

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**CONTRIBUIÇÃO DIAGNÓSTICA DE BIOMARCADORES
EM CÃES SOB RISCO DE DESENVOLVER LESÃO RENAL
AGUDA**

Karla Alejandra Hidalgo Teran
Médica Veterinária

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**CONTRIBUIÇÃO DIAGNÓSTICA DE BIOMARCADORES
EM CÃES SOB RISCO DE DESENVOLVER LESÃO RENAL
AGUDA**

Karla Alejandra Hidalgo Teran

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

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área Clínica Médica.

2022

T315c Hidalgo Teran, Karla Alejandra
Contribuição diagnóstica de biomarcadores em cães
sob risco de desenvolver lesão renal aguda / Karla
Alejandra Hidalgo Teran. -- Jaboticabal, 2022
31 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Marileda Bonafim Carvalho

1. biomarcador de lesão renal. 2. diagnóstico precoce.
3. NGAL. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados
fornecidos pelo autor(a).

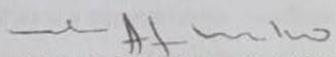
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

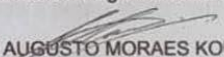
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CONTRIBUIÇÃO DIAGNÓSTICA DE BIOMARCADORES EM CÃES SOB RISCO DE DESENVOLVER LESÃO RENAL AGUDA

AUTORA: KARLA ALEJANDRA HIDALGO TERAN
ORIENTADORA: MARILEDA BONAFIM CARVALHO

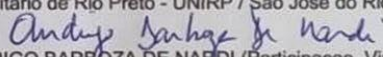
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. MARCELO AUGUSTO MORAES KOURY ALVES (Participação Virtual)
Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP / São José do Rio Preto/SP



Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 30 de junho de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Karla Alejandra Hidalgo Teran - nascida em Quito - Equador aos dezesseis de junho do ano 1992, filha de Benito Fidel Hidalgo Cruz e de Anita Germania Teran Ortega. Em fevereiro de 2016, graduou-se de Medicina Veterinária e Zootecnia na *Universidad de las Américas* (UDLA) em Quito-Ecuador. Desde o ano 2016 até 2020, trabalhou na Clínica Veterinária *Perros e Gatos* na área de Clínica Médica de pequenos animais. Desde abril de 2019 até dezembro do mesmo ano, participou do Curso de pós-graduação *lato sensu* em Medicina Felina da *Universidad Católica de Salta* (UCASAL) e o Grupo de Educação contínua *Veterinarios en web*. Em 2020, obteve a Certificação de *Cat Friendly Veterinary Professional* na *Asociación Internacional de Medicina Felina* (ISFM). Em março de 2020 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação, *stricto sensu*, em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica com ênfase em Nefrologia e Urologia, oferecido pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* Jaboticabal. Atualmente é Integrante do Grupo de pesquisa em Nefrologia e Urologia (GPNUV) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, *campus* Jaboticabal, SP.

AGRADECIMENTOS

À minha avó, a pessoa mais importante na minha vida. Sem você, eu não estaria escrevendo estas palavras.

À professora Marileda, minha orientadora. Por ter me acolhido como orientada e ter me proporcionado a melhor das guias durante minha trajetória. A senhora é um exemplo como pessoa e como profissional para mim.

À *Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT)*, por ter acreditado nas minhas capacidades e ter investido na minha educação.

À equipe do Hospital Veterinário da FCAV - UNESP. Aos residentes e pós-graduandos. Foram amigos e parceiros; aprendi muito com todos vocês. Com muito carinho, sempre ficarão no meu coração.

Finalmente, mas não menos importante, ao Francisco. Juntos carregamos todas minhas emoções nestes dois anos, as boas e as ruins. Mesmo à distância, sempre senti uma mão onde apoiar a minha.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESES	1
3. JUSTIFICATIVA	2
4. OBJETIVOS	2
4.1 Objetivos específicos	2
5. REVISÃO DE LITERATURA	3
6. MATERIAL E MÉTODOS	5
6.1 Avaliação preliminar dos pacientes	6
6.2 Critérios de inclusão	6
6.3 Critérios de exclusão	6
6.4 Obtenção e preparo das amostras para avaliação dos biomarcadores	6
6.5 Análises laboratoriais	7
6.6 Estatística	7
7. RESULTADOS	8
8. DISCUSSÃO	15
9. CONCLUSÕES	16
10. REFERÊNCIAS	17

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Contribuição diagnóstica de biomarcadores em cães sob risco de desenvolver lesão renal aguda"**, protocolo nº 4369/20, 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 julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de setembro de 2020.

Vigência do Projeto	01/10/2020 a 26/02/2021
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	30
Peso / Idade	≥ 5 Kg / ≥ 1 ano
Sexo	Sem restrição
Origem	Pacientes da espécie canina atendidos no HV-FCAV-Unesp

Jaboticabal, 17 de setembro de 2020.



Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Características físicas e clínicas dos 17 cães avaliados.	8
Tabela 2 Dados de estatística descritiva das variáveis uNGAL (pg/mg), sNGAL (pg/mL), sCr (mg/dL), UP/C e densidade urinária (Coleta, T0). n=17	9
Tabela 3 Dados de estatística descritiva das variáveis uNGAL (pg/mg), sNGAL (pg/mL), sCr (mg/dL), UP/C e densidade urinária (Coleta, T48). n=17	9
Tabela 4 Dados de estatística descritiva das variáveis uNGAL (pg/mg), sNGAL (pg/mL), sCr (mg/dL), UP/C e densidade urinária (Coleta, T96). n=17	9
Tabela 5 Aumento de NGAL, 48 horas após o término da cirurgia, observados em 10 cães.	10
Tabela 6 Análise de variância para mensurações repetidas (<i>Two-way RM ANOVA</i> - Alfa 0,05) das concentrações de NGAL sérico (sNGAL) e NGAL urinário (uNGAL), além dos outros três biomarcadores tradicionais de lesão renal (sCr, DU e UP/C), avaliados em três momentos: T0 (12 a 24h antes da cirurgia); T48 (após término da cirurgia); T96 (após término da cirurgia) dos 13 pacientes com câncer.	12
Tabela 7 Análise de variância para mensurações repetidas (<i>Two-way RM ANOVA</i> - Alfa 0,05) das concentrações de NGAL sérico (sNGAL) e NGAL urinário (uNGAL), além dos outros três biomarcadores tradicionais de lesão renal (sCr, DU e UP/C), avaliados em três momentos: T0 (12 a 24h antes da cirurgia); T48 (após término da cirurgia); T96 (após término da cirurgia) dos quatro pacientes caninos sem câncer.	12
Tabela 8 Resultados de correlação entre as variáveis uNGAL (pg/mg), sCr (mg/dL), UP/C, densidade urinária e tempo de anestesia (mostrados somente resultados estatisticamente significantes). n=17	13

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Representações dos valores individuais obtidos em três momentos, para cada uma das cinco variáveis analisadas. Os números 1, 2 e 3 do eixo X representam os três momentos de coletas das amostras, respectivamente, antes dos tratamentos, com dois a três dias de tratamento e mais dois a três após. As linhas vermelhas demarcam os valores das medianas. As linhas pontilhadas em azul indicam o topo dos valores normais das variáveis.	11

CONTRIBUIÇÃO DIAGNÓSTICA DE BIOMARCADORES EM CÃES SOB RISCO DE DESENVOLVER LESÃO RENAL AGUDA

RESUMO – Pacientes caninos, com necessidade de intervenção cirúrgica, correm risco de desenvolver Lesão renal aguda, cuja manifestação clínica se apresenta tardiamente. A busca por métodos diagnósticos precoces revelou o biomarcador Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) como o mais apropriado para detecção de lesão tubular aguda (LTA). Considerando a hipótese de que cães com câncer são mais propensos a desenvolver LTA, relacionada às diversas intervenções ao longo do processo cirúrgico, foi conduzido estudo prospectivo longitudinal (do pré-operatório até pós-operatório mediato), de 17 cães, clinicamente estáveis, indicados para procedimento cirúrgico. Para o estudo foram avaliadas creatinina sérica, densidade urinária, razão proteína/creatinina urinária, que são indicadores tradicionais para doença renal, o biomarcador NGAL do soro e da urina. As coletas de amostras foram realizadas em três momentos: 12 a 24 horas antes da cirurgia, 48 horas e 96 horas após o término da cirurgia. Os resultados evidenciaram aumento relevante da NGAL urinária em 11 dos 17 cães, 48 horas após a cirurgia, enquanto os biomarcadores convencionais não apresentaram alteração significativa e não foram observados sinais clínicos relacionados. Assim, confirmada a hipótese do estudo, a NGAL se mostrou útil para detecção precoce de eventos silenciosos de ataques à integridade tubular renal.

Palavras-chave: biomarcador de lesão renal, diagnóstico precoce, NGAL.

DIAGNOSTIC CONTRIBUTION OF BIOMARKERS IN DOGS AT RISK OF DEVELOPING ACUTE KIDNEY INJURY

ABSTRACT - Canine patients needing surgical intervention are at risk of developing acute kidney injury, whose clinical manifestation is late. The search for early diagnostic methods revealed the neutrophil gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) biomarker as the most appropriate for detecting acute tubular injury (ATI). Considering the hypothesis that dogs with cancer are more likely to develop ATI, related to the different interventions throughout the surgical process, a prospective longitudinal study (from the preoperative to the immediate postoperative period) of 17 clinically stable dogs indicated for surgical procedure. The serum creatinine, urinary density, and urinary protein/creatinine ratio, which are traditional indicators for kidney disease, the serum, and urine NGAL biomarkers, were evaluated. The sample collections were performed three times: 12 to 24 hours before surgery, 48 hours, and 96 hours after surgery. The results showed a significant increase in urinary NGAL in 11 of 17 dogs 48 hours after surgery, while conventional markers showed no significant change, and no related clinical signs were observed. Thus, confirming the study's hypothesis, NGAL proved helpful for the early detection of silent events of attacks on renal tubular integrity.

Keywords: biomarker of kidney injury, early diagnosis, NGAL.

AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DIAGNÓSTICA DE BIOMARCADORES EM CÃES SOB RISCO DE DESENVOLVER LESÃO RENAL AGUDA

1. INTRODUÇÃO

As nefropatias adquiridas podem comprometer qualquer um dos componentes do parênquima renal (glomérulos, túbulos, interstício e vasculatura), de forma isolada ou conjunta, a depender da causa e da duração do processo mórbido. Os túbulos renais, com destaque para o túbulo contornado proximal, são o alvo primário nas doenças renais agudas desencadeadas por fatores isquêmicos ou nefrotóxicos. Esse tipo de doença, atualmente denominada lesão renal aguda (LRA), é relativamente comum em cães e humanos. Os pacientes desenvolvem insuficiência renal aguda (IRA) e, comumente, evoluem para óbito, doença renal crônica ou, na melhor das hipóteses, déficit de função tubular. Contudo, o desfecho pode ser favorável ou melhorado se o fator causal for passível de eliminação ou compensação e a condição seja diagnosticada em tempo hábil.

Existem vários fatores, que isolada ou conjuntamente, influenciam a gravidade das lesões tubulares e o tipo de desfecho da LRA. O diagnóstico tardio da LRA é um dos fatores relevantes mais graves. A concentração sérica de creatinina (sCr), o biomarcador tradicional para IRA, só se manifestam quando o paciente já se encontra em estado crítico.

Pacientes que necessitam de intervenção cirúrgica são particularmente expostos a fatores com potencial para causar eventos isquêmicos e nefrotóxicos que, somados aos fatores mórbidos já existentes, resultem em lesão tubular aguda (LTA), que podem evoluir para os piores efeitos por falta de diagnóstico precoce.

2. HIPÓTESES

Considerando as variações das condições clínicas de pacientes caninos com necessidade de intervenção cirúrgica, na prática, são esperados desfechos distintos. Mesmo que os protocolos cirúrgicos e terapêuticos sejam específicos para cada paciente, pode haver efeitos adversos e complicações. Como os rins podem ser alvos imediatos em tais circunstâncias, elaborou-se a hipótese de que possa haver LTA, mesmo na ausência de manifestações clínicas ou laboratoriais

tradicionais, detectável por meio da Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos (NGAL) que é biomarcador precoce e sensível para identificar LTA.

3. JUSTIFICATIVAS

A LRA tem índice alto de mortalidade e os pacientes que sobrevivem têm propensão a se tornarem doentes renais. O biomarcador tradicional de IRA, a sCr, tem sua concentração aumentada tardiamente, o que reduz drasticamente as chances de recuperação. Em um cenário clínico ideal, a LRA deve ser identificada precocemente para que possam ser adotados procedimentos terapêuticos que venham a evitar ou minimizar a perda de néfrons.

A NGAL pode ser analisada em urina, soro ou plasma, por método imunoenzimático (ELISA), que exige anticorpo espécie-específico, já disponível para estudos experimentais com cães. Outrossim, a metodologia do estudo não requer qualquer intervenção adicional, além das coletas de amostras de sangue e de urina.

4. OBJETIVOS

Conduzir estudo prospectivo longitudinal para identificação, não invasiva, da ocorrência de LTA em pacientes caninos sob risco de desenvolver LRA relacionada aos eventos cirúrgicos e pós-operatórios.

4.1. Objetivos Específicos

- Avaliar cães, antes e após intervenção cirúrgica sob anestesia inalatória e exposição a tratamentos com potencial nefrotóxico ou isquêmico, para detecção de LTA, por meio do biomarcador tradicional (sCr) e do biomarcador NGAL.
- Comparar a eficiência das duas formas de avaliação para detectar sinais de LRA.
- Considerando os resultados esperados, enunciar aspectos relevantes para a fisiopatologia da LTA em cães sob as condições especificadas no estudo.

5. REVISÃO DE LITERATURA

A IRA se manifesta por deterioração rápida da função renal causada por lesão aguda de endotélios, glomérulos, túbulos ou interstício (CARVALHO, 2015). A taxa de filtração glomerular (TFG) é comprometida drasticamente e, por conta disso, existe azotemia e sinais de uremia (DUNAEVICH, 2020). Este processo pode ser reversível se o diagnóstico e tratamento forem realizados em tempo razoável (CARVALHO, 2015). A LRA, uma causa comum da IRA, ocorre por ação de isquemia renal, nefrotoxinas ou ambas, que afetam primariamente os túbulos renais (GINÉ, 2010, CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011, CARVALHO, 2015).

As causas mais comuns de isquemia renal incluem desidratação, hipotensão, redução do débito cardíaco e choque hipovolêmico. Com a diminuição da perfusão sanguínea renal, ativam-se os mecanismos de vasoconstrição das arteríolas glomerulares aferentes, para eliminar a menor quantidade de água possível. Como consequência, acentua-se a diminuição do fluxo sanguíneo renal, o que compromete ainda mais a hemodinâmica renal e favorece o desenvolvimento de LRA (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011, ROSS, 2011, CRILLY; GRAUER, 2017).

Por outro lado, os rins contam com mecanismos fisiológicos de proteção que são mediados pelos derivados de eicosanoides, as prostaciclina PGE₂ e PGI₂ presentes nos rins (PELLIGAND; ELLIOTT, 2017). O efeito vasodilatador das prostaglandinas e a estimulação da liberação de renina permitem, até certo ponto, que a resistência vascular e o fluxo sanguíneo renal possam ser relativamente modulados nos casos de hipovolemia, hipotensão ou qualquer outra alteração hemodinâmica que comprometa a perfusão sanguínea renal (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011).

O papel das prostaciclina renais, tem muita relevância para manter o suprimento de oxigênio para as células tubulares em momentos críticos (ROSS, 2011). Pacientes em tratamento com anti-inflamatório não esteroide (AINE) ficam sem esse recurso e podem desenvolver LRA isquêmica (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011; CARVALHO, 2015). Esses medicamentos, independentemente de serem usados em doses terapêuticas, inibem a ação das enzimas COX1 e COX2 (BENSMAN, 2020), que normalmente intervêm na produção de prostaglandinas e mediadores inflamatórios responsáveis pelo tônus vascular do

córtex e da medula renal (CARVALHO, 2015; PELLIGAND; ELLIOTT, 2017). Em pacientes com doença renal pré-existente, a condição pode ser agravada drasticamente (CARVALHO, 2015).

A isoenzima COX2 também está envolvida no mecanismo de contracorrente na alça de Henle, no interstício e na vasa reta, pois as prostaglandinas ajudam as células do interstício a se adaptarem à hiperosmolalidade, prevenindo a apoptose delas (PELLIGAND et al., 2015). Por conseguinte, o tratamento com AINE pode provocar isquemia renal, diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e lesão hipertônica causada pela inibição das isoenzimas COX-1 e COX-2 (KUKANICH et al., 2012). As lesões podem variar a depender do estado clínico do animal e da importância relativa da expressão das isoenzimas COX 1 ou COX 2 nos diferentes tecidos (PELLIGAND; ELLIOTT, 2017).

Em estudo com animais saudáveis, tratados com AINE, os biomarcadores convencionais indicaram ausência de efeitos negativos ou efeitos mínimos nos valores destes marcadores tradicionais (KUKANICH et al., 2012). Contudo, estes marcadores mostraram alteração, quando doses altas de AINE foram usadas (SIMMONS et al., 2004).

A LRA pode também ser causada por diversos tipos de agentes nefrotóxicos, incluindo algumas classes medicamentos excretados por via urinária, onde atingem concentrações altas e provocam distúrbios das células tubulares (KAI et al., 2013). A nefrotoxicidade depende de vários fatores, tais como dose e frequência de administração, idade e condição clínica do paciente, principalmente se houver doença renal preexistente (CARVALHO, 2015). Alguns antibióticos se destacam pelo potencial de nefrotoxicidade, como é o caso dos aminoglicosídeos (CARVALHO, 2015; PALM et al., 2016). Contudo, muitos dos outros antibióticos, de uso comum para tratamento de cães, podem causar lesão tubular (KAI et al., 2013; CARVALHO, 2015).

Em décadas passadas diversos novos biomarcadores de lesão renal induzida por medicamentos nefrotóxicos foram descobertos em modelos experimentais (ZHOU et al., 2014). Dentre os biomarcadores testados em cães, a NGAL vem se destacando como biomarcador precoce de LRA, por seu comportamento dinâmico no organismo, principalmente nos túbulos renais (DEVARAJAN, 2008, SEGEV et al., 2013, SINHA; VENCE; SALAHUDEEN, 2013).

A NGAL, uma glicoproteína da família das lipocalinas, é expressa no útero, próstata, glândulas salivares, medula óssea, estômago, cólon, traqueia, pulmões, fígado e rins (PERIS et al., 2020). A molécula é sintetizada em concentrações baixas nos túbulos renais, intestinos, fígado e pulmões (KO et al., 2021). O polipeptídeo também é encontrado na circulação sanguínea, de onde é filtrado pelos glomérulos, reabsorvido pelos túbulos contornados proximais e secretado pela porção ascendente espessa da alça de Henle (DEVARAJAN et al., 2008). Em experimento com cultivo de células de rato foi constatada a expressão de NGAL em túbulos proximais, sem nenhuma evidência de expressão glomerular (COWLAND; BORREGAARD, 1997). Outros estudos na espécie canina mostraram os mesmos resultados, quanto à expressão da NGAL nos tecidos renais (CAO et al., 2020, GU et al., 2020).

Durante a fase ativa da lesão tubular, há aumento da síntese de NGAL e diminuição da reabsorção, que resultam em aumento da concentração sérica de NGAL (sNGAL) e da concentração urinária de NGAL (uNGAL) que atinge valores maiores (KIM et al., 2019). Os aumentos de sNGAL e uNGAL são proporcionais ao tempo de duração do evento agressor, nos casos de isquemia (MORI et al., 2005).

Estudo conduzido por Palm et al. (2016) indicou que o diagnóstico de IRA por meio da uNGAL é significativamente precoce em comparação com os marcadores, para indicar a fase de início das lesões como a da fase de recuperação. De fato, o aumento da NGAL já pode ser detectado na urina 2 horas depois da agressão renal (DEVARAJAN, 2008, LEE et al., 2012, SEGEV et al., 2013, SINHA; VENCE; SALAHUDEEN, 2013), inclusive nos casos de procedimento cirúrgico (HSU et al., 2014a), o que evidencia a precocidade da NGAL em relação aos biomarcadores convencionais (GU et al., 2020).

6. MATERIAL E MÉTODOS

Antes da fase de execução, o presente projeto foi submetido e aprovado à CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV- Unesp, *campus* de Jaboticabal/SP (Número de protocolo: 4369/20). A inclusão dos pacientes foi feita sob consentimento livre e esclarecido dos respectivos tutores.

O estudo foi realizado pelo Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Urologia (GPNUV) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *campus* Jaboticabal.

Os cães estudados eram pacientes encaminhados para o Serviço de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP – *campus* de Jaboticabal.

6.1. Avaliação dos pacientes recrutados para o estudo

Pacientes, já examinados e com diagnóstico, foram encaminhados para procedimentos cirúrgicos. Os exames pré-operatórios compreenderam anamnese, exame físico, hemograma, perfil bioquímico sérico, exame cardiorrespiratório de rotina, além de exame completo do trato urinário.

6.2. Critérios de inclusão

Foram avaliados animais adultos, >1 ano de idade, com pelo menos 5 kg de massa corporal, sem restrição quanto à raça ou ao gênero, encaminhados para procedimento cirúrgico de tecidos moles.

6.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com complicação pós-operatória, amostras de sangue ou de urina impróprias para avaliação laboratorial, confirmação de infecção urinária ou desistência do tutor.

6.4. Obtenção e preparo das amostras para avaliação dos biomarcadores e demais variáveis de interesse para o estudo

Nesse estudo, as variáveis analisadas, que compreendem uNGAL, sNGAL, sCr, razão proteína/creatinina urinária (UP/C) e densidade urinária (DU), foram mensuradas em três momentos distintos. A primeira coleta de amostras (T0) foi realizada no momento dos exames pré-operatórios (12 a 24 horas antes da anestesia). A segunda coleta foi realizada 48 horas após o término da cirurgia (T48) e a terceira coleta foi feita 96 horas após o término da cirurgia (T96).

As coletas de sangue foram feitas por punção da veia jugular ou da cefálica. Quatro mililitros de sangue foram requeridos para extração de soro para análises

bioquímicas e ensaios de NGAL. Os soros destinados para avaliação do sNGAL foram envasados e conservados a -80°C.

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese antepúbica, guiada por ultrassom quando possível, ou por cateterização transuretral. Em último caso, a urina foi coletada por micção espontânea (jato médio). As amostras de urina foram centrifugadas para separação do sobrenadante e sedimento e execução imediata de urinálise e mensuração das concentrações urinárias de creatinina e proteína. Do restante de sobrenadante de urina, 3 mL foram envasados e mantidos a -80°C para avaliação de uNGAL.

6.5. Análises laboratoriais

As concentrações séricas e urinárias de creatinina foram mensuradas pelo método Jaffé modificado (VADEN et al., 2009). Para os cálculos de U/PC, as concentrações de proteína urinária foram mensuradas pelo método vermelho de pirogalo. As bioquímicas foram feitas com os reagentes do sistema Labtest para diagnósticos e, para a leitura, foi utilizado espectrofotômetro semiautomático. As densidades de urina foram mensuradas em refratômetro.

Os ensaios para dosagem da sNGAL e da uNGAL foram feitos com o kit específico para cães - *Dog NGAL ELISA KIT 043RUO – Bioporto Diagnostics, Hellerup, Denmark*, disponível para pesquisa. O procedimento foi feito de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados foram lidos em leitor de microplaca SpectraMax M3, utilizando comprimento de onda de 450nm.

Para tornar possível as avaliações dos valores de uNGAL obtidos no ensaio, o fator concentração urinária foi uniformizado pela fórmula que se segue.

$$[\text{uNGAL (pg/mL)/uCr (mg/mL)} = \text{uNGAL (pg/mg)}].$$

6.6. Estatística

Os resultados foram avaliados por estatística descritiva e testes de análise de variância (*Two-way ANOVA*), complementados por teste de comparação múltipla (Tukey). Também foram realizados testes de correlação (Spearman) para as variáveis contínuas (biomarcadores convencionais e NGAL). Foi adotado $P \leq 0,05$ como valores significativos.

Todas as análises e gráficos foram feitas por meio do programa estatístico *GraphPad Prism version 9.4.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA*, www.graphpad.com.

7. RESULTADOS

Dos 26 pacientes, inicialmente recrutados, 17 se enquadraram completamente nos critérios de inclusão do estudo. Os exames anteriores às cirurgias indicaram câncer em 13 pacientes e doença renal em cinco. Todos os incluídos passaram por cirurgia sob anestesia inalatória com duração mínima de 36 minutos e máxima de 270 minutos. A medicação pós-operatória foi iniciada ao término da cirurgia. Cinco cães foram medicados com antibióticos, outros quatro com AINE e os oito restantes receberam antibiótico e AINE (Tabela 1).

Tabela 1. Características físicas e clínicas dos 17 cães avaliados.

Nº	Raças	Físicas				Clínicas				
		M 6	F 11	Idade anos	MC kg	DR 5	Câncer 13	AI min.	AINE 12	Atb 13
1	Labrador		X	5	25,7	X	X	150		X
4	SRD		X	14	38		X	240		X
6	SRD	X		12	25		X	270		X
16	SRD		X	13	5,4		X	245		X
24	Teckel		X	8	8,8	X	X	190		X
2	Labrador	X		9	39	X	X	40	X	X
9	SRD		X	10	30		X	180	X	X
12	Bull dog francês	X		10	14,5		X	90	X	X
17	SRD		X	9	17,3		X	90	X	X
18	Husky siberiano		X	9	33	X	X	190	X	X
20	Cocker Spaniel	X		5	15		X	140	X	X
23	Bulldog inglês		X	8	25		X	215	X	X
25	SRD		X	10	15		X	139	X	X
5	SRD	X		10	41			36	X	
10	Teckel		X	10	10,1	X		90	X	
14	Teckel	X		2	6,9			38	X	
26	SRD		X	10	16,6			98	X	

M: macho; F: fêmea; SRD: sem raça definida; MC: massa corporal; DR: doença renal; AI: anestesia inalatória; AINE: anti-inflamatório não esteroide; Atb: antibiótico.

Os resultados de estatística descritiva para cada momento de coleta estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4. Os gráficos de dispersão (Figura 1), com os dados individuais para cada momento, são complementares.

Tabela 2. Dados de estatística descritiva das variáveis uNGAL (pg/mg), sNGAL (pg/mL), sCr (mg/dL), UP/C e densidade urinária (Coleta, T0). n=17

		uNGAL	sNGAL	sCr	UP/C	DU
Mínimo		153,0	4215	0,6000	0,02000	1,007
Percentil 25%		419,5	9001	0,8000	0,06500	1,022
Mediana		1598	13490	1,000	0,1900	1,034
Percentil 75%		54756	26449	1,400	0,9800	1,040
Máximo		173836	85877	2,100	1,700	1,055
IC (95%)	Inferior	6428	9958	0,9118	0,2044	1,025
	Superior	60946	33653	1,323	0,7332	1,038
CV (%)		157,4%	105,7%	35,82%	109,7%	1,246%

IC: intervalo de confiança da mediana; CV: coeficiente de variação; DU: densidade urinária. Os valores de uNGAL foram corrigidos pela concentração da urinária.

Tabela 3. Dados de estatística descritiva das variáveis uNGAL (pg/mg), sNGAL (pg/mL), sCr (mg/dL), UP/C e densidade urinária (Coleta, T48). n=17

(mg/dL); Cr e densidade urinária (Coleta, 1-4): 1-17						
	uNGAL	sNGAL	sCr	UP/C	DU	
Mínimo	412,0	2837	0,6000	0,05000	1,003	
Percentil 25%	2255	7513	0,8000	0,08000	1,015	
Mediana	5412	16302	1,000	0,2100	1,037	
Percentil 75%	44992	36811	1,150	0,5600	1,046	
Máximo	225034	138795	1,800	1,300	1,065	
IC (95%)	Inferior	2496	7631	0,9000	0,09000	1,015
	Superior	34116	35916	1,100	0,4100	1,046
CV (%)	169%	115,2%	31,34%	113,2%	1,848%	

IC: intervalo de confiança da mediana; CV: coeficiente de variação; DU: densidade urinária. Os valores de uNGAL foram corrigidos pela concentração da urinária

Tabela 4. Dados de estatística descritiva das variáveis uNGAL (pg/mg), sNGAL (pg/mL), sCr (mg/dL), UP/C e densidade urinária (Coleta, T96). n=17

(mg/dL); ≥ 170 e densidade urinária (g/dL); $\geq 1,03$; $n = 17$						
	uNGAL	sNGAL	sCr	UP/C	DU	
Mínimo	143,0	3388	0,6000	0,05000	1,009	
Percentil 25%	572,5	8884	0,7000	0,1000	1,022	
Mediana	3766	16180	1,000	0,1900	1,035	
Percentil 75%	30481	33878	1,200	0,4100	1,045	
Máximo	112747	56069	2,200	1,600	1,062	
IC (95%)	Inferior	681,0	10871	0,7000	0,1000	1,024
	Superior	30292	33090	1,200	0,3200	1,045
CV (%)	151,7%	74,54%	42,39%	121,8%	1,452%	

IC: intervalo de confiança da mediana; CV: coeficiente de variação; DU: densidade urinária. Os valores de uNGAL foram corrigidos pela concentração da urinária.

Em relação às possíveis influências dos procedimentos cirúrgicos e tratamento pós-operatório, sobre as concentrações séricas e urinárias de NGAL, a maioria dos pacientes (11 de 17) teve aumento marcante do T0 para T48, que são compatíveis com Lesão tubular aguda. Entretanto, somente 5 apresentaram

aumento de sNGAL, dentre os quais, 4 foram coincidentes com os aumentos do uNGAL. Para considerar relevantes os aumentos das concentrações de NGAL foi estabelecido um mínimo de 2 vezes os valores obtidos na primeira avaliação na coleta T0. Na Tabela 5, estão discriminados os pacientes e as respectivas taxas de aumentos.

Tabela 5. Aumento de NGAL, 48 horas após o término da cirurgia, observados em 10 cães.

Pacientes	uNGAL	sNGAL
	Aumento* (em vezes)	
6	18	-
1	13	-
25	11	2
12	10	2
16	-	2
17	8	-
23	3	-
18	3	3
14	3	-
4	2	-
10	2	2

* em relação aos valores do T0

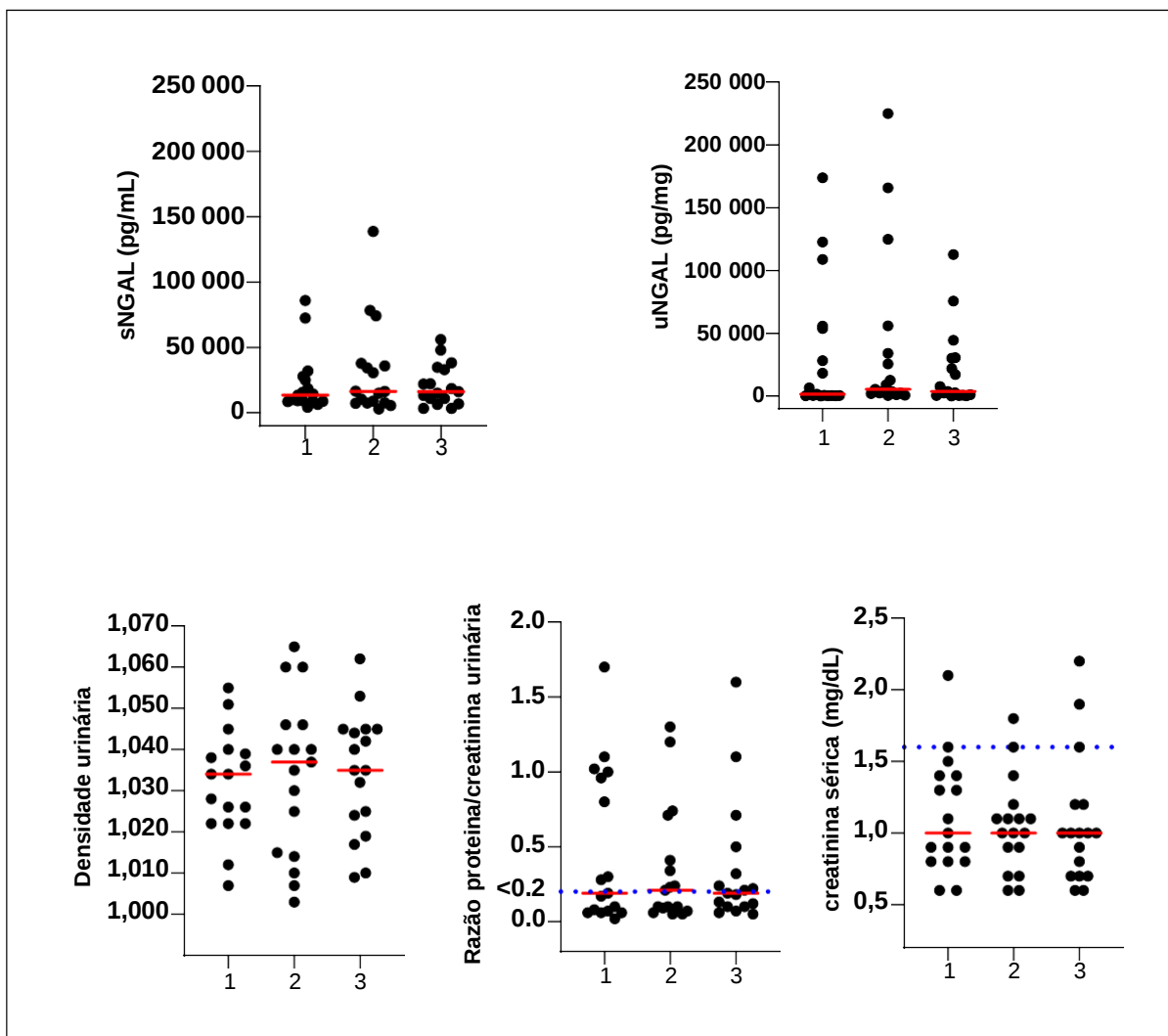


Figura 1. Representações dos valores individuais obtidos em três momentos, para cada uma das cinco variáveis analisadas. Os números 1, 2 e 3 do eixo X representam os três momentos de coletas das amostras, respectivamente, antes dos tratamentos, com dois a três dias de tratamento e mais dois a três após. As linhas vermelhas demarcam os valores das medianas. As linhas pontilhadas em azul indicam o topo dos valores normais das variáveis.

Os resultados das análises de variância dos 13 pacientes que tinham câncer (Tabela 6), indicam que a obtenção de dados em três momentos distintos revelou efeito extremamente significativo ($P < 0,0001$). Também, as características clínicas dos pacientes incluídos no estudo foram suficientemente semelhantes para gerar efeito significativo ($P = 0,0283$). Outrossim, a interação repetição x momentos não foi significativa ($P = 0,7836$), o que indica 78% de chance de conseguir os mesmos efeitos em experimentos aleatórios do mesmo tamanho.

Dentre os pacientes incluídos no estudo (Tabela 1), quatro deles não tinham câncer, mas passaram por procedimento cirúrgico e foram medicados com AINE. Assim, para a ANOVA os quatro pacientes foram isolados (Tabela 7). Constatou-se que somente o fator paciente teve efeito significativo ($P < 0,0001$).

Tabela 6 Análise de variância para mensurações repetidas (*Two-way RM ANOVA* - Alfa 0,05) das concentrações de NGAL sérico (sNGAL) e NGAL urinário (uNGAL), além dos outros três indicadores tradicionais de lesão renal (sCr, DU e UP/C), avaliados em três momentos: T0 (12 a 24h antes da cirurgia); T48 (após término da cirurgia); T96 (após término da cirurgia) dos 13 pacientes com câncer.

Fonte de variação	% de variação total	Valor de P	Significância
Repetições x Momentos	1,703	0,7836	ns
Repetições	0,8144	0,4991	ns
Momentos	25,00	<0,0001	****
Pacientes	20,69	0,0283	*

Tabela ANOVA

	Valor de P
Repetições x Momentos	"F (8, 144) = 0,5916"
Repetições	P=0,7836
Momentos	"F (2, 36) = 0,7085"
Pacientes	P=0,4991
	"F (1,355, 48,78) = 17,37"
	P<0,0001
	"F (36, 144) = 1,598"
	P=0,0283

NGAL: Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; sCr: creatinina sérica; DU: densidade urinária; UP/C: razão proteína/creatinina urinária. Os valores de uNGAL foram corrigidos pela concentração da urinária; AINE: anti-inflamatório não esteroidal.

Tabela 7. Análise de variância para mensurações repetidas (*Two-way RM ANOVA* - Alfa 0,05) das concentrações de NGAL sérico (sNGAL) e NGAL urinário (uNGAL), além dos outros três indicadores tradicionais de lesão renal (sCr, DU e UP/C), avaliados em três momentos: T0 (12 a 24h antes da cirurgia); T48 (após término da cirurgia); T96 (após término da cirurgia) dos quatro pacientes caninos sem câncer.

Fonte de variação	% de variação total	Valor de P	Significância
Repetições x Momentos	1,058	0,7378	ns
Repetições	0,3921	0,3727	ns
Momentos	30,81	0,1669	ns
Pacientes	61,54	<0,0001	****

Tabela ANOVA

	Valor de P
Repetições x Momentos	"F (8, 30) = 0,6402"
Repetições	P=0,7378
Momentos	"F (1,404, 21,05) = 0,9487"
Pacientes	P=0,3727
	"F (4, 15) = 1,877"
	P=0,1669
	"F (15, 30) = 19,85"
	P<0,0001

NGAL: Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; sCr: creatinina sérica; DU: densidade urinária; UP/C: razão proteína/creatinina urinária. Os valores de uNGAL foram corrigidos pela concentração da urinária; AINE: anti-inflamatório não esteroidal.

O teste de Spearman r, aplicado sob forma de matriz de correlação para todas as variáveis contínuas com as respectivas repetições, evidenciou correlação entre uNGAL e UP/C (Tabela 8).

Com o mesmo teste, considerando os tempos de duração das anestésias para os procedimentos cirúrgicos, a administração de AINE, e os valores de sNGAL e uNGAL do T48, para cada paciente, não houve correlação significativa entre as variáveis.

Tabela 8. Resultados de análise de correlação entre as variáveis uNGAL (pg/mg), sCr (mg/dL), UP/C, densidade urinária e tempo de anestesia (mostrados somente resultados estatisticamente significantes). n=17

Spearman (uNGAL vs UP/C)	r	P
Coleta T0; pré-cirurgia	0,877	0,00001
Coleta T48; pós-cirurgia, em tratamento	0,766	0,0005
Coleta T96; pós-cirurgia, em tratamento	0,685	0,0031

uNGAL: Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos urinária; sCr: creatinina sérica; DU: densidade urinária; UP/C: razão proteína/creatinina urinária. Os valores de uNGAL foram corrigidos pela concentração da urinária

8. DISCUSSÃO

Para acompanhar o transcurso e desfecho do pós-operatório imediato (quatro a cinco dias), foram reavaliados biomarcadores tradicionais (sCr, UP/C e DU) e as concentrações séricas e urinárias de NGAL. Os resultados, comparados aos dados basais (obtidos 12 a 24 horas antes da cirurgia) mostraram que os biomarcadores tradicionais não apresentaram variação significativa, tanto estatística quanto clinicamente, como já esperado (KAI et al., 2013, PALM et al., 2016). Contudo, houve alteração ($P < 0,0001$) de uNGAL e sNGAL. A maioria dos pacientes (11 de 17) teve aumento marcante da uNGAL (T48), que são compatíveis com lesão tubular aguda.

Muito embora os pacientes avaliados tenham passado por anestesia inalatória, cirurgia e tratamento pós-operatório semelhantes, a condição médica, particular de cada um, constituiu fator altamente relevante para as variações das concentrações de uNGAL.

Nos casos de câncer, os tecidos podem expressar quantidades altas de NGAL (BAUER et al., 2008, COBRIN et al., 2016). Também foi relatado que a molécula, desempenha papel no desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer (SUN et al., 2011). Dentre os 13 pacientes com câncer, sete tinham uNGAL aumentado, já no primeiro momento (T0).

A doença renal crônica estabelecida também pode gerar aumento NGAL (HSU et al., 2014b, STEINBACH et al., 2014, AHN; HYUN, 2015, KIM et al., 2019,

KO et al., 2021). Dentre os pacientes, cinco apresentavam doença renal pré-existente e uNGAL aumentado já na primeira coleta de amostras.

Os anestésicos inalatórios, incluindo isoflurano e sevoflurano, que foram utilizados nos pacientes do presente estudo, poderiam causar diminuição da perfusão sanguínea renal a depender da dose administrada. Pacientes que recebem anestesia inalatória podem ter risco de desenvolver LRA, a depender dos fatores clínicos, como idade avançada e doenças preexistentes, que são considerados preditores de LRA pós-operatória. (KUKANICH et al, 2012, KIM et al., 2021). Contudo, os tempos de duração das anestесias, não houve correlação com as demais variáveis. Outrossim, os pacientes foram medicados com anti-inflamatório não esteroideal e antibióticos, isoladamente ou combinados. Embora tenham sido usadas doses terapêuticas, existe a possibilidade de haver efeitos colaterais ou adversos. O NSAID administrado inibe principalmente a COX-2, mas também a COX-1. Sabe-se que os cães são particularmente mais sensíveis aos possíveis efeitos adversos, principalmente se houver comorbidades (LOMAS; GRAUER, 2015), como é o caso neste estudo. No entanto, os resultados desse estudo não indicaram ter havido efeitos adversos dos fármacos administrados no pós-operatório.

Os dados de uNGAL são mais específicos do que os de sNGAL, para detectar LRA (MISHRA et al., 2003, LEE et al., 2012). Entretanto, a NGAL não é secretada unicamente pelos túbulos renais, mas também em outros órgãos além dos rins (COBRIN et al., 2016, KIM et al., 2019). A NGAL circulante é filtrada nos glomérulos, reabsorvida nos túbulos proximais e excretadas no lúmen na alça de Henle (KIM et al., 2014). Portanto, a sNGAL compõe o *pull* eliminado na urina. Entretanto, os resultados do presente estudo não mostraram correlação significativa entre os valores de sNGAL e uNGAL.

A estatística descritiva revelou coeficientes de variação (CV) muito altos para as variáveis sNGAL, uNGAL, indicando disparidade entre as condições clínicas dos pacientes. Por outro lado, para os indicadores convencionais, sCr e DU, os resultados de CV baixos, confirmam padrões mais uniformes nos três momentos de avaliação. Contudo, os valores de CV da UP/C foram altos e, não por acaso, juntamente com a uNGAL, foram as únicas variáveis com correlação significativa. A NGAL pode estar relacionada com o grau de proteinúria em pacientes com doenças renais decorrentes de processos infecciosos (PERIS et al., 2020).

Contudo, na literatura consultada, não foram encontradas outras observações sobre correlação entre uNGAL e UP/C.

Estudos realizados com modelos experimentais de lesão renal induzida, mostram que, na LRA, a creatinina se eleva tardiamente em comparação com a NGAL, que chega a se elevar em duas horas após o insulto (LEE et al., 2012, KAI et al., 2013, PALM et al., 2016). No presente estudo de pacientes com doenças naturalmente adquiridas, foram diagnosticados cinco casos de doença renal e 13 de câncer, ambas pré-existent, por meios convencionais. Porém só foram identificadas as lesões tubulares agudas por meio dos resultados de uNGAL.

9. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo confirmaram a hipótese proposta. Foi possível detectar aumentos de uNGAL compatíveis com lesão tubular aguda, apesar da ausência de sinalização dos biomarcadores convencionais.

Os marcadores tradicionais não são eficientes para determinar lesões renais nos pacientes com condições clínicas pré-existent em risco de desenvolver insuficiência renal aguda.

É plausível considerar que vários fatores podem estar simultaneamente relacionados às variações da uNGAL, com destaque para os procedimentos cirúrgicos e as condições clínicas de cada paciente.

10. REFERÊNCIAS

- AHN, H. J.; HYUN, C. Evaluation of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) activity in dogs with chronic kidney disease. **The Veterinary Record**, v. 173, n. 18, p. 452, 2013.
- BAUER, M.; EICKHOFF, J. C.; GOULD, M. N.; MUNDHENKE, C.; MAASS, N.; FRIEDL, A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 108, n. 3, p. 389-397, 2008.
- BENSMAN, A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) systemic use: the risk of renal failure. **Frontiers in Pediatrics**, p. 517, 2020.
- CAO, J.; LU, X.; GAO, F.; ZHANG, X.; XIA, X.; SUN, H. Assessment of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker for canine renal ischemia-reperfusion injury. **Annals of translational medicine**, v. 8, n. 22, 2020.
- CARVALHO, M. B. Insuficiência Renal Aguda. In: MARQUEZ, M.; DE ANDRADE J.; KOGICA, M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2015. p. 4106-4193.
- CHEW, D.; DIBARTOLA, S.; SCHENCK, P. Acute Renal Failure. In: **Canine and Feline Nephrology and Urology**. St. Louis: Elsevier, 2011. p. 63-92.
- COBRIN, A. R.; BLOIS, S. L.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; KRUTH, S. A.; DEWEY, C.; HOLOWAYCHUK, M. K.; GAUTHIER, V. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with chronic kidney disease, carcinoma, lymphoma and endotoxemia. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 6, p. 291-298, 2016.
- COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. **Genomics**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 1997.
- CRILLY, S.; GRAUER, G. Acute Kidney Injury. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G.; WESTROPP, J. **BSAVA Manual of Nephrology and Urology**. Gloucester: BSAVA British Small Animal Veterinary Association, 2017. p. 246-255.
- DEVARAJAN, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 68, n. 241, p. 89-94, 2008.
- DUNAEVICH, A.; CHEN, H.; MUSSERI, D.; KUZU, S.; MAZAKI-TOVI, M.; AROCH, I.; SEGEV, G. Acute on chronic kidney disease in dogs: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and survival. **Journal of Internal Veterinary Medicine**, v. 34, n. 6, p. 2507–2515, 2020.

GINÉ, J. Fallo Renal Agudo. In: CORTADELLAS, O. **Manual de Nefrología e Urología Clínica Canina y Felina**. Zaragoza: SERVET, 2010. p. 175-187.

GU, Y. Z.; VLASAKOVA, K.; DARBES, J.; WANG, E.; FERRARO, J.; GLAAB, W. E.; SISTARE, F. D. Urine kidney safety biomarkers improve understanding of indirect intra-renal injury potential in dogs with a drug-induced prerenal azotemia. **Toxicology**, v. 439, p. 152462, 2020.

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**, V. 10, N. 1, P. 1-8, 2014a.

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**, v. 28, n. 2, p. 437-442, 2014b.

KAI, K.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIMATSU, Y.; KINOSHITA, J.; TERANISHI, M.; TAKASAKI, W. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a sensitive urinary biomarker of acute kidney injury in dogs receiving gentamicin. **The Journal of toxicological sciences**, v. 38, n. 2, p. 269-277, 2013.

KIM, B. H.; YU, N.; KIM, H. R.; YUN, K. W.; LIM, I. S.; KIM, T. H.; LEE, M. K. Evaluation of the optimal neutrophil gelatinase-associated lipocalin value as a screening biomarker for urinary tract infections in children. **Annals of laboratory medicine**, v. 34, n. 5, p. 354, 2014.

KIM, B. R.; YOON, S.; SONG, G. Y.; LEE, S.; BAHK, J. H.; NAM, K. The impact of total intravenous anesthesia versus inhalation anesthesia on acute kidney injury after major abdominal surgery: a propensity score analysis. **Journal of Anesthesia**, n. 35, p. 112-121, 2021.

KIM, Y. M.; POLZIN, D. J.; RENDAHL, A.; GRANICK, J. L. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with stable or progressive kidney disease. **Journal of veterinary internal MEDICINE**, V. 33, N. 2, P. 654-661, 2019.

KO, H. Y.; KIM, J.; GEUM, M.; KIM, H. J. Cystatin C and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as early biomarkers for chronic kidney disease in dogs. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 45, p. 100580, 2021.

KUKANICH, B.; BIDGOOD, T.; KNESL, O. Clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 39, n. 1, p. 69-90, 2012.

LEE, Y. J.; HU, Y. Y.; LIN, Y. S.; CHANG, C. T.; LIN, F. Y.; WONG, M. L.; KUO-HSUAN, H.; HSU, W. L. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2012.

LOMAS, A. L.; GRAUER, G. F. The renal effects of NSAIDs in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 51, n. 3, p. 197-203, 2015.

MISHRA, J.; MA, Q.; PRADA, A.; MITSNEFES, M.; ZAHEDI, K.; YANG, J.; BARASCH, 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**, v. 14, n. 10, p. 2534-2543, 2003.

MORI, K.; LEE, H. T.; RAPOPORT, D.; DREXLER, I. R.; FOSTER, K.; YANG, J.; SCHMIDT-OTT, K. M.; CHEN, X.; LI, J. Y.; WEISS, S.; MISHRA, J.; CHEEMA, F. H.; MARKOWITZ, G.; SUGANAMI, T.; SAWAI, K.; MUKOYAMA, M.; KUNI, C.; D'AGATI, V.; DEVARAJAN, P.; BARASCH, J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 3, p. 610-621, 2005.

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

PELLIGAND, L.; ELLIOTT, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug treatment on the kidney. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G.; WESTROPP, J. **BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology**. BSAVA Library, 2017. p. 232-245.

PELLIGAND, L.; SUEMANOTHAM, N.; SEEWALD, W.; SYME, H.; SMITH, K.; LEES, P. E.; ELLIOTT, J. Effect of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition on furosemide-induced renal responses and isoform immunolocalization in the healthy cat kidney. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2015.

PERIS, M. P.; MORALES, M.; ARES-GÓMEZ, S.; ESTEBAN-GIL, A.; GÓMEZ-OCHOA, P.; GASCÓN, M.; MORENO, B.; CASTILLO, J. A. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Is Related with the Proteinuria Degree and the Microscopic Kidney Findings in Leishmania-Infected Dogs. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1966, 2020.

ROSS, L. Acute kidney injury in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 41, n. 1, p. 1-14, 2011.

SEGEV, G.; PALM, C.; LEROY, B.; COWGILL, L. D.; WESTROPP, J. L. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of kidney injury in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 6, p. 1362-1367, 2013.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.

SINHA, V.; VENCE, L. M.; SALAHUDEEN, A. K. Urinary tubular protein-based biomarkers in the rodent model of cisplatin nephrotoxicity: a comparative analysis of serum creatinine, renal histology, and urinary KIM-1, NGAL, and NAG in the initiation, maintenance, and recovery phases of acute kidney injury. **Journal of investigative medicine**, v. 61, n. 3, p. 564-568, 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**, v. 28, n. 2, p. 264-269, 2014.

SUN, Y; YOKOI, K; LI, H; GAO, J; HU, L; LIU, B; CHEN, K; HAMILTON, SR; FAN, D; SUN, B; ZHANG, W. NGAL Expression Is Elevated in Both Colorectal Adenoma–Carcinoma Sequence and Cancer Progression and Enhances Tumorigenesis in Xenograft Mouse Models. **American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4331-4340, 2011.

VADEN, SL; KNOLL, JS; SMITH JR, FWK; TILLEY, LP. **Blackwell's Five-MinuteVeterinary Consult: Laboratory Tests and Diagnostic Procedures: Canine & Feline**. Willey-Blackwell, 2009. p. 200-201.

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 beagle dogs. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 280, n. 1, p. 30-35, 2014.