

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado de Pós-Graduação**

**N-ACETYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE (NAG): PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO  
ESPECTROFOTOMÉTRICO AUTOMÁTICO EM URINA DE CÃES.**

**Luiz Eduardo de Souza Tassini**

**Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado de Pós-Graduação**

**N-ACETYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE (NAG): PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO  
ESPECTROFOTOMÉTRICO AUTOMÁTICO EM URINA DE CÃES.**

**Luiz Eduardo de Souza Tassini**

Dissertação apresentada na Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciência  
Animal.

Área: Patologia Clínica

Orientadora: Profa. Fabiola Oliveira Paes Leme

**Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2015**

T213n Tassini, Luiz Eduardo de Souza, 1986-  
N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG): padronização de ensaio  
espectrofotométrico automático em urina de cães / Luiz Eduardo de Souza Tassini. –  
2015.  
67 p. : il.

Orientadora: Fabiola Oliveira Paes Leme  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Rins – Doenças – Teses. 3. Urina – Análise – Teses.  
4. Urina – Exame – Teses. 5. Patologia clínica veterinária – Teses. I. Leme, Fabiola Oliveira  
Paes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 96

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e coragem. Agradeço ao meu pai e minha mãe pelo apoio, incentivo no sonho de ser veterinário, amor incondicional e paciência com a ausência do filho “tão sem tempo”. À minha irmã e meus sobrinhos pelo carinho, sorrisos e momentos de distração. À Nilda pela amizade e o cafezinho. Agradeço à Lívia, minha grande companheira das horas boas e ruins, por todo amor, dedicação, carinho e paciência. À Nala, Pierre, Mia, Luna, Dodô e Rosa por serem essa fonte maior de inspiração. Agradeço ao grande mestre, amigo e padrinho, professor Júlio, por todas as portas que foram abertas, conselhos, orientação e ensinamentos sobre a linda área da nefrologia. À amiga e grande profissional, professora Fabíola, por todos os ensinamentos, pela paciência e por acreditar nesse projeto e nesse aluno que quase não entendia da rotina de um laboratório. Agradeço especialmente ao grande amigo Márcio Henrique Lacerda, por todos os ensinamentos e apoio que me ofereceu com tanta boa vontade, em meio à sua rotina tão atarefada, sempre com palavras de incentivo e um novo “insight” a cada momento, acreditando na importância desse projeto e em sua capacidade de dar certo. E por fim, agradeço a todos os animais e proprietários que contribuíram com este estudo.

## RESUMO

A determinação de injúria renal, especialmente pela avaliação da atividade de enzimas urinárias, é uma importante ferramenta para o médico veterinário, especialmente, por sua precocidade em relação aos métodos de avaliação da função renal, que são considerados tardios, visto que a instalação da injúria precede a alteração da função. Neste estudo foi realizada a padronização de reagentes, determinação de valor de referência (com e sem correção para densidade urinária) e avaliação de estabilidade – em diferentes faixas de temperatura – da enzima NAG (N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase) para cães (machos e fêmeas), hígidos de diferentes faixas etárias. Para a padronização de reagentes para avaliação de atividade urinária de NAG em cães, a enzima apresentou pH ótimo e concentração de substrato similares aos utilizados em kits comerciais para avaliação da atividade desta enzima em humanos. A automatização da técnica de avaliação da atividade urinária de NAG em humanos, para cães hígidos de diferentes faixas etárias, mostrou-se eficaz. Por meio de análise estatística, observou-se que a NAG apresenta correlação positiva com a idade do animal e com a densidade urinária. Quando aplicada a fórmula de correção para densidade urinária de 1,025, o intervalo de confiança médio de atividade urinária da NAG foi menor do que quando não se realizou a correção e estatisticamente concluiu-se que a atividade urinária de NAG, com correção de densidade urinária é mais precisa. Para avaliação da estabilidade urinária da enzima, foram analisados três métodos de conservação de urina em temperaturas de -20° C, 2-8° C e 20-30° C, com tempos de armazenamento de 24, 48, 72 horas, 7 e 15 dias. Concluiu-se que o método de armazenamento das amostras de urina em temperatura de 2-8° C é um método confiável de armazenamento por até 7 dias, sem que haja alterações estatísticas nos valores encontrados nas análises das amostras. Os métodos de conservação em temperaturas de -20° C e em temperaturas de 20-30° C demonstraram-se inadequados para conservação de amostras de urina para posterior avaliação da atividade de NAG urinária devido às diferenças estatísticas nas médias ao longo do tempo.

**Palavras chave:** marcador, injúria renal, renoproteção

## ABSTRACT

*The determination of renal injury, especially through the assessment of the activity of urinary enzymes, is an important tool for the veterinary doctor, especially by its precocity in relation to methods of evaluation of renal function, which are considered to happen late, since the installation of injury precedes the change in the function. In this study was performed the standardization of reagents, determination of a reference value (with and without correction for urine density) and assessment of stability - in different temperature ranges - the enzyme NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) for dogs (male and female), healthy individuals of different age groups. For the standardization of reagents for evaluation of urinary activity of NAG in dogs, the enzyme showed optimal pH and concentration of substrate similar to those used in commercial kits for evaluation of the activity of this enzyme in humans. The automation of the technique for the assessment of urinary NAG activity in humans, for healthy dogs in different age groups, has proved to be effective. By means of statistical analysis, it was observed that NAG presents a positive correlation with the age and urine density of the animal. Once applied the correction formula for urinary specific density of 1.025, the average confidence interval of*

*urinary activity of NAG was shorter than when there was no correction and statistically it was concluded that the activity of urinary NAG, with correction of urinary density is more accurate. In order To evaluate the stability of urinary enzyme, were analyzed three methods of conservation of urine in temperatures of -20 C, 2-8C and 20-30C, with retention times of 24, 48, 72 hours and 7 and 15 days. It was concluded that the storage method of urine samples at a temperature of 2-8C is a reliable method of storage for up to 7 days, without any statistical changes in the values found in the analyzes of the samples. The methods of conservation in temperatures of -20 C and at temperatures of 20-30C proved to be unsuitable for conservation of urine samples for later evaluation of urinary activity of NAG due to statistical differences in average values over time.*

**Key words:** renal injury, marker, stability

## SUMÁRIO

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 8  |
| 2.     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 9  |
| 2.1.   | Objetivo geral .....   | 9  |
| 2.2.   | Objetivos específicos .....  | 9  |
| 3.     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 10 |
| 3.1.   | Injúria Renal Aguda .....  | 10 |
| 3.1.1  | Tipos de injúria renal.....  | 12 |
| 3.1.2. | Classificação da injúria renal aguda em fases .....  | 14 |
| 3.2.   | Biomarcadores convencionais para detecção de insuficiência e de injúria renal aguda            | 15 |
| 3.2.1. | Concentração sérica de creatinina .....  | 15 |
| 3.2.2. | Concentração sérica de ureia .....   | 16 |
| 3.3.   | Renoproteção .....   | 16 |
| 3.4    | Biomarcadores para detecção de injuria renal .....   | 17 |
| 3.4.1. | Enzimas urinárias .....  | 17 |
| 3.4.2. | Outros biomarcadores precoces de injúria renal .....   | 22 |
| 4.     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 25 |
| 4.1.   | Padronização da técnica de avaliação da atividade urinária de NAG.....                         | 27 |
| 4.1.1. | Local de execução .....  | 27 |
| 4.1.2. | Preparo de soluções reagentes.....   | 27 |
| 4.1.3. | Preparo da amostra de urina .....  | 28 |
| 4.1.4. | Técnica automatizada para determinação da atividade de NAG urinária.....                       | 28 |
| 4.1.5. | Determinação do coeficiente de absorvidade (absorbância) em espectrofotômetro ....             | 30 |
| 4.1.6. | Determinação do fator de correção, a partir do coeficiente de absorvidade .....                | 31 |
| 4.2.   | Determinação do intervalo de confiança médio de atividade urinária de NAG em cães hígidos..... | 31 |
| 4.2.1. | Local de execução .....  | 31 |
| 4.2.2. | Seleção dos animais.....   | 31 |
| 4.2.3. | Divisão dos grupos .....   | 32 |
| 4.2.4. | Realização de exames, coleta de material e envio para análise.....                             | 34 |
| 4.3.   | Determinação do intervalo de confiança médio para a atividade urinária de NAG .....            | 37 |
| 4.4.   | Determinação da estabilidade da NAG urinária .....   | 37 |
| 4.4.1. | Local de execução .....  | 37 |
| 4.4.2. | Protocolo utilizado .....  | 37 |
| 4.5.   | Aprovação do projeto .....   | 38 |
| 4.6.   | Análise estatística.....   | 38 |
| 5.     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 38 |
| 5.1.   | Padronização de reagentes e determinação da atividade urinária da NAG .....                    | 38 |
| 5.2.   | Avaliação da estabilidade urinária da NAG .....  | 46 |
| 6.     | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | 49 |
| 7.     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 50 |
| 8.     | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 50 |
|        | <b>ANEXO 1</b> .....   | 58 |
|        | <b>ANEXO 2</b> .....   | 61 |

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1. Estadiamento de pacientes nefropatas segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), baseado na concentração sérica de creatinina. .... | 10 |
| Quadro 2. Sub-estadiamento de pacientes segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), baseado na concentração sérica de creatinina. ....        | 11 |
| Quadro 3. Reagentes utilizados para a padronização da técnica de mensuração da atividade da NAG em cães. ....  | 27 |
| Quadro 4. Divisão de grupos entre os animais participantes do experimento.....   | 32 |
| Quadro 5. Idade de erupção dos dentes decíduos e muda para dentição definitiva .....   | 33 |
| Quadro 6. Desgaste natural de arcada dentária, a partir de 8 meses de idade. ....  | 33 |
| Quadro 7. Classificação de escore de condição corporal. ....   | 35 |
| Quadro 8. Análises de Sangue e Urina realizados em todos os cães participantes do estudo. ....   | 36 |
| Tabela 1. Valores dos componentes para cálculo de fator de correção.....   | 41 |
| Tabela 2. Intervalo de confiança da média da atividade de NAG para cães segundo o sexo.....  | 43 |
| Tabela 3. Atividade de NAG (U/L) na urina de 10 cães hígidos em três temperaturas e seis tempos de análise diferentes.....                                     | 48 |

## TABELA DE FIGURAS E GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Injúria Renal Aguda – Adaptado de Chew et al. (2011).....  | 12 |
| Figura 2. Fases da injúria renal aguda (IRA) – Adaptado de Chew et al. (2011) .....  | 15 |
| Figura 3. Marcadores de injúria e de função renais .....   | 18 |
| Figura 4. Fluxograma de atividades – Padronização da técnica para determinação de NAG urinária em cães e determinação de intervalo de referência .....       | 26 |
| Figura 5. Fluxograma de atividades da 2ª e 3ª etapas do experimento.....   | 26 |
| Figura 6. Fluxograma do tratamento de amostras de urina para realização da técnica automatizada para análise da atividade de NAG urinária em cães .....      | 28 |
| Figura 7. Aparelho de bioquímica Cobas Mira Plus® (Arquivo pessoal).....   | 29 |
| Figura 8. Aparelho para espectrofotometria semiautomática (Arquivo pessoal) .....  | 31 |
| Figura 9. Figura esquemática da dentição dos cães utilizada para classificar os animais do experimento entre grupos etários (Adaptado de: Emily, 1994) ..... | 33 |
| Figura 10. Pesagem dos animais (Arquivo pessoal).....  | 34 |
| Figura 11. Coleta de sangue por acesso venoso central (Arquivo pessoal).....   | 35 |
| Figura 12. Realização de cistocentese guiada por ultrassom (Arquivo pessoal).....  | 37 |
| Gráfico 1. Variação da atividade de NAG urinária em relação ao pH do tampão citrato .....  | 39 |
| Gráfico 2. Variação de absorbância obtida em espectrofotômetro de acordo com a concentração de substrato p-Nitrofenil utilizada .....                        | 40 |
| Gráfico 3. Variação da atividade de NAG urinária com relação a idade de 60 cães clinicamente hígidos ( $p < 0,001$ ).....                                    | 42 |
| Gráfico 4. Variação da atividade de NAG urinária sem correção de densidade urinária.....   | 44 |
| Gráfico 5. Variação da atividade de NAG urinária com correção de densidade urinária .....  | 44 |

Gráfico 6. Média da atividade de NAG na urina de 10 cães hígidos em três temperaturas segundo tempo de análise..... 47

### LISTA DE ABREVIATURAS

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>ALA-U</b>                 | Ácido aminolevulínico                           |
| <b>AMP</b>                   | 2-amino-2-metyl-1-propanol                      |
| <b>ALT</b>                   | Alanina aminotransferase                        |
| <b>DRC</b>                   | Doença renal crônica                            |
| <b>ECC</b>                   | Escore de condição corporal                     |
| <b>EDTA</b>                  | Ácido etilenodiaminotetracético                 |
| <b>F</b>                     | Fator de correção                               |
| <b>FA</b>                    | Fosfatase alcalina                              |
| <b>GGT</b>                   | Gama-glutamyl-transferase                       |
| <b>HCl</b>                   | Ácido clorídrico                                |
| <b>IECA</b>                  | Inibidores da enzima conversora de angiotensina |
| <b>IL-18</b>                 | Interleucina 18                                 |
| <b>IRA</b>                   | <b>Injúria renal aguda</b>                      |
| <b>IRIS</b>                  | Sociedade Internacional de Interesse Renal      |
| <b>kDa</b>                   | Quilo dálton                                    |
| <b>KIM-1</b>                 | Molécula de injúria renal                       |
| <b>L</b>                     | Caminho óptico                                  |
| <b>LDH</b>                   | Lactato desidrogenase                           |
| <b>mM</b>                    | Mili molar                                      |
| <b>mmHG</b>                  | Milímetros de mercúrio                          |
| <b>NAG</b>                   | N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase            |
| <b>NaOH</b>                  | Hidróxido de sódio                              |
| <b>NGAL</b>                  | Lipocaína associada à gelatinase neutrofílica   |
| <b>nm</b>                    | Nanômetro                                       |
| <b>PAD</b>                   | Pressão arterial diastólica                     |
| <b>PAS</b>                   | Pressão arterial sistólica                      |
| <b>RPC</b>                   | Relação proteína creatinina urinária            |
| <b>TFG</b>                   | Taxa de filtração glomerular                    |
| <b>Va</b>                    | Volume da amostra                               |
| <b>Vd</b>                    | Volume de diluente                              |
| <b>Vr</b>                    | Volume de reagente                              |
| <b>Vt</b>                    | Volume total                                    |
| <b><math>\epsilon</math></b> | Épsilon   |

## 1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo as abordagens dos pacientes nefropatas estiveram relacionadas às investigações de alterações de funções renais, utilizando exames que identificam comprometimento da excreção, reabsorção ou secreção de células renais. Tais exames têm como característica comum, acusarem alterações somente quando cerca de 66 a 75% dos néfrons de ambos os rins, se mostram comprometidos. Este fato revela um caráter tardio de identificação podendo, muitas vezes, ser impossível reverter um quadro instalado, e comprometer desta forma, funções renais de modo permanente. Pacientes nessas condições passam a ter uma vida limitada, monitorada, sob risco de desencadear momentos de desequilíbrio da homeostase, com menor expectativa e qualidade de vida. Para muitos destes pacientes restam os tratamentos dialíticos e o transplante renal.

O primeiro exame solicitado na rotina, para esclarecer se há comprometimento renal, é a avaliação da função excretora, em geral a primeira função alterada. Para tanto, mede-se as concentrações séricas de ureia e creatinina, que, quando acima dos valores de normalidade, indicam deficiência de excreção. Este, normalmente, é um indicativo de insuficiência renal. A partir daí é necessário que o médico veterinário identifique se o aumento de ureia e creatinina tem origem pré-renal, renal ou pós-renal e qual tipo de insuficiência renal pode estar presente – aguda ou crônica – visto que estes sinais podem ocorrer tanto nos casos de injúria renal aguda quanto nos de doença renal crônica (dos Santos et al., 2014; Veado, 2014).

Sabe-se que a injúria renal pode levar a alterações de função. Concentrações séricas de ureia e creatinina são marcadores de função excretora e, mesmo que apresentem valores dentro de um intervalo de normalidade, é possível que haja uma injúria renal. Esta característica justifica a necessidade de métodos de avaliação que sinalizem injúria renal (Chew et al., 2011; dos Santos et al., 2014). Tanto a identificação da injúria como o acompanhamento para impedir seu avanço são consideradas práticas de renoproteção (Praga, 2002; Levey, 2005).

Diferentemente da ureia e creatinina que podem ser consideradas marcadores de avaliação tardios, existem marcadores com a qualidade de evidenciar dano renal celular, como é o caso dos marcadores enzimáticos urinários. Devido às diferentes porções do néfron conterem enzimas características, as enzimas urinárias podem ser utilizadas para localizar a lesão renal. As enzimas urinárias também podem ser utilizadas para avaliar o grau de lesão renal através do aumento de sua atividade urinária (Clemon, 1998). Em cães, as enzimas urinárias têm sido primariamente utilizadas na avaliação de nefrotoxicidade aguda por serem testes sensíveis e não invasivos para o diagnóstico de lesão tubular renal (Rocha e Veado, 2005; Van Der Harst et al., 2005; Veado et al., 2010). É observada uma baixa atividade de enzimas urinárias em animais sadios e, a constatação de aumento de sua atividade, sinaliza que há injúria renal. Assim, o clínico pode atuar de forma precoce, tendo a possibilidade de reverter o quadro e evitar que se torne uma insuficiência renal (Jung e Mattenheimer, 1992).

Devido à limitada sensibilidade dos métodos disponíveis para a avaliação e monitoramento de injúria renal, enzimas urinárias, como N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, Gama-glutamyl-transferase, fosfatase alcalina e antígenos epiteliais dos túbulos renais vêm sendo estudados e avaliados como marcadores de injúrias renais. Estas enzimas podem dar informações sobre o início da lesão e sua progressão, devido à variação de sua atividade no curso da injúria renal (Clemon, 1998; Melchert, 2007).

A N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase é uma enzima lisossomal presente em altas concentrações nas células dos túbulos proximais renais. Seu peso molecular de 140 kDa não permite filtração glomerular, sendo que o aumento de sua atividade na urina é um dos indicadores mais sensíveis de injúria tubular. Ela reflete predominantemente lesões tubulointersticiais, incluindo as causadas por aminoglicosídeos e outras drogas nefrotóxicas (Ring et al., 1998). Caso seja observado valor da atividade da enzima acima de sua referência de normalidade, pode-se considerar que há lesão de parênquima renal. Tal constatação pode alterar, ou mesmo, guiar a conduta do clínico, de forma a evitar a progressão da injúria e possível quadro de insuficiência renal (Nelson e Couto, 2001; Heiene et al., 2001; Veado et. al., 2003). Atualmente, não existem no mercado kits comerciais para análise de atividade urinária de N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase em cães, ou mesmo, intervalo de referência da enzima para esta espécie. Os trabalhos publicados em medicina veterinária fazem uso de kits comerciais para análise de humanos, como o Shionogi, Osaka/Japão (Noto et al., 1983).

As formas de armazenamento e conservação de amostras para análise laboratorial vêm sendo estudadas em diversas pesquisas (Magnusson e Holst, 1998). De acordo com alguns autores, os mesmos analitos podem ter diferentes estabilidades, caso comparados entre espécies e diferentes métodos de armazenamento (Lehninger, 1995). Mesmo que o ideal seja submeter amostras ao laboratório de análises dentro do prazo máximo de 12 horas, isto nem sempre é possível (Wittwer et al., 1986). Assim, é importante que o médico veterinário detenha informações sobre a melhor forma de conservação da amostra, bem como o tempo até o seu processamento, sem que haja interferência nos resultados das análises (Paes Leme et al., 2011).

A determinação de valores de normalidade ou intervalo de referência em amostras orgânicas permite a identificação de alterações bioquímicas no paciente avaliado, propiciando ao clínico uma conduta mais adequada de tratamento e predição de prognóstico (Wallach et al., 2000). A possibilidade de ter como recurso um marcador enzimático precoce, que atua identificando injúria renal é uma ferramenta importante para o clínico. Além disso, ter conhecimento da melhor forma de conservação e armazenamento, proporciona um uso adequado e eficaz do método de análise.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar valores de referência para a atividade urinária da enzima N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) para cães hígidos de diferentes faixas etárias, testar a estabilidade da enzima em amostras de urina, além de correlacionar os resultados de cada indivíduo com sexo, idade e densidade.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ❖ Validar metodologia de determinação da concentração de NAG para cães: testar pH ótimo e validar uma curva de calibração;
- ❖ Determinar a atividade da NAG nos dois sexos e em cinco faixas de idade

- ❖ Testar a estabilidade da NAG de amostras de urina em três diferentes temperaturas e em diferentes tempos de armazenamento de 24, 48, 72 horas, 7 e 15 dias.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Injúria Renal Aguda

Por muito tempo, “insuficiência renal” foi a expressão utilizada para representar situações em que afecções, que atingem os rins, somente podiam ser identificadas quando observadas alterações clínicas ou laboratoriais das funções renais. Como “suficiência renal” subentende-se “funcional”, sendo então, a expressão insuficiência utilizada para definir uma condição onde observa-se alteração de uma ou mais funções renais. Hoje, com o uso de exames considerados precoces à insuficiência, também conhecidos como identificadores de injúria, é possível identificar agressão antes da instalação do quadro de insuficiência funcional. Assim, a expressão “insuficiência” vem sendo substituída por “injúria”. Esta substituição, ainda reforça a importância da causa (injúria, agressão) nesta afecção (Veado, 2014). A Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) propôs uma nova definição e classificação de injúria renal aguda (IRA), a fim de uniformizar este conceito (Quadros 1 e 2), para efeitos de estudos clínicos e, principalmente, para prevenir e facilitar o diagnóstico desta síndrome, na tentativa de diminuir sua alta morbidade e mortalidade. Esta classificação representa um momento no curso da injúria e pode se alterar à medida que apresente piora, melhora ou mesmo, progrida para doença renal crônica (IRIS, 2013).

A expressão injúria renal aguda tenta atingir um grupo de pacientes portadores de alterações renais graves ou não, sem, contudo, que estejam com sinais de insuficiência renal, como é o caso de animais com glomerulonefrites ou injúrias tubulares isquêmicas ou tóxicas. Nestes animais a injúria está presente porém, a insuficiência, muitas vezes, ainda não está instalada (Veado, 2014).

A IRA é o estado no qual os rins perdem de modo súbito a capacidade de exercício de uma ou mais funções devido a um fator primário, levando a um aumento brusco da concentração sérica de ureia e creatinina (azotemia) (Veado, 2013). É causada por alterações hemodinâmicas, intrínsecas glomerulares ou tubulares, ou por uma eliminação de urina deficiente. Em muitos casos o dano tubular, que pode levar à insuficiência renal, desenvolve-se em ambiente hospitalar, muitas vezes, de forma inadvertida quase sempre associada a procedimentos terapêuticos, como por exemplo, uso de drogas potencialmente nefrotóxicas (Brown et al., 1985). Pode também estar associada à regulação anormal do equilíbrio eletrolítico, ácido básico e hídrico. A IRA trata-se, portanto, de uma condição na qual uma ou mais funções renais estão alteradas. A função renal pode ser comprometida de forma agressiva, causando riscos à sobrevivência do paciente, se a resolução não ocorrer dentro de um curto período de tempo. A IRA é consequência de alguma alteração, ou seja, sempre há uma causa (dos Santos, 2014).

Quadro 1. Estadiamento de pacientes nefropatas segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), baseado na concentração sérica de creatinina.

| <b>Estágio de IRA</b> | <b>Creatinina sérica</b> | <b>Descrição clínica</b>                                      |
|-----------------------|--------------------------|---|
| Estágio I             | <1,6 (mg/dL)             | IRA não azotêmica:<br>a. IRA documentada (Histórico, clínica, |

|             |                  |   |
|-------------|------------------|---|
|             |                  | laboratório ou evidência de IRA em imagem)<br>b. Aumento progressivo não azotêmico na creatinina sérica; $\geq 0,3$ mg/dL dentro de 48 horas<br>c. Oligúria ( $< 1$ mL/Kg/Hr) ou anúria por mais de 6 horas                       |
| Estágio II  | 1,7 - 2,5 mg/dL  | IRA média<br>a. IRA documentada e estática ou azotemia progressiva<br>b. Aumento progressivo e azotêmico na creatinina sérica; $\geq 0,3$ mg/dL dentro de 48 horas<br>c. Oligúria ( $< 1$ mL/Kg/Hr) ou anúria por mais de 6 horas |
| Estágio III | 2,6 – 5,0 mg/dL  |   |
| Estágio IV  | 5,1 – 10,0 mg/dL | IRA moderada a grave:<br>a. IRA documentada e aumento grave de azotemia e prejuízo de função renal  |
| Estágio V   | $> 10,0$ mg/dL   |   |

Adaptado de IRIS (2013)

Quadro 2. Sub-estadiamento de pacientes segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), baseado na concentração sérica de creatinina.

| Estágio de IRA | Creatinina sérica | Subestágio   |
|----------------|-------------------|--|
| Estágio I      | $< 1,6$ mg/dL     | Cada estágio de IRA é subestadiado como:<br>1. Não oligúrico ou oligoanúrico<br>2. Requer terapia de transplante |
| Estágio II     | 1,7 – 2,5 mg/dL   |  |
| Estágio III    | 2,6 – 5,0 mg/dL   |  |
| Estágio IV     | 5,1 – 10,0 mg/dL  |  |
| Estágio V      | $> 10,0$ mg/dL    |  |

Adaptado de IRIS (2013)

A identificação da injúria é um ato fundamental, pois a IRA pode ser reversível se tratada rapidamente, impedindo-se a instalação da insuficiência. Se a agressão não for suficiente para provocar a perda definitiva do parênquima renal, há o reestabelecimento anatômico e funcional dos néfrons. A persistência da injúria pode acarretar na instalação de um quadro irreversível, gerando doença renal crônica, ou mesmo, em muitos pacientes pode ser grave o suficiente para causar o óbito (Chew et al., 2011). Em estudo realizado em pacientes, cães e gatos, com IRA

adquirida em hospital, a taxa de sobrevivência foi de 40% (Behrend et al., 1996). Em outro estudo retrospectivo com 99 cães, com diferentes tipos de IRA, 22% dos animais morreram, 34% foram eutanasiados, 24% sobreviveram, mas evoluíram para doença renal crônica (DRC), e apenas 19% recuperaram a função renal normal ou adequada. Esses estudos ressaltam a importância da detecção precoce da lesão tubular aguda e da prevenção da instalação de quadros de IRA (Vaden et al., 1997). Fazendo-se uso da sinalização precoce, o clínico tem condições de instituir monitoramento e manejo adequado e, principalmente, preventivo, da injúria renal, aumentando a sobrevida do paciente (Stevens et al., 2006).

Tamãna a importância da causa, a IRA é classificada de acordo com sua origem. A IRA pode ser classificada em pré-renal, renal (ou intrínseca) ou pós-renal (Figura 1) (Conforme Sociedade Brasileira de Nefrologia e Urologia Veterinária).

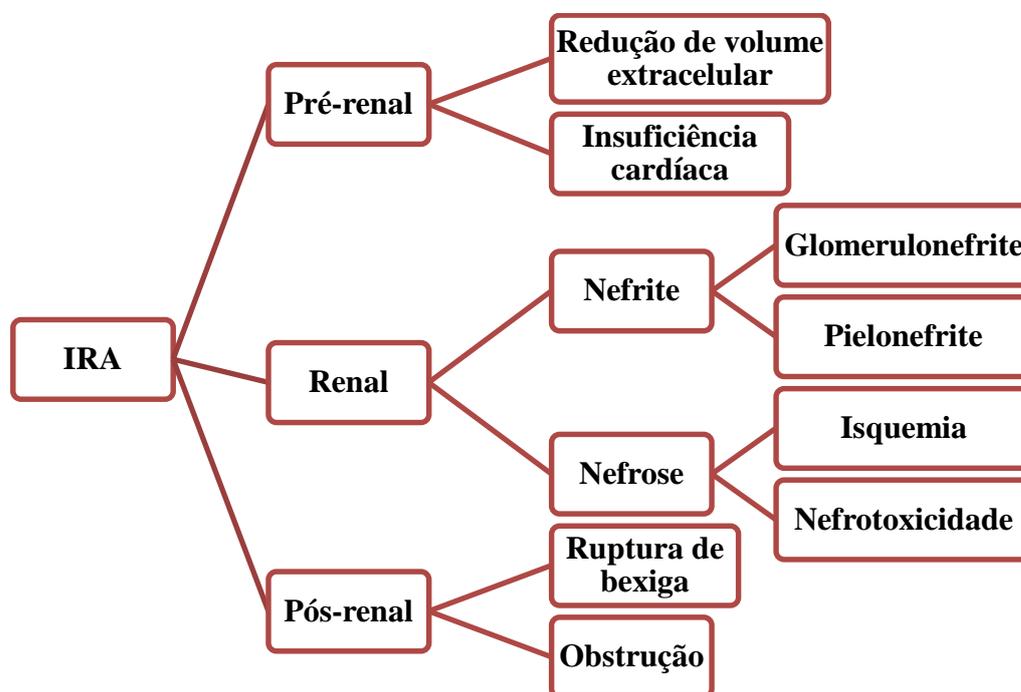


Figura 1. Injúria Renal Aguda – Adaptado de Chew et al. (2011)

### 3.1.1 Tipos de injúria renal

#### *Injúria renal*

Qualquer condição que cause uma agressão glomerular, tubular ou do interstício renal é considerada uma injúria renal. As injúrias podem ser discretas e não causar qualquer dano ao

parênquima renal. Entretanto, muitas delas são a causa da instalação dos quadros de insuficiência funcional. Quando detectado e avaliado o grau da agressão, pode-se determinar a continuação de uma ação ou sua interrupção. Identificar injúrias de forma precoce é uma medida preventiva de alto valor clínico, sendo considerada uma atitude de renoproteção, procedimento muito desejado na nefrologia moderna (Freitas, 2014).

### ***Injúria renal aguda pré-renal***

A injúria pré-renal ocorre devido a uma interferência hemodinâmica, com diminuição da perfusão renal, iniciando muitas vezes, sem a ocorrência de dano estrutural renal. Os rins recebem cerca de 20 a 25% do sangue proveniente do débito cardíaco; assim, qualquer afecção que cause alteração hemodinâmica, como desidratação, anemia, sedação (anestesia), hipovolemia (hipotensão) e/ou hemorragia pode comprometer a irrigação sanguínea renal. Estas injúrias comprometem inicialmente, e principalmente, a função excretora renal, visto que essas funções dependem do fluxo sanguíneo. Ocorrerá acúmulo de catabólitos, havendo azotemia e o animal poderá, ainda, manifestar sinais clínicos variados (Chew et al., 2011; dos Santos, 2014).

Com o comprometimento da perfusão renal haverá hipóxia e pouca nutrição às células dos túbulos renais, ocasionando desprendimento de celular, apoptose e liberação de integritinas. Ocorrerá formação de lacunas nos túbulos, de cistos, edema intersticial, formação de cilindros e, em quadro mais grave, nefrose isquêmica ou necrose tubular aguda (Schrier, 2008; Chew et al., 2011; dos Santos, 2014).

### ***Injúria renal aguda intrínseca (IRA renal)***

As injúrias renais agudas intrínsecas podem ser glomerulares, tubulares e/ou intersticiais. Refere-se a uma condição que afeta diretamente o parênquima renal, suficiente para causar significativa diminuição da taxa de filtração glomerular, com conseqüente aumento dos resíduos nitrogenados no sangue, caracterizando sinais de uma insuficiência renal funcional (Senior, 2005; Scott e Stockham, 2012).

Qualquer afecção que cause um dano glomerular pode ser classificada como uma injúria renal glomerular. Afecções que provocam estímulo à produção de anticorpos, resultando em formação de imunocomplexos, são grandes causadoras de IRA glomerular, a qual é uma das maiores causadoras de óbito em pacientes portadores de IRA. As glomerulopatias são consideradas as injúrias renais agudas mais graves, mais difíceis de serem tratadas e que apresentam maior índice de insucesso terapêutico, sendo, normalmente, associadas a uma doença grave (Ross, 2011).

Os túbulos, que representam a composição celular dos rins, podem, assim como os glomérulos, receber agressões e perder sua integridade, comprometendo uma ou mais de suas funções. Hipóxia e falta de nutrientes causam degeneração e conseqüente morte celular. Pelo fato dos túbulos renais serem constituídos de uma camada única de células, a perda de uma célula, pode representar um dano grave ao parênquima renal. As causas mais comuns das injúrias tubulares são necrose tubular aguda, como causa isquêmica, glomerulonefrite, lesão arteriolar, nefrite intersticial aguda induzida por medicamentos, deposição intra renal de sedimentos, embolização pelo colesterol, hemoglobinúria, mioglobinúria; substâncias diversas como venenos, metais pesados, pesticidas, que apresentem potencial nefrotóxico, podendo acarretar em apoptose e destruição dos túbulos (Motta, 2009; dos Santos, 2014).

### ***Injúria renal aguda pós-renal***

Na insuficiência renal aguda pós-renal a causa inicial está distal aos néfrons. Todo fator que interrompa a passagem da urina formada pelas vias urinárias, como processos obstrutivos do trato urinário, tais como urolitíase, cistite idiopática e intersticial felina, neoplasia, hiperplasia prostática benigna e ruptura da bexiga, podem levar ao aumento da pressão do líquido no interior dos túbulos renais. A pressão aumentada interfere com a filtração glomerular e leva ao acúmulo de catabólitos no organismo do animal (Scott e Stockham, 2012).

#### **3.1.2. Classificação da injúria renal aguda em fases**

##### ***Fase de instalação***

A IRA pode ser classificada em fases (Figura 2), sendo a fase de instalação a primeira. Esta fase representa o tempo após o início da glomerulonefropatia, da exposição à nefrotoxina ou da isquemia renal, mas antes do início da azotemia. Ela está associada com aumento crescente do número e da gravidade das lesões glomerulares ou tubulares no decorrer do tempo se a agressão renal não for interrompida. Esta fase ocorre devido a uma lesão glomerular e tubular renal e, geralmente não é detectada, pois os sinais clínicos são ausentes ou mínimos. Caso haja remoção da causa incitante da injúria, logo no início, resultará em rápido retorno à função renal normal (Chew et al., 2011).

##### ***Fase de manutenção***

A fase de manutenção (Figura 2) é caracterizada por um aumento persistente da concentração sérica de creatinina, mesmo após correção de todos os fatores pré-renais (restauração do volume extracelular e débito cardíaco). A entrada nessa fase significa que uma quantidade significativa de injúrias ocorreu nos túbulos renais, que levam a uma redução no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular (TFG). Mesmo se a causa desencadeante da injúria seja identificada e removida, não há retorno imediato da função renal em sua forma normal. Ainda, de acordo com a severidade da lesão, o paciente pode se manter nessa fase (Chew et al., 2011).

##### ***Fase de resolução***

Para os animais que sobrevivem à fase de manutenção, a fase seguinte é a de resolução (Figura 2). Nela a concentração de creatinina sérica pode retornar ao normal, porém isso pode não ser possível em pacientes que passaram por lesão renal irreversível, com perda de néfrons e subsequente fibrose renal, resultando em doença renal crônica. A hipertrofia e hiperplasia renal permitem ao rim restaurar parte do fluxo sanguíneo renal e da TFG, o que auxilia a restabelecer o processo de diurese em pacientes previamente anúricos ou oligúricos (Chew et al., 2011)



Figura 2. Fases da injúria renal aguda (IRA) – Adaptado de Chew et al. (2011)

## 3.2 Biomarcadores convencionais para detecção de insuficiência e de injúria renal aguda

### 3.2.1 Concentração sérica de creatinina

A creatinina é um marcador de função renal que identifica alteração de função excretora. É o produto da degradação de creatina fosfato e creatina que estão presentes nos músculos e alimentos. O volume de distribuição de creatinina corresponde ao volume total de água no corpo (cerca de 600 mL / kg de peso corporal). A creatinina é eliminada pelos rins, por filtração glomerular, com secreção renal e metabolismo extra renal insignificantes, sendo que o valor de sua depuração fornece boa estimativa da TFG. Ela não é afetada diretamente pela desidratação, a menos que seja grave o suficiente para reduzir a TFG. A creatinina produzida é filtrada pelos glomérulos e excretada na urina, sem ser reabsorvida ou excretada novamente pelos túbulos renais (Elliot, 2014). Tem como característica identificar alteração quando a quantidade de néfrons funcionais é inferior a uma faixa de 33 a 25% e que haja uma redução de pelo menos 30% da TFG. Sendo assim, apresenta alterações nos seus valores quando a insuficiência já está instalada ou seja, pode ser considerada um marcador tardio. As elevações das concentrações séricas e diminuição das concentrações urinárias demoram cerca de quatro dias após o processo inicial da injúria. Além disto, não permite a diferenciação de injúria glomerular ou injúria tubular (Barrak e Pressler, 2013).

Para utilizar a creatinina sérica como marcador de referência para avaliar a função renal, deve-se levar alguns pontos em consideração. O aumento da concentração de creatinina deve-se à doença renal, obstrução de uretra e ruptura de bexiga. Porém, é importante considerar outros

fatores. As principais variações interindividuais em cães são a idade e a relação entre massa muscular e peso do corpo. A creatinina plasmática é menor em filhotes que em cães adultos e aumenta progressivamente até alcançar o nível basal de adultos com cerca de um ano de idade. Isso poderia ser potencialmente explicado pelo valor da TFG ser maior em filhotes (Laroute et al., 2005) e, posteriormente, pelo aumento da massa muscular, até o tamanho do adulto ser alcançado. A creatinina é geralmente estável em cães adultos saudáveis com 8 a 10 anos, e depois diminui. A creatinina plasmática aumenta com o peso corporal, relacionando-se também com o estado nutricional do animal, é mais baixa em cães caquéticos e é maior em cães com grande massa muscular (Elliot, 2014). Além disto, a concentração de creatinina sérica também pode ser afetada tanto pelo uso de medicamentos capazes de interferir no transporte da creatinina tubular, como a cimetidina e trimetoprim, bem como se o animal se encontra em estado de catabolismo ou caquexia (Sirota et al., 2011; Urbschat et al., 2011; dos Santos, 2014).

Por ser um marcador de função renal, principalmente, excretora, pode-se considerar que a lesão renal já estava presente ou ocorreu, antes que a creatinina sérica estivesse elevada, já que a injúria precede a redução de função (Finco et al., 1995; Dibartola, 2000). A creatinina tem sido utilizada como marcador padrão para detectar IRA e insuficiência renal. Trata-se de uma análise de baixo custo e a molécula mostra boa estabilidade química para análise (Peres et al., 2013).

### **3.2.2 Concentração sérica de ureia**

A ureia é sintetizada no fígado, pela transformação do nitrogênio em amônia e, posteriormente, em ureia e distribuída pelos fluidos corporais. É eliminada, principalmente, pelos rins, sendo filtrada livremente pelos glomérulos e, grande parte, reabsorvida pelos túbulos. A taxa de reabsorção depende da taxa de fluxo de urina tubular e aumenta à medida que o fluxo urinário diminui (como na desidratação). A reabsorção da ureia, portanto, aumenta em animais desidratados. A concentração sérica de ureia também pode aumentar, quando o catabolismo da proteína é induzido por condições não fisiológicas, ou quando a ingestão de proteína alimentar aumenta. Por isso, as análises de concentrações séricas de ureia só devem ser realizadas em animais em jejum de 10 a 12 horas e hidratados. O aumento na concentração de ureia sérica também pode ser observado em situações de catabolismo protéico, como febre, infecção ou sangramento gastrointestinal (Kerr, 2003; Elliot, 2014).

Valores de concentrações séricas de ureia, abaixo da faixa de normalidade, podem ser observados em cães com dieta hipoprotéica, com insuficiência hepática grave ou quando tratados com esteroides anabolizantes. O aumento, causado por fatores não renais, pode ocorrer devido ao uso de medicamentos como glicocorticóides, agentes antineoplásicos ou tetraciclina, por exemplo. Valores de concentrações séricas de ureia acima da faixa de normalidade, devido a causas pré-renais, renais ou pós-renais, ocorre quando cerca de 66 a 75% dos néfrons de ambos rins apresentam suas funções comprometidas. Assim, pode-se considerar esse marcador tardio, pois é um marcador de função e não de injúria (Finco et al., 1995; Dibartola, 2000; Elliot, 2014).

### **3.3 Renoproteção**

Baseado nas observações dos estudos das nefropatias progressivas estabeleceu-se a correlação entre a magnitude da pressão arterial e a velocidade de declínio da função renal (Brenner et al., 1986). O tratamento da hipertensão arterial sistêmica foi a primeira intervenção que demonstrou reduzir, significativamente, a taxa de progressão da doença renal crônica (DRC). Isso foi bem

observado em estudos em pacientes humanos, diabéticos tipo um e dois, e em não diabéticos com DRC (Parving et al., 1983).

A proteinúria, mais especificamente, a albuminúria decorrente de uma falha da barreira glomerular, é um importante indicador de prognóstico renal visto que, ao reduzi-la, observa-se uma menor velocidade de declínio da função renal (Veado et al., 2011). A demonstração experimental de que o bloqueio da angiotensina II com fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) retardou a perda progressiva da função renal em ratos com doença renal crônica permitiu conceber a possibilidade de não se limitar a acompanhar, passivamente, os pacientes ao seu destino de diálise ou óbito por falência renal. Em vez disso, foi proposta uma estratégia de tratamento cujo objetivo era preservar a função renal o máximo possível. Surgiu o conceito de renoproteção ou nefroproteção, baseado em princípios de controle da pressão arterial e redução da proteinúria (Brenner e Tall, 2000).

Renoproteção, frequentemente, nos remete a um pensamento importante: a terapia com os IECA para retardar a progressão da doença renal. Esses fármacos, certamente, merecem essa reputação (Brenner e Taal, 2000). Partindo desse princípio, entende-se por renoproteção medidas compostas por um conjunto de ações, que atuam de forma associada com o objetivo de prevenir, retardar e controlar a progressão da DRC. O emprego de terapias conservadoras através da utilização de IECA, de antagonistas de angiotensina II, do consumo de proteínas de alto valor biológico, da redução de fósforo e sódio na dieta e da suplementação com ácidos graxos do tipo ômega 3 (Tassini et al., 2011) tem mostrado ser eficazes. O diagnóstico, baseado na identificação de lesão, prescinde essas condutas, pois permite identificar uma injúria antes que haja perda de função renal.

## **Biomarcadores para detecção de injúria renal**

### **Enzimas urinárias**

As células que compõem o arcabouço dos túbulos renais contêm diversas enzimas em diferentes partes de sua estrutura. Por serem originadas de organelas celulares específicas, o aumento na atividade urinária destas enzimas indica a ocorrência de lesão em sua célula de origem, o que garante sua especificidade como marcador (Grauer, 2001). Assim como grande parte das enzimas séricas, possuem peso molecular que não permite que sejam filtradas pelos glomérulos. Em situação normal estas enzimas estão presentes em baixa concentração na urina. Assim, o aumento em sua atividade urinária acima do valor de referência considerado permite a identificação de uma injúria ou mesmo, avaliar o grau de lesão renal indicando, por exemplo, extravasamento ou necrose tubular renal (Grauer e Lane, 1997; Clemo, 1998).

As análises que indicam injúria às células renais, como a dosagem de atividade urinária da Gama-glutamyl-transferase (GGT) e da N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), permitem a detecção de injúrias de forma precoce, em relação àqueles que avaliam funções renais, como a dosagem sérica de ureia e creatinina (Figura 3). O aumento na atividade de enzimas urinárias foi observado em nefropatias induzidas pela gentamicina, em situações nas quais as análises de função renal, indicavam concentrações séricas de ureia e creatinina dentro da faixa de normalidade, o que reforça a capacidade de identificação de injúria pela determinação da atividade urinária dessas enzimas (Morita et al., 1998; Rocha, 2005; Veado, 2005; Van Der Harst et al., 2005; Veado et al., 2010).

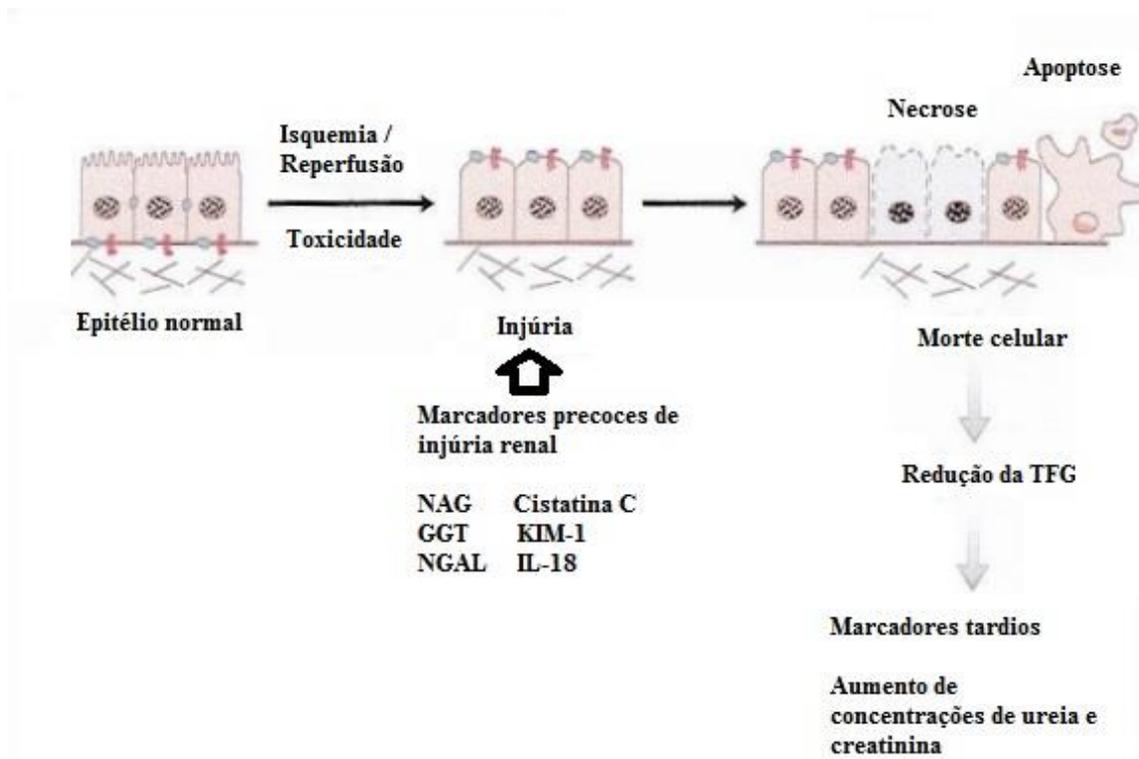


Figura 3. Marcadores de injúria e de função (Adaptado de Vaidya et al., 2008)

Para análises de atividade de enzimas urinárias em seres humanos já existem valores de normalidade para essas enzimas bem definidos. Em medicina veterinária as enzimas urinárias vêm sendo estudadas, porém em alguns casos, seus valores de normalidade ainda não foram bem determinados, como o da N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, ou então os ensaios foram realizados utilizando técnicas e parâmetros para humanos. Além disso, pouco se sabe sobre a relação dessas enzimas com outros marcadores urinários e sanguíneos, ou se sofrem interferência em suas concentrações, por fatores como sexo ou idade (Grauer et al., 1995; Grauer e Lane, 1997; Elliot, 2014; Freitas, 2014).

### *Gama-Glutamil-Transferase*

A Gama-glutamil-transferase (GGT) foi isolada e caracterizada em células renais de homens e animais. É uma glicoproteína de peso molecular entre 90 a 120kDa, dependendo da técnica de isolamento utilizada. A molécula é isolada de vários tecidos do organismo e possui a mesma massa e atividade catalisadora, diferenciando-se apenas pelos pontos isoelétricos. Nos rins é onde ocorre com maior atividade e está localizada nas microvilosidades do túbulo proximal e alça de Henle onde é liberada na urina pela desintegração fisiológica ou não, das células tubulares (Jung e Burchardt, 1992; Melo et al., 2006).

Devido ao seu peso molecular, a GGT não é filtrada através do glomérulo, portanto sua presença na urina reflete perdas a partir das microvilosidades das células tubulares do túbulo proximal (Waldrop, 2008). Em estudos conduzidos com cães expostos a várias drogas potencialmente nefrotóxicas, foi possível realizar a correlação entre atividade de GGT na urina e manifestações morfológicas de injúria renal. Imagens de microscopia eletrônica de biópsias renais dos cães estudados revelaram perda das microvilosidades na célula do túbulo proximal

(Jung e Burchardt, 1992). Variações na atividade urinária da GGT fornecem informações importantes sobre a progressão da lesão tubular, sendo que o aumento de sua concentração acima do valor de normalidade, também pode estar relacionado à lesão glomerular severa, o que permite o aumento da filtração das enzimas séricas. Apesar disso, alguns fatores extrarenais podem influenciar nesta enzímúria, são eles: febre, septicemia, hepatopatias, diabetes, aminoglicosídeos, nefrotoxinas, intoxicação por metais pesados, uso de antiinflamatórios não esteroidais e anestésicos (Freitas, 2014).

Em cães a GGT urinária é considerada não só um marcador precoce de lesão renal, mas também um marcador persistente da mesma (Greco et al., 1985; Rivers et al., 1996). Em cães com nefrotoxicidade induzida por gentamicina, a elevação da atividade da GGT urinária antecedeu o aparecimento de proteinúria e glicosúria (Henneman et al., 1997) e elevações de ureia e creatinina sérica (Veado et al., 2010). Já em cães com lesão renal induzida por anfotericina B, a GGT urinária não teve eficiência como marcador precoce, não apresentando significativa precocidade em relação à ureia e creatinina (Santin et al., 2006).

Melo et al. (2006) avaliaram a capacidade das enzimas urinárias GGT, fosfatase alcalina (FA), lactato desidrogenase (LDH), aspartato (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em indicar, durante o período de 24 horas, IRA devido a uma intoxicação por paracetamol. A GGT, FA e LDH apresentaram concentrações significativamente acima do valor de normalidade ao fim das 24 horas, se comparadas ao momento inicial da avaliação, sendo que o quadro de IRA se instalou em um intervalo de quatro dias após a intoxicação. A avaliação da atividade da GGT, FA e LDH se mostrou como um método eficaz, simples e de baixo custo para determinar IRA.

#### ***N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase***

A N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase é uma enzima lisossomal presente em altas concentrações nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e é estável em urina ácida (Price, 1992). Quando há maior excreção de proteínas nos túbulos renais, há aumento da atividade lisossomal e consequente liberação de NAG (Greco et al., 1985; Rivers et al., 1996; Waldrop, 2008). Seu peso molecular de 140 kDa não permite filtração glomerular; assim sua atividade urinária aumentada é um dos indicadores mais sensíveis de injúria renal (Greco et al., 1985; Grauer, 2001).

A elevada atividade urinária da enzima foi relatada em humanos na injúria renal aguda de etiologia diversa. A atividade de NAG foi comparada à de outros dois marcadores: KIM-1 (glicoproteína transmembrana do tipo um) e a NGAL (Lipocaína associada à gelatinase neutrofílica), sendo avaliada antes e após a realização de cirurgia cardíaca em 77 pacientes, dos quais 28 desenvolveram injúria renal aguda pós-cirúrgica. A NAG apresentou aumento de atividade urinária imediatamente após a cirurgia, seguida pela NGAL e pelo KIM-1, que teve aumento de atividade três horas após o procedimento. A NAG apresentou aumento de atividade precoce e indicou injúria de forma sensível e específica (Katagiri et al., 2012). O aumento da atividade urinária de NAG é observado em indivíduos expostos a drogas potencialmente nefrotóxicas, sendo que isso se deve, provavelmente, à disfunção das células tubulares epiteliais, causada pelo aumento do fluxo proteico no lúmen tubular.

Bazzi et al. (2002), avaliaram a correlação do aumento da atividade de NAG urinária com o valor de proteinúria avaliado em 136 pacientes humanos portadores de glomerulonefrite. Nesse estudo a NAG foi considerada um marcador confiável de toxicidade tubular causada pela

proteinúria no estágio inicial de nefropatia idiopática, glomeruloesclerose e em indivíduos com injúria renal, porém sem alteração de função renal. Nos indivíduos que apresentaram função renal normal, a atividade urinária da enzima estava acima de seu intervalo de normalidade.

Em trabalho realizado por Gonçalves et al. (2008), atividade urinária de NAG foi avaliada em situações de intoxicação por chumbo em humanos, sendo comparada ao ALA-U (Ácido aminolevulínico), indicador biológico de escolha para esses casos. Foram avaliados indivíduos que apresentavam concentração de chumbo no sangue menor que 40mg / dL, intervalo no qual o ALA-U ainda não apresenta aumento de atividade significativo. Ao realizar a análise da urina desse grupo e do grupo controle, a NAG apresentou atividade urinária aumentada nos indivíduos expostos ao chumbo, enquanto o ALA-U mantinha-se dentro de seu intervalo de referência. Já na avaliação do grupo controle, ambos marcadores apresentaram concentrações dentro de seu intervalo de normalidade. Concluiu-se que o aumento da atividade urinária de NAG e o possível efeito subclínico da exposição a baixas concentrações de chumbo podem ser evidenciados antes da alteração da atividade do ALA-U. Assim, o aumento da atividade urinária de NAG indica injúria renal na exposição plúmbica (Gonçalves et al., 2008).

A injúria renal observada na diabetes é caracterizada estruturalmente tanto por lesões glomerulares e nos túbulos intersticiais, como mudanças funcionais, elevando a severidade da microalbuminúria e alterando a TFG (Panchapakesan, et al., 2005; Mogenson et al., 1993). A presença de DRC em diabéticos está aumentando e cerca de 40% dos pacientes necessitam de diálise ou transplante (Friedman e Friedman, 2007). A hiperglicemia é o principal fator metabólico associado ao dano renal irreversível na diabetes mellitus, pois a passagem de concentrações aumentadas de glicose nos túbulos renais leva à injúria renal. Embora a microalbuminúria tenha sido considerada por muito tempo como um marcador importante para a nefropatia diabética, por refletir a perda da seletividade glomerular, a estimativa da função renal tubular e sua integridade podem prover uma sinalização precoce de agressão renal e identificar indivíduos em risco de desenvolver disfunção renal (Whiting e Price, 2001). Kalansooriya et al., (2007) avaliaram a atividade urinária da NAG, em comparação à microalbuminúria e creatinina sérica, em humanos portadores de *diabetes mellitus*. Nesse estudo, em 90% dos pacientes, a NAG apresentou atividade urinária aumentada, enquanto a proteinúria não apresentava concentração significativa e a creatinina se manteve dentro de seu intervalo de normalidade. O resultado é consistente com o papel da NAG como sinalizador precoce de injúria renal.

A atividade urinária aumentada NAG também foi observada em lesões tubulointersticiais causadas por aminoglicosídeos e outras drogas nefrotóxicas (Ring et al., 1998); exposição a cádmio (Bernard e Lauwerys, 1989); uso de meio para contraste (Semerci et al., 2014).

Em 2007, Liangos et al. avaliaram a ação da NAG no monitoramento de pacientes com IRA. O trabalho teve como objetivo comparar a atividade da NAG nesses indivíduos com as concentrações de ureia e creatinina sérica durante seu período de internação e assim avaliar se o paciente estava compensado, se a injúria estava regredindo ou progredindo. Foi determinada a atividade urinária de NAG, ureia e creatinina sérica em 201 pacientes. Os valores obtidos foram correlacionados ao risco de necessidade de procedimento de diálise ou morte desses pacientes. Observou-se que apesar de alguns indivíduos apresentarem concentrações de ureia e creatinina estáveis e não estarem em uremia, a atividade de NAG estava acima de seu valor de normalidade, indicando que a injúria tubular persistia. De 201 pacientes avaliados, 39% necessitaram de diálise e 24% morreram. Dentre os 37% que sobreviveram, 13% receberam alta

hospitalar, porém com a necessidade de manter procedimento de diálise. Os 24% que receberam alta sem necessidade de diálise, apresentaram redução progressiva da atividade urinária de NAG e da concentração de ureia e creatinina. O monitoramento da atividade urinária da NAG mostrou-se como uma ferramenta auxiliar para determinar prognóstico dos pacientes, assim como monitorar a progressão da injúria renal (Liangos et al., 2007).

Em medicina veterinária, a NAG já foi avaliada como biomarcador no desenvolvimento de azotemia em gatos com hipertireoidismo, tratados com metimazol, submetidos a grande risco de apresentarem injúria renal e chegarem ao estágio de doentes renais crônicos. Foram avaliados 24 animais, recém-diagnosticados com hipertireoidismo e não azotêmicos e 10 animais saudáveis. No fim do estudo, os animais foram divididos em três grupos: gatos saudáveis, gatos não azotêmicos e gatos azotêmicos. Os valores de referência de NAG foram determinados para cada grupo, para assim ser possível realizar uma comparação para prever injúria renal e azotemia. Os valores basais de cada grupo foram diferentes, o grupo azotêmico apresentou maior média quando comparado aos outros dois. A NAG apresentou uma capacidade de predição de azotemia de 88,9% nos gatos. A determinação da atividade urinária da NAG demonstrou-se como um recurso para monitorar a injúria renal existente ou mesmo a função renal, permitindo ao clínico ajustar a dosagem do medicamento da melhor e mais segura forma possível (Lapointe et al., 2008).

Em estudo realizado por Jepson et al. (2009), foram monitorados 118 gatos, com mais de nove anos de idade, a cada seis meses ou até que desenvolvessem quadro de azotemia. Avaliou-se a capacidade da creatinina sérica, densidade urinária, NAG, relação proteína:creatinina urinária em prever azotemia nesses animais. Desses animais, 30,5% desenvolveram azotemia. No estudo a NAG foi significativamente maior em gatos que desenvolveram azotemia do que naqueles que não desenvolveram. A enzima também apresentou correlação positiva com os outros parâmetros avaliados, considerando-se a predição de azotemia.

No estudo de Sato et al. (2002) foram avaliados 48 cães. Destes, 28 (18 machos e 10 fêmeas) eram saudáveis e 20 (10 machos e 10 fêmeas) apresentavam injúria renal ou DRC. Dentre os 20 animais doentes, sete eram doentes renais crônicos, dois apresentavam cistite e pielonefrite, quatro cistite, três diabetes e quatro cadelas, piometra. Foram realizadas avaliações da atividade urinária de NAG, urinálise e creatinina sérica desses animais. Os cães com DRC apresentaram aumento da atividade urinária de NAG antes de haver aumento da concentração de creatinina sérica e não houve correlação significativa entre os dois marcadores. Tais observações em cães com DRC estão de acordo com o encontrado entre seres humanos (Powell et al., 1983). Em cães que apresentavam exclusivamente cistite, a concentração de NAG se manteve dentro do intervalo de normalidade, havendo aumento apenas nos casos em que os animais apresentavam cistite e pielonefrite. Concentração de NAG acima do valor de referência também foi observada em seres humanos com pielonefrite (Sherman et al., 1983). Cães com *diabetes mellitus* apresentaram concentração de NAG acima da normalidade quando havia hiperglicemia e presença de glicose e corpos cetônicos na urina, responsáveis por causar injúria em células tubulares, o que está de acordo com o observado em humanos (Patrick et al. 1990; Kalansooriya et al., 2007). Cadelas com piometra apresentaram concentração de NAG maior que o valor de normalidade antes da ovariectomia e após o procedimento entraram em quadro de insuficiência renal. Cadelas que apresentaram atividade urinária de NAG dentro do valor de referência antes da cirurgia mantiveram a função renal normal após o procedimento. O monitoramento da atividade urinária de NAG mostrou-se eficaz como sinalizador eficaz em quadro de IRA induzida por endotoxemia em piometra. Os autores, então concluíram que a

avaliação da atividade urinária de NAG foi importante para o monitoramento de injúria tubular em estágio inicial em cães.

### **3.3.1 Outros biomarcadores precoces de injúria renal**

#### *Cistatina C*

A cistatina C é uma proteína de baixo peso molecular (13 kDa), com 122 aminoácidos não glicosilada, sintetizada por um gene expresso em todas as células nucleadas em ritmo constante de produção. Portanto, mesmo em processos infecciosos, a sua concentração sérica depende fundamentalmente da TFG e não da massa muscular, estado nutricional, sexo ou febre. Em cães, ela foi identificada principalmente no soro, líquido cefalorraquidiano, glândulas parótidas, rins e sistema nervoso central (Prates et al., 2007). Devido à sua estabilidade, a cistatina C é um marcador para a estimativa da função glomerular em pacientes caquéticos ou com IRA, em que a creatinina sérica poderia subestimar a verdadeira função renal. No entanto, a cistatina C não é considerada um biomarcador de IRA primário (Herget-Rosenthal et al., 2004; Urbschat et al., 2011).

Devido à sua pequena massa molecular e à sua carga positiva, em pH fisiológico, a cistatina C é livremente filtrada pelos glomérulos, sendo quase totalmente removida da circulação, e metabolizada nos túbulos contorcidos distais, onde ocorre reabsorção quase completa (99%) pelas células tubulares, e posterior degradação enzimática dentro dos lisossomos. A cistatina C, então não é excretada na urina nem retorna à corrente circulatória (Royakkers et al., 2011). Sendo assim, esse marcador endógeno poderia estimar a TFG sem a necessidade de dosagem urinária, dispensando a coleta repetida de urina e solucionando um dos principais problemas dos outros marcadores endógenos da TFG (Schwartz e Furth, 2007). A cistatina C, quando comparada com a creatinina sérica, tem melhor acurácia e é considerada um melhor marcador para estimar a TFG em indivíduos com pequenas perdas de função renal (Camargo, 2011).

Em um estudo em cães, o sexo não influenciou na concentração de cistatina C plasmática. Em relação ao peso, os maiores valores de cistatina C foram observados nos cães acima de 15 Kg (Braun et al., 2002). Estudos sugerem que o volume renal diminui em pacientes idosos, acarretando diminuição na TFG e na perfusão renal. Dessa forma, a cistatina C é considerada como melhor marcador de função renal do que a creatinina sérica em idosos (a qual tem sua concentração reduzida devido à menor massa muscular) (Prates et al., 2007).

Braun et al. (2002) mensuraram a cistatina C sérica em 179 cães clinicamente saudáveis utilizando método de avaliação para a cistatina C humana. Os autores também observaram aumento nas concentrações de cistatina C em alguns cães que apresentaram sinais clínicos de insuficiência renal e que tinham concentrações de creatinina nos níveis normais ou discretamente aumentadas e concluíram que a cistatina C pode auxiliar a discriminar elevações limítrofes de creatinina plasmática quando a insuficiência renal é suspeita.

Segundo Braun et al. (2002) os tumores devem ser investigados quanto aos efeitos sobre a concentração de cistatina C em cães. O uso de doses elevadas de corticoides tem sido associado ao aumento da produção de cistatina C e elevação de seus níveis séricos, o que resulta em uma subestimativa da TFG devido à elevação da cistatina C (Camargo, 2011). Entretanto, Okay (2002) afirma que somente a metilprednisolona aumenta os níveis de cistatina C, enquanto que a ciclosporina causa a sua diminuição. A cistatina C também é influenciada pela ação dos

hormônios tireoidianos. Possivelmente essa interferência ocorre por influência direta do hormônio tireoidiano na taxa de produção desta proteína. Assim, ao contrário do que acontece com a creatinina, os níveis de cistatina são mais baixos no hipotireoidismo e mais elevados no hipertireoidismo (Novo, 2009). Possíveis explicações para esses achados baseiam-se nos efeitos dos hormônios tireoideanos sobre a hemodinâmica renal, a homeostase renal de sal e água e o transporte tubular ativo de sódio, potássio e íons hidrogênio (Gabriel et al., 2011).

Apesar de ser reconhecidamente um avanço da medicina laboratorial, a dosagem de cistatina C ainda é muito pouco utilizada. Na medicina veterinária a cistatina C tem sido utilizada somente na pesquisa e existem poucos estudos a respeito de sua eficiência como marcador precoce de função renal, especialmente no contexto da doença renal crônica (Braun et al. 2002). A maioria dos estudos avalia o desempenho da cistatina C comparando-a com a creatinina e não com marcadores diretos da taxa de filtração glomerular. A mensuração direta da taxa de filtração glomerular, independente de creatinina, é importante para a correta avaliação do desempenho da cistatina C. Sabe-se que a creatinina possui várias limitações como a produção de creatinina pelas células tubulares e o conseqüente erro de estimativa da TFG (Lofberg e Grubb, 1979). Além disso, os valores de referência da cistatina C para cães citados pela literatura possuem alta discrepância. São necessários novos estudos com maior número de animais, que avaliem a cistatina C em diferentes populações de cães, assim como em diferentes nefropatias. Os custos para a análise ainda são considerados elevados, o que limita o seu uso na prática clínica, e alguns fatores como disfunções tireoidianas, obesidade, uso de corticosteróides e inflamação, podem interferir nos seus níveis séricos (Peres et al., 2013).

### ***Kim-1***

A KIM-1 (Molécula de injúria renal) é uma glicoproteína transmembrana do tipo um, com um domínio de imunoglobulina e mucina que não é detectável em tecido renal normal ou urina, mas é expresso em níveis muito elevados em células diferenciadas do epitélio tubular proximal renal após lesão isquêmica ou tóxica. O KIM-1 foi encontrado marcadamente aumentado após 24 a 48 horas no túbulo proximal do rim pós-isquêmico do rato. Uma forma solúvel de KIM-1 humana pode ser detectada na urina de pacientes com necrose tubular aguda e pode servir como um biomarcador útil na lesão tubular proximal renal, facilitando o diagnóstico precoce da doença e servindo como um diferencial do local de injúria renal (Ichimura et al., 2008).

Além disso, alta expressão urinária de KIM-1 foi avaliada prospectivamente em uma coorte de 201 pacientes humanos hospitalizados com IRA e também foi associada com o resultado clínico adverso (morte e necessidade de diálise) em pacientes com esse quadro. Embora o gene KIM-1 ou a expressão da proteína seja indetectável no rim normal, após lesão o ácido ribonucléico mensageiro KIM-1 é rapidamente sintetizado e a proteína gerada é localizada em altos níveis na membrana apical do túbulo proximal (Sirota et al., 2011; Urbschat et al., 2011). Em humanos com IRA isquêmica e tóxica, a proteína KIM-1 é encontrada em todos os três segmentos do túbulo proximal. Há um número de características que poderiam torná-lo um atraente biomarcador de lesão renal, tais como: ausência de expressão KIM-1 no rim normal, a sua marcada expressão aumentada e a inserção na membrana apical do túbulo proximal e a sua persistência na célula epitelial até que a célula se recupere completamente (Sirota et al., 2011; Urbschat et al., 2011).

### ***Interleucina-18***

A interleucina-18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória que é constitutivamente expressa nas células intercaladas do túbulo contorcido distal e do túbulo coletor. Além disso, essas células contêm três componentes principais necessários para a liberação desta citocina ativa e pró-inflamatória, a chamada pró-IL-18, o P2X7, e a cisteína protease intracelular caspase-1, a qual converte a pró-forma da IL-18 na sua forma ativa, o que, em seguida, sai da célula tubular para o lúmen e aumenta seus níveis urinários na IRA (Uchino et al., 2005).

Em um estudo em humanos com várias doenças renais, os níveis urinários de IL-18 foram significativamente maiores e tinham uma sensibilidade e especificidade elevadas para o diagnóstico de necrose tubular aguda, em comparação com infecção urinária, doença renal crônica e função renal normal entre indivíduos saudáveis e indivíduos controle. A IL-18 pode servir como um marcador para lesão tubular proximal em necrose tubular aguda. Além disso, estava significativamente elevada antes do aumento da creatinina sérica em pacientes com insuficiência respiratória aguda/síndrome da angústia respiratória que desenvolveram IRA, prevendo mortalidade no período de ventilação mecânica (Ichimura et al., 2008).

O aumento da atividade da IL-18 na urina correlaciona-se com a gravidade da injúria renal, bem como com a mortalidade. No entanto, em análise prospectiva, a IL-18 não demonstrou capacidade de prever o posterior desenvolvimento da IRA. Considerando-se a IL-18 ser uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel importante na sepse, concentrações de IL-18 podem também ser influenciadas por um número de variáveis coexistentes, tais como endotoxemia, doenças inflamatórias, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, hepatite e esclerose múltipla. Assim, suas propriedades pró-inflamatórias e seus níveis elevados na doença inflamatória podem limitar a sua aplicação em termos de sensibilidade e especificidade (Urbschat et al., 2011).

### ***Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL)***

A Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica é uma glicoproteína da família lipocalina, de 25 kDa. É expressa em baixos níveis em vários tecidos humanos, incluindo pulmão, estômago, cólon e células epiteliais localizadas no túbulo proximal. Foi identificada como uma das mais rápidas proteínas formadas por expressão aumentada de genes na fase precoce do rim pós-isquêmico em modelo animal utilizando ratos, sendo detectada na primeira amostra de urina dentro de duas horas após isquemia, exibindo níveis aumentados correlacionados com a duração da isquemia. Além disso, foi amplamente detectável na urina de ratos com nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. Uma meta-análise de dados de 19 estudos, incluindo 2500 pacientes de estudos observacionais, foi realizada para estimar o diagnóstico e prognóstico preciso da NGAL e seu valor na IRA. A população, que incluía adultos e crianças foi estudada em uma variedade de condições. A IRA mais frequentemente investigada foi após cirurgia cardíaca, seguida por IRA em pacientes criticamente doentes e depois expostos aos meios de contraste para angiografia coronariana (Haase et al., 2009).

A NGAL foi encontrada como um preditor útil na fase precoce da IRA, que funcionou bem com amostras de urina ou plasma. Além disso, o nível de NGAL teve valor prognóstico para desfechos clínicos, como a necessidade de diálise e na mortalidade. Infelizmente, a grande produção extrarrenal em resposta ao estresse sistêmico pode aumentar a sua excreção urinária

na ausência de IRA, bem como, pode aumentar na doença renal crônica e não apenas na aguda, o que pode confundir sua interpretação (Urbschat et al., 2011).

NGAL é agora reconhecido como um biomarcador útil e preciso de lesão renal aguda em humanos (Sirota et al., 2011 e Urbschat et al., 2011). Também tem se mostrado altamente preciso para detectar a IRA e inflamação em modelos animais (Ichino et al., 2009). Recentemente, NGAL demonstrou ser um biomarcador sensível na detecção da IRA em cães submetidos a diferentes tipos de cirurgias e experimentalmente num modelo canino submetido a nefrotoxicidade com gentamicina (Lee et al., 2012; Kai et al., 2013).

O desempenho de biomarcadores para IRA é modificado pelos métodos de determinação utilizados e pelas características da população de pacientes estudados. A maioria dos resultados da NGAL descrita na literatura têm sido obtidos por meio de pesquisas baseadas em ensaios com o método de ELISA, o qual não é prático no ambiente clínico. A implantação global da padronização de valores laboratoriais é altamente promissora para uma interpretação mais uniforme dos resultados. De fato, diferentes níveis de corte para NGAL urinária foram descritos (mais de 10µg, mais de 60µg, e mais de 100µg) para identificar pacientes que irão potencialmente desenvolver IRA (Schiffl et al., 2012).

Existem algumas limitações para o valor da NGAL como um preditor de doença renal aguda e sua gravidade. Os níveis de NGAL parecem ser mais sensíveis e específicos na previsão de IRA em estudos de pacientes homogêneos, com uma única injúria aguda, facilmente identificável e com previsíveis insultos nefrotóxicos, tais como a circulação extracorpórea ou contraste intravenoso. A NGAL parece ser menos sensível e específica em estudos com causas multifatoriais para IRA. Também não está claro se níveis da NGAL podem diferenciar causas potencialmente reversíveis de IRA, por exemplo, diferenciar uma azotemia pré-renal de uma lesão mais grave nos rins. Os níveis da NGAL parecem prever IRA em crianças com melhor precisão do que em adultos, que compõem a grande maioria dos pacientes com IRA. Os níveis plasmáticos de NGAL também são maiores em pacientes com DRC subjacente e, na maioria das pesquisas clínicas, a NGAL exclui os pacientes com DRC da análise. Esta exclusão é uma questão de confusão, porque DRC é um importante fator de risco para IRA, particularmente no ambiente de cuidados intensivos. Em estudo prospectivo de mais de 25.000 pacientes com lesão renal aguda, mais de 30% tinham DRC subjacente (Uchino et al., 2005; Shemin et al., 2011).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi constituído de três etapas. A 1ª etapa foi dedicada à padronização da técnica de avaliação da atividade urinária de NAG para cães hípidos de diferentes raças, sexo e faixas etárias. A 2ª etapa compreendeu a seleção de 60 cães hípidos que tiveram amostras de urina coletadas para determinação da atividade de NAG e, com estes valores, determinar, por análise estatística, um intervalo de confiança médio para a atividade desta enzima. Por fim, na 3ª etapa foi avaliada a estabilidade urinária da NAG, em diferentes temperaturas (Figuras 4 e 5).

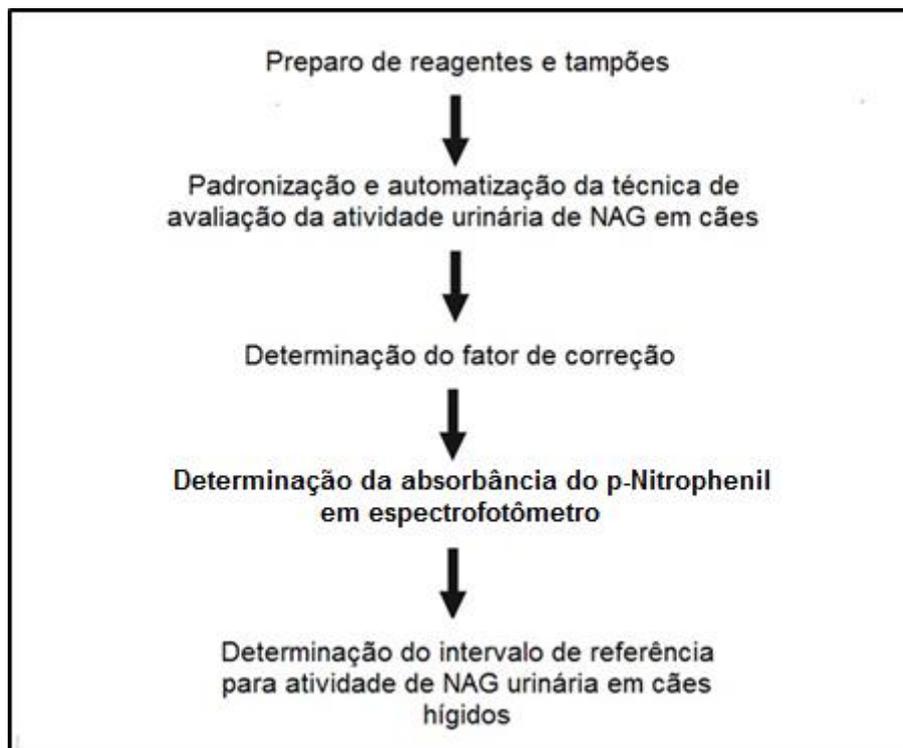


Figura 4. Fluxograma de atividades – Padronização da técnica para determinação de NAG urinária em cães e determinação de intervalo de referência

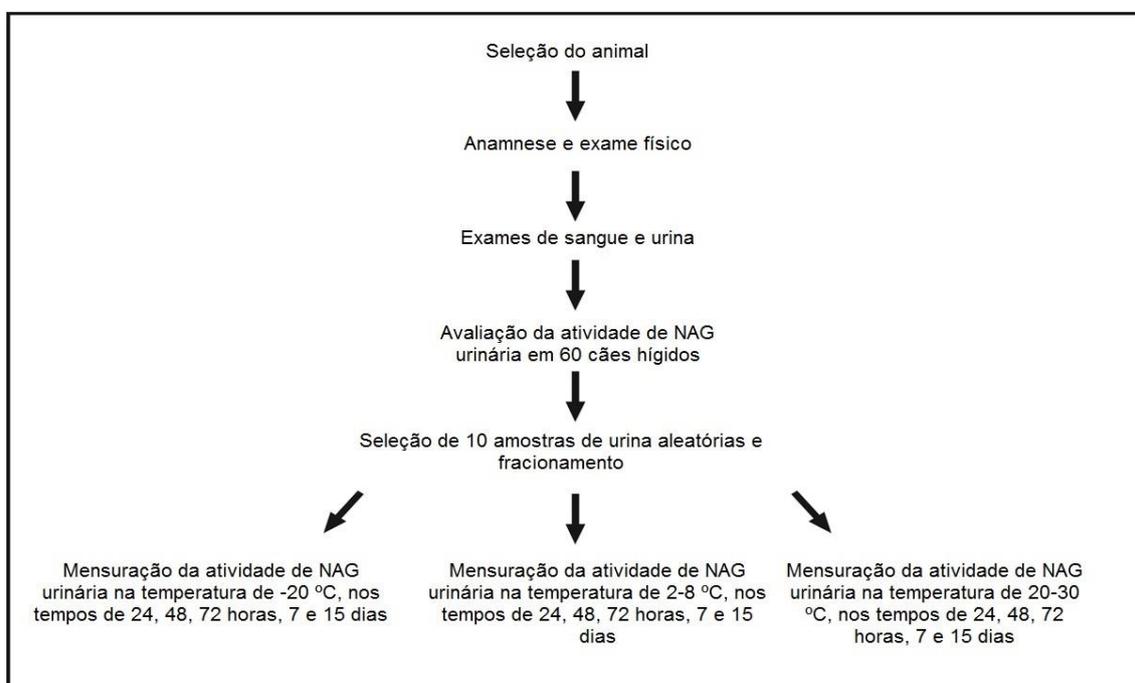


Figura 5. Fluxograma de atividades da 2ª e 3ª etapas do experimento

## 4.1. Padronização da técnica de avaliação da atividade urinária de NAG

### 4.1.1. Local de execução

A padronização da técnica de avaliação da atividade urinária de NAG em cães hípidos de diferentes raças, sexo e faixas etárias, assim como sua estabilidade em diferentes temperaturas, foi realizada nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte, Minas Gerais.

### 4.1.2. Preparo de soluções reagentes

As especificações dos reagentes utilizados para o preparo das soluções de trabalho estão descritas no quadro 3.

Quadro 3. Reagentes utilizados para a padronização da técnica de mensuração da atividade da NAG em cães.

| Reagente                           | Especificações   | Concentração   | Solvente  | Temperatura de conservação |
|------------------------------------|--|--|---|----------------------------|
| Ácido Cítrico Monohidratado        | PA – Sigma Aldrich - Vetec® - Lote DCBB4909                                | 0,2 mol/litro  | Água destilada  | 4°C                        |
| Citrato de sódio Anidro            | PA – Sigma Aldrich - Vetec® - Lote DCBB4266                                | 0,2 mol/litro  | Água destilada  | 4°C                        |
| N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) | Pureza ≥ 99 %; impurezas totais ≤ 0,05 % - Sigma Aldrich® - Lote SLBB4917V | 10 mmol/litro  | Tampão citrato de sódio pH 4,4                          | -20°C                      |
| Hidróxido de Sódio (NaOH)          | PA – Teor 97 % - Synth® - Lote 180311                                      | 4 mol/litro  | Água destilada  | 4 °C                       |
| Ácido Clorídrico (HCl)             | PA - Vetec® - Lote DCBC3237  | 10,5 mol/litro   | Água destilada  | 4°C                        |
| 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP)  | Teor 93-97 % - Sigma Aldrich® - Lote MFCD00008051                          | 0,75 mol/litro   | Água destilada  | 4°C                        |
| p-Nitrophenol                      | Sigma Aldrich® - Lote MKBK3825V  | 0,0696 gramas<br>0,1392 gramas<br>0,2088 gramas<br>0,6960 gramas | Água destilada e solução tampão citrato de sódio pH 4,4 | 4°C                        |
| Solução tampão pH 4,0              | Synth® - Lote 180464   | -  | -   | 4°C                        |
| Solução tampão pH 7,0              | Synth® - Lote 170456   | -  | -   | 4°C                        |
| Solução tampão pH 9,0              | Synth® - Lote 17059  | -  | -   | 4°C                        |

#### 4.1.3. Preparo da amostra de urina

No momento da análise, as amostras de urina eram retiradas da temperatura de refrigeração e centrifugadas em centrífuga de macrotubos durante 5 minutos a 2000 RPM, em tubos cônicos a 37°C, para então, se utilizar o sobrenadante.

#### 4.1.4. Técnica automatizada para determinação da atividade de NAG urinária

A determinação da NAG urinária foi baseada no método descrito por Maruhn (1976) e Horak et al. (1981) por espectrofotometria, porém, adaptada para automação (Figura 6) em aparelho de bioquímica (Cobas Mira Plus- Roche) (Figura 7). A amostra de urina foi pré-aquecida até atingir 37°C e, então, adicionada a uma solução contendo o substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidase dissolvido em solução tampão de citrato de sódio 0,2 mol/L (pH 4,4). A mistura resultante foi incubada a 37°C por 15 minutos para que ocorresse a hidrólise enzimática do substrato com liberação do íon p-nitrofenilato. Este método executado representa a técnica com monoreagente. Para avaliação da técnica com bireagente a ação enzimática foi interrompida com a adição de solução tampão AMP (2-amino-2-metil-propano-1-ol), 0,75 mol/L (pH 10,25), levando à liberação do íon p-nitrofenilato.

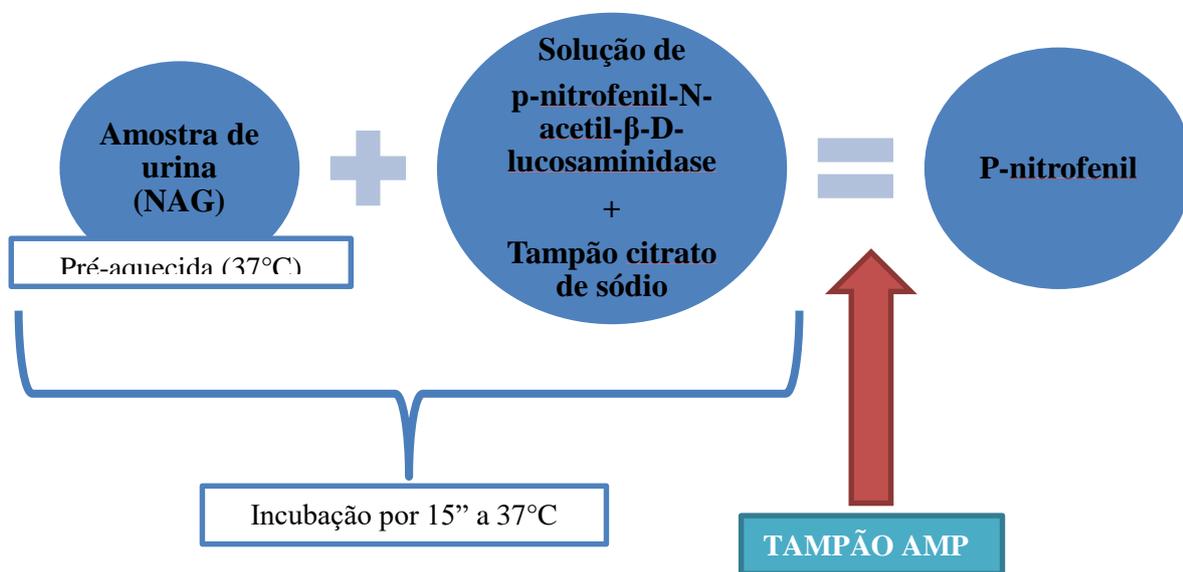


Figura 6. Tratamento de amostras de urina para realização da técnica automatizada para análise da atividade de NAG urinária em cães



Figura 7. Aparelho de bioquímica Cobas Mira Plus®

Quadro 4. Programação utilizada do aparelho de bioquímica Cobas Mira Plus® antes da determinação do fator de correção específico por espectrofotômetro

| <b>GENERAL</b>   |          |
|------------------|----------|
| MEASUREMENT MODE | ABSORB   |
| REACTION MODE    | R-S-SR1  |
| CALIBRATION MODE | FACTOR   |
| REAGENT BLANK    | REAG/DIL |
| CLEANER          | NO       |
|                  |          |
| WAVELENGTH       | 405 nm   |
| DECIMAL POSITION | 2        |
| UNIT             | U/l      |
|                  |          |
| <b>ANALYSIS</b>  |          |
| POST DIL. FACTOR | 2.00     |

|                    |            |
|--------------------|------------|
| CONC. FACTOR       | NO         |
| SAMPLE CYCLE       | 1          |
| VOLUME             | 25.0 µl    |
| DILUENT NAME       | H2O        |
| VOLUME             | 10.0 µl    |
| REAGENT CYCLE      | 1          |
| VOLUME             | 100 µl     |
| START R1 CYCLE     | 8          |
| VOLUME             | 50.0 µl    |
| DILUENT NAME       | H2O        |
| VOLUME             | 10.0 µl    |
| <b>CALCULATION</b> |            |
| SAMPLE LIMIT       | NO         |
| REAC. DIRECTION    | INCREASE   |
| CHECK              | ON         |
| CONVERS. FACTOR    | 1.00000    |
| OFFSET             | 0.0000     |
| TEST RANGE LOW     | 0.00 U/l   |
| HIGH               | 200.00 U/l |
| NORM. RANGE LOW    | 0.00 U/l   |
| HIGH               | 3.20 U/l   |
| NUMBER OF STEPS    | 1          |
| CALC. STEP A       | ENDPOINT   |
| READINGS FIRST     | 7          |
| LAST               | 15         |
| <b>CALIBRATION</b> |            |
| CALIB. INTERVAL    | ON REQUEST |
| <b>BLANK</b>       |            |
| REAG. RANGE LOW    | NO         |
| HIGH               | NO         |
| BLANK RANGE LOW    | NO         |
| HIGH               | NO         |
| FACTOR             | 1000.00    |
| <b>CONTROL</b>     |            |
| CS1 POS            | NO         |
| CS2 POS            | NO         |
| CS3 POS            | NO         |

#### **4.1.5. Determinação do coeficiente de absorvidade (absorbância) em espectrofotômetro Thermo Plate ® TP Analyzer**

Para a leitura em espectrofotômetro, utilizou-se um aparelho Thermo Plate ® TP Analyzer, para leitura semiautomática (Figura 8), assim como soluções de estoque de p-Nitrofenol, já com a adição de 9,9 mL de tampão citrato de sódio, pH 4,4. Foram realizadas leituras em triplicata, para cada solução, a 405 nm, com o aparelho zerado com o pH do tampão AMP, de 10,25. A absorbância determinada permite o cálculo do fator de correção real, em pH adequado.



Figura 8. Aparelho para espectrofotometria semiautomática Thermo Plate® TP Analyzer

#### 4.1.6. Determinação do fator de correção, a partir do coeficiente de absortividade

O fator de correção foi determinado a partir da leitura realizada pelo espectrofotômetro da absorbância do íon p-Nitrofenilato, a 405nm. Calculou-se uma média entre os resultados de absorbância obtidos para as triplicatas. Este valor foi colocado na fórmula para determinação de fator de correção:

$$F = \frac{Vt \times 1000}{Va \times \epsilon \times l}$$

Onde:

- “*F*” é o fator de correção
- “*V<sub>t</sub>*” é o volume total, representado pela soma do volume da amostra, com o volume de reagente e o volume de diluente
- “*V<sub>a</sub>*” é o volume da amostra
- “*ε*” é coeficiente de absortividade
- “*l*” é o caminho óptico

#### 4.2. Determinação do intervalo de confiança médio de atividade urinária de NAG em cães hígidos

##### 4.2.1. Local de execução

A seleção dos cães, exames de triagem e anamnese foram realizados nas dependências da Clínica Veterinária Vetmaster, situada em Belo Horizonte, Minas Gerais.

##### 4.2.2. Seleção dos animais

Foram selecionados 60 cães hígidos (*Canis familiaris*) com idade entre três meses e 15 anos de idade, clinicamente saudáveis, de diferentes raças, ambos os sexos, castrados ou inteiros, provenientes de tutores particulares e de grupos de apoio a cães abandonados da região metropolitana de Belo Horizonte. Os 60 cães incluídos no estudo preencheram todos os pré-

requisitos estabelecidos, a partir de um questionário de anamnese (Anexo 2) e realização de exames clínicos, laboratoriais e ultrassonografia; e aqueles que seus proprietários, depois de devida orientação, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os proprietários dos animais tiveram o direito de retirá-los do experimento a qualquer instante.

Os critérios para inclusão dos animais foram:

- Residir na região metropolitana de Belo Horizonte.
- Não estar gestante ou lactante.
- Estar clinicamente hígido no momento do exame clínico e coleta de amostras de sangue e urina.
- Não ter sido submetido ao uso de medicações potencialmente nefrotóxicas nos últimos 4 meses.
- Ter concentrações séricas de ureia, creatinina, GGT, fósforo, proteínas totais e frações e potássio dentro dos intervalos de referência para a espécie.
- Não apresentar alterações hematológicas classificadas como patológicas.
- Não apresentar alterações no exame de urina de rotina classificadas como patológicas.
- Apresentar relação proteína/creatinina urinária menor ou igual a 0,25.

Os animais que não atenderam a todos os requisitos necessários foram excluídos do projeto.

#### 4.2.3. Divisão dos grupos

Os animais foram divididos em três grupos (Quadro 5).

Quadro 5. Divisão de grupos entre os animais participantes do experimento

| Grupo | n Total* | Tamanho a amostra segundo sexo |        | Idade (anos) |
|-------|----------|--------------------------------|--------|--------------|
|       |          | Machos                         | Fêmeas |              |
| I     | 20 cães  | 10                             | 10     | 1 - 2        |
| II    | 20 cães  | 10                             | 10     | 3 - 7        |
| III   | 20 cães  | 10                             | 10     | >7           |

Neste experimento foram avaliados animais de diferentes raças, pesos, sexo e faixa etária. Os cães apresentam grande diferença em termos de desenvolvimento, provavelmente devido a diferença entre raças, ou mesmo cães sem raça definida. Assim, animais com mesma idade cronológica podem não se encontrar no mesmo estágio de desenvolvimento ósseo ou de maturidade sexual (Merck, 1992). Os grupos foram classificados com parâmetros mais específicos e individuais para cada animal, já que é inviável generalizar a estimativa de idade entre os cães. A classificação do grupo I foi realizada com base no período médio estimado para fechamento de placas epifisárias (Pereira, 2010). A divisão dos grupos II e III foi realizada com base em avaliação do desgaste de arcada dentária dos animais (Merck, 1992; Cameriere et al., 2007).

O cão adulto possui 42 dentes (20 na mandíbula superior e 22 na inferior). A fórmula dentária da dentição definitiva do cão é: 6 incisivos, 2 caninos, 8 pré-molares e 4 molares (mandíbula superior); 6 incisivos, 2 caninos, 8 pré-molares e 6 molares (mandíbula inferior) (Figura 9). Os dentes decíduos, ou “dentes de leite”, surgem a partir do 20º dia, até a 5ª semana. Em seguida, todos os dentes de leite serão substituídos pelos definitivos, entre o 4º e o 7º mês (Quadro 6)

(Gioso, 2007). Estes parâmetros foram seguidos para classificar os cães até sete meses de idade. Os períodos de erupção e muda dentária podem variar de acordo com a raça do animal.

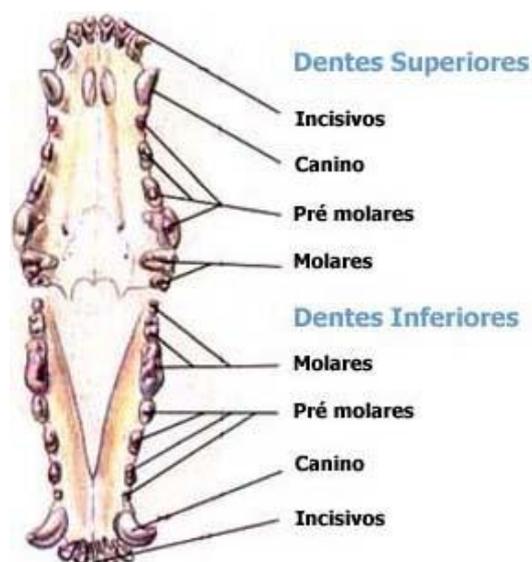


Figura 9. Figura esquemática da dentição dos cães utilizada para classificar os animais do experimento entre grupos etários (Adaptado de: Emily, 1994)

Quadro 6. Idade de erupção dos dentes decíduos e muda para dentição definitiva

| Dentes      | Decíduos – Erupção             | Definitivos – Muda |
|-------------|--------------------------------|--------------------|
| Incisivos   | 3 – 5 semanas                  | 4 – 5 meses        |
| Caninos     | 3 – 4 semanas                  | 4 – 6 meses        |
| Pré-molares | 3 – 12 semanas                 | 5 – 6 meses        |
| Molares     | 5 – 7 (primeiro os inferiores) |                    |

Fonte: Gioso (2007)

A classificação de cães com idade superior a sete meses de idade foi realizada levando em consideração a anamnese com o proprietário, exame clínico e a seguinte classificação quanto à avaliação do desgaste natural de arcada dentária (Quadro 7).

Quadro 7. Desgaste natural de arcada dentária, a partir de 8 meses de idade.

| Faixa etária                             | Desgaste de arcada dentária  |
|--|--|
| Após 7 meses e até 1 ano e meio de idade | Dentes brancos e limpos  |
| De 1 ano e meio até 2 anos de idade      | Molares amarelados   |
| De 3 a 5 anos de idade                   | Todos os dentes podem mostrar sinais de desgaste, amarelados e alguma evidência de placa ou doença periodontal |
| De 5 a 10 anos de idade                  | Dentes desgastados e amarelados. Doenças periodontais podem estar presente                                     |
| De 10 a 15 anos de idade                 | Dentes bastante desgastados e amarelados. Presença intensa de tártaro; alguns dentes ausentes                  |

Fonte: Gioso (2007)

#### 4.2.4. Realização de exames, coleta de material e envio para análise

Após a seleção por meio da anamnese, os cães foram submetidos a exame físico completo, para verificar a existência de alteração clínica (Anexo 1). Para avaliação dos parâmetros vitais dos animais, foram aferidas as frequências respiratória, cardíaca e de pulso, além da temperatura corporal, tempo de preenchimento capilar, bem como avaliação de coloração de mucosas aparentes, grau de hidratação e verificação de linfonodos palpáveis.

O exame físico incluiu também exame torácico, por meio de inspeção, palpação, auscultação; exame abdominal por palpação e percussão; além de exame otoscópico e inspeção geral da pele para pesquisa de ectoparasitas e/ou lesões dermatológicas (Stephen e Sherding, 1998).

Após exame físico completo, todos os animais foram pesados (Figura 10), submetidos à avaliação (duplo-cego) de escore de condição corporal (ECC) e classificados em uma escala de um a cinco pontos (Quadro 8). A avaliação duplo-cego foi realizada com o auxílio de outro médico veterinário, que avaliava o animal no momento do exame físico inicial.



Figura 10. Pesagem dos animais

Quadro 8. Classificação de escore de condição corporal.

| ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL |       |       |           |       |
|-----------------------------|-------|-------|-----------|-------|
| 1                           | 2     | 3     | 4         | 5     |
| Muito magro                 | Magro | Ideal | Sobrepeso | Obeso |

Fonte: Castro et al. (2010)

Para a coleta de material para análises sanguíneas (Quadro 9) os animais foram manualmente contidos e a focinheira foi utilizada (Figura 11) para evitar estresse ou acidentes durante a manipulação do animal.



Figura 11. Coleta de sangue por acesso venoso central

As amostras de sangue foram coletadas utilizando-se seringa de 5ml com agulha de 25 x 0,7 mm, realizado a flebotomia na veia jugular, após a antissepsia prévia com álcool 70%. Os animais estavam com jejum alimentar de 8 horas e as amostras foram acondicionadas em tubos contendo EDTA e em tubo sem anticoagulante.

Os frascos foram identificados logo após a obtenção do material. As amostras com EDTA foram refrigeradas (entre 2 e 8°C) em conjunto com as amostras sem anticoagulante (após sofrerem retração completa do coágulo), até serem levadas ao laboratório, no prazo máximo de 12 horas.

Quadro 9. Análises de Sangue e Urina realizados em todos os cães participantes do estudo.

| <b>Analito</b>                  | <b>Metodologia e Equipamento / Kit de diagnóstico</b>  |
|---------------------------------|--|
| Hemograma                       | Impedância - Abacus Vet Jr <sup>®</sup> / Diatron, com contagem diferencial em esfregaço sanguíneo corado por panótico (LaborClin <sup>®</sup> )   |
| Proteína total e frações        | Colorimetria- Cobas Mira Plus <sup>®</sup> - Roche/ Synermed <sup>®</sup>  |
| Ureia                           | Colorimetria- Cobas Mira Plus <sup>®</sup> - Roche / Synermed <sup>®</sup>   |
| Creatinina                      | Colorimetria- Cobas Mira Plus <sup>®</sup> - Roche / Synermed <sup>®</sup>   |
| Fósforo                         | Colorimetria- Cobas Mira Plus <sup>®</sup> - Roche / Synermed <sup>®</sup>   |
| Potássio                        | Química Seca / Analyst II- Rotor Vet 16 - Hemagen <sup>®</sup>   |
| Leishmaniose                    | ELISA e RIFI / Biogene <sup>®</sup>  |
| Babesiose / Erliquiose          | ELISA / Biogene <sup>®</sup>   |
| Urinálise                       | Fita de urinálise/ Uroteste <sup>®</sup> , microscopia óptica (sedimentoscopia)  |
| Proteína:Creatinina<br>Urinária | Proteína - Sensiprot Colorimétrico (Vermelho de piragolol) - Doles Creatinina - Colorimétrico (Picrato alcalino - Jaffé) / Synermed <sup>®</sup><br>Cobas Mira Plus <sup>®</sup> - Roche |

As amostras de sangue em tubo contendo EDTA foram homogeneizadas durante 15 minutos. Amostras dos tubos sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação a 3800 RPM durante 10 minutos e logo após separado o soro que foi acondicionado individualmente em eppendorf de 3 ml devidamente identificados.

Para o hemograma, foi realizada contagem celular total (RBC e WBC) e determinação do Volume globular (VG%) e dos índices hematimétricos (VCM e CHCM). A contagem diferencial de leucócitos foi feita em esfregaço sanguíneo corado por panótico (LaborClin<sup>®</sup>). Foram avaliadas 100 células sob imersão em microscópio óptico Nikon, sob aumento de 1000 vezes.

As amostras de urina foram homogeneizadas e logo em seguida mensurada a densidade urinária em refratometria e realizado o teste com fitas reagentes para uroanálise (Quadro 9). Os volumes restantes das amostras foram centrifugados em centrífuga de macrotubos durante 5 minutos a 2000 RPM, em tubos cônicos, onde separou-se o sobrenadante ficando o sedimento com quantidade aproximada de 0,3 mL. Para o exame microscópico foram utilizadas alíquotas de 10µL do sedimento, entre lâmina microscópica e lamínula de 20 x 20 mm, com contagem média de cinco campos aleatórios, sem o emprego de corantes específicos para identificação dos elementos figurados da urina. O sobrenadante foi utilizado para as determinações bioquímicas no equipamento de semiautomação Cobas Mira Plus<sup>®</sup> – Roche.

Para as análises de urina (rotina e relação proteína:creatinina urinária), a coleta foi realizada por cistocentese (Figura 12), com frasco coletor de urina acoplado em agulha, guiada por ultrassonografia abdominal, após prévia antisepsia com álcool 70%. As amostras foram identificadas e refrigeradas imediatamente após a coleta, até serem enviadas ao laboratório, no prazo máximo de 4 horas. Para o exame de ultrassonografia, utilizou-se um transdutor linear na frequência de 9 Mhz acoplado ao equipamento de ultrassonografia Chison 8100 Vet<sup>®</sup> que serviu de ferramenta para orientar a cistocentese.



Figura 12. Realização de cistocentese guiada por ultrassom

### **4.3. Determinação do intervalo de confiança médio para a atividade urinária de NAG**

Após anamnese, exames de triagem e seleção dos animais, as amostras de urina foram coletadas e a análise da atividade urinária de NAG foi realizada, utilizando a técnica padronizada para cães hígidios. Com base na atividade urinária determinada para cada cão, foi determinado, por análise estatística, o intervalo de confiança médio correspondente à atividade urinária de NAG para 60 cães hígidios.

### **4.4. Determinação da estabilidade da NAG urinária**

#### **4.4.1. Local de execução**

A determinação da estabilidade urinária da NAG para cães hígidios foi realizada nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica, da Escola de Veterinária da UFMG.

#### **4.4.2. Protocolo utilizado**

Para determinação da estabilidade da NAG urinária, foram consideradas três faixas de temperatura:

- Temperatura de 20 a 30°C;
- Temperatura de refrigeração (2 a 8°C)
- Temperatura de congelamento (-20°C)

Respeitou-se o protocolo de armazenar as amostras nas temperaturas determinadas, acondicionadas em recipientes individualizados, no total de cinco para cada amostra, e realização das análises bioquímicas nos tempos de 24, 48, 72 horas, sete e quinze dias, sendo avaliadas, em triplicata, três amostras quanto à atividade urinária da enzima.

#### **4.5. Aprovação do projeto**

O projeto foi aprovado pelos seguintes órgãos:

- ✓ Câmara Departamental do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV) da Escola de Veterinária (EV) da UFMG.
- ✓ Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal (EV/UFMG).
- ✓ Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) -. Protocolo de número 373/2015.

#### **4.6. Análise estatística**

A determinação do intervalo de referência para a N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase foi realizada por análise de intervalo de confiança da média. A correlação entre as variáveis analisadas foi determinada pelo teste de Pearson. A comparação entre as médias de atividade da enzima em diferentes tempos para três temperaturas foi realizada pelo método ANOVA para medidas repetidas (amostra pareada). Para as análises foi considerado  $p \leq 0,05$ . As análises foram realizadas com software SPSS® v17.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Padronização de reagentes e determinação da atividade urinária da NAG**

A padronização da técnica para determinação da atividade urinária da NAG, para cães, realizada neste experimento, foi executada a partir das técnicas descritas para ensaios humanos por Maruhn (1976) e Horak et al. (1981), consideradas relativamente simples e de custo baixo. A avaliação desta enzima tem sido introduzida na medicina como teste de rotina para detecção e monitoramento de injúria renal (Kunin et al., 1978; Maruhn, 1979; Liangos et al., 2007; Gonçalves et al., 2008).

Horak et al. (1981) optaram por trabalhar com a técnica de Knoll et al. (1980), que provou-se satisfatória, mas fizeram modificações para melhorar a precisão analítica, confiabilidade e praticidade. O volume de amostra foi reduzido e o de reação foi aumentado. As amostras do branco de urina foram preparadas para conter o mesmo que as amostras de teste e o p-Nitrofenol foi utilizado como padrão espectrofotométrico.

No presente trabalho o cuidado quanto à escolha dos sais para preparo de reagentes foi essencial; optou-se por produtos de alta pureza, de forma a evitar possíveis interferências durante a padronização da técnica. Na literatura (Knoll et al., 1980; Horak et al., 1981; Noto et al., 1983), é descrito o uso de tampão citrato de sódio pH 4,4 como pH ótimo para hidrólise enzimática, em avaliação para humanos. Foi realizada avaliação de uma mesma amostra de urina, com concentração de substrato idêntica, porém sob ação de diferentes valores de pH, em triplicata.

A NAG apresentou atividade urinária mais estável quando a solução reagente foi preparada com tampão citrato de sódio, em valores de pH ácidos, de 4,0 a 5,0. Em pH 4,0 a NAG apresentou maior atividade, porém foi observada atividade mais estável em pH 4,4 (Gráfico 1). O uso do tampão citrato de sódio em pH 4,4 se justifica pela estabilidade da atividade urinária da enzima confirmada estatisticamente e por literatura. O pH 4,4 do tampão citrato de sódio é descrito

como pH ótimo para realização de hidrólise enzimática da NAG (Banerjee e Basu, 1975; Bermeyer, 1983). À medida que o pH era alcalinizado, a atividade enzimática diminuiu. Tal observação está de acordo com a literatura, que descreve instabilidade enzimática da NAG em pH alcalino (Shibata e Yagi, 1996; Aćimović, et al., 2005), levando à redução de sua atividade urinária.

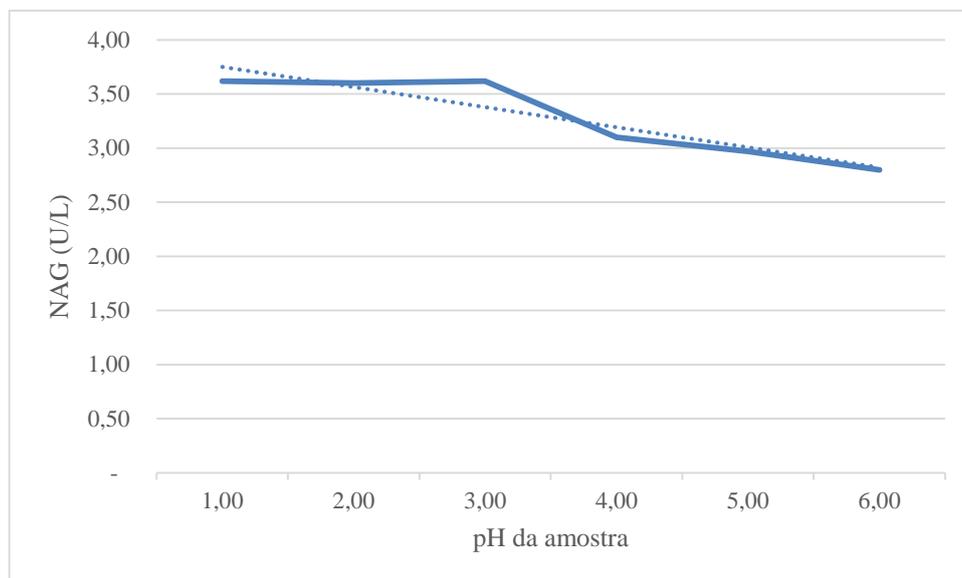


Gráfico 1. Variação da atividade de NAG urinária em relação ao pH do tampão citrato

Além do pH, a temperatura também é um fator que pode interferir na avaliação da atividade urinária de NAG. A NAG apresenta atividade adequada em temperatura de 37°C, tendo sido observado que, em valores de temperatura superiores a este, a enzima tem redução em sua atividade (Banerjee e Basu, 1975). Assim, durante a realização das análises, a temperatura foi mantida em 37° C, de forma a reduzir a possibilidade de interferência na reação e na atividade urinária da NAG.

A literatura relata que o substrato NAG é utilizado normalmente, em concentração de 10 mM (Horak et al., 1981). No trabalho foi avaliada a solubilidade e saturação de diferentes concentrações de substrato em tampão citrato de sódio, a 37°C (pH 4,4). Em concentrações acima de 10 mM o substrato apresentou baixa capacidade de dissolução, mesmo sendo mantido em homogeneizador e à temperatura ideal de 37°C. À 10 mM, o substrato se dissolveu de maneira adequada em tampão citrato de sódio, tendo sido utilizados 80mL de tampão 0,25 mol/L. Em concentrações de substrato inferiores a 10 mM, foi observada boa dissolução. O uso do substrato em concentração superior a 10 mM permitiria trabalhar com um menor volume de solução reagente e seria economicamente mais viável, porém houve a limitação da solubilidade. Foram descritas variações do método de Leback e Walker (1961), a maior parte envolvendo o uso de menores volumes de reagentes. Normalmente são utilizados volumes em um intervalo de 3 µL a 2,0 mL e concentrações de substrato de 0,2 mM/L a 3,3 mM/L. Mesmo nas concentrações de substrato mais altas, a enzima não é saturada. O volume de reagente utilizado foi de 100 µL, o que está dentro do intervalo descrito.

Neste trabalho foi realizada uma adaptação e padronização da técnica manual para um ensaio semiautomatizado, em aparelho bioquímico Cobas Mira Plus®. Em um primeiro momento tentou-se realizar a técnica utilizando monoreagente, constituído por 4 mL de tampão citrato de sódio pH 4,4 e 1 mL de substrato NAG 10 mM. Como não havia sido determinado ainda o coeficiente de absorvidade molar (Épsilon) do íon p-Nitrofenilato, trabalhou-se com um fator de correção 1.000 na programação. O ensaio com monoreagente não se mostrou eficaz. O aparelho bioquímico não realizou leitura de atividade enzimática de NAG urinária com a programação para monoreagente em várias tentativas com amostras de urina de cães hígdos de diferentes raças, sexo e idades.

A vantagem do uso de monoreagente – caso este fosse eficaz – seria praticidade no preparo da técnica. Porém, foi necessário realizar a técnica bireagente, através da adição do tampão alcalino AMP 0,75 mol/L (pH 10,25), conforme descrito em literatura (Knoll et al., 1980; Horak et al., 1981). O tampão alcalino AMP interrompe a reação enzimática, permitindo a conversão do p-Nitrofenil em sua forma iônica (p-Nitrofenilato). Com o preparo da técnica utilizando bireagente, a reação ocorreu de forma adequada, havendo hidrólise enzimática e liberação do íon p-Nitrofenilato, o que permitiu a leitura de atividade urinária de NAG pelo aparelho bioquímico.

Para determinar o valor de referência de atividade urinária da NAG foi preciso, também, avaliar o coeficiente de absorvidade da reação, para assim, determinar um fator de correção, adequado para cães hígdos. Com este fator, é possível chegar ao intervalo de confiança correto, já que foi utilizado em um primeiro momento, um fator 1.000 na programação do aparelho Cobas Mira Plus®. Para obter o coeficiente de absorvidade foram avaliadas diferentes concentrações do íon p-Nitrofenil em solução e, posteriormente, realizada a leitura em espectrofotômetro, a 405 nm (Gráfico 2) – sendo que as análises foram executadas em triplicata.

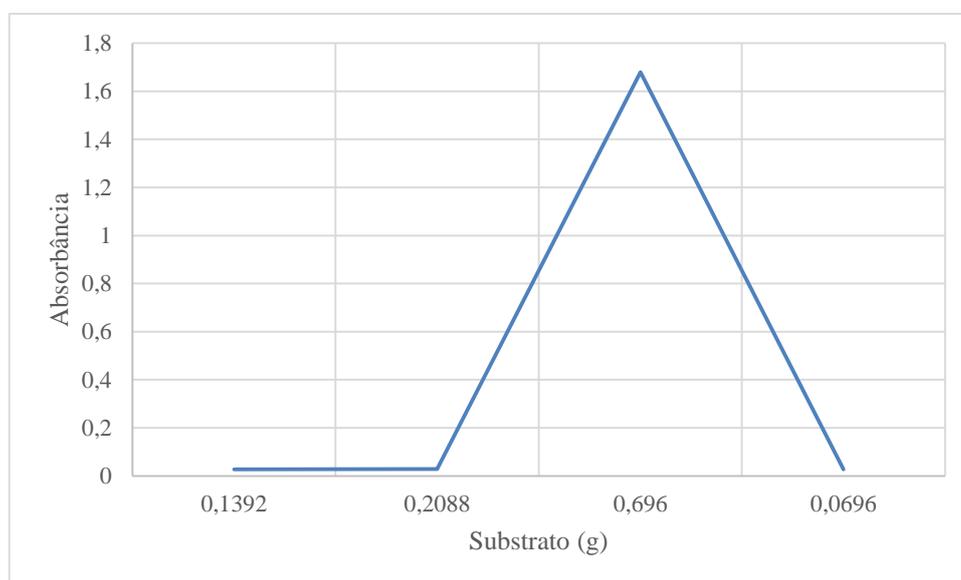


Gráfico 2. Variação de absorbância obtida em espectrofotômetro de acordo com a concentração de substrato p-Nitrofenil utilizada.

A concentração de p-Nitrofenil de 0,696 g foi a que apresentou maior coeficiente de absorvidade ( $\epsilon = 1,679$ ) após o cálculo da média obtida pelas triplicatas. Isto reduz a margem

de erro em avaliação no aparelho de espectrofotômetro e no valor determinado para absorvância, o que justificou o uso desta concentração de p-nitrofenil. Com este valor de coeficiente, foi possível determinar o fator de correção para a técnica, segundo a fórmula para cálculo de fator de correção. Os valores dos componentes para o cálculo são descritos na tabela 1. Através do cálculo, obteve-se um fator de correção igual a 127,26.

$$F = \frac{Vt \times 1000}{Va \times \epsilon \times l}$$

Tabela 1. Valores dos componentes para cálculo de fator de correção

| Componente           | Valor  |
|----------------------|--------|
| <i>V<sub>t</sub></i> | 195 µL |
| <i>V<sub>a</sub></i> | 25 µL  |
| <i>ε</i>             | 1,679  |
| <i>l</i>             | 0,6    |

O volume total (*V<sub>t</sub>*) foi determinado pelo somatório de volume de diluente (*V<sub>d</sub>*), volume de reagente (*V<sub>r</sub>*) e volume da amostra (*V<sub>a</sub>*). O diluente utilizado foi água de injeção.

Após ser corrigida com o fator de correção, a atividade urinária de NAG também foi dividida por 3,33, valor referente ao número de ciclos executados pelo aparelho de bioquímica Cobas Mira Plus®. As análises da atividade urinária de NAG foram processadas em até seis horas após a coleta e os resultados obtidos, foram corrigidos pelo uso do fator de correção obtido. Com base neste valor foi possível a determinação de um intervalo de confiança médio para a enzima avaliada de  $\bar{X} = 5,55 \pm 1,39$  U/ L (Intervalo de Confiança 95% ).

Um dos pontos importantes para determinação de atividade de enzimas urinárias é a influência de fatores endógenos e exógenos sobre sua concentração. Assim, é importante excluir tais interferências para que seja possível obter um resultado de atividade urinária confiável, por exemplo, pH adequado, temperatura, concentração de substrato, preparo de amostra e correção da densidade urinária. Conhecendo estes parâmetros, deve-se investigar qual é sua característica ótima para determinada enzima e para a metodologia.

Foi observado em humanos (Kunin et al., 1978) e cães (Sato et al., 2002) que a atividade urinária de NAG não é aumentada quando há infecção urinária, com presença de bactérias na urina. Pascale et al. (2010) observaram que a atividade urinária de NAG não sofreu alterações pela presença de piúria, hematúria e bacteriúria. Isto difere do observado com a GGT urinária que, segundo Beck e Sammons (1975), a presença bacteriana na urina pode causar a diminuição da atividade do GGT na amostra analisada. Apesar disso, para evitar esse tipo de interferência neste experimento, todas as amostras de urina foram coletadas por cistocentese, com o objetivo de diminuir a contaminação da amostra pela flora bacteriana presente nos órgãos genitais e uretra, o que poderia acontecer nas coletas realizadas por micção natural ou por coleta com sonda uretral.

Além disso, todas as amostras de urina foram centrifugadas e logo em seguida tiveram os seus respectivos sedimentos analisados em microscopia óptica para excluir a presença de contaminação bacteriana, que poderia ser decorrente de uma infecção do trato urinário do animal estudado. Outro fator a se levar em consideração é o momento de coleta. A NAG apresenta pequena variação ao longo do dia em sua atividade, porém que não chega a ser estatisticamente significativa (Price, 1979; Sato et al., 1998). Para efeito de padronização e

facilitar a rotina laboratorial, as amostras de urina do experimento foram coletadas sempre entre 8:00 e 11:00 horas.

Uma das condições para que as cadelas participassem desse experimento era não estarem gestantes, pois segundo Semczuk-Sikora et al. (2003), a NAG apresenta aumento de sua atividade urinária no terceiro trimestre de gestação, em mulheres gestantes. Essa variação fisiológica pode ocorrer devido à hipertrofia e / ou hiperplasia dos néfrons, que se alteram como uma forma de adaptação à condição da gestação. Os néfrons voltam à sua normalidade após a gestação, quando esta ocorre sem complicações (hipertensão e eclampsia) (Semczuk-Sikora et al., 2003).

Neste trabalho, por meio de análises estatísticas, observou-se que o peso e sexo não influenciaram nos resultados da atividade de NAG urinária, o que pode ser observado na distribuição uniforme dos resultados e que está de acordo com o observado em humanos (Price, 1992; Liangos et al., 2007). Observou-se porém, correlação positiva da atividade de NAG urinária (Gráfico 3) com a idade dos animais avaliados ( $p < 0,001$ ). Animais mais velhos, machos e fêmeas, de diferentes raças, apresentaram atividade urinária de NAG maior conforme sua idade. A presença desta correlação observada em cães hígdos está de acordo com o observado em humanos por Kono et al. (1990). Em seu experimento foi avaliada a atividade urinária de NAG em 1.152 indivíduos, do sexo masculino e feminino, tendo sido observado um aumento da atividade urinária de NAG com o aumento da idade.

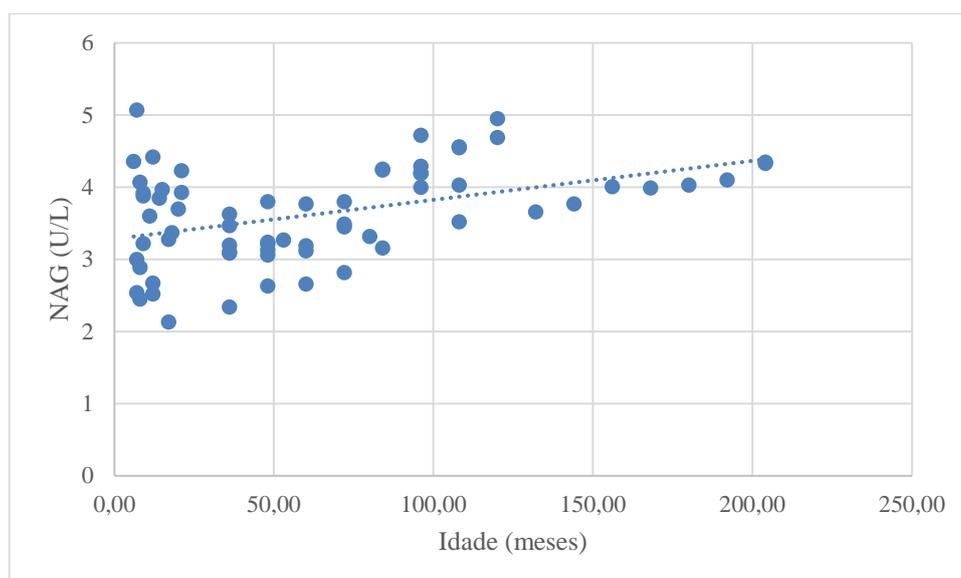


Gráfico 3. Variação da atividade de NAG urinária com relação a idade de 60 cães clinicamente hígdos ( $p < 0,001$ )

A densidade urinária é um fator que pode levar a alterações na atividade da NAG urinária. Segundo Scott e Stockham (2012), a densidade urinária é uma estimativa precisa da concentração de solutos na urina, assim sua variação é acompanhada de alteração na concentração dos solutos diluídos na urina, tendo por consequência a influência direta nos valores de atividade de NAG urinário.

O método empregado para correção da interferência dos valores de densidade urinária nesse trabalho foi o uso da fórmula proposta por Deschepper et al. (1989). A fórmula utilizada define

a densidade urinária 1,025 (valor considerado normal para cães com livre acesso à ingestão de água) como fator de correção para o fluxo urinário de uma única amostra. Assim, os resultados de todas as amostras do experimento foram padronizados para um mesmo valor de densidade urinária. Optou-se por este método de correção da densidade urinária, por ser um método de simples realização e que apresenta um resultado confiável (Scott e Stockham, 2012).

$$X = Y \cdot 25 / Z$$

Onde:

- “X” é o valor da atividade urinária da enzima após correção pela fórmula
- “Y” é o valor da atividade urinária da enzima obtida sem correção
- “Z” corresponde aos dois últimos dígitos do valor da densidade urinária da amostra

Foi observado que os valores da atividade de NAG urinário, das amostras obtidas sem o uso da fórmula de correção pela densidade urinária, diferem estatisticamente da atividade de NAG urinária corrigida por essa mesma fórmula, com  $p < 0,01$ . Os valores da atividade urinária de NAG, já que não houve diferença significativa entre os sexos (tabela 2), após correção, apresentaram um intervalo de confiança da média de  $\bar{X} = 3,62 \text{ U/L} \pm 0,66 \text{ U/L}$ , menor que o obtido sem a correção para densidade urinária ( $\bar{X} = 5,55 \pm 1,39 \text{ U/L}$ ).

Tabela 2. Intervalo de confiança da média da atividade de NAG para cães segundo o sexo

| Nível de significância estatística | Intervalo de confiança |             |
|------------------------------------|------------------------|-------------|
|                                    | Macho                  | Fêmea       |
| 95%                                | 3,43 – 3,91            | 3,36 – 3,81 |
| 99%                                | 3,47 – 3,87            | 3,41 – 3,76 |
| 99,9%                              | 3,36 – 3,98            | 3,28 – 3,87 |

Observa-se que, quando aplicada à fórmula de correção da densidade urinária, os desvios padrão dos valores de atividade de NAG urinário são menores se comparados com os valores obtidos nas mesmas amostras estudadas, porém sem a aplicação da fórmula de correção da densidade urinária para 1,025, conforme demonstrado nos gráficos 4 e 5.

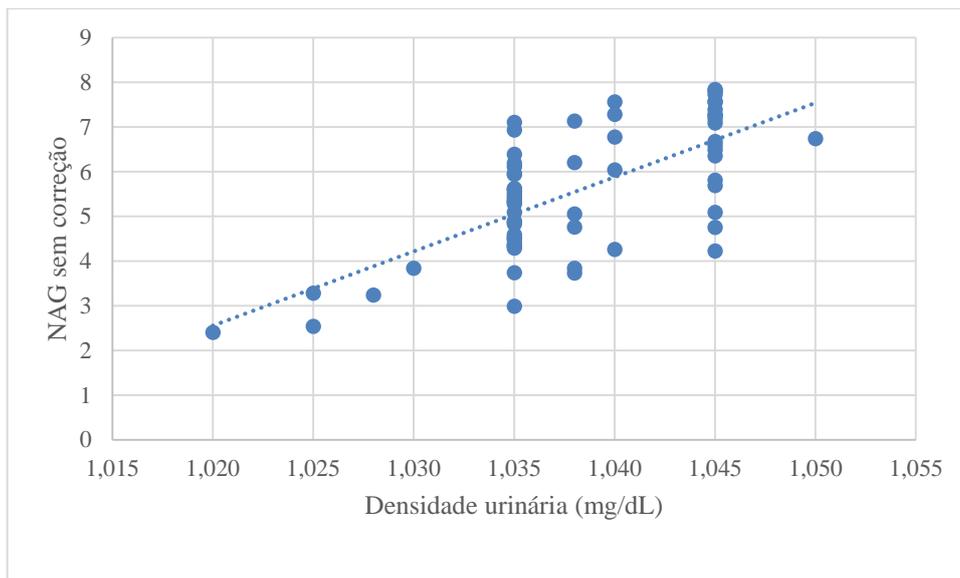


Gráfico 4. Variação da atividade de NAG urinária sem correção de densidade urinária

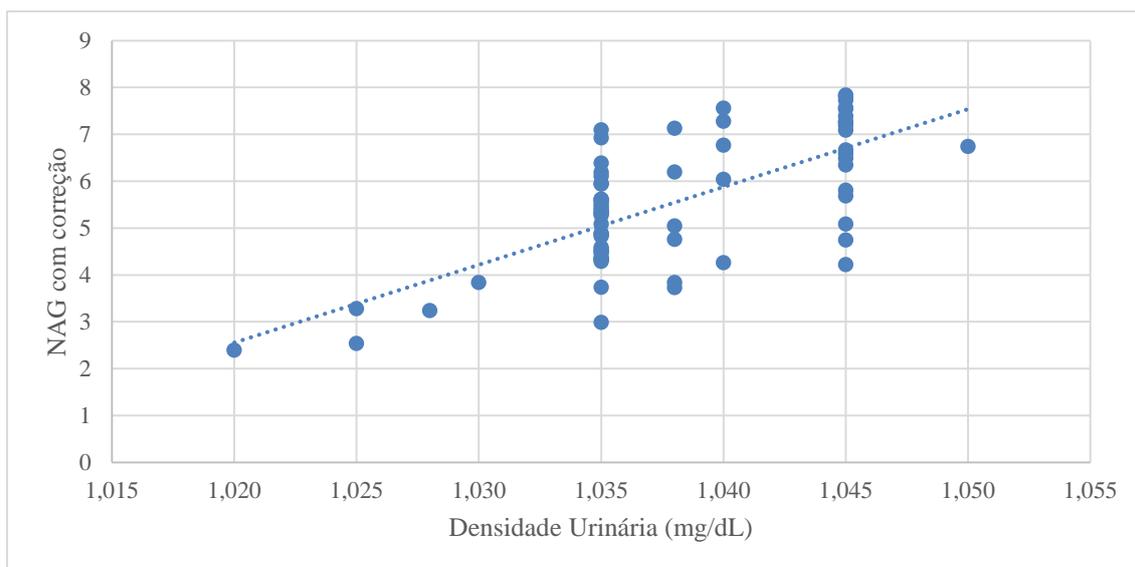


Gráfico 5. Variação da atividade de NAG urinária com correção de densidade urinária

Com a metodologia padronizada, foi possível determinar o intervalo de confiança médio para a NAG. Para isso foi realizada uma triagem com anamnese, exames físico, de sangue, urina e imagem, para qualificar os cães avaliados como hígidos. Além disso, é importante que se trabalhe com um número adequado de animais para poder determinar intervalo de confiança médio. O método estatístico utilizado para determinação do intervalo de confiança da média foi a análise multivariada por meio da análise de componentes principais (ACP), descrita por Judez (1989) e Mingotti (2013), para isso se faz necessário um número mínimo de 50 observações.

A análise da atividade urinária de NAG tem sido realizada em seres humanos utilizando kits comerciais para espectrofotometria urinária, normalmente, com o substrato 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, como o descrito por Shionogi, Osaka, Japão (Noto et al., 1983). Em medicina veterinária os ensaios utilizando a NAG vêm sendo conduzidos utilizando kits comerciais para humanos, como o Sanko Junyaku Co. Ltd, Japan, que utiliza o p-nitrophenyl-N-Acetyl-  $\beta$ -D-glucosaminidase como substrato porém, este varia de acordo com o kit. Ainda não foi descrito em literatura os valores de normalidade para a atividade urinária de NAG determinados para cães hígidos.

Em ensaios como o de Sato et al. (2002), foi utilizado o p-nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase como substrato, em um kit para análise de NAG urinária em humanos, para determinar atividade urinária de NAG em cães. Foram avaliados um total de 48 cães, porém, destes, apenas 28 eram hígidos, tendo sido determinada uma média de confiança de  $3,2 \pm 2,4$  U/l para NAG urinária. Em 2009, Bruncker et al. avaliaram a atividade urinária de NAG em 38 cães hígidos, de diferentes sexos e faixas etárias, utilizando kit para análise de NAG urinária humana, e obtivera um intervalo de normalidade de 0,02 a 3,63 U/l. Nestes ensaios não é possível considerar que foi determinado um intervalo de normalidade para a atividade urinária da enzima, visto que em uma análise foram avaliadas 28 amostras e na outra 38, um número abaixo do mínimo necessário de 50 observações (Judez, 1989; Mingotti, 2013).

A avaliação de um número de observações reduzido pode não permitir determinar um intervalo de confiança médio para um determinado parâmetro, mantendo a atividade urinária média mais baixa do que a observada neste experimento. Além disso, não são descritos o pH, temperatura ou concentração de substrato utilizados nestes kits, fatores que afetam a reação enzimática (Knoll et al., 1980; Horak al., 1981), podendo aumentar ou reduzir a atividade urinária avaliada. O pH, por exemplo, varia em alguns ensaios, sendo descrito como ótimo em um intervalo de 4 – 5,0 porém, pode haver variações na atividade enzimática neste mesmo intervalo, conforme foi observado neste experimento.

A determinação do fator de correção foi importante para a padronização da metodologia e confiabilidade dos resultados. Ao se realizar a leitura em espectrofotômetro a 405 nm e determinar o coeficiente de absorvidade, foi possível calcular o fator de correção. Este fator permitiu corrigir os resultados de atividade urinária de NAG obtidos para um valor padronizado e adequado ao íon p-Nitrofenilato (produto da hidrólise enzimática da NAG). Pois, no cálculo foram considerados seu coeficiente de absorvidade e parâmetros como  $V_a$ ,  $V_r$ ,  $V_d$  e caminho óptico. Sendo estes últimos parâmetros utilizados na programação do aparelho de bioquímica Cobas Mira Plus® durante automatização da técnica. Além disso, considerou-se também para o cálculo, o número de ciclos executados por minuto no aparelho de bioquímica – no caso, 3,33 ciclos por minutos – o que permite uma padronização específica de acordo com o aparelho utilizado na análise. Desta forma, assegura-se um resultado mais fidedigno.

Assim, pode-se considerar que para padronizar a metodologia neste estudo foram respeitadas as particularidades físico-químicas da NAG e os fatores de meio e execução de técnica que poderiam afetar seus resultados. O intervalo de confiança médio determinado foi obtido com um número de cães adequado, de diferentes raças, sexo, faixa etária e todos os animais hígidos. Apesar de os valores de pH e concentração de substrato encontrados neste experimento para cães hígidos estarem de acordo com o descrito para humanos por Knoll et al. (1980) e Horak et al. (1981), não significa que a metodologia descrita por eles seja a adequada para cães ou que geraria resultados de atividade urinária semelhantes aos observados na técnica deste

experimento. Deve-se levar em consideração fatores como a densidade urinária, pH da urina e fator de correção.

A NAG apresenta características importantes que justificam seu uso como método de diagnóstico, observadas principalmente em humanos, espécie na qual encontramos mais estudos. A NAG tem sido utilizada em humanos e animais como marcador capaz de sinalizar injúria tubular renal com grande especificidade e precocidade (Bazzi et al. 2002; Katagiri et al., 2012). Além disso, serve também como recurso para monitoramento de injúria renal persistente, em situações em que somente sua atividade urinária é avaliada ou associada a outro marcador precoce em pacientes com DRC (Liangos et al., 2007; Katagiri et al., 2012). Em medicina veterinária, a avaliação da atividade desta enzima tem se restringido à pesquisa e ainda não existe kit comercial para análise da atividade urinária de NAG para cães (Sato et al., 2002). Neste estudo não foi realizada a avaliação da atividade urinária de NAG em cães com injúria renal e, por este motivo, não foi possível comparar sua eficácia como sinalizador precoce de injúria renal em relação à GGT urinária e outros marcadores, pois este não era um dos objetivos do experimento.

## **5.2. Avaliação da estabilidade urinária da NAG**

Neste experimento, a atividade urinária da NAG das amostras foi avaliada em até 6 horas após a coleta. Porém, na rotina clínica, nem sempre é possível enviar o material coletado ao laboratório de análises dentro de um prazo máximo de 12 horas, como é recomendado por Wittwer et al. (1986). Portanto, é importante ter conhecimento de qual a melhor forma de conservação da amostra até o seu processamento sem que haja interferência dos resultados. Não foram encontrados dados em literatura científica, quanto à estabilidade da atividade urinária de NAG para urina de cães hípidos, de diferentes raças e faixas etárias.

Dentre os métodos descritos para conservação de amostras, alguns necessitam do uso de soluções conservantes e procedimentos de diálise em gel, o que dificulta seu emprego na rotina. Além disso, é necessária mão de obra qualificada para processar tais métodos, o que predispõem a possíveis fatores de interferência nos resultados das análises (Stockham e Scott, 2011). Assim, o método de conservação avaliado neste experimento é caracterizado pela temperatura e sua diferente capacidade de conservação em diferentes intervalos de tempo. Não foi feito uso de aditivos e/ou outros procedimentos, de forma a avaliar sua aplicação e eficácia para conservação de amostras para avaliação da atividade urinária de NAG na rotina clínica.

Para a avaliação da estabilidade da atividade urinária da NAG, as amostras foram acondicionadas em recipientes individualizados, em um total de cinco para cada amostra e protegidos de luz solar. As análises bioquímicas foram realizadas nos tempos de 24, 48, 72 horas, sete e quinze dias, em três diferentes faixas de temperatura (-20°C, 2 a 8°C e 20 a 30°C) (Gráfico 6 e Tabela 3).

A análise estatística dos resultados das amostras conservadas na temperatura de -20°C demonstra que houve uma diminuição dos valores da atividade da NAG urinária, conforme aumentava o tempo de armazenamento. Esta informação difere do observado por Manley et al. (1994). Em seu experimento, foram avaliadas amostras de urina de humanos, em diferentes estados de saúde (apresentavam a atividade de NAG até 40% acima do valor máximo de normalidade), mantidas em temperatura de -20°C. A atividade urinária das amostras manteve-se constante por duas semanas, havendo redução a partir da terceira semana de avaliação. No trabalho não é descrito se houve um preparo da amostra antes da análise, pois esse método de

conservação pode ser adequado desde que a amostra seja preparada previamente por meio de filtração em gel com adição de albumina, ou etileno-glicol, podendo permanecer estável por até um período de 12 meses, conforme descrito por Jung et al. (2008).

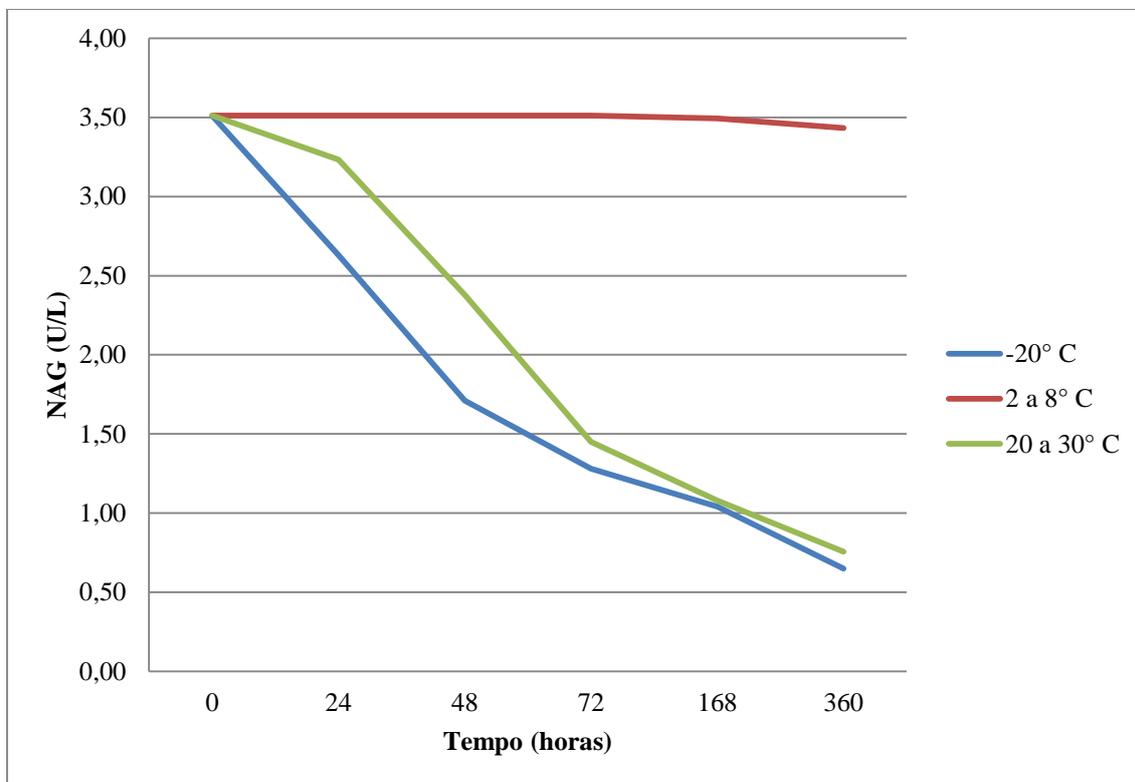


Gráfico 6. Média da atividade de NAG na urina de 10 cães hígidos em três temperaturas segundo tempo de análise

Análise estatística mostrou que para a temperatura de refrigeração (2 a 8°C) não houve diferença estatística entre as médias de atividade até 168 horas ( $p > 0,05$ ). Para a temperatura de 20 a 30°C não houve diferença estatística entre as médias de atividade até o tempo de 24 horas ( $p > 0,05$ ). Após 24 horas de conservação a esta temperatura, a amostra apresentou diferença estatística nas médias de atividade. Para a temperatura de congelamento (-20°C) houve diferença estatística entre as médias de atividade em todos os tempos avaliados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade de NAG (U/L) na urina de 10 cães hípidos em três temperaturas e seis tempos de análise diferentes

| Temperatura (°C) | Tempo (horas) | Média | Desvio padrão | Intervalo de Confiança (95%) |
|------------------|---------------|-------|---------------|------------------------------|
| -20              | 0             | 3,51  | 0,72          | 3,07 – 3,95                  |
|                  | 24*           | 2,63  | 0,70          | 2,2 – 3,06                   |
|                  | 48*           | 1,70  | 1,15          | 0,99 – 2,41                  |
|                  | 72*           | 1,28  | 1,31          | 0,47 – 2,09                  |
|                  | 168*          | 1,04  | 1,12          | 0,35 – 1,73                  |
|                  | 360*          | 0,65  | 0,90          | 0,1 - 1,2                    |
| 2 a 8            | 0             | 3,51  | 0,72          | 3,07 - 3,95                  |
|                  | 24            | 3,51  | 0,72          | 3,07 – 3,95                  |
|                  | 48            | 3,51  | 0,72          | 3,07 – 3,95                  |
|                  | 72            | 3,51  | 0,72          | 3,07 – 3,95                  |
|                  | 168           | 3,49  | 0,72          | 3,05 – 3,93                  |
|                  | 360*          | 3,49  | 0,72          | 3,05 – 3,93                  |
| 20 a 30          | 0             | 3,51  | 0,72          | 3,07 – 3,95                  |
|                  | 24*           | 3,23  | 0,64          | 2,84 – 3,62                  |
|                  | 48*           | 2,37  | 0,96          | 1,78 – 2,96                  |
|                  | 72*           | 1,45  | 1,32          | 0,64 – 2,26                  |
|                  | 168*          | 1,07  | 1,10          | 0,44 – 1,76                  |
|                  | 360*          | 0,75  | 1,03          | 0,12 – 1,38                  |

\*Indica diferença estatisticamente significativa entre resultado da atividade no tempo dado e atividade no tempo 0 ( $\alpha= 0,05$ )

Em situações nas quais não há preparação prévia da amostra de urina para o armazenamento na temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  é possível que haja perda da estabilidade da enzima NAG. Isso pode ocorrer tanto pelo processo de desnaturação a frio, observado em enzimas que são estáveis em meio aquoso e que apresentam desnaturação em temperaturas de congelamento, como durante o descongelamento, antes da realização da análise bioquímica (Beck e Sammons, 1975). Isto pode justificar a redução acentuada dos valores de atividade de NAG nas amostras de urina armazenadas por este método, conforme descrito por Beck e Sammons (1975). Em estudo avaliando a estabilidade de GGT urinária, Paes Leme et al. (2011), Heiene (2001) e Jung e Mattenheimer (1992) foram unânimes ao afirmar em seus experimentos que observaram uma diminuição significativa da atividade do GGT urinário nas amostras armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Na avaliação da atividade urinária de NAG em temperatura de 4 a  $8^{\circ}\text{C}$  não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p>0,05$ ) entre as médias da atividade da NAG urinária até o tempo de 168 horas. Esta informação está de acordo com o observado por Manley et al. (1994), em humanos. Em seu experimento, a atividade urinária da NAG de 60 indivíduos, manteve-se estável em temperatura de 2 a  $8^{\circ}\text{C}$ , por um período de uma semana. Após 7 dias (168 horas), a atividade urinária da NAG não se manteve estável, apresentando diferença estatística ( $p<0,05$ ).

A estabilidade para enzimas urinárias, nesta faixa de temperatura, já foi descrita para a GGT. Esta enzima apresentou estabilidade urinária por um período de 10 dias, em amostras de cães (Veado et al., 2003). Paes Leme et al. (2011) também avaliaram a atividade urinária de GGT em 30 cães e obtiveram um resultado semelhante. As amostras mantiveram-se estáveis, sob temperaturas de 2 a 8°C, por um período de sete dias, sem alterações de suas médias, conforme análise estatística.

A atividade urinária de NAG, no intervalo de temperatura de 20 a 30°C apresentou, após avaliação estatística, instabilidade nos valores mínimos e máximos ao longo dos dias, aumento do desvio padrão e diminuição dos valores médios encontrados, conforme gráfico 7 e tabela 3.

Essas alterações são justificadas por Jung et al. (1990) e Jung e Mattenheimer (1992), pois amostras de urina destinadas a análise da atividade de NAG urinária não devem ficar mais do que três horas à temperatura de 20 a 30°C após a coleta. Isto se deve ao fato de haver perda da estabilidade enzimática, levando à redução da atividade urinária, como ocorrido com as amostras analisadas.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Na rotina da clínica veterinária a busca por segurança e confiabilidade no diagnóstico, monitoramento, prognóstico e, principalmente, prevenção é fundamental. O diagnóstico precoce em quadros de injúria renal é a melhor forma para prevenir a redução de função renal e evitar que o paciente se torne um doente renal crônico ou venha a óbito. Tendo em vista a busca por maior longevidade e qualidade de vida para os animais, a possibilidade de trabalhar com um método de detecção de injúria precoce e monitoramento, preciso e padronizado para a espécie avaliada, é de grande importância. Este trabalho foi pioneiro em determinar o valor de referência para a NAG em cães hígidos de diferentes faixas etárias tendo utilizado um número de observações amostrais significativo e realizando uma padronização de reagentes e coeficiente de absorvidade para esta espécie. Com a metodologia e número de animais adequados, foi possível determinar um intervalo de normalidade para a atividade urinária de NAG, no qual foi aplicado um fator de correção, determinado para este ensaio. Além disso, a automatização da técnica para aparelho de análise bioquímica simplifica a realização do ensaio, trazendo maior praticidade para a execução da análise e maior rapidez na obtenção do resultado do exame, possibilitando o desenvolvimento de um kit comercial para análise de rotina.

Deter o conhecimento sobre a estabilidade da atividade urinária de NAG é de grande valia, pois permite ao clínico coletar a amostra e conservá-la da melhor maneira possível, de forma a preservar sua amostra e evitar que fatores externos prejudiquem sua análise. Este trabalho também foi pioneiro em determinar a estabilidade da NAG na urina de cães hígidos. Além disso, os métodos de conservação aqui avaliados são práticos e de baixo custo, sendo acessíveis a qualquer clínica veterinária. É importante considerar que a análise de amostras patológicas, ou seja, de animais com injúria renal podem apresentar alteração da estabilidade da atividade urinária da NAG. Isto demonstra também a importância de se realizar a validação desta metodologia, através de sua aplicação prática, avaliando a atividade urinária de NAG em animais com injúria renal. Pela validação metodológica, será possível determinar os valores de atividade urinária de NAG em animais com injúria renal, assim como testar a estabilidade desta enzima na urina destes animais, em diferentes temperaturas e tempos.

Este trabalho não terá cumprido seus objetivos se os médicos veterinários não se conscientizarem de que o diagnóstico precoce é uma forma de renoproteção capaz de evitar que um paciente com injúria renal aguda progrida para o estágio de doente renal crônico e morte. É preciso que haja um entendimento de que a dependência de exames de diagnóstico tardio, ou seja, de avaliação de função e não de injúria, como prática de rotina, será mais um fator a aumentar a alta prevalência de pacientes doentes renais crônicos. Devido à baixa requisição por exames de diagnóstico precoce pelos clínicos, existem poucas opções no mercado padronizadas para medicina veterinária e, por isso, com custo relativamente elevado. Assim, não basta apenas a realização de trabalhos científicos e validação de metodologias de diagnóstico precoce, é preciso que o médico veterinário aprimore seus conhecimentos e difunda o uso dessas técnicas. Desta forma além de aumentar as chances de prevenção de doença renal crônica e monitoramento do paciente com injúria renal, o custo do exame laboratorial ficará, também, mais acessível às clínicas veterinárias.

## 7. CONCLUSÕES

- Há correlação positiva entre a densidade urinária e a atividade de NAG urinária: quanto maior o valor da densidade menor o valor do resultado da análise de atividade urinária de NAG.
- Há correlação positiva entre a atividade urinária de NAG e a idade dos animais avaliados: quanto maior a idade, maior a atividade urinária de NAG avaliada.
- O uso da fórmula de correção da densidade urinária para 1,025 diminui a interferência da variação da densidade urinária da amostra avaliada.
- O método de conservação utilizando a temperatura de 2 a 8° C é adequado para conservação da amostra até 7 dias, sem que haja diferenças estatísticas nos valores da atividade da NAG urinária, nas amostras conservadas por esse método.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACÍMOVIĆ J. M.; JOVANOVIĆ, V. B.; MANDIĆ, L. M. Influence of pigments and pH of urine on the determination of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity with 2-methoxy-4-(2'-nitrovinyl)-phenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide. *J Clin Lab Anal.* 2005;19 (6):260-6.

BANERJEE, D. K.; BASU, D. Purification of Normal Human Urinary N-Acetyl-p-hexosaminidase A by Affinity Chromatography. *Biochem J.* (1975) 145, 113-118 Printed in Great Britain

BAZZI, C.; PETRINI, C.; RIZZA, V.; ARRIGO, G.; NAPODANO, P.; PAPARELLA, M.; D'AMICO, G. Urinary N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17: 1890-1896.

- BECK, P. R.; SAMMONS, H. G. *Clinica chimica acta*, 65, 531 (1975).
- BEHREND, E. M; GRAUER, G. F; MANI, I; GROMAN, R. P.; GRECO, D. S. Hospital acquired acute renal failure in dogs: 29 cases (1983-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1996; 208: 537-541
- BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium, NAG activity, and B2-microglobulin in the urine of cadmium pigment workers. *Br J Ind Med*, 1989; 46: 679-680.
- BOLDT, J.; BRENNER, T.; LEHMANN, A.; LANG J.; KUMLE B.; WERLING C.. Influence of two different volume replacement regimens on renal function in elderly patients undergoing cardiac surgery: comparison of a new starch preparation with gelatin. *Intensive Care Medicine*, v. 29, p. 763-769, 2003.
- BRENNER, B. M.; ZATZ, R; DUNN, B.R.; MEYER, T.W.; ANDERSON S; RENNKE, H.G. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *Journal of Clinical Investigation*. 1986;77:1925–1930.
- BRENNER, B.M.; TAAL, M. W. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 2000 May; 57(5):1803-17
- BRAUN, J. P.; PERXACHS, A.; PECHEREAU, D.; DE LA FARGE, F. Plasma cystatin C in the dog: reference values and variations with renal failure. *Comparative Clinical Pathology*, London, v. 11, p. 44-49, 2002
- BROWN, S. A.; BARSANTI, J. A.; CROMWELL, W. A. Gentamicin-associated acute renal failure in the dog. *J Am Vet* , 186, 686-690, 1985.
- BRUNKER, J.D.; PONZIO, N. M.; PAYTON, M. E. Indices of urine N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and gamma-glutamyl transpeptidase activities in clinically normal adult dogs. *Am J Vet Res*. 2009 Feb;70(2):297-301. doi: 10.2460/ajvr.70.2.297.
- CAMARGO, E. G. Estimativa da taxa de filtração glomerular com equações baseadas na creatinina e cistatina C séricas em pacientes com diabetes melito tipo 2. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CAMERIERE, R.; FERRANTE, L.; BELCASTRO, M. G.; BONFIGLIOLI, B.; RASTELLI, E.; CINGOLAN, I. M. Age estimation by pulp/tooth ratio in canines by mesial and vestibular periapical X-rays. *J Forensic Sci* 52(5):1151-1155 (2007).
- CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.;SCHENCK, P.A. Urologia e nefrologia do cão e do gato - Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.
- CLEMO FAS (1998). URINARY ENZYME EVALUATION OF NEPHROTOXICITY IN THE DOG. *TOXICOL PATHOL* 26:29-32.
- DESCHEPPER, J. de; COCK, I de; CAPIAU, E. Urinary (G-glutamyltransferase and degree of renal dysfunction in 75 bitches with pyometra. *Res Vet Sci*, v.46, p.396-400, 1989

DOS SANTOS, K. K. F. Guia Prático de Nefrologia em cães e gatos. 1ª Edição. Rio de Janeiro: LF Livros, 2014.

EMILY, P.; PENMAN, S. Small Animal Dentistry. Pergamon Press Ltd, 1994

FRIEDMAN, E. A.; FRIEDMAN, A. L. Is there really good news about pandemic diabetic nephropathy? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 681- 3.

GABRIEL, I. C.; NISHIDA, S. K.; KIRSZTAJN, G. M. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 261-267, 2011

GIOSO, M. A. Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais. 2ª edição. Editora Manole, 2007

GONÇALES, L. N.; PAOLIELLO, M. M. B.; JANEIRO, V.; JUNIOR, M. M. N-acetil-β-D-glicosaminidase como biomarcador precoce de disfunção renal para a exposição ocupacional ao chumbo inorgânico. *J Bras Patol Med Lab* • v. 44 • n. 4 • p. 241-247 • agosto 2008

GRAUER, G. F.; LANE, I. F. Insuficiência renal aguda. In: ETTINGER, J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4ed. São Paulo: Manole, 1997, v.2, p.2374-2393.

GRAUER, G. F. Distúrbios urinários. In: Nelson, N. W.; Couto, C. G. Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais. 2ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2001, p.453-532.

GRECO, D. S.; TURNWALD, G. H.; ADAMS, R.; GOSSET, K. A.; KEARNEY, M.; CASEY, H. Urinary gamma-glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Am J Vet Res*, Chicago, v. 46, n. 11, p. 2332-2335, 1985

HAASE, M.; BELLOMO, R.; DEVARAJAN, P.; SCHLATTMANN, P.; HAASE-FIELITZ, A. NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta- analysis. *Am J Kidney Dis*, v.54, p.1012-24, 2009.

HEIENE, R. L.; MOE, L.; MØLMEM, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. *Res Vet Sci*, v.70, p. 129-137, 2001.

HENNEMAN, C. R. A.; SILVA, C. F.; SCHOENAU, W.; KOMMERS, G. D.; POLYDORO, A. S.; LEITZKE, M. R. M. Atividade da gama glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de ureia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeos em cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 237-244, 1997.

HORAK, E.; HOPFER, S.M.; JR, F.W.S. Spectrophotometric Assay for Urinary N-Acetyl-β-D-Glucosamiidase Activity. *Clin Chem* 1981; 27/7, 1180-1185

ICHIMURA, T.; ASSELDONK, E. J.; HUMPHREYS, B. D.; GUNARATNAM, L.; DUFFIELD, J. S.; BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*, v.118, p.1657-68, 2008.

IRIS Staging of CKD, 2013. Disponível em: <[http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging\\_ckdl](http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckdl)>

JEPSON, R. E.; VALLANCE, C.; SYME, H. M.; ELLIOTT, J. Urinary n-acetyl-d-glucosaminidase (nag) index in cats with variable azotaemia and as a predictor of chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*, 2008; 22 (3): 730 (abstract).

JUDEZ, L. Técnicas de análisis de datos multidimensionales: bases teóricas y aplicaciones en agricultura, Madrid: Ministério de Agricultura Pesca y Alimentacion, 1989. 301p.

JUNG, K.; HEMPEL, A.; GRÜTZMANN, K. D.; HEMPEL, R. D.; SCHREIBER, G. Age-dependent excretion of alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase, G-glutamyltransferase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase in human urine. *Enzyme* 1990; 43:10—6.

JUNG, K.; MATTENHEIMER, H. Urinary enzymes in clinica and experimental medicine. New York: *Springer-Verlag*; 1992.

KAI, K.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIMATSU, Y.; KINOSHITA, J.; TERANISHI, M.; TAKSAKI, W. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a sensitive urinary biomarker of acute kidney injury in dogs receiving gentamicin. *J Toxicol Sci*, v.38, p.269–277, 2013.

KALANSOORYIA, A.; JENNINGS, P.; HADDAD, F.; HOLBROOK, I.; WHITING, P.H. Urinary enzyme measurements as early indicators of renal insult in type 2 diabetes. *Br J Biomed Sci*, v. 64, n. 4, p. 153-156, 2007.

KATAGIRI, D ; DOI, K ; HONDA, K ; NEGISHI, K ; FUJITA, T ; HISAGI, M. Combination of two urinary biomarkers predicts acute kidney injury after adult cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2012;93:577-83. PMID: 22269724

KERR, M. Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia 2ª edição. Roca, 436p. 2003.

KNOLL, E., WISSER, H., AND RAUTENSTRAUCH, H., Comparative study of the diagnostic value of disc electrophoresis of urine proteins and measurement of the excretion of N-acetylglucosaminidase for the detection of renal tubule damage in chronic polyarthritis. *J Clin Chem Clin Biochem*, 18,53-58(1980).

KONO, K.; YOSHIDA, Y.; WATANABE, M. ; WATANABE, H.; INOUE, S.; TANIOKA, Y.; DOTE, T.; ORITA, Y. ; UMEBAYASHI, K.; TANIMURA, Y. Serum and urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity among the inhabitants of a rural area in Japan--the effect of age and hypertension. *Bull Osaka Med Coll*. 1990 Nov;36(1-2):27-34.

- KUNIN, C. M.; CHESNEY, R. W.; CRAIG, W. A. Enzymuria as a marker of renal injury and disease: Study of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease. *Pediatrics* 62,751-760 (1978)
- LAPOINTE, C.; BELANGER, M. C.; DUNN M. N-acetyl- $\beta$ -dglucosaminidase index as an early biomarker for chronic kidney disease in cats with hyperthyroidism. *J Vet Intern Med* 2008;22:1103–1110.
- LEABACK, D. H.; WALKER, P. G. Studies on glucosaminidase. 4. The fluorimetric assay of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. *Biochem J.* (1961) 78 (151–0)
- 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 Vet Res*, v.8, p.248, 2012.
- LEVEY, A. S.; ECKARDT, K.; TSUKAMOTO, Y.; LEVIN, A. Definição e classificação de doença renal crônica: uma declaração de posição de Kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kid Intl*, v.1, n.4, p.133-143, 2005.
- LOCKWOOD, T. D. AND BOSMANN, H. B., The use of urinary N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in human renal toxicology. I. Partial biochemical characterization and excretion in humans and release from the isolated perfused rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol.* 49,323-336 (1979).
- LOFBERG, H.; GRUBB, A. O. Quantitation of gamma-trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest*, v. 39, p. 619-26, 1979.
- LUMSDEN, J. H. 2000. Reference values. In: Feldman, BF; Zinkl, JG; Jain, NC. Eds. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th edition, 12-15. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA. 1992. São Paulo: Roca, 1804p.
- MARUHN, D. Rapid colorimetric assay of  $\beta$ -galactosidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta*, v. 73, n.3, p. 453-61, 1976.
- MARUHN, D., Evaluation of urinary enzyme patterns in patients with kidney diseases and primary benign hypertension. *Curr Probi Clin Biochem.* 9, 135-149 (1979).
- MELO, M.B. Avaliação da técnica de dopplerfluxometria e cálculo do índice resistivo das artérias renais em cães saudáveis e infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. 2004. 47 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MOGENSON CE, CHRISTENSEN CK, VITTINGHUS E. The stages in diabetic renal disease. *Diabetes* 1993; 32: 64S-78S
- MORITA, A.; NUMATA, Y.; KOSUGI, Y.; NOTO, A.; TAKEUCHI, N.; UCHIDA, K. Stabilities of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) isoenzymes in urine: advantage of NAG isoenzyme B measurement in clinical applications. *Clinica Chimica Acta*, v. 278, p. 35-43, 1998.

- NOTO, A., OGAWA, Y., MORI, S., YOSHIYOKA, M., KITAKAZE, T., HORI, T., NAKAMURA, M. AND MIYAKE, T. 1983, Simple, rapid spectrophotometry of urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, with use of a new chromogenic substrate. *Clin Chem*, 29, 1713±1716
- NOVO, A. C. A. C. F. Evolução dos níveis séricos de cistatina C em recém-nascidos de termo no primeiro mês de vida. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OKAY, T. S. Cistatina C: um novo marcador de função renal em crianças. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 112-113, 2002.
- PAES LEME, F. O.; TEIXEIRA, N. C. T.; PAES, P. R. O. Estabilidade de constituintes de urina de cães após conservação sob refrigeração e congelamento. In: Simpósio Internacional de Nefrologia e Urologia Veterinárias, 1., 2011, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: SINUV, 2011. CD- ROM.
- PANCHAPAKESAN U, XIN-MING C, AND POLLOCK CA. Drug insight: thiazolidinediones and diabetic nephropathy – relevance to renoprotection. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005; 1: 33-43
- PARVING, H.H.; ANDERSEN, A.R.; SMIDT, U.M.; SVENDSEN, P.A. Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. *Lancet*. 1983; 8335: 1175-9.
- PATRICK, A. W.; OLIVER, M. D.; HOWIE, A. F.; DAWES, J.; MACINTYRE, C. C. A.; FRIER, B. E. Urinary excretion of  $\beta$ -thromboglobulin and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in type 1 diabetes: potential indicators of early nephropathy. *Diabete Metab*. 1990; 16: 441-447
- PERES, L. A. B.; JUNIOR, A. D. C. J.; SCHAFFER, A. J.; SILVA, A. L.; GASPAR, A. D.; SCARPARI, D. F.; ALVES, J. B. F.; NETO, R. G. N.; OLIVEIRA, T. F. T. Biomarcadores da Injúria Renal Aguda. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v.35 n.3 Jul/Set, 2013
- PASCALE, M. Y. SMETS, E. M.; BERT, M. ; LUC DUCHATEAU, S. D. Effect of sampling method and storage conditions on albumin, retinol-binding protein, and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase concentrations in canine urine samples. *J Vet Diagn Invest* 22:896–902 (2010)
- PEREIRA, A. A. Atlas radiográfico do esqueleto imaturo de cães e gatos. Editora Revinter, 2010
- POLZIN, D.J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Veterinary Clinical Small Animal*. v.41, p.15-30, 2011.
- POWELL, S. C.; SCARO, J.; WILSON, E.; SHIHABI, Z. K.. Assay of urinary n-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in a centrifugal analyzer. *Clin chem*. 29: 1717-1719, 1983.
- PRAGA, M. Slowing the progression of the renal failure. *Kid Intl*, v.61, p.18-22,2002
- PRESSLER B. M. Clinical Approach to Advanced Renal Function Testing in Dogs and Cats. *Vet Clin N Am*, v. 43, p.1193–1208, 2013.

- PRICE, R. G. Urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) as an indicator of renal disease. *Curr Probl Clin Biochem*, 9, 150-163 (1979).
- PRICE, R. G. The role of NAG (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 1992;38(Suppl 1):S14-S19.
- RING, E.; et al. Urinary N-acetyl-B-D-glucosaminidase activity in patients with cystic fibrosis on long term gentamicin inhalation. *Arch Dis Child*, v. 78, p. 540-543, 1998.
- RIVERS, B. J. WALTER, P. A. O'BRIEN, T. D.; KING, V. L.; POLZIN, D.J. Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a diagnostic tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the dog. *J Am Hos Assoc* , v. 32, n. 4, p. 323-336, 1996.
- ROCHA, D. F. *Apis mellifica* no tratamento homeopático da nefrotoxicidade induzida por gentamicina em cães. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ROSS, L. Acute Kidney Injury in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011; 41: 1-14
- SANTIN, F.; MOUTINHO, F. Q.; AMARAL, A. S.; TAKAHIRA, R. K. Acompanhamento laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina B. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1816-1823, 2006.
- SATO, R.; SOETA, S.; MIYAZAKI, M.; SYUTO, B.; SATO, J.; MIYAKE, Y.; YASUDA J.; OKADA K.; NAITO Y. Urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and its isoenzymes in cats with urinary disease. *J Vet Med Sci*. 2002 Apr;64(4):367-71.
- SATO, R.; SOETA, S.; MIYAZAKI, M.; SYUTO, B.; SATO, J.; MIYAKE, Y.; YASUDA, J.; OKADA, K.; NAITO, Y. Clinical availability of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase index in dogs with urinary diseases. *J Vet Med Sci*. 2002 Apr;64(4):361-5.
- SCHIFFL H.; LANG S. M. Update on biomarkers of acute kidney injury: moving closer to clinical impact? *Mol Diag & Ther*, v.16, p.199-207, 2012.
- SEMCZUK-SIKORA, A.; SIKORA, P.; SEMCZUK, M. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in women with preeclampsia. *Ginekol Pol*, 2000 Mar;71(3):141-5.
- SEMERCİ, T.; CUHADAR, S.; AKÇAY, F. A.; AYDIN, T. K.; ATAY, A.; KOSEOĞLU, M.; BAYATA, S. Comparing the renal safety of isoosmolar versus low-osmolar contrast medium by renal biomarkers N-acetyl-B-D-glucosaminidase and endothelin. *Angiology*, 2014 Feb; 65(2):108-12.
- SHERMAN, R. L.; DRAYER, D. E.; LEYLAND-JONES, B. R.; REIDENBERG, M. M. N-acetyl-B-D-glucosaminidase and B2-microglobulin. *Arch Intern Med*, 1983 143: 1183-1185

- SIROTA, J. C.; KLAWITTER, J.; EDELSTEIN, C. L. Biomarkers of acute kidney injury. *Jo Toxi*. Online, out. 2011.
- SHIBATA, H.; YAGI, T. Rate assay of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase with 4-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosaminide as an artificial substrate. *Clin Chim Acta*. 1996 Jul 15;251(1):53-64.
- STEPHEN J.; SHERDING R. G. Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais. São Paulo: Roca, p.1591, 1998.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de patologia clínica veterinária. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 8, p. 368-375.
- TASSINI, L. E. S.; VEADO J. C. S.; VALLE P. G.; PIACESI T. M. A.; BANDEIRA C. M.; LAGARES M. A. Ômega-3 como terapia renoprotetora na doença renal crônica. In: *Simpósio Internacional de Nefrologia e Urologia Veterinárias*, 1., 2011, Belo Horizonte. *Anais...* Porto de Galinhas: SINUV, 2011. CD- ROM.
- UCHINO, S.; KELLUM, J. A.; BELLOMO, R.; DOIG, G. S.; MORIMATSU, H.; MORGERA, S. Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA J Am*, v.8, p.294-813, 2005.
- URBSCHAT, A.; OBERMÜLLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers*, v.16, p.22-30, 2011.
- VADEN, S. L.; LEVINE, J.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective case-control of acute renal failure in 99 dogs. *J Vet Intern Med*, 11, 58-64, 1997.
- VEADO, J. C. C.; ROCHA, D. F.; COBUCCI, G. C.; MELO, M. M.; BANDEIRA, C. M.; PAES, P. R. O.  $\gamma$ -Glutamyltransferase urinária, proteína urinária e fósforo sérico no diagnóstico precoce da insuficiência renal aguda induzida em cães. In: CONFERÊNCIA SULAMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 10., 2010, Rio de Janeiro
- VEADO, J. C. C.; TASSINI, L. E. S.; PIACESI, T. M. A.; VALLE, P. G.; BANDEIRA, C. M.; MELO, M. M. Inibidores da enzima conversora de angiotensina na nefrologia. In: *Simpósio Internacional de Nefrologia e Urologia Veterinárias - SINUV*, Porto de Galinhas. 2011.
- VEADO, J. C.; ROCHA, D. F.; COBUCCI, G. C.; MELO, M. M.; BANDEIRA, C. M.; PAES, P. R. O. Gama glutamiltransferase urinária, proteína urinária e fósforo sérico no diagnóstico precoce da insuficiência renal aguda induzida em cães. In: *Combravet*, 2012.
- WHITING, P. H.; PRICE, R. G. Importance of early detection of renal dysfunction: value of markers of early renal disease and damage. *Clin Biochem* 2001; 3: 3-8
- WITWER, F.; BOHNWALD, H.; KLAASEN, R. Efecto del tiempo, temperatura de conservacion y del anticoagulante (EDTA/NaF) en muestras para perfiles metabolicos. *Arch Med Vet*, v.18, p.43-51, 1986.

## ANEXO 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### **Título do Projeto:**

Padronização de ensaio espectrofotométrico automático para NAG (N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase) em urina de cães.

#### **Nome do (a) Professor (a) Responsável:**

Profa. Dra. Fabíola Oliveira Paes Leme

#### **Nome dos (as) demais participantes:**

Aluno de mestrado Luiz Eduardo de Souza Tassini (CRMV-MG 13.539)

#### **Descrição do Projeto:**

Serão selecionados 60 cães com peso de 1 a 40 Kg, idade de dois meses a 15 anos, de diferentes raças, oriundos de canis e atendimento clínico do médico veterinário Luiz Eduardo de Souza Tassini – CRMV-MG 13.539.

Os proprietários serão orientados pessoalmente que serão apenas coletadas amostras de sangue e urina nos cães, não havendo acompanhamento clínico posterior, vinculado com a autorização da coleta de amostras para exames.

Que a coleta das amostras não causam alterações clínicas e ou laboratoriais nos animais, já que serão coletadas com técnicas assépticas e em volume adequado.

As amostras serão analisadas inicialmente para verificar se existem alterações laboratoriais que impeçam que os cães sejam incluídos no experimento.

Aqueles que tiverem a condição de hígidos terão as amostras de urina avaliadas para a atividade de NAG urinária, o que, após análise estatística, auxiliará na determinação de um intervalo de valores de normalidade para essa enzima urinária.

Serão selecionadas aleatoriamente amostras de 10 cães, que terão a atividade de NAG urinária avaliada em três métodos de conservação diferentes: refrigeração de 2 a 8 °C, congelamento a -20 °C, e temperatura de 20 a 30° C, com mensuração da atividade de NAG urinária nos tempos, 24, 48, 72 horas, 7 e 15 dias de armazenamento..

Após análises estatísticas serão avaliados entre os três métodos de conservação o mais adequado para a amostra estudada, e os valores de normalidade da atividade de NAG urinária em cães hígidos.

### **Aquiescência/Consentimento livre e esclarecido**

Eu, Sr (Sra) \_\_\_\_\_, portador(a) do RG: \_\_\_\_\_,  
CPF: \_\_\_\_\_, residente e domiciliado(a) na \_\_\_\_\_, Bairro:  
\_\_\_\_\_, Cidade: \_\_\_\_\_, MG, CEP: \_\_\_\_\_, *neste ato  
oferto a participação de meu (s) animal (is) da espécie canina de nome  
\_\_\_\_\_ raça \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, para  
participar(rem) deste projeto.*

*De acordo com o que me foi esclarecido, minha participação neste projeto é voluntária, não havendo nenhum custo a mim conferido, portanto, não existe remuneração ou vínculo empregatício, e poderei me recusar a participar e retirar meu animal do estudo sem prejuízo ou justificativa a qualquer momento.*

*Fui informado que não existe risco associado ao tratamento, sendo que qualquer enfermidade ocorrida durante a pesquisa não é de responsabilidade da equipe, uma vez que os procedimentos adotados não estão associados a qualquer dano a saúde. Assim a equipe de trabalho fica isenta da obrigação de tratamento de enfermidade no (s) animal (is) durante o estudo.*

*Ao participar deste estudo permitirei que o (a) médico (a) veterinário (a) colete sangue, urina, realize exame de imagem (ultrassonografia abdominal) e faça avaliação clínica, ficando os resultados dos exames obtidos à minha disposição. Também fico ciente que serão coletados dados sobre meu animal e a sua criação.*

*A participação neste projeto não traz complicações legais. Os procedimentos adotados neste projeto obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e à Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008.*

*Todas as informações coletadas neste estudo serão utilizadas apenas para fins acadêmicos.*

---

Assinatura do (a) Proprietário (a)

---

Luiz Eduardo de Souza Tassini (*Mestrando*)

---

Fabíola Oliveira Paes Leme (*Orientador*)

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

## ANEXO 2

### Ficha de Identificação, Anamnese e Exame Clínico

**Data:**

#### Dados do(a) Proprietário(a)

**Nome:**

**Rua/Avenida:**

**Bairro:**

**Cidade:**

**Estado:**

**CEP:**

**Telefones:**

**E-mail:**

#### Dados do Animal

**Nome:**

**Sexo:** ( ) Macho ( ) Fêmea

**Raça:**

**Pelagem:**

**Data de Nascimento:**

**Peso:**

**Tipo de moradia:** ( ) Casa ( ) Apartamento ( ) Abrigo ( ) Sítio

**Tem contactantes:** ( ) Não ( ) Sim - **Quantos?** \_\_\_\_

**Apetite:** ( ) Normal ( ) Mais do que o normal ( ) Diminuído ( ) Não Come ( ) Não Sabe



**Linfonodos:** ( ) Normais ( ) Aumentados Quais: \_\_\_\_\_

**Frequência respiratória:** ( ) Normal ( ) Taquipnéia ( ) Bradipnéia

**Ausulta cardíaca:** ( ) Normal ( ) Sopro / Grau: \_\_\_\_\_

**Pressão arterial sistólica:** \_\_\_\_\_ mm/Hg **Pressão arterial diastólica:** \_\_\_\_\_

**Ausulta torácica:** ( ) Normal ( ) Estertor Descrever: \_\_\_\_\_

**Narinas:** ( ) Normais ( ) Secreção ( ) Ressecadas

**Olhos:** ( ) Normais ( ) Secreção ocular ( ) Secreções ( ) Úlceras ( ) Outros: \_\_\_\_\_

**Boca:** ( ) Normais ( ) Alterações Quais: \_\_\_\_\_

**Ouvidos:** ( ) Normais ( ) Alterações Quais: \_\_\_\_\_

**Pele:** ( ) Normais ( ) Alterações Quais: \_\_\_\_\_

**Abdômem:** ( ) Normais ( ) Alterações Quais: \_\_\_\_\_

**Genito-urinário:** ( ) Normais ( ) Alterações Quais: \_\_\_\_\_

**Mamas:** ( ) Normais ( ) Tumor Quais: \_\_\_\_\_

**Membros:** ( ) Normais ( ) Alterações Quais: \_\_\_\_\_

**SNC:** ( ) Normal ( ) Alterações Quais: \_\_\_\_\_