LEE, S.; HUEN, S.; NISHIO, H.; NISHIO, S.; LEE, H. K.; CHIO, B. S.; RUHRBERG, C.; CANTLEY, L. G. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 22, n. 2, p. 317-326, 2011.

LEE, Y. J.; HU, Y. Y.; LIN, Y. S.; CHANG, C. T.; LIN, F. Y.; WONG, M. L.; HSUAN, H. K.; HSU, W. L. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. **BMC Veterinary Research**, London, v. 8, p. 248-256, 2012.

LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, n. 4, p. 867-885, 2004.

LEFEBVRE, H. P.; DOSSIN, O.; TRUMEL, C.; BRAUN, JP. Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v. 37, n. 1, p. 4-20, 2008.

LEFEBVRE, H. P. Renal function testing. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. **Nephrology and urology of small animals**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011. cap. 14, p. 91-96.

LEVEY, A. S.; CORESH, J.; BALK, E.; KAUSZ, A. T.; LEVIN, A.; STEFFES, M. W.; HOGG, R. J.; PERRONE, R. D.; LAU, J.; EKNOYAN, G. National kidney foundation. practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 139, n. 2, p. 137-47, 2003.

LEVEY, A. S.; ECKARDT, K. U.; TSUKAMOTO, Y.; LEVIN, A.; CORESH, J.; ROSSERT, J De ZEEUW, D.; HOSTETTER, T. H.; LAMEIRE, N.; EKNOYAN, G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from kidney disease: improving global outcomes (KDIGO). **International Society of Nephrology**, New York, v. 67, n. 6, p. 2089-2100, 2005.

LIEBERTHAL, W.; LEVINSKY, N. G. Acute clinical renal failure. In: SELDIN, D. W.; GIEBISCH, G. **The kidney, physiology and pathophysiology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1992. cap. 96, p. 3181-3225.

LIU, F.; YANG, H.; CHEN, H.; ZHANG, M.; MA, Q. High expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the kidney proximal tubules of diabetic rats. **Advances in Medical Sciences**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 133-138, 2015.

MARTÍNEZ, P. P.; CARVALHO, M. B. Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudáveis e cães com doença renal crônica. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n.10, p. 868-876, 2010.

McDOUGALL, D. F.; COOK, T.; STEWARD, A. P.; CATTELL, V. Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. **Kidney International**, New York, v. 29, n. 6, p. 1144-1151, 1986.

MCGROTTY, Y. Diagnosis and management of chronic kidney disease in dogs and cats. **Journal of the British Veterinary Association**, London, v. 30, n. 9, p. 502-507, 2008.

MELDRUM, K. K.; HILE, K.; MELDRUM, D. R.; CRONE, J. A.; GEARHART, J. P.; BURNETT, A. L. Simulated ischemia induces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor- κ B dependent mechanism. **The Journal of Urology**, v. 168, n. 1, p. 248-252, 2002.

MENG, X. M.; PATERSON, D. J. N.; LAN, H. Y. Inflammatory processes in renal fibrosis. **Nature Reviews. Nephrology**, London, v. 10, n. 9, p. 493-503, 2014.

MEYER, T. W. Tubular injury in glomerular disease. **Kidney International**, New York, v. 63, n. 2, p. 774-787, 2003.

MISHRA, J.; MA, Q.; PRADA, A.; MITSNEFES, M.; ZAHEDI, K.; YANG, J.; BARASH, J.; DEVARAJAN, P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 14, n. 10, p. 2534-2543, 2003.

MISHRA, J.; MORI, K.; MA, Q.; KELLY, C.; YANG, J.; MITSNEFES, M.; BARASCH, J.; DEVARAJAN, P. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 15, n.12, p. 3073-3082, 2004.

MULLER-PEDDINGHAUS, R.; TRAUTWEIN, G. Spontaneous glomerulonephritis in dogs. I. classification and immunopathology. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 14, n. 1, p. 1-13, 1977.

NABITY, M. B.; LEES, G. E.; CIANCIOLO, R.; BOGGESS, M. M.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI J. S. Urinary biomarkers of renal disease in dogs with x-linked hereditary nephropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 2. p. 282-293, 2012.

NENTWIG, A.; SCHWEIGHAUSER, A.; MAISSEN-VILLIGER, C.; BRUCKMAIER, R. M.; ZURBRIGGEN, A.; VAN DORLAND, H. A.; FRANCEY, T. Assessment of the expression of biomarkers of uremic inflammation in dogs with renal disease. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 77, n. 2, p. 218-224, 2016.

OKUDA, S.; LANGUINO, L. R.; RUOSLAHTI, E.; BORDER, W. A. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 86, n. 2. p. 453-462, 1990.

OTTO, G. P.; GRUNWALD, B.; GEIS, C; KOTHE, S.; HURTADO-OLIVEROS, J.; CHUNG, H. Y.; EKANEY, M.; BOCKMEYER, C. L.; SOSSDORF, M.; BUSCH, M.; CLAUS, R. A. Impact of antibiotic treatment intensity on long-term sepsis-associated kidney injury in a polymicrobial peritoneal contamination and infection model. **Nephron**, New York, v. 129, n. 2, p.137-142, 2015.

PALM, C. A.; SEGEV, G.; COWGILL, L. D.; LeROY, B. E.; KOWALKOWSKY, K. L.; KANAKUBO, K.; WESTROPP, J. L. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker for identification of acute canine kidney injury and recovery in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 200-205, 2016.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A. Pathophysiology of renal failure and uremia. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. 2. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995. cap. 16, p. 335-367.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ROSS, S. Chronic renal failure. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Text book of veterinary internal medicine**. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2005. cap. 260, p. 1756-1785.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. **Nephrology and urology of small animals**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011a. cap. 48, p. 433-471.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia. v 41, p. 15-30, 2011b.

PRESSLER, B. M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 35, n. 3, p. 487-502, 2015.

PRICE, R. G. Early markers of nephrotoxicity. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 11, n. 1, p. 2-7, 2002.

ROCHA, P. N.; MACEDO, M. N.; KOBAYASHI, C. D.; MORENO, L.; GUIMARÃES, L. H.; MACHADO, P. R.; BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; GLESBY, M. J. Role of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the early diagnosis of amphotericin B-induced acute renal injury. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 11, p. 6913-6921, 2015.

ROUSE, B. T.; LEWIS, R. J. Canine glomerulonephritis: prevalence in dogs submitted at random for euthanasia. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Québec, v. 39, n. 4, p. 365-370, 1975.

SEGEV, G.; PALM, C.; LeROY, B.; COWGILL, L. D.; WESTROPP, J. L. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of kidney injury dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 27, n. 6, p. 1362-1367, 2013.

SCHMIDT-OTT, K. M.; MORI, K.; LI, J. Y.; KALANDADZE, A.; COHEN, D. J.; DEVARAJAN, P.; BARASCH, J. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 18, n. 2, p. 407-413, 2007.

SHEMIN, D.; DWORKIN, L. D. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for early acute kidney injury. **Critical Care Clinics**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. 379-389, 2011.

SHRESTHA, K.; SHAO, Z.; SINGH, D.; DUPONT, M.; TANG, W. H. Relation of systemic and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels to different aspects of impaired renal function in patients with acute decompensated heart failure. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 110, n. 9, p.1329-1335, 2012.

SOUMA, T.; YAMAZAKI, S.; MORIGUCHI, T.; SUZUKI, N.; HIRANO, I.; PAN, X.; MINEGISHI, N.; ABE, M.; KIYOMOTO, H.; ITO, S.; YAMAMOTO, M. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 24, n. 10, p. 1599-1616, 2013.

STEINBACH, S.; WEIS, J.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T.; NEIGER, R. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 28, n. 2, p. 264-269, 2014.

SYME, H. M.; MARKWELL, P. J.; PFEIFFER, D.; ELLIOTT, J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 528-535, 2006.

SYME, H.; ELLIOTT, J. Proteinuria and microalbuminuria. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. **Nephrology and urology of small animals**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011. cap. 43, p. 410-414.

TAKAORI, K.; NAKAMURA, J.; YAMAMOTO, S.; NAKATA, H.; SATO, Y.; TAKASE, M.; NAMETA, M.; YAMAMOTO, T.; ECONOMIDES, A. N.; KOHNO, K.; HAGA, H.; SHARMA, K.; YANAGITA, M. Severity and frequency of proximal tubule injury determines renal prognosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 27, n. 8, p. 2393-2406, 2015.

TAKAORI, K.; YANAGITA, M. Insights into the mechanisms of the acute kidney injury-to-chronic kidney disease continuum. **Nephron**, Basel, v. 134, n. 3. P. 1-5, 2016.

TANAKA, S.; TANAKA, T.; NANGAKU, M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, Bethesda, v. 307, n. 11, p. 1187-1195, 2014.

THAKAR, C. V.; CHRISTIANSON, A.; HIMMELFARB, J.; LEONARD, A. C. Acute kidney injury episode and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 6, n. 11, p. 2567-2572, 2011.

VADEN, S. L. Glomerular disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Veterinary internal medicine*. 6. ed. St. Louis: Elsevier-Saunders, 2005. cap. 261, p. 1786-1800.

VADEN, S. L.; GRAUER, G. F. Glomerular disease. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. **Nephrology and urology of small animals**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011. cap. 53, p. 538-546.

VALLE, D. A. S. D.; MOHAN, S.; CHENG, J. T.; PARAGAS, N. A.; SISE, M. E.; AGATI, V. D. D.; BARASCH, J. Urinary NGAL is a useful clinical biomarker of HIV-associated nephropathy. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, Berlin, v. 26, n. 7, p. 2387-2390, 2011.

VIANNA, P. T. G. Marcadores biomoleculares da insuficiência renal. In: CAVALCANTE, I. L.; CANTINHO, F. A. F.; ASSAD, A. **Medicina perioperatória**. Rio de Janeiro: Sociedade de anestesiologia do estado do rio de janeiro, 2006. cap. 10, p. 57-61.

WANG, Y.; CHEN, J.; CHEN, L.; TAY, Y. C.; RANGAN, G. K.; HARRIS, D. C. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 8, n. 10, p. 1537-1545, 1997.

WATANABE, M.; SILVA, G. F.; FONSECA C. D.; VATTIMO, M. F. F. 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, 2014.

YANG, J.; LIU, Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 159, n. 4. p. 1465-1475, 2001.

ZHOU, X.; MA, B.; LIN, Z.; QU, Z.; HUO, Y.; WANG, J.; LI, B. Evaluation of the usefulness of novel biomarkers for drug-induced acute kidney injury in beagles dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 280, n. 1, p. 30-35, 2014.

ZOJA, C.; MORIGI, M.; FIGLIUZZI, M.; BRUZZI, I.; OLDROYD, S.; BENIGNI, A.; RONCO, P.; REMUZZI, G. Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 934-941, 1995.

ZOJA, C.; DONADELLI, R.; COLLEONI, S.; FIGLIUZZI, M.; BONAZZOLA, S.; MORIGI, M.; REMUZZI, G. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- κ B activation. **Kidney International**, New York, v. 53, n. 6, p. 1608-1615, 1998.