UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS BIOMARCADORES DE PARADA DO CICLO CELULAR [TIMP-2] E [IGFBP7] COM MARCADORES TRADICIONAIS DE LESÃO RENAL AGUDA EM CADELAS SÉPTICAS

Larissa Ayane do Nascimento Braz

Médica Veterinária

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS BIOMARCADORES DE PARADA DO CICLO CELULAR [TIMP-2] E [IGFBP7] COM MARCADORES TRADICIONAIS DE LESÃO RENAL AGUDA EM CADELAS SÉPTICAS

Larissa Ayane do Nascimento Braz

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi
Coorientadores: Prof. Dr. Leandro Zuccolotto Crivellenti

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias, área de Saúde Animal.

2025

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 04/04/2027.

B827a

Braz, Larissa Ayane do Nascimento
Avaliação comparativa dos biomarcadores de parada do ciclo celular [TIMP-2] e [IGFBP7] com marcadores tradicionais de lesão renal aguda em cadelas sépticas / Larissa Ayane do Nascimento Braz. -- Jaboticabal, 2025
103 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Andrigo Barboza de Nardi
Coorientador: Leandro Zuccolotto Crivellenti

1. Biomarcador renal. 2. Histopatologia veterinária. 3. Lesão renal aguda. 4. Medicina veterinária. 5. Nefrologia veterinária. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS BIOMARCADORES DE PARADA DO CICLO CELULAR [TIMP-2] E [IGFBP7] COM MARCADORES TRADICIONAIS DE LESÃO RENAL AGUDA EM CADELAS SÉPTICAS

AUTORA: LARISSA AYANE DO NASCIMENTO BRAZ
ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
COORIENTADOR: LEANDRO ZUCCOLOTTO CRIVELLENTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Data: 21/04/2025 10:36:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participaçao Presencial)
Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinaria / FCAV UNESP Jaboticabal

gov.br Documento assinado digitalmente
ALESSANDRA APARECIDA MEDEIROS RONCHI
Data: 16/04/2025 16:45:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. ALESSANDRA APARECIDA MEDEIROS-RONCHI (Participaçao Virtual)
Departamento de Patolgia Animal / Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - Uberlândia/MG

gov.br Documento assinado digitalmente
JAISLANE BASTOS BRAZ
Data: 16/04/2025 20:46:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. JAISLANE BASTOS BRAZ (Participaçao Virtual)
Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

gov.br Documento assinado digitalmente
VALESKA RODRIGUES
Data: 05/04/2025 19:29:06-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. VALESKA RODRIGUES (Participaçao Virtual)
Universidade de Franca (UNIFRAN) / Franca/SP

Documento assinado digitalmente
MARICY APPARICIO FERREIRA
Data: 17/04/2025 11:25:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ/UNESP-Campus de Botucatu

Jaboticabal, 04 de abril de 2025

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LARISSA AYANE DO NASCIMENTO BRAZ - nascida em 31 de janeiro de 1993, na cidade de Jaboticabal – SP, filha de Edna Cecilia do Nascimento Braz e Silvelei Braz. Concluiu o ensino médio no ano de 2010 e iniciou, em 2011, sua graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Jaboticabal, concluindo em fevereiro de 2017. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com foco na área de nutrição clínica de pequenos animais, sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi; foi bolsista do Programa de Educação Tutorial – PET - pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob tutoria do Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe; e foi bolsista do Programa de Intercâmbio BRAFAGRI/CAPES, junto à École Nationale Vétérinaire d'Alfort, sob orientação conjunta dos Professores Doutores Aureo Evangelista Santana, Andrew Ponter e Fabrício Singaretti de Oliveira. Em fevereiro de 2017, ingressou no Programa de Aprimoramento - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária *stricto sensu*, Área de concentração em Clínica Médica de Pequenos Animais, na Universidade de Franca (UNIFRAN), sob orientação do Prof. Dr. Leandro Zuccolotto Crivellenti, concluindo-o em janeiro de 2019. Em março de 2019, ingressou no mestrado, Programa de Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica, concluindo-o em fevereiro de 2021, com o foco nos biomarcadores dimetilarginina simétrica sérica e gama glutamil transpeptidase urinária e lesão renal aguda, na Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana e fomentado pela CAPES. Em março de 2021, ingressou no curso de doutorado, na mesma instituição e sob a orientação dos Professores Doutores Aureo Evangelista Santana e Andrigo Barboza de Nardi, Programa de Ciências Veterinárias, com foco na avaliação da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 e inibidor tecidual de metaloproteinases 2 durante a lesão renal aguda e sepse e avaliação histopatológica, também fomentado pela CAPES.

Pois, tomai-me para guarda dos bichos.
Gosto deles.
Basta-me ver um desses cães vadios,
como aquele de junto à padaria,
um verdadeiro vira-lata!
e, no entanto,
por ele,
arrancaria meu próprio fígado: Toma, querido,
sem cerimônia, come!

A Esperança - Vladimir Maiakóvski

DEDICO

Ao Professor Áureo Evangelista Santana (*In Memoriam*), meu orientador, mentor e amigo, que por 14 anos me estendeu a mão e guiou meu caminho com empatia, sabedoria e um amor incondicional pela ciência até o último segundo.

Carregarei sua crença no meu potencial em cada passo que darei. Serei grata por toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Um dos maiores desafios de escrever esta tese é utilizar tão poucas palavras para agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que ela nascesse, afinal, foram quase 3 décadas de estudo e muitos desafios. Por isso, agradeço:

Aos meus avós, Edna Ennes do Nascimento e José Affonso do Nascimento (*in memoriam*) que me criaram com todo incentivo e amor que uma garota sonhadora pudesse ter. Meu presente do universo.

Aos meus pais, Edna Cecilia do Nascimento Braz e Silvelei Braz, que me apoiaram, incentivaram, estiveram ao meu lado em todas as fases, dificuldades, sejam elas acadêmicas ou não, nas alegrias e nas construções de memórias. Sem vocês, não chegaria aonde estou.

Ao meu querido orientador, o Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana (*in memoriam*), por sua incansável dedicação e vontade de ajudar, não apenas os seus orientandos, mas também todos aqueles que fazem parte dos programas que lidera. Os seus ensinamentos transcenderam a área acadêmica: com seus conselhos, com as conversas, e exemplo de amor e humildade. Agradeço por ter me concedido a experiência maravilhosa de representar a UNESP Jaboticabal na École Nationale Vétérinaire d'Alfort - ENVA (França), ao mesmo tempo que me forneceu todo apoio no meu pior momento, quando estive doente no final do mestrado e no início do doutorado. Sempre fiel à pesquisa, aos ensinamentos e à Medicina Veterinária até o último segundo, dedico-lhe também, como fã da poetisa Hilda Hilst (1930-2004), esta citação:

> "Um deles está estudando o hipotálamo há mais de trinta anos e ainda não chegou a qualquer conclusão (...) seria melhor dizer para ele não se preocupar mais com o hipotálamo, mas isso seria o mesmo que sentenciá-lo à morte (...) é difícil acabar com uma coisa pela qual se vive."
>
> (Hilda Hilst)

Ao Prof. Dr. Leandro Zuccolotto Crivellenti, meu coorientador deste projeto e eterno orientador. Seu papel foi fundamental para cultivar em mim uma paixão pela nefrologia e pela pesquisa. Agradeço sinceramente por todos os valiosos ensinamentos durante minha residência, pelos sábios conselhos, pela amizade e pela extraordinária concepção deste projeto.

Ao Prof. Dr. Andrigo Barboza di Nardi, meu professor desde a graduação, gostaria de expressar minha mais sincera gratidão, que gentilmente aceitou assumir a orientação formal desta tese em um momento crucial. Seu gesto de generosidade e compromisso com a continuidade deste trabalho acadêmico foi fundamental para sua conclusão.

A todos os meus familiares que me ensinaram o conceito de família, amor e companheirismo: um por todos e todos por um!

Aos meus educadores, desde a educação infantil até a pós-graduação. Vocês constroem a nação e são o pilar da humanidade. Seguirei este caminho!

A todos os funcionários, discentes e docentes das instituições de ensino, especialmente a Universidade de Franca (UNIFRAN) e a Universidade Estadual Paulista (UNESP Jaboticabal).

Aos membros das bancas de pré-qualificação, qualificação e defesa pela contribuição, sugestões e conselhos.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos, que incluem iniciação científica, programa de educação tutorial, intercâmbio, auxílio de projeto temático e bolsas de pesquisas ao longo de minha carreira acadêmica.

A todas as mulheres que trabalharam nos bastidores para que eu chegasse aonde estou. O trabalho de vocês, por vezes, invisível, movimenta o mundo.

A todos aqueles que lutam contra doenças crônicas, a vida não é fácil com a gente, mas a nossa vitória é viver um dia de cada vez, da melhor maneira que conseguimos. Só nós sabemos a nossa dor.

E, por último, expresso minha sincera gratidão aos animais. Ao longo de todos esses anos dedicados, meu comprometimento tem sido exclusivamente por eles e para eles. Esta tese é uma modesta tentativa de retribuir um ínfimo fragmento do amor incondicional que eles têm me proporcionado ao longo de toda a minha vida.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.610798/2021-00”.

.

SUMÁRIO

Páginas

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS i
RESUMO ii
ABSTRACT iii
LISTA DE TABELAS iv
LISTA DE FIGURAS vi
LISTA DE ABREVIATURAS ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS 1
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1 Sepse 5
2.2 Lesão Renal Aguda 7
2.3 Sepse associada à LRA (SE-LRA) 10
2.4 Piometra 11
2.5 Biomarcadores 12
2.5.1 Creatinina sérica [Cr(s)] 13
2.5.2 Dimetilarginina simétrica sérica [SDMA(s)] 14
2.5.3 Gama glutamil transferase urinária [GGT(u)] 15
2.5.4 Proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina [IGFBP7(u)] e Inibidor tecidual metaloproteinase-2 [TIMP-(2)] 17
2.5.5 Urinálise 18
2.6 Biópsia renal 18
2.6.1 Histopatologia renal na LRA-SE 20
3 CONCLUSÃO 22
4 REFERÊNCIAS 24
CAPÍTULO 2 – Perspectives of the use of cell cycle arrest biomarkers [TIMP-2] and [IGFBP7] compared to classic biomarkers of acute kidney injury in septic dogs 35
RESUMO 35
ABSTRACT 36
INTRODUÇÃO 37
MATERIAIS E MÉTODOS 39
Comitê de Ética 39

Pacientes 40
Análise laboratorial 40
Biomarcadores renais 42
Procedimentos Cirúrgicos, Anestésicos e Pós-Cirúrgicos 42
Avaliação histopatológica 43
Interpretação das lâminas 44
Grupo experimental proposto 45
Análise estatística 46
RESULTADOS 46
Grupos experimentais e Avaliação histopatológica 46
Parâmetros clínicos 50
Hemograma 51
Análise bioquímica 52
Urinálise e Hemogasometria 54
Análise dos componentes principais dos grupos por somatória 55
Biomarcadores Renais 57
Análise multivariada dos grupos por graus de degeneração tubular 64
DISCUSSÃO 66
REFERÊNCIAS 75

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Dosagem de biomarcadores de parada de ciclo celular [TIMP-2].[IGFBP7] em conjunto com biomarcadores clássicos de lesão renal aguda em cadelas sépticas"**, protocolo nº 1855/21, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, 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 19 de agosto de 2021.

Vigência do Projeto	20/08/2021 a 01/03/2023
Espécie / Linhagem	*Canis lupus*
Nº de animais	Até 40 cadelas com piometra
Peso / Idade	Peso variável; Adultos e idosos.
Sexo	Fêmea
Origem	Animais da rotina clínica do Setor de Obstetrícia Veterinária

Jaboticabal, 19 de agosto de 2021.

Fabiana Pilarski

Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcavunesp.br

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS BIOMARCADORES DE PARADA DO CICLO CELULAR [TIMP-2] E [IGFBP7] COM MARCADORES TRADICIONAIS DE LESÃO RENAL AGUDA EM CADELAS SÉPTICAS

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação grave da sepse e está associada a altos índices de morbidade e mortalidade. Diversos biomarcadores não invasivos, séricos ou urinários, têm sido investigados no diagnóstico precoce da LRA. Recentemente, biomarcadores de parada de ciclo celular, como o inibidor tecidual da metaloproteinase-2 [TIMP-2(u)] e a Proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina [IGFBP7(u)], surgiram como potenciais indicadores de LRA em pacientes humanos criticamente enfermos. Esses biomarcadores são excretados na urina em resposta ao estresse celular e têm mostrado sensibilidade na detecção precoce de lesões renais. Até o momento nada foi publicado sobre a utilização de tais marcadores em cães. Uma condição potencial de sepse na medicina veterinária é a piometra, sendo os animais acometidos considerados bons modelos experimentais. Neste estudo prospectivo e cego, avaliou-se a eficácia dos biomarcadores urinários TIMP-2(u) e IGFBP7(u) na detecção de LRA em 27 cadelas com piometra consideradas sépticas segundo os critérios da SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica). Utilizou-se o grau histopatológico de lesão renal como padrão-ouro para a formação dos grupos discreto, moderado e severo e comparou-se esses biomarcadores aos tradicionais: creatinina sérica [Cr(s)], dimetilarginina simétrica sérica [SDMA(s)], gama glutamil transferase urinária [GGT(u)], e a razão proteína/creatinina urinária (UPC), por meio da Análise de Componentes Principais (PCA). A creatinina sérica não excedeu 1,6 mg/dL, e todas as cadelas foram consideradas não azotêmicas. A lesão tubular foi a mais prevalente, observada em 85% das pacientes, destacando a necessidade de acompanhamento renal em pacientes sépticos. Não houve diferença significativa nos biomarcadores convencionais: Cr(s) (p=0,3672), GGT(u) (p=0,2820), SDMA(s) (p=0,1819) e UPC (p=0,1119). No entanto, os biomarcadores urinários isolados ou em relação à creatinina urinária [Cr(u)], SDMA(u) (p=0,0006), SDMA(u)/Cr(u) (p=0,0198), IGFBP7(u) (p=0,0001), IGFBP7(u)/Cr(u) (p=0,0189), TIMP-2(u) (p=0,0006), TIMP-2(u)/Cr(u) (p=0,0153), e [IGFBP7].[TIMP2] (p=0,0001) foram capazes de diferenciar os grupos de gravidade histopatológica renal. Esses resultados sugerem a potencial precocidade desses biomarcadores urinários na prática clínica veterinária e apontam para a possibilidade de serem adicionados aos critérios de diagnóstico e estadiamento da LRA.

Palavras-chave: biomarcadores urinários, biopsia renal, cães, nefrologia veterinária, sepse.

COMPARATIVE EVALUATION OF CELL CYCLE ARREST BIOMARKERS [TIMP-2] AND [IGFBP7] WITH TRADITIONAL MARKERS OF ACUTE KIDNEY INJURY IN SEPTIC FEMALE DOGS

ABSTRACT

Acute Kidney Injury (AKI) is a serious complication of sepsis and is associated with high rates of morbidity and mortality. Several non-invasive biomarkers, both serum and urinary, have been investigated for early AKI diagnosis. Recently, cell cycle arrest biomarkers such as tissue inhibitor of metalloproteinase-2 [TIMP-2(u)] and Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7 [IGFBP7(u)] have emerged as potential indicators of AKI in critically ill human patients. These biomarkers are released in urine in response to cellular stress and have shown sensitivity in early detection of renal injuries. To date, no studies have been published on the use of such markers in dogs. A potential condition of sepsis in veterinary medicine is pyometra, with affected animals considered good experimental models. In this prospective, blinded study, we evaluated the effectiveness of urinary biomarkers TIMP-2(u) and IGFBP7(u) in detecting AKI in 27 dogs with pyometra classified as septic according to SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) criteria. We used histopathological grading of renal injury as the gold standard to categorize groups into mild, moderate, and severe, and compared these traditional biomarkers: serum creatinine [Cr(s)], serum symmetric dimethylarginine [SDMA(s)], urinary gamma-glutamyl transferase [GGT(u)], and urinary protein/creatinine ratio (UPC), using Principal Component Analysis (PCA). Serum creatinine did not exceed 1.6 mg/dL, and all patients were considered non-azotemic. Tubular injury was the most prevalent, observed in 85% of patients, emphasizing the need for renal monitoring in septic patients. There were no significant differences in conventional biomarkers: Cr(s) (p=0.3672), GGT(u) (p=0.2820), SDMA(s) (p=0.1819), and UPC (p=0.1119). However, isolated urinary biomarkers or in relation to urinary creatinine [Cr(u)], SDMA(u) (p=0.0006), SDMA(u)/Cr(u) (p=0.0198), IGFBP7(u) (p=0.0001), IGFBP7(u)/Cr(u) (p=0.0189), TIMP-2(u) (p=0.0006), TIMP-2(u)/Cr(u) (p=0.0153), and [IGFBP7].[TIMP2] (p=0.0001) were able to differentiate between groups of renal histopathological severity. These findings suggest the potential early utility of these urinary biomarkers in veterinary clinical practice and indicate the possibility of their addition to diagnostic and staging criteria for AKI.

Keywords: dogs, renal biopsy, sepsis, urinary biomarkers, veterinary nephrology.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Páginas

Tabela 1. Critérios para diagnóstico clínico de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica em cães (Montealegre; Lyons, 2021).....6

Tabela 2. Pontuação de avaliação sequencial de falência de órgãos (SOFA) em humanos (Montealegre; Lyons, 2021). 7

Tabela 3. Estadiamento da lesão renal aguda para cães. Adaptada da International Renal Interest Society, 2016. 9

CAPÍTULO II

Páginas

Tabela 1. Achados histopatológicos em rins de cadelas com piometra pontuados de acordo com o grau de severidade de cada lesão, de acordo com a “International Veterinary Renal Pathology Service” (“IVRPS”). 48

Tabela 2. Mediana ± faixa interquartil das variáveis estudadas e decorrentes da anamnese e o exame físico em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia em grupo Discreto (igual ou inferior a 2), grupo Moderado (iguais a 3 ou 4) e grupo Severo (igual ou maior que 5). 51

Tabela 3. Mediana ± faixa interquartil dos valores de hemograma em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia em grupo Discreto (igual ou inferior a 2), grupo Moderado (iguais a 3 ou 4) e grupo Severo (igual ou maior que 5).....52

Tabela 4. Mediana ± faixa interquartil das variáveis bioquímicas em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões histopatológicas nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). 53

Tabela 5. Mediana ± faixa interquartil da urinálise (sedimentoscopia) em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). 54

Tabela 6. Mediana ± faixa interquartil de hemogasometria em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia

nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). 55

Tabela 7. Mediana ± faixa interquartil dos biomarcadores em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia em grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). 57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Páginas

Figura 1. Fotomicrografias de rim de cadelas com piometra. **A:** Túbulo dilatado contendo substância hialina (asterisco). HE. Barra: 50 µm. **B:** Túbulos com grande quantidade de cilindros hialinos (asteriscos), infiltrado inflamatório intersticial (círculo) e fibrose intersticial (seta preta). HE. Barra: 50 µm. **C:** Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico grau 3 (círculo). HE. Barra: 20 µm. **D:** Glomerulonefrite membranoproliferativa grau 1. Observar espessamento da membrana basal (cabeça de seta preta). Jones. Barra: 50 µm. **E:** Glomerulonefrite membranoproliferativa grau 2. Observar aumento do mesângio glomerular e espessamento da membrana basal (cabeça de seta preta). Evidencia-se também infiltrado inflamatório periglomerular (seta preta). HE. Barra: 50 µm. **F:** Lesão tubular aguda grau 3. TM. Barra: 20 µm. Microscópio: Olympus BX60. 49

Figura 2. Mediana ± faixa interquartil da concentração de ureia (mg/dL) em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0358).....53

Figura 3. Biplot da Análise de componentes principais (PCA) das variáveis explicativas da separação em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia em grupo Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Variáveis com maior contribuição apresentam-se coloridas em azul. Círculos maiores no centro das elipses representam a média dos animais em cada grupo. INFinf= Infiltrado inflamatório intersticial. GNMP = Glomerunefrite membranoproliferativaI. INJTub= injúria tubular. TIMP-2 = inibidor tecidual de metaloproteinases 2 urinária ou TIMP-2(u). IGFBP7.u= proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina urinária ou IGFBP7(u). TIMP2.u= inibidor tecidual de metaloproteinases 2. IGFBP7.TIMP-2 = índice de IGFBP7 associado a TIMP-2 ou [IGFBP7].[TIMP-S]. GGT.u = gamaglutamiltransferase urinária ou GGT(u). SDMA.u = dimetilarginina simétrica urinária ou SDMA(u). Cl= Cloreto ou Cl^-. CHCO3=bicarbonato ou $cHCO_3$. UR: ureia. tCO_2= concentração total de gás carbônico. PT= Proteína total. K: potássio UI.L: Unidades Internacionais por Litro. Ca_iônico: cálcio iônico ou Ca^{+2}. CK= creatinokinase. EB: excesso de base.....56

Figura 4. Mediana ± faixa interquartil da densidade urinária em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4)

e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0022).....58

Figura 5. Mediana ± faixa interquartil da concentração de SDMA(u) µg/mL em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0006).....59

Figura 6. Mediana ± faixa interquartil do biomarcador SDMA(u)/CR(u) em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões histopatológicas nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0198).....59

Figura 7. Mediana ± faixa interquartil da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 - IGFBP7(s) ug/mL em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões histopatológicas nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0204).....60

Figura 8. Mediana ± faixa interquartil da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 - IGFBP7(u) µg/mL em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0001).....60

Figura 9. Mediana ± faixa interquartil do biomarcador proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 [IGFBP7(u)] em relação à creatinina urinária Cr(u) - IGFBP7(u)/Cr(u) - em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0189). 61

Figura 10. Mediana ± faixa interquartil da concentração do inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (TIMP-2) (s) µg/mL em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Tendencia reportada pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0940).....62

Figura 11. Mediana ± faixa interquartil da concentração do inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (TIMP-2) (u) µg/mL em cadelas diagnosticadas com piometra

agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), grupo Moderado (iguais a 3 ou 4) e grupo Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0006). 62

Figura 12. Mediana ± faixa interquartil do biomarcador inibidor tecidual de metaloproteinases 2 urinário [TIMP-2(u)] e a creatinina urinária [Cr(u)] em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia dos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0153). 63

Figura 13. Mediana ± faixa interquartil do biomarcador proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 (IGFBP7) * inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (TIMP-2) em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela somatória da pontuação das lesões de histopatologia nos grupos Discreto (igual ou inferior a 2), Moderado (iguais a 3 ou 4) e Severo (igual ou maior que 5). Diferença significativa pelo teste de Kruskal Wallis e post teste de Dunns (P = 0,0001). 63

Figura 14. Biplot da Análise de componentes principais (PCA) das variáveis explicativas da separação em cadelas diagnosticadas com piometra agrupadas pela pontuação da lesão de histopatologia degeneração tubular em grupo Controle (C), Discreto (D), Moderado (M) e Severo (S). Variáveis com maior contribuição apresentam-se coloridas em azul. Círculos maiores no centro das elipses representam a média dos animais em cada grupo. INFinf= Infiltrado inflamatório intersticial. GNMP = Glomerunefrite membranoproliferativaI. INJTub= injúria tubular. TIMP-2 = inibidor tecidual de metaloproteinases 2 urinária ou TIMP-2(u). IGFB P7.u= proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina urinária ou IGFBP7(u). TIMP2.u= inibidor tecidual de metaloproteinases 2. IGFBP7.TIMP-2 = índice de IGFBP7 associado a TIMP-2 ou [IGFBP7].[TIMP-S]. GGT.u = gamaglutamiltransferase urinária ou GGT(u). SDMA.u = dimetilarginina simétrica urinária ou SDMA(u). Cr.s: creatinina sérica ou Cr(s). Cl= Cloreto ou Cl^-. CHCO3=bicarbonato ou $cHCO_3$. UR: ureia. tCO_2= concentração total de gás carbônico. PT= Proteína total. K: potássio UI.L: Unidades Internacionais por Litro. Ca: cálcio iônico ou Ca^{+2}. CK= creatinokinase. EB: excesso de base. BW= peso corporal. tCa= cálcio total. DU= densidade urinária. SHL= Somatória das lesões histopatológicas. TR_Cel: células de transição. ALP= fosfatase alcalina ou FA. 65

LISTA DE ABREVIATURAS

µmol/L	Micromoles por litro
Ca+2	Cálcio iônico
cHCO3	Concentração de bicarbonato
CK	Creatinakinase
Cl-	Cloreto
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
Cr(s)	Creatinina sérica
Cr(u)	Creatinina urinária
Cr	Creatinina
cysC	Cistatina C
Da	Dalton
DRC	Doença renal crônica
EB	Excesso de base
Esc	Esclerose glomerular
ExPEC	*Escherichia coli* patogênica extraintestinal
FIAT	Fibrose e atrofia
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
GGT(u)/Cr(u)	Relação gama-glutamil transferase urinária/creatinina urinária
GGT(u)	Gama-glutamil transferase urinária
GGT	Gama-glutamil transferase
GNM	Glomerulonefrite membranosa
GNMP	Glomerulonefrite proliferativa
HE	Hematoxilina e eosina
IGFBP7(s)	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 sérica
IGFBP7(u)	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 urinária

IGFBP7	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
INFInf	Infiltrado inflamatório intersticial
InfPGl	Infiltrado periglomerular
INJTub	Injúria tubular
IQR	Faixa interquartil
IR	Intervalo de referência
IRA	Injúria renal aguda
IRIS	International Renal Interest Society
IVRPS	International Veterinary Renal Pathology Service
kDa	Kilodalton
KIM-1	Molécula de lesão renal-1
LRA	Lesão renal aguda
mg/dL	Miligramas por decilitro
Na	Sódio
Na+K+ATPase	Bomba de sódio e potássio ATPase
NAG	N-Acetil-β-glucosaminidase
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos
NTA	Necrose tubular aguda
P	Fósforo
PCA	Análise de componentes principais
PCO_2	Pressão parcial de dióxido de carbono
PO_2	Pressão parcial de oxigênio
PT	Proteína total
SE-LRA	Sepse associada à LRA
SIRS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica
SHL	Somatória das lesões de histopatologia
SO_2	Saturação de oxigênio

SOFA	Avaliação sequencial de falência de órgãos
tCa	Cálcio total
TFG	Taxa de filtração glomerular
TIMP-2(s)	Inibidor tecidual de metaloproteinase 2 sérico
TIMP-2(u)	Inibidor tecidual de metaloproteinase 2 urinário
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloproteinase 2
TRI	Tricrômico de Masson
UPC	Razão proteína/creatinina urinária
VCM	Volume corpuscular médio

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A sepse é caracterizada como uma síndrome grave e multifatorial decorrente de uma intensa e descontrolada resposta inflamatória do organismo, frente a uma infecção e que pode levar à hipotensão e à diminuição de oxigenação dos tecidos, culminando na falência múltipla de órgãos (Harjen *et al*., 2021; Molema *et al*., 2022). Dentre os órgãos acometidos, os rins são um dos principais afetados, o que resulta frequentemente em Lesão Renal Aguda (LRA) em humanos e animais (Flannery *et al*., 2021; Kuwabara *et al*., 2022; Zarbock *et al*., 2023). A LRA é definida como uma síndrome resultante de um insulto aos rins, que leva à diminuição abrupta da taxa de filtração glomerular (também pode ser marcada por apenas lesão renal sem perda da função em seus estádios iniciais), juntamente com distúrbios hidroeletrolíticos, acúmulo de metabólitos tóxicos, deterioração da função endócrina renal e desequilíbrio ácido-base (International Renal Interest Society, 2016; Ciuca *et al*., 2022).

Embora o desenvolvimento da LRA como uma das principais complicações da sepse seja bem conhecido, a fisiopatologia da interrelação entre as duas síndromes não está completamente elucidada (Chang *et al*., 2022), mesmo que estudos prévios tenham implicado a disfunção microcirculatória, a reprogramação metabólica celular e as respostas inflamatórias desreguladas como possíveis causas (Doganyigit *et al*., 2022; Molema *et al*., 2022; Zarbock *et al*., 2023).

Tanto a sepse quanto a LRA apresentam elevadas morbidade e mortalidade, impactando milhões de pacientes humanos e veterinários anualmente (Kuwabara *et al*., 2022; Montealegre; Lyons, 2021). No entanto, quando ocorrem simultaneamente - na forma de sepse associada à LRA (SE-LRA) - prenuncia-se um prognóstico pior do que o observado em cada uma dessas síndromes isoladamente (Kellum *et al*., 2021; Kuwabara *et al*., 2022). Isto resulta no significativo aumento da taxa de mortalidade, dos custos hospitalares e aumento de complicações, tais como doenças cardiovasculares, doença renal crônica e falência renal (Xie *et al*., 2019; John, 2020; Flannery *et al*., 2021).

Dada a escassez de estudos sobre a fisiopatologia associada a essa condição, a SE-LRA emerge como um grave problema de saúde pública, demandando uma investigação mais aprofundada e, por conseguinte, a necessidade crescente de um modelo experimental (Nandi *et al*., 2020). Cães acometidos por piometra são considerados um excelente modelo para SE-LRA, uma vez que as bactérias encontram no ambiente uterino um local propício para seu crescimento, a fisiopatologia é semelhante entre as espécies humana e canina e apresenta elevada casuística (Gasser *et al*., 2020; Hagman, 2018; 2023; McCobb *et al*., 2023).

O diagnóstico precoce da LRA é fundamental para reduzir a evolução do envolvimento renal e a mortalidade com a implementação de intervenções terapêuticas (Yerramilli *et al*., 2016; Chang *et al*., 2022; Ragán, *et al*. 2022). Embora o diagnóstico e estadiamento da LRA sejam, atualmente, baseados no histórico, achados clinicopatológicos e exames de imagem, os biomarcadores renais são os mais utilizados para este fim. Há quase duas décadas, o diagnóstico da lesão renal aguda (LRA) baseia-se principalmente na redução do débito urinário e na elevação da creatinina sérica [Cr(s)]. Esta elevação pode ocorrer tanto por valores absolutos acima da faixa de referência quanto por um aumento progressivo superior a 0,3 mg/dL em 48 horas (International Renal Interest Society, 2016; Chang *et al*., 2022).

No entanto, a dosagem da creatinina como biomarcador da LRA pode ser afetada pela idade, sexo, raça, dieta, pontuação de massa muscular e estado hídrico. É importante ressaltar que o aumento só é significativo quando ocorre perda de pelo menos 50-75% da função renal (Chang *et al*., 2022; Hokamp; Nabity, 2016; International Renal Interest Society, 2016). Além de não ser considerada um biomarcador precoce, resultando em falha no diagnóstico em um momento no qual as intervenções terapêuticas são susceptíveis de trazer benefícios (Martin-Cleary *et al*., 2023; Wen; Parikh, 2021). A avaliação de um aumento sérico de 48 horas da Cr(s), como padronizado para diagnóstico (International Renal Interest Society, 2016), pode ser fatal para um paciente séptico cuja apresentação clínica pode variar muito rapidamente (Huang *et al*., 2021).

Além da Cr(s), a dimetilarginina simétrica sérica SDMA(s) é utilizada na prática clínica como um biomarcador mais precoce de doença renal crônica em relação à creatinina, pois aumenta a partir da perda de 25% da função renal e recentemente

está sendo investigada como marcador funcional endógeno precoce de LRA em cães e gatos, com resultados promissores (Loane *et al*., 2022; Starybrat *et al*., 2022).

Até o momento, outros biomarcadores estão sendo pesquisados mundialmente como a N-Acetil-β-glucosaminidase (NAG), molécula de lesão renal-1 (KIM-1), interleucinas 6 e 18 (IL-6, IL-18), lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e cistatina C (cysC) (Lesnik *et al*., 2022; Nabity; Hokamp; 2023). Contudo, a aplicabilidade clínica desses novos biomarcadores renais permanece limitada, uma vez que diversos estudos revelaram que nem sempre estão disponíveis para serem utilizados na prática médico veterinária (Nabity; Hokamp, 2023), ou a sua dosagem não refletia a condição real do rim em lesão renal aguda confirmada por biópsia como padrão-ouro (Crivellenti *et al*., 2014). A biópsia renal é necessária para estabelecer um diagnóstico definitivo e determinar a gravidade da lesão e pode ser necessária em casos de LRA (Vaden, 2005; Schnuelle, 2023). No entanto, a análise histopatológica da LRA relacionada à sepse em pacientes críticos é um tema pouco estudado (Kosaka *et al*., 2016).

Recentemente, os biomarcadores urinários associados à parada do ciclo celular e que indicam estresse celular renal, o inibidor tecidual metaloproteinase-2 - TIMP-2(u) e a proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 7 – IGFBP7(u), vêm sendo aplicados em pacientes humanos em unidades de terapia intensiva para predizer o desenvolvimento da LRA (Mello *et al*., 2022; Martin-Cleary *et al*., 2023; Schanz *et al*., 2023). Essas duas proteínas estão envolvidas na interrupção do ciclo celular durante a fase G1, a qual ocorre se danos ao DNA celular forem detectados (Kashani *et al*., 2013; Greco *et al*., 2023;). Este é um mecanismo de autoproteção para evitar que as células danificadas continuem a se dividir, o que poderia levar a mais danos (Greco *et al*., 2023). Ambas são expressas em todo o corpo, especialmente nas células tubulares dos rins. Desta forma, quando lesionado, o rim aumenta a produção de TIMP-2(u) e IGFBP7(u) que podem ser detectadas na urina (Kashani *et al*., 2013).

Na medicina, foi desenvolvido o teste de imunoensaio Nephrocheck® (Astute Medical, San Diego, CA, USA), que permite uma avaliação rápida e precisa das concentrações urinárias dos biomarcadores [TIMP-2] e [IGFBP7], possibilitando a previsão precoce do desenvolvimento da LRA (Mello et al., 2022; Martin-Cleary *et al.*,

2023). Este teste gera um índice de risco quantitativo, combinando ambos os biomarcadores em uma única proporção numérica ([TIMP-2].[IGFBP7]), considerada um preditor confiável de LRA em pacientes críticos humanos (Martin-Cleary *et al*., 2023). Apesar do potencial promissor e das vantagens desses biomarcadores em relação à creatinina, amplamente utilizada na prática clínica, ainda não há publicações sobre sua aplicação na medicina veterinária.

Em decorrência da escassez de trabalhos conclusivos com relação à utilização dos biomarcadores TIMP-2 e IGFBP7 como possíveis indicadores de lesão renal aguda, pelo fato de as alterações vistas não terem sido sempre confirmadas por biópsia, almejou-se com este estudo verificá-los e validá-los no momento do diagnóstico de piometra em cadelas com sepse, correlacionando-os com a gravidade das lesões histopatológicas como padrão-ouro; além de verificar se possuem superioridade diagnóstica em comparação aos biomarcadores clássicos Cr(s), SDMA(s), GGT(u) e a razão proteína creatinina urinária (UPC).

REFERÊNCIAS[2]

Adembri, C., Sgambati, E., Vitali, L., Selmi, V., Margheri, M., Tani, A., Bonaccini, L., Nosi, D., Caldini, A.L., Formigli, L., De Gaudio, A.R. (2011). Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. Crit. Care. 15(6). doi: 10.1186/cc10559

Aslan, A., van den Heuvel, M.C., Stegeman, C.A., Popa, E.R., Leliveld, A.M., Molema, G., Zijlstra, J.G., Moser, J., van Meurs, M. (2018). Kidney histopathology in lethal human sepsis. Crit. Care. 22(1):359. doi: 10.1186/s13054-018-2287-3.

Balkrishna, A., Sinha, S., Kumar, A., Arya, V., Gautam, A.K., Valis, M., Kuca, K., Kumar, D., Amarowicz, R. (2023). Sepsis-mediated renal dysfunction: Pathophysiology, biomarkers and role of phytoconstituents in its management. Biomed. Pharmacother. 165:115183. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115183.

Bidin, M.Z., Shah, A.M., Stanslas, J., Seong, C.L.T. (2019). Blood and urine biomarkers in chronic kidney disease: An update. Clin. Chim. Acta. 495:239-250. doi: 10.1016/j.cca.2019.04.069.

Bigot, A., Tchan, M.C., Thoreau, B., Blasco, H., Maillot, F. (2017). Liver involvement in urea cycle disorders: a review of the literature. J. Inherit. Metab. Dis. 40(6):757-769. doi: 10.1007/s10545-017-0088-5.

Cianciolo, R.E., Mohr, F.C., Aresu, L., Brown, C.A., Brovida, C., Carrillo, J.M., Elliott, J., Francey, T., Grauer, G.F., Nakayama, H., van Dongen, A.M. (2016). World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: Classification of glomerular diseases in dogs. *Vet. Pathol.* 53(1):113–135. doi: 10.1177/0300985815579996.

Chang, Y.M., Chou, Y.T., Kan, W.C., Shiao, C.C. (2022). Sepsis and acute kidney injury: A review focusing on the bidirectional interplay. Int. J. Mol. Sci. 23(16):9159. doi: 10.3390/ijms23169159.

Ciuca, A.M., Bolin, L.P., Horne, C. (2022). Perioperative urinary TIMP-2*IGFBP7 and acute kidney injury: A systematic review. AANA J. 90(3):171-179.

Clemo, F.A. (1998). Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. Toxicol. Pathol. 26(1):29-32. doi: 10.1177/019262339802600104.

Coyne, M.J., Schultze, A.E., McCrann, D.J. 3rd, Murphy, R.E., Cross, J., Strong-Townsend, M., Drake, C., Mack, R. (2022). Evaluation of renal injury and function biomarkers, including symmetric dimethylarginine (SDMA), in the rat passive Heymann nephritis (PHN) model. PLoS One. 17(5). doi: 10.1371/journal.pone.0269085.

Crivellenti, L.Z., Mesa, J.S., Meirelles, A.É., Borin Crivellenti, S., Mireya, E.G., Canola, J.C., Hatayde, M.R., Santana, A.E., Dantas, M., Silva, G.E. (2014). False

[2] De acordo com as normas da Revista Frontiers, https://www.frontiersin.org/guidelines/author-guidelines#references, atualizado em 2024.

positivity of gamma-glutamyl transpeptidase measurement in urine. Ren. Fail. 36(4):581-584. doi: 10.3109/0886022X.2014.880325.

Crivellenti, L.Z., Silva, G.E., Borin-Crivellenti, S., Cianciolo, R., Adin, C.A., Dantas, M., Dos Anjos, D.S., Tinucci-Costa, M., Santana, A.E. (2016). Prevalence of glomerulopathies in canine mammary carcinoma. PLoS One. 11(10). doi:10.1371/journal.pone.0164479.

Davis, J., Rossi, G., Cianciolo, R.E., Ho, K.M., Hosgood, G.L., Miller, D.W., Raisis, A.L. (2022). Early diagnosis of acute kidney injury subsequent to severe hypotension and fluid resuscitation in anaesthetized dogs. Vet. Anaesth. Analg. 49(4):344-353. doi: 10.1016/j.vaa.2022.02.006.

Doganyigit, Z., Eroglu, E., Akyuz, E. (2022). Inflammatory mediators of cytokines and chemokines in sepsis: From bench to bedside. Hum. Exp. Toxicol. 41:9603271221078871. doi: 10.1177/09603271221078871.

Doi, K., Yuen, P.S., Eisner, C., Hu, X., Leelahavanichkul, A., Schnermann, J., Star, R.A. (2009). Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. J. Am. Soc. Nephrol. 20(6):1217-1221. doi: 10.1681/ASN.2008060617.

Er, R.E., Ulusal Okyay, G., Aygencel, B., Kmaz, G., Türkoğlu, M., Erten, Y. (2020). Comparison Between RIFLE, AKIN, and KDIGO: Acute Kidney Injury Definition Criteria for Prediction of In-hospital Mortality in Critically Ill Patients. Iran J Kidney Dis. 14(5):365-372. doi: 10.22037/ijhpm.2020.62.

Flannery AH, Li X, Delozier NL, Toto RD, Moe OW, Yee J, Neyra JA. Sepsis-Associated Acute Kidney Disease and Long-term Kidney Outcomes. Kidney Med. 2021 Apr 16;3(4):507-514.e1. doi: 10.1016/j.xkme.2021.02.007.

Gao, Y. (2015). Urine is a better biomarker source than blood especially for kidney diseases. Adv. Exp. Med. Biol. 845:3-12. doi: 10.1007/978-94-017-9523-4_1.

Gasser, B., Uscategui, R.A.R., Maronezi, M.C., Pavan, L., Simões, A.P.R., Martinato, F., Silva, P., Crivellenti, L.Z., Feliciano, M.A.R. (2020). Clinical and ultrasound variables for the early diagnosis of septic acute kidney injury in bitches with pyometra. Sci. Rep. 10:8994. doi: 10.1038/s41598-020-65902-4.

Gomez, H., Ince, C., De Backer, D., Pickkers, P., Payen, D., Hotchkiss, J., Kellum, J.A. (2014). A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. Shock. 41(1):3-11. doi: 10.1097/SHK.0000000000000052.

Gómez, H. (2023). Reprogramming metabolism to enhance kidney tolerance during sepsis: The role of fatty acid oxidation, aerobic glycolysis, and epithelial de-differentiation. Nephron. 147(1):31-34. doi: 10.1159/000527392.

Gómez, H., Kellum, J.A. (2016). Sepsis-induced acute kidney injury. Curr Opin Crit Care. 22(6):546-553. doi: 10.1097/MCC.0000000000000356.

Greco, M., De Rosa, S., Boehm, F., Spano, S., Aceto, R., Voza, A., Reggiani, F., Calatroni, M., Castellani, G., Costantini, E., Villa, G., Cecconi, M. (2023). Kinetics of the cell cycle arrest biomarkers (TIMP-2 and IGFBP7) for the diagnosis of

acute kidney injury in critically ill COVID-19 patients. Diagnostics (Basel). 13(2):317. doi: 10.3390/diagnostics13020317.

Hagman, R. (2018). Pyometra in small animals. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 48:639–661. doi: 10.1016/j.cvsm.2018.03.001.

Hagman, R. (2023). Pyometra in small animals 3.0. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 53(5):1223-1254. doi: 10.1016/j.cvsm.2023.04.009.

Harazim, M., Tan, K., Nalos, M., Matejovic, M. (2023). Blood urea nitrogen - independent marker of mortality in sepsis. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 167(1):24-29. doi: 10.5507/bp.2022.015.

Harjen, H.J., Nicolaysen, T.V., Negard, T., Lund, H., Sævik, B.K., Anfinsen, K.P., Moldal, E.R., Zimmer, K.E., Rørtveit, R. (2021). Serial serum creatinine, SDMA and urinary acute kidney injury biomarker measurements in dogs envenomated by the European adder (Vipera berus). BMC Vet Res. 17(1):154. doi: 10.1186/s12917-021-02851-8.

Hokamp, J.A., Nabity, M.B. (2016). Renal biomarkers in domestic species. Vet. Clin. Pathol. 45(1):28-56. doi: 10.1111/vcp.12333.

Huang, Y., Craig Don-Wauchope, A. (2011). The clinical utility of kidney injury molecule 1 in the prediction, diagnosis and prognosis of acute kidney injury: a systematic review. Inflammation & Allergy-Drug Targets. 10:260-271.

Ilchyshyn, N.P., Villiers, E., Monti, P. (2019). Validation of a spectrophotometric method for GGT measurement in canine urine and determination of the urine GGT-to-creatinine ratio reference interval and biological variation in 41 healthy dogs. J Vet Diagn Invest. 31(1):33-39. doi: 10.1177/1040638718812927.

International Renal Interest Society. (2016). IRIS grade of acute kidney injury (AKI). Available at: http://www.iris-kidney.com/pdf/4_ldc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf. (Accessed January 1, 2024).

International Renal Interest Society. (2023). IRIS staging of chronic kidney disease (CKD). Retrieved from http://www.iris-kidney.com/pdf/2_IRIS_Staging_of_CKD_2023.pdf. (Accessed January 1, 2024).

John S. (2020). Lessons learned from kidney dysfunction: Preventing organ failure. Med Klin Intensivmed Notfmed. 115(Suppl 1):21-27. doi: 10.1007/s00063-020-00659-2.

Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, Bihorac A, Birkhahn R, Cely CM, Chawla LS, Davison DL, Feldkamp T, Forni LG, Gong MN, Gunnerson KJ, Haase M, Hackett J, Honore PM, Hoste EA, Joannes-Boyau O, Joannidis M, Kim P, Koyner JL, Laskowitz DT, Lissauer ME, Marx G, McCullough PA, Mullaney S, Ostermann M, Rimmelé T, Shapiro NI, Shaw AD, Shi J, Sprague AM, Vincent JL, Vinsonneau C, Wagner L, Walker MG, Wilkerson RG, Zacharowski K, Kellum JA. (2013). Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care.* 17(1). doi: 10.1186/cc12503.

Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders HJ. (2021). Acute kidney injury. Nat Rev Dis Primers. 7(1):52. doi: 10.1038/s41572-021-00284-z.

Kosaka, J., Lankadeva, Y. R., May, C. N., & Bellomo, R. (2016). Histopathology of septic acute kidney injury: A systematic review of experimental data. Critical Care Medicine, 44(9), e897-e903. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001735

Kuwabara, S., Goggins, E., Okusa, M.D. (2022). The pathophysiology of sepsis-associated AKI. Clin J Am Soc Nephrol. 17(7):1050-1069. doi: 10.2215/CJN.00850122.

Langenberg, C., Gobe, G., Hood, S., May, C.N., Bellomo, R. (2014). Renal histopathology during experimental septic acute kidney injury and recovery. Crit Care Med. 42(1). doi: 10.1097/CCM.0b013e3182a639da.

Lerolle, N., Nochy, D., Guérot, E., Bruneval, P., Fagon, J.Y., Diehl, J.L., Hill, G. (2010). Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. Intensive Care Med. 36(3):471-8. doi: 10.1007/s00134-009-1723-x.

Leśnik, P., Łysenko, L., Fleszar, M.G., Fortuna, P., Woźnica-Niesobska, E., Mierzchała-Pasierb, M., Janc, J. (2022). Measurement of serum levels of 5 amino acids and dimethylamine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in patients without septic associated acute kidney injury and those with septic associated acute kidney injury requiring continuous renal replacement therapy. Med. Sci. Monit. 28. doi: 10.12659/MSM.937784.

Lippi, G., Schena, F., Ceriotti, F. (2018). Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. Clin Chem Lab Med. 57(2):175-182. doi: 10.1515/cclm-2018-0656.

Loane, S.C., Thomson, J.M., Williams, T.L., McCallum, K.E. (2022). Evaluation of symmetric dimethylarginine in cats with acute kidney injury and chronic kidney disease. J Vet Intern Med. 36(5):1669-1676. doi: 10.1111/jvim.16497.

Martin-Cleary, C., Sanz, A.B., Avello, A., Sanchez-Niño, M.D., Ortiz, A. (2023). NephroCheck at 10: addressing unmet needs in AKI diagnosis and risk stratification. Clin Kidney J. 16(9):1359-1366. doi: 10.1093/ckj/sfad146.

McCobb, E., Dowling-Guyer, S., Pailler, S., Intarapanich, N.P., Rozanski, E.A. (2022). Surgery in a veterinary outpatient community medicine setting has a good outcome for dogs with pyometra. J Am Vet Med Assoc. 260(S2). doi: 10.2460/javma.21.06.0320.

Mello, M.F., de Bessa, J. Júnior, Reis, S.T., Kondo, E.Y., Yu, L., Dénes, F.T., Lopes, R.I. (2022). Evaluating TIMP-2 and IGFBP-7 as a predictive tool for kidney injury in ureteropelvic junction obstruction. Int Braz J Urol. 48(2):284-293. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2021.0340.

Molema, G., Zijlstra, J.G., van Meurs, M., Kamps, J.A.A.M. (2022). Renal microvascular endothelial cell responses in sepsis-induced acute kidney injury. Nat Rev Nephrol. 18(2):95-112. doi: 10.1038/s41581-021-00489-1.

Molinari, L., Del Rio-Pertuz, G., Smith, A., Landsittel, D.P., Singbartl, K., Palevsky, P.M., Chawla, L.S., Huang, D.T., Yealy, D.M., Angus, D.C., Kellum, J.A.; ProCESS and ProGReSS-AKI Investigators. (2022). Utility of biomarkers for sepsis-associated acute kidney injury staging. JAMA Netw Open. 5(5). doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.12709.

Montealegre, F., Lyons, B.M. (2021). Fluid Therapy in Dogs and Cats With Sepsis. Front Vet Sci. 8:622127. doi: 10.3389/fvets.2021.622127.

Nabity, M.B., Lees, G.E., Boggess, M.M., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Rakitin, A., Aguiar, J., Relford, R. (2015). Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. J. Vet. Intern. Med. 29:1036–1044. doi: 10.1111/jvim.12835.

Nabity M, Hokamp J. (2023). Urinary biomarkers of kidney disease in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 53(1):53-71. doi: 10.1016/j.cvsm.2022.07.006.

Nandi M, Jackson SK, Macrae D, Shankar-Hari M, Tremoleda JL, Lilley E. (2020). Rethinking animal models of sepsis – working towards improved clinical translation whilst integrating the 3Rs. *Clin Sci (Lond).* 134(13):1715-1734. doi: 10.1042/CS20200679.

Nivy, R., Avital, Y., Aroch, I., Segev, G. (2017). Utility of urinary alkaline phosphatase and γ-glutamyl transpeptidase in diagnosing acute kidney injury in dogs. Vet. J. 220:43–47. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.12.010.

Ostermann, M., Zarbock, A., Goldstein, S., Kashani, K., Macedo, E., Murugan, R., Bell, M., Forni, L., Guzzi, L., Joannidis, M., Kane-Gill, S.L., Legrand, M., Mehta, R., Murray, P.T., Pickkers, P., Plebani, M., Prowle, J., Ricci, Z., Rimmelé, T., Rosner, M., Shaw, A.D., Kellum, J.A., Ronco, C. (2020). Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference: A Consensus Statement. JAMA Netw Open. 3(10). doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.19209.

Perondi, F., Lippi, I., Ceccherini, G., Marchetti, V., Guidi, G. (2019). Evaluation of urinary γ-glutamyl transferase and serum creatinine in non-azotemic hospitalized dogs. Vet. Rec. 185:52. doi: 10.1136/vr.104439.

Ragán, D., Horváth-Szalai, Z., Szirmay, B., Mühl, D. (2022). Novel Damage Biomarkers of Sepsis-Related Acute Kidney Injury. EJIFCC. 33(1):11-22.

Schanz M, Kimmel M, Alscher MD, Amann K, Daniel C. (2023). TIMP-2 and IGFBP7 in human kidney biopsies in renal disease. Clin Kidney J. 16(9):1434-1446. doi: 10.1093/ckj/sfad010.

Scholz H, Boivin FJ, Schmidt-Ott KM, Bachmann S, Eckardt KU, Scholl UI, Persson PB. (2021). Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection. Nat Rev Nephrol. 17(5):335-349. doi: 10.1038/s41581-021-00394-7.

Schnuelle P. (2023). Renal Biopsy for Diagnosis in Kidney Disease: Indication, Technique, and Safety. J Clin Med. 12(19):6424. doi: 10.3390/jcm12196424.

Starybrat, D., Jepson, R., Bristow, P., Peterson, S., Yerramilli, M., Yerramilli, M., Chang, Y.M., Cortellini, S. (2022). Prospective evaluation of novel biomarkers of acute kidney injury in dogs after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio). 32:733–742. doi: 10.1111/vec.13250.

Tenzi, J., Hurtado, J., Nin, N., Rodriguez, F., Molina, C., & Aunchayna, M. (2022). Renal histopathology in critically ill patients with septic acute kidney injury (S-AKI). J Crit Care, 68, 38-41. doi: 10.1016/j.jcrc.2021.11.013.

Vaden, S.L. (2005). Renal biopsies of dogs and cats. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 20:11–22. doi: 10.1053/j.ctsap.2004.12.003.

Wen, Y., Parikh, C.R. (2021). Current concepts and advances in biomarkers of acute kidney injury. Crit Rev Clin Lab Sci. 58(5):354-368. doi: 10.1080/10408363.2021.1879000.

Xie, Y., Ankawi, G., Yang, B., Garzotto, F., Passannante, A., Breglia, A., Digvijay, K., Ferrari, F., Brendolan, A., Raffaele, B., Giavarina, D., Gregori, D., Ronco, C. (2019). Tissue inhibitor metalloproteinase-2 (TIMP-2) • IGF-binding protein-7 (IGFBP7) levels are associated with adverse outcomes in patients in the intensive care unit with acute kidney injury. Kidney Int. 95(6):1486-1493. doi: 10.1016/j.kint.2019.01.020.

Yerramilli, M., Farace, G., Quinn, J., Yerramilli, M. (2016). Kidney disease and the nexus between chronic kidney disease and acute kidney injury: Role of novel biomarkers as early and accurate diagnostics. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 46:961–993. doi: 10.1016/j.cvsm.2016.06.011.

Zarbock, A., Nadim, M.K., Pickkers, P., Gomez, H., Bell, S., Joannidis, M., Kashani, K., Koyner, J.L., Pannu, N., Meersch, M., Reis, T., Rimmelé, T., Bagshaw, S.M., Bellomo, R., Cantaluppi, V., Deep, A., De Rosa, S., Perez-Fernandez, X., Husain-Syed, F., Kane-Gill, S.L., Kelly, Y., Mehta, R.L., Murray, P.T., Ostermann, M., Prowle, J., Ricci, Z., See, E.J., Schneider, A., Soranno, D.E., Tolwani, A., Villa, G., Ronco, C., Forni, L.G. (2023). Sepsis-associated acute kidney injury: consensus report of the 28th Acute Disease Quality Initiative workgroup. Nat. Rev. Nephrol. 19(6):401-417. doi: 10.1038/s41581-023-00683-3.