

**ELIANA MATIAS DE SOUZA**

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOTURBIDIMÉTRICA PARA  
DOSAGEM DE CISTATINA C E SUA COMPARAÇÃO COM  
OUTROS MARCADORES DE INJÚRIA RENAL AGUDA EM CÃES  
CRITICAMENTE ENFERMOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal  
Orientadora: Profa. Dra. Fabiola Paes Leme

**Belo Horizonte  
2017**

S729v Souza, Eliana Matias de, 1966-  
Validação da técnica imunoturbidimétrica para dosagem de cistatina C e sua  
comparação com outros marcadores de injúria renal aguda em cães criticamente  
enfermos / Eliana Matias de Souza. – 2017.  
130 p. : il.

Orientadora: Fabiola Paes Leme  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Rins – Doenças – Teses.  
3. Biomarcadores – Teses. I. Leme, Fabiola Paes. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

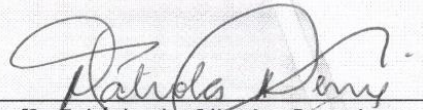
CDD – 636.708 966

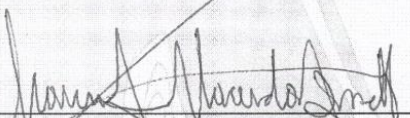
## FOLHA DE APROVAÇÃO

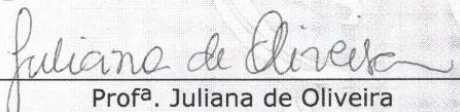
**ELIANA MATIAS DE SOUZA**

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

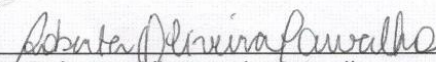
Aprovada em 02 de Maio de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Fabiola de Oliveira Paes Leme  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Márcio Henrique Lacerda Amdt  
Enzytec Consultoria em Biotecnologia Ltda

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Juliana de Oliveira  
Universidade Federal Fluminense - UFF

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Roberta Oliveira de Carvalho  
Doutorado - UFMG



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Em especial, aos animais, razão pela qual sempre procurarei um aprimoramento profissional, para que possa ajuda-los da melhor maneira.

Agradeço ao meu grande exemplo, o professor Antônio Ultimo de Carvalho que admiro pelo seu caráter, determinação, humildade, coerência e pela sua inteligência ímpar. Acreditando em meu potencial incentiva-me sempre, respeitando minha personalidade e meu modo de ser. Para mim é uma imensa honra e orgulho tê-lo como orientador, seus preciosos conselhos e inestimável confiança.

À Professora Fabiola Paes Leme agradeço pelos ensinamentos e pela maneira com a qual conduziu toda elaboração do nosso trabalho. E mais importante à boa amizade constituída.

À LABTEST por ter viabilizado a concretização deste projeto, fornecendo material necessário, sem o apoio dos quais esta pesquisa não teria sido possível.

Ao Dr. Marcio Henrique Lacerda Arndt pela competência, disponibilidade e pelos conselhos e experiência sempre para oferecer.

À amiga Mardelene Geisa Gomes pelas correções indispensáveis e providenciais, pela certeza de uma revisão ímpar e também pela valiosa amizade.

Meus agradecimentos aos Professores Paulo Ricardo de Oliveira Paes e Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho pela importante contribuição e principalmente pela participação na banca de qualificação e pré-defesa.

Aos médicos veterinários e funcionários do Hospital Veterinário da UFMG os quais contribuíram direta ou indiretamente na realização dessa pesquisa.

Agradeço sincera e profundamente a todas as pessoas que muito me encorajaram e ajudaram a produzir algo de valor em minha vida.

Aos familiares pelo apoio e compreensão nas ausências.



## Sumário

RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS .....	17
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
1. Etiopatogenia e classificação da IRA .....	19
2. Critérios de diagnóstico e classificação da IRA .....	23
2.1. Métodos tradicionais .....	23
2.2. Ultrassonografia renal na avaliação do paciente com IRA .....	28
2.3. Novas metodologias de diagnóstico de ira em cães .....	33
b. Novos biomarcadores de IRA .....	35
b.1. Enzimas urinárias .....	37
Gama-glutamil transferase (GGT).....	38
N- acetyl-β-D- glucosaminidase (NAG) .....	38
Neutrófilo gelatinase-associada lipocaina (NGAL) .....	39
Kidney injury molecule-1 (KIM-1).....	39
Interleucina-18 (IL-18).....	39
b.2. Proteínas de baixo peso molecular (Cistatina C).....	40
Determinação laboratorial da cistatina C .....	41
Estabilidade da amostra.....	45
Valores de referência.....	45
Cistatina C na avaliação da função renal.....	47
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
1. Animais .....	51
2. Avaliação laboratorial .....	52
Urinalise .....	52
Hemograma e Bioquímica sérica: .....	52
Taxa de filtração glomerular .....	52
3. Exame ultrassonográfico .....	53
4. Análise estatística .....	53
RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	54
ARTIGO I .....	55
VALIDAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOTURBIDIMÉTRICA DA CISTATINA C PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL DE CÃES.....	55
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>55</b>

<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	56
<b>RESULTADOS</b> .....	57
1. Calibração .....	57
2. Precisão .....	58
3. Recuperação .....	59
4. Limite de quantificação .....	59
5. Efeito pró-zona .....	60
6. Estabilidade das amostras .....	60
7. Intervalo de referência .....	60
8. Correlação entre os valores de cistatina C e creatinina séricas no diagnóstico de ira .....	61
9. Desempenho da cistatina C como biomarcador de injúria renal em animais com diferentes graus de IRA .....	62
<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>ARTIGO II</b> .....	67
<b>CISTATINA C NA INJÚRIA RENAL AGUDA: DIAGNÓSTICO EM CÃES CRITICAMENTE ENFERMOS EM UTI</b> .....	67
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	67
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67
<b>RESULTADOS</b> .....	68
<b>DISCUSSÃO</b> .....	71
<b>CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>ARTIGO III</b> .....	75
<b>CISTATINA C E CLASSIFICAÇÃO IRIS: AVANÇOS NA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL EM CÃES EM CRITICAMENTE ENFERMOS EM UTI</b> .....	75
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	75
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	77
<b>RESULTADOS</b> .....	78
<b>DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>ARTIGO IV</b> .....	87
<b>CONTRIBUIÇÃO DA ULTRASSONOGRAFIA NO DIAGNÓSTICO DE INJÚRIA RENAL AGUDA EM CÃES EM UTI</b> .....	87
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	87
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	87
<b>RESULTADOS</b> .....	88
<b>DISCUSSÃO</b> .....	91



<b>CONCLUSÕES</b> .....	96
<b>ARTIGO V</b> .....	97
<b>MARCADORES URINÁRIOS E SÉRICOS NO DIAGNÓSTICO DE IRA EM CÃES CRITICAMENTE ENFERMOS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA</b> .....	97
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	97
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	97
<b>RESULTADOS</b> .....	98
<b>DISCUSSÃO</b> .....	102
<b>CONCLUSÕES</b> .....	106
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	107
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	108
<b>ANEXO 1</b> .....	124
<b>ANEXO 2</b> .....	125
<b>ANEXO 3</b> .....	127

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios obtidos para construção da curva de calibração utilizando cistatina C canina purificada	58
Tabela 2	Valores médios seguidos do desvio padrão, da cistatina C sérica em amostras de soro canino com alta e baixa concentrações, utilizadas para avaliação da precisão intra e inter ensaios	59
Tabela 3	Valores médios e porcentagem de cistatina C sérica recuperadas, em amostras de soro canino com alta e baixa concentrações, utilizadas para avaliação da recuperação	59
Tabela 4	Valores médios, desvios padrão e correlação entre creatinina e cistatina C de cães do grupo controle e do grupo IRA.	60
Tabela 5	Correlação entre cistatina C canina, peso, idade e sexo dos animais grupo controle	61
Tabela 6	Valores médios e desvios padrão de creatinina e cistatina C séricas de cães com e sem injúria renal aguda	62
Tabela 7	Frequências absolutas e relativas, médias e desvio padrão das características demográficas (sexo, peso e idade), dos cães saudáveis (GC) e admitidos na unidade de terapia intensiva (UTI) do HV-UFGM entre os meses de janeiro a julho de 2016	68
Tabela 8	Concentrações médias e desvios padrão da creatinina e cistatina C de cães saudáveis e admitidos no UTI do HV-UFGM	69
Tabela 9	Concentrações médias e desvios padrão nos tempos 24, 48 e 72h da creatinina e cistatina C durante a permanência dos cães no UTI do HV-UFGM	69
Tabela 10	Percentual de detecção injúria renal aguda pelos biomarcadores, creatinina e cistatina C, em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	70
Tabela 11	Concentração de cistatina C e creatinina séricas individual de cães às 24, 48 e 72 horas após admissão no UTI do HV – UFGM	70
Tabela 12	Concentrações médias e desvios padrão nos tempos 24, 48 e 72h da creatinina e cistatina C durante a permanência dos cães no UTI do HV-UFGM	78
Tabela 13	Valores absolutos e percentuais de normalidade e alteração do débito urinário dos cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	79
Tabela 14	Estadiamento IRIS em valores percentuais e absolutos dos cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	80
Tabela 15	Percentual de detecção de injúria renal aguda segundo a classificação IRIS (2013) e a concentração de cistatina C, em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	80

Tabela 16	Percentual de detecção injúria renal aguda pelo critério IRIS e pela cistatina C em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	81
Tabela 17	Percentual de detecção de injúria renal aguda pelo critério IRIS e pelas alterações ultrassonográficas em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	89
Tabela 18	Percentual de detecção de injúria renal aguda pelas cistatina C e alterações ultrassonográficas em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	90
Tabela 19	Percentual de detecção de injúria renal aguda pelas alterações ultrassonográficas em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	90
Tabela 20	Médias seguidas de desvio padrão (s) de hemácias e leucócitos de cães admitidos no UTI do HV-UFGM.	98
Tabela 21	Concentrações médias e desvios padrão da creatinina, ureia e albumina sérias de cães admitidos no CTI do HV-UFGM	99
Tabela 22	Percentual de detecção de injúria renal aguda considerando relação proteína creatinina urinária (UPC) e gama glutamil tranferase (GGT) urinária de cães admitidos no UTI do HV-UFGM	99
Tabela 23	Percentual de detecção de injúria renal aguda considerando creatinina sérica e cistatina C de cães admitidos no UTI do HV-UFGM.	100
Tabela 24	Percentual de pacientes com hipoalbuminemia durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	100
Tabela 25	Concentração de creatinina, cistatina C e albumina séricas; relação proteína creatinina urinárias (UPC) e gama glutamil transferase (GGT) urinária de cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	100
Tabela 26	Percentual de pacientes com sedimento urinário ativo durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	100
Tabela 27	Percentual de pacientes com alterações na TFG e débito urinário, durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	101
Tabela 28	Correlação(r) entre as variáveis analisadas nas amostras de cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos fisiológicos da insuficiência renal aguda e sua reparação.	20
Figura 2	Fases da IRA. Alteração da filtração glomerular e lesão renal na insuficiência renal aguda	21
Figura 3	Modelo conceitual de desenvolvimento e evolução da lesão associado à expressão de marcadores precoces e tardios de função renal (VAIDYA, 2008)	36
Figura 4	Desenho esquemático dos principais biomarcadores de função renal e sua localização anatômica no néfron (VAIDYA, 2008)	37
Figura 5	Comportamento de diferentes biomarcadores no diagnóstico de IRA em comparação com a creatinina sérica	40
Figura 6	Estrutura proteica da cistatina C humana (A e B). <b>A)</b> Representação bidimensional da molécula. <b>B)</b> Comparação entre as dimensões da estrutura proteica da Cistatina C humana creatinina e os poros da membrana de filtração	41
Figura 7	Desenho esquemático do processamento renal da cistatina C	42
Figura 8	Representação esquemática do princípio de técnicas imunológicas utilizadas para detecção da Cistatina C	43
Figura 9	Representação esquemática do efeito prozona	44
Figura 10	Sensibilidade e especificidade da Cistatina C e creatinina na avaliação da função renal	45
Figura 11	Relação entre os valores reais e os valores medidos da cistatina C canina purificada durante a calibração.	57
Figura 12	Valores das concentrações séricas da Cistatina C e da Creatinina séricas de cães saudáveis	61
Figura 13	Valores séricos de Creatinina e Cistatina C de cães com Injúria Renal Aguda	62
Figura 14	Alterações ultrassonográficas em cães com IRA	95

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Critérios de classificação e estadiamento de cães com disfunção renal aguda segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS, 2013)	34 e 78
-----------	---	---------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CV</b>	Coeficiente de variação
<b>CTI</b>	Centro de Tratamento Intensivo
<b>DRC</b>	Doença renal crônica
<b>DUE</b>	Densidade urinária específica
<b>DU</b>	Débito urinário
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>GGT</b>	Gama-glutamyl-transferase
<b>IL-18</b>	Interleucina-18
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
<b>IRA</b>	Injúria Renal Aguda
<b>IRIS</b>	Sociedade Internacional de Interesse Renal
<b>KDa</b>	Quilo Daltons
<b>KIM-1</b>	Kidney Injury Molecule-1
<b>mg/dL</b>	Miligrama por decilitro
<b>mg/L</b>	Miligrama por litro
<b>ml</b>	Mililitros
<b>NAG</b>	N acetyl- $\beta$ -D- Glucosaminidase
<b>NGAL</b>	Neutrófilo Gelatinase-Associada Lipocaina
<b>NTA</b>	Necrose tubular aguda
<b>PENIA</b>	Particle Enhanced Nephelometric Immunoassay
<b>PETIA</b>	Particle Enhanced Turbidimetric Immunossay
<b>S</b>	Desvio padrão
<b>TFG</b>	Taxa de Filtração Glomerular
<b>UPC</b>	Relação proteína -creatinina
<b>UTI</b>	Unidade Terapia Intensiva
<b>%</b>	Porcentagem



## RESUMO

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome complexa, associada a uma evolução desfavorável, principalmente em cães em unidade de terapia intensiva (UTI), onde apresenta elevada morbidade e mortalidade. Entretanto, seus efeitos podem ser minimizados, se diagnosticada e tratada precoce e adequadamente. O diagnóstico de IRA requer combinação de testes laboratoriais, incluindo novos biomarcadores como cistatina C, considerada superior a creatinina sérica por apresentar melhor correlação com a taxa de filtração glomerular. Contudo, poucos estudos demonstram a utilidade diagnóstica da cistatina C em cães em unidade de terapia intensiva. O objetivo primário deste estudo foi validar a técnica imunoturbidimétrica (PETIA) para mensurar a cistatina C sérica em cães. O método comercialmente disponível para cistatina C humana (PETIA) foi calibrado com cistatina C canina e resultou em uma curva de calibração adequada. As análises em amostras de soro canino apresentaram recuperação média de 97% e coeficiente de variação entre 3,7 a 8,5%. O intervalo de referência da cistatina C em cães hígidos foi de 0,57 mg/L - 1,29 mg/L. Não houve diferenças entre os sexo, idade e peso. A concentração em cães com lesão renal aguda foi significativamente maior ( $2,82 \pm 1,46$  mg/L) do que em 19 cães controle ( $0,93 \pm 0,18$  mg/L). A análise estatística dos dados confirmou forte correlação entre cistatina C e creatinina sérica ( $r = 0,94$ ,  $p < 0,05$ ) em cães com lesão renal aguda. O segundo objetivo foi avaliar desempenho deste biomarcador para o diagnóstico de lesão renal aguda em cães em unidade de terapia intensiva. A concentração da cistatina C foi determinado em 28 cães e foi comparado com creatinina sérica, classificação IRIS e outros testes laboratoriais. A cistatina C sérica foi elevada em 78,6% dos cães e a maioria deles apresentaram creatinina plasmática dentro dos limites de referência. Os resultados demonstram que a cistatina C pode ser utilizada para a detecção da lesão renal aguda em cães em UTI devido à sua sensibilidade.

**Palavras-chave:** cão, lesão renal, biomarcador, diagnóstico.

## ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a complex syndrome, associated with unfavorable evolution, especially in dogs in intensive care unit (ICU), which high morbidity and mortality. However, AKI effects can be minimized if diagnosed and treated early and adequately. AKI diagnosis requires combination of laboratory tests, which are considered to be non-sensitive and specific for the early detection of discrete degrees of loss of renal function. The biomarker cystatin C is considered superior to serum creatinine as it has better correlation with the glomerular filtration rate. However, there are no studies that demonstrated the use of cystatin C in dogs at ICU. The primary aim of this study was to validate the immunoturbidimetric technique (PETIA) to measure serum cystatin C in dogs. Commercially available method for human cystatin C (PETIA) was calibrated with canine cystatin C and resulted in a suitable calibration curve, with an average recovery of 97%. The reference range of serum cystatin C in healthy dogs was 0.57 mg / L - 1, 29 mg / L. No statistical differences among sex, age and weight were observed. The concentration of cystatin C in dogs with AKI was significantly higher ( $2.82 \pm 1, 46$  mg / L) than in control dogs ( $0.93 \pm 0.18$  mg / L). Statistical analysis of the data confirmed a strong correlation between cystatin C and serum creatinine ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.05$ ) in dogs with AKI. The second objective was to evaluate the performance of this biomarker in the diagnosis of AKI in dogs in ICU. Cystatin C concentration was determined in 28 dogs and compared with serum creatinine, IRIS classification and other laboratory tests. Serum cystatin C presented higher concentrations in 78.6% of dogs and most of them presented plasmatic creatinine level within the reference limits. The results demonstrate that cystatin C can be used for the detection of AKI in dogs in ICU, as it shows greater sensitivity when compared to traditional markers.

**Keywords:** dog, kidney injury; biomarker; diagnosis;



## INTRODUÇÃO

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome complexa e multifatorial, frequente em cães hospitalizados, principalmente em unidade de terapia intensiva (UTI), onde está associada a elevada taxa de morbidade e mortalidade. Entretanto, pode ter seu curso minimizado se diagnosticada e tratada adequadamente. Apesar de sua importância clínica, seu diagnóstico precoce ainda é um desafio devido ao fato da utilização de indicadores bioquímicos pouco sensíveis e, portanto, tardios para esta finalidade. Dentre os testes disponíveis na rotina, a taxa de filtração glomerular é considerada o “teste ouro” para avaliar a função renal, entretanto é uma técnica trabalhosa e de difícil realização. Atualmente os biomarcadores mais utilizados são a ureia e creatinina séricas, contudo, são considerados pouco sensíveis e específicos para detecção precoce de graus discretos de perda de função renal. Neste sentido, torna-se necessário a busca de um biomarcador não invasivo que favoreça o diagnóstico precoce, possibilitando condutas terapêuticas mais eficientes. Com esse objetivo, diversas proteínas de baixo peso molecular foram analisadas dentre as quais a cistatina C se destacou, por apresentar boa correlação com a taxa de filtração glomerular. Os principais atributos deste biomarcador são seu pequeno tamanho e alto ponto isoelétrico os quais permitem que seja livremente filtrada através da membrana glomerular, sendo reabsorvida e catabolizada nos túbulos proximais. Os níveis séricos da cistatina C não são afetados pelo sexo, peso e idade, conferindo assim uma maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico precoce de alterações renais. Portanto, este biomarcador tem sido proposto como forma alternativa para avaliação da função renal. Na veterinária existem poucos estudos que avaliam seu desempenho no diagnóstico de injúria renal aguda.

Dessa forma, a hipótese deste estudo é de que a cistatina C pode representar uma boa alternativa para diagnóstico e acompanhamento de injúria renal aguda em cães. O presente trabalho é motivado pela falta de consenso quanto à definição e classificação da IRA, escassez de estudos sobre sua incidência em cães hospitalizados, principalmente em unidade de terapia intensiva (UTI) e pelo fato de se utilizar indicadores bioquímicos pouco sensíveis e específicos para o diagnóstico de injúria renal.

## OBJETIVOS

Validar o método imunoturbidimétrico existente para determinar a concentração de cistatina C canina sérica em cães;

Estabelecer valores de referência da cistatina C para cães hígidos;

Comparar a concentração sérica de cistatina C canina em cães hígidos e aqueles com injúria renal aguda;

Avaliar o desempenho da cistatina C, comparando-a com a creatinina sérica para o diagnóstico de IRA;

Avaliar a função renal de cães em unidade de terapia intensiva através do critério IRIS (2013) e comparar com a dosagem sérica de cistatina C;

Caracterizar as principais alterações ultrassonográficas renais em cães com IRA e correlacioná-las com os diferentes estágios de disfunção renal estabelecidos através do critério IRIS (2013) e com os níveis séricos de cistatina C.

Avaliar o desempenho de marcadores rotineiramente utilizados como a urianálise, débito urinário, razão proteína creatinina urinária (UPC) e Gama glutamil transferase (GGT) urinária no diagnóstico de IRA em cães em unidade de terapia intensiva.

## REVISÃO DE LITERATURA

Tradicionalmente, a injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome definida como declínio rápido, abrupto, sustentado e reversível da função renal, por período de dias a semanas (Lameire *et al.*, 2005). Entretanto, segundo Armitage e Thomson (2007) e Sharma (2012), esta definição apresenta limitações com implicações na prática clínica. Neste sentido, os termos “*rápido, abrupto e sustentado*” são pouco definidos, já que a IRA pode envolver períodos superiores a dias, dependendo da causa e do tipo de paciente acometido. Por este motivo, outras definições foram introduzidas, considerando outros fatores como diminuição de 20% da taxa de filtração glomerular (TFG), elevações discretas nos valores de creatinina sérica ou aumento de 25%, até a necessidade de tratamento dialítico. Na prática clínica a IRA se manifesta como aumento sérico de ureia e creatinina, alterações hidroeletrólíticas e do equilíbrio ácido base, com ou sem redução no débito urinário (Bellomo *et al.*, 2004; Grauer, 2009; Sharma, 2012). Cabe ressaltar que existem mais de 35 definições para IRA e que a falta de conceito único e universalmente aceito dificulta o reconhecimento de sua verdadeira incidência (Bellomo *et al.*, 2004; Vaidya *et al.*, 2008). Atualmente, o termo insuficiência renal aguda foi substituído por injúria renal aguda com a finalidade de descrever melhor esta alteração e enfatizar a existência de lesão anterior à perda funcional, bem como a necessidade de se estabelecer um diagnóstico precoce a fim de promover intervenções que diminuam danos renais e conseqüentemente, o aparecimento de insuficiência renal. Em veterinária, a identificação precoce destes pacientes é extremamente importante, pois tratamentos dialíticos nem sempre estão disponíveis (Segev, 2011; Alves *et al.*, 2012; Mugford *et al.*, 2013).

Dados sobre incidência e prevalência da IRA são controversos tanto em medicina quanto em veterinária, sendo a falta de consenso em sua definição um motivo provável. Apesar disso e dos avanços significativos nos cuidados intensivos e da nefrologia, tem-se observado aumento de sua incidência nos últimos anos com conseqüente elevação do tempo de internamento e consumo de recursos hospitalares. A IRA também está associada a altas taxas de mortalidade, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTI), onde os pacientes a desenvolvem por uma combinação de eventos, tais como causas infecciosas e iatrogênicas, pós-cirúrgicos complicados, hipovolemia, alterações hemodinâmicas, induzidas pela quimioterapia, sepse e choque séptico (Armitage e Tomson, 2007; Vaidya *et al.*, 2008; Santos e Marinho, 2013, Mugford *et al.*, 2013). Sendo assim, em pacientes críticos, várias condições como o estado clínico, aumento da idade, existência de outras comorbidades como sepse, são considerados fatores de risco significativo para o desenvolvimento de lesão renal aguda (Kenney *et al.*, 2010; Bennet e Devarajan, 2010; Dirkes, 2011; Santos e Mendonça, 2015). Em humanos, a incidência de IRA adquirida em ambiente hospitalar afeta aproximadamente 7% das admissões hospitalares, podendo chegar a 30% em UTI, sendo que a taxa de mortalidade pode exceder 50% (Bennet e Devarajan, 2010; Griffiths e Kanagasundaram, 2011). Ao contrário da medicina, existem poucos estudos na veterinária que documentam a frequência e as etiologias de IRA em cães em UTI. Por isso observa-se elevada variabilidade dos dados, sendo que relatos indicam incidência de 12 a 63% com taxa de mortalidade entre 43% a 86%. Possivelmente, esta variação se deve ao método de classificação utilizado, ao contexto clínico e à população avaliada (Kenney *et al.*, 2010; Lunn, 2011; Thoen e Kerl, 2011; Segev *et al.*, 2015). Segundo Pelander *et al.* (2015) são necessários estudos epidemiológicos a fim de se estimar a verdadeira incidência e mortalidade das afecções renais em cães, bem como dos fatores de risco associados, a fim de auxiliar os clínicos na tomada de decisões médicas.

## 1. Etiopatogenia e classificação da IRA

Características morfofisiológicas como o elevado aporte sanguíneo renal, tornam o rim susceptível aos efeitos de isquemia e agentes tóxicos. A região cortical renal possui elevada taxa metabólica, sendo mais sensível a toxinas, enquanto a região medular devido ao decréscimo de perfusão e aumento da demanda energética é mais vulnerável à isquemia. Quatro estruturas morfológicas constituem o parênquima e o estroma renal: glomérulos renais, túbulos, vasos peritubulares e interstício. Em relação às afecções renais em cães, observa-se maior prevalência de glomerulopatias secundárias a doenças sistêmicas e infecciosas, seguida por lesões tubulares decorrentes de agentes nefrotóxicos e, as alterações vasculares incomuns nesta espécie (Lees, 2004; Grauer, 2007; Grauer, 2009; Yaqoob, 2009; Clarkson e Fletcher, 2011; Lunn, 2011). Com o propósito de classificação e manejo a IRA classicamente se divide em três categorias: pré-renal, renal e pós-renal.

A IRA pré-renal ocorre em 55% dos casos, é caracterizada pela diminuição reversível da função renal devido à queda na perfusão decorrente de hipovolemia (hemorragias, queimaduras, perdas gastrintestinais, perdas para terceiro espaço, febre, desidratação, hipoalbuminemia), redução de débito cardíaco (insuficiência cardíaca, tamponamento cardíaco), hipotensão sistêmica, sepse, choque, cirurgias prolongadas ou uso de drogas nefrotóxicas. Inicialmente não ocorre lesão parenquimatosa renal, sendo rapidamente reversível após a correção da causa, entretanto, quando mal conduzida e sustentada, pode evoluir para o quadro de IRA parenquimatosa. Em pacientes hipovolêmicos ou sépticos há vasoconstricção intensa para manutenção de pressão sistêmica normal, neste caso, a IRA pré-renal pode ocorrer como resultado da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona associada aos mecanismos regulatórios renais. IRA pré-renal pode também ser dividida em responsiva e não responsiva a volume, sendo que nesta, ocorre dano parenquimatoso e evolução menos favorável (Bellomo *et al.*, 2004; Grauer, 2009; Yaqoob, 2009; Nunes *et al.*, 2010; Griffiths e Kanagasundaram, 2011).

Considera-se também que a hipovolemia pode aumentar o risco de danos isquêmicos, reduzir a distribuição de drogas nefrotóxicas por redução da filtração glomerular, do fluxo tubular com consequente aumento da absorção tubular de agentes tóxicos. É nesse momento que a vulnerabilidade do rim a isquemia e à hipóxia se manifesta, podendo determinar a passagem de IRA pré-renal à IRA renal. Hipotensão discreta também pode provocar azotemia em pacientes de risco como idosos e com doenças que afetam a integridade das arteríolas aferentes, bem como aqueles que utilizam drogas que interferem com a autorregulação renal como inibidores farmacológicos da síntese de prostaglandina (anti-inflamatórios não esteroides) ou da enzima conversora de angiotensina (IECA). Neste caso, pode haver azotemia pré ou renal intrínseca principalmente em pacientes desidratados ou com doença renal pré-existente (Costa *et al.*, 2003; Armitage e Tomson 2007; Nunes *et al.*, 2010; Griffiths e Kanagasundaram, 2011; Rahman *et al.*, 2012).

A IRA renal (intrínseca) é causada por anormalidades originadas no parênquima e que diminuem a função renal e o débito urinário. Sua incidência é cerca de 40%, é usualmente reversível com a interrupção do insulto causador, e retorno da função em um prazo variável de horas a semanas. Entretanto, em alguns casos dependendo do grau da injúria renal ou de doença renal crônica pré-existente, pode ocorrer necessidade de terapia substitutiva renal (Dessen, 2001; Yarlagadda e Perazella, 2006; Rahman *et al.*, 2012). Deve-se à combinação de vasoconstricção intrarrenal intensa e persistente, causada pela liberação de endotelinas, produção de espécies reativas de oxigênio, lesão das células tubulares com descamação, formação de cristais e diminuição do fluxo urinário e da perfusão glomerular (Schrier *et al.*, 2004; Armitage e Tomson 2007; Griffiths e Kanagasundaram, 2011).

A IRA renal pode ser dividida em necrose tubular aguda (NTA) isquêmica, nefrotóxica ou a combinação de ambas. Considera-se que a NTA isquêmica é mais frequente em pacientes internados, submetidos a grande trauma cirúrgico, hipovolemia intensa, sepse e queimaduras extensas, especialmente quando associado à utilização de agentes nefrotóxicos (Dessen, 2001; Mugford *et al.*, 2013). A NTA nefrotóxica ocorre por lesões decorrentes de exposição a substâncias tóxicas como agentes farmacológicos usados no ambiente do suporte intensivo (antibióticos, antifúngicos, anti-inflamatórios não hormonais), quimioterápicos e também por nefrotoxinas endógenas como proteínas filtradas após hemólise (hemoglobinúria) e lesão muscular (mioglobinúria). Várias observações clínicas e experimentais sugerem que a lesão nefrotóxica é reversível, previsível e passível de correção, se identificada precocemente (Costa *et al.*, 2003; Yarlagadda e Perazella, 2006).

A patogenia da IRA renal é complexa e multifatorial, incluindo alterações hemodinâmicas, disfunção endotelial, vasoconstrição, inflamação, disfunção tubular e morte celular por apoptose e necrose. A liberação de mediadores inflamatórios e vasoativos intrarrenais, stress oxidativo e alterações da microcirculação com hipóxia tecidual contribuem para o desenvolvimento da IRA após um insulto tóxico ou isquêmico (Devarajan, 2006; Vadya *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2012; Doi, 2016). A fig. 1 representa o mecanismo geral de lesão renal, em suas diferentes regiões – vasos, espaço intersticial e o néfron propriamente dito. Os eventos fisiopatológicos, independentemente de sua etiologia, resultam em lesão endotelial seguida de diapedese e migração leucocitária, com consequente lesão das células tubulares renais, caracterizada pelas perdas da borda em escova e da polaridade das células proximais, que pode resultar em morte celular por apoptose ou por necrose (Lameire *et al.*, 2005; Barros e Filho, 2013) (Fig.1).

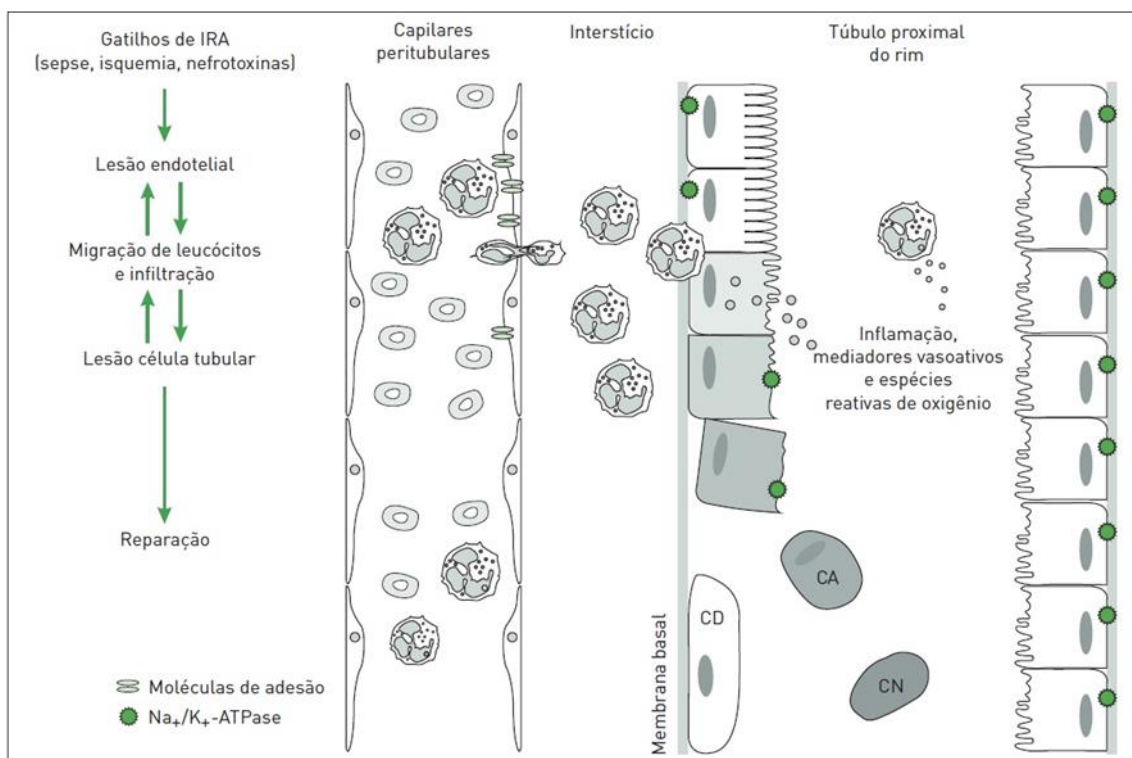


Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos da injúria renal aguda e sua reparação. Lesão das células tubulares renais com perda da borda em escova das células proximais, perda da polaridade. Legenda: CA, células apoptóticas; CD, células de diferenciação; CN, células necróticas. Fonte: Barros e Filho, 2013.

A fisiopatologia da IRA renal aborda quatro fases: iniciação, extensão, manutenção e recuperação, sendo que muitas vezes não é possível distingui-las, especialmente na prática clínica (Fig. 2). A *iniciação* compreende o período de exposição ao agente etiológico e sua duração varia de horas a dias. Nesta fase o paciente ainda não apresenta sintomatologia clínica nem alterações laboratoriais detectáveis pelos métodos tradicionais.

A *extensão* é a fase caracterizada por isquemia contínua e inflamação local, as quais produzem lesão tubular epitelial e endotelial, levando a apoptose ou necrose. Esta fase pode durar entre um a dois dias e, normalmente, a correção da causa bem como intervenção terapêutica apropriada pode prevenir a progressão e alterar o desfecho por melhorar a resposta durante a fase de recuperação (Fig. 2).

A terceira fase é a *manutenção*, caracterizada por lesões tubulares e redução considerável da TFG. O curso desta fase é variável e pode durar dias a semanas, normalmente neste período a IRA é detectada devido a ocorrência de azotemia, oligúria ou anúria. Embora a intervenção terapêutica durante este período possa salvar a vida do paciente, em geral possui pouco efeito nas lesões renais existentes. Muitos pacientes vêm a óbito durante esta fase.

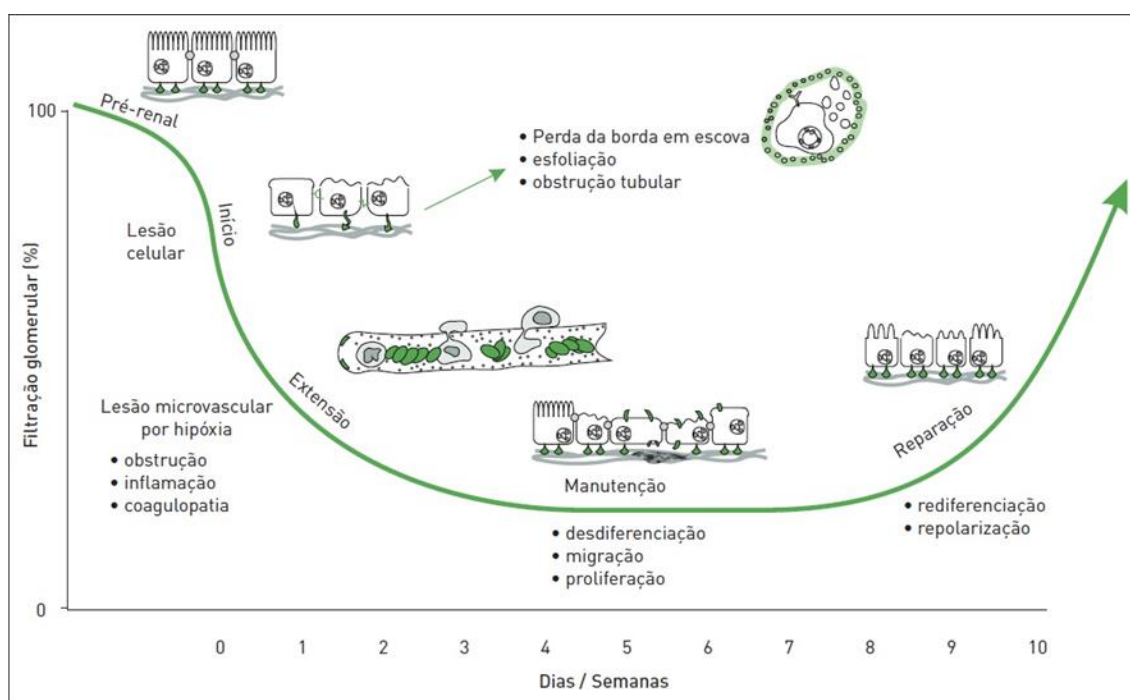


Figura 2. Fases da IRA. Alteração da filtração glomerular e lesão renal. Fonte: Barros e Filho, 2013.

A quarta e última fase é a *recuperação*, na qual ocorre reparação dos túbulos renais cujas células têm capacidade de se regenerar rapidamente após dano, o que explica a reversibilidade da IRA. Contudo, caso a causa seja isquêmica glomerular, as lesões tendem a ser mais intensas e, conseqüentemente, o reparo resulta em fibrose. Clinicamente, ocorre poliúria devido ao retorno parcial da função tubular ou por diurese osmótica devido à lavagem medular. Cabe ressaltar que, embora novos néfrons não possam ser produzidos nem os irreversivelmente danificados reparados, a hipertrofia das unidades funcionais restantes pode compensar adequadamente a função. Esta última fase pode durar semanas a meses e pode ter recuperação completa ou parcial da função renal e neste caso, resulta em doença renal crônica (Devarajan,

2006; Ross, 2006; Vaidya *et al.*, 2008; Langston, 2009; Lunn, 2011; Ross, 2011; Monaghan *et al.*, 2012 Barros e Filho, 2013; Mugford *et al.*, 2013).

A IRA pós-renal é o tipo menos frequente (< 5%) de IRA e ocorre por fatores que obstruam a eliminação da urina (Rahman, 2012). A fisiopatologia relaciona-se ao aumento de pressão dentro do sistema coletor renal com diminuição da TFG e da função tubular. Embora seja reversível se a causa for corrigida rapidamente, obstrução duradoura pode resultar em lesão renal intrínseca irreversível (Yarlagadda e Perazella, 2006; Lunn, 2011).

Segundo Lunn (2011) e Griffiths e Kanagasundaram (2011) é essencial para o clínico considerar estes diferentes componentes de IRA, uma vez que a correção das alterações pré e pós-renais podem diminuir as chances de dano renal intrínseco. É importante entender também, que muitos pacientes podem ter a combinação de mais de um tipo de insulto renal, uma vez que existe um dano contínuo entre a azotemia pré-renal e renal e, pós-renal e renal.

Conforme relatado acima, as etiologias de IRA em cães podem ser categorizadas em isquêmica, nefrotóxica (tóxicos, antibióticos), e infecciosas (leptospirose, pielonefrite), dentre outras, sendo sua identificação e correção fundamentais para o prognóstico e desfecho (Stocker e Forrester, 2004). Contudo, deve-se considerar que em animais idosos alguns fatores agravam o quadro. Nesse sentido, mesmo na ausência de doenças específicas, os rins sofrem alterações da senilidade, com conseqüente diminuição da função renal, às vezes de forma subclínica (Grauer, 2005). Portanto, animais idosos estão propensos às mesmas causas de IRA que afetam os jovens, entretanto, as iatrogênicas são mais prevalentes como, por exemplo, o uso de antiinflamatórios não esteróides (AINES), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e antibióticos nefrotóxicos. Além disso, tanto hipovolemia verdadeira (perdas gastrointestinais, hemorragias) quanto a funcional (insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica) são comuns em idosos devido incapacidade de compensar as perdas hídricas através da ingestão oral de água e muitas vezes à dificuldade de locomoção que limita seu acesso a água (Ross, 2011; Mugford *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

Outra consideração é o ambiente em que o paciente está inserido. Neste contexto, a IRA hospitalar é considerada séria complicação de alta taxa de mortalidade, pois resulta de procedimentos potencialmente lesivos ao rim. De acordo com Santos e Marinhos (2013), a incidência de IRA em UTI pode chegar a 40% com mortalidade em torno de 70%. Também está associada ao aumento de custos, do tempo de internação e do risco de evolução para doença renal crônica. Em pacientes críticos, a IRA é de origem multifatorial e ocorre principalmente devido a sepse e choque séptico e falência múltipla de órgãos (Barbosa *et al.*, 2006; Buvic, 2009; Ross, 2011; Gomes, 2014; Wang *et al.*, 2014). Em medicina considera-se que a IRA ocorre em aproximadamente 19% dos pacientes com sepse moderada, 23% com sepse severa e 51% com choque séptico e hemocultura positivo. A combinação de sepse e IRA eleva a mortalidade em 25% (Costa *et al.*, 2003; Scherier *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2012; Santos e Mendonça, 2015).

Neste contexto, considera-se a IRA como uma patologia multisistêmica, e por isso, cada paciente deve ser avaliado quanto às possíveis complicações para completa recuperação, menor tempo de internação e conseqüentemente, melhor desfecho. Neste sentido, o tratamento dos animais acometidos é intensivo e envolve eliminação da causa, correção das conseqüências hemodinâmicas e bioquímicas e, se disponível, a hemodiálise (Grauer, 2005; Brown *et al.*, 2007; Griffiths e Kanagasundaram, 2011). Considera-se que a maioria dos pacientes que sobrevivem recuperam a função renal a níveis normais, mas em alguns dos casos podem apresentar déficits funcionais subclínicos definitivos (Alves *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2012; Souza, 2012; Santos e Marinho, 2013).

Vários são os fatores que determinam o desfecho e o prognóstico de cães com IRA, tais como a causa e a gravidade da injúria, as comorbidades, as complicações existentes e a disponibilidade de tratamento médico adequado (Ross, 2011; Segev *et al.*, 2016). Mesmo pequenas elevações da creatinina sérica se correlacionam com um aumento na mortalidade. Em geral, a mortalidade em cães com quadro clínico grave, varia em torno de 43% a 86%, podendo ser menor naqueles pacientes que recebem tratamentos intensivos, entretanto, é altamente dependente da causa inicial, nem sempre conhecida na admissão deste paciente (Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Souza, 2012; Brown *et al.*, 2015).

Portanto, torna-se importante o reconhecimento dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de IRA em cães hospitalizados, pois muitos podem ser prevenidos através do diagnóstico precoce e manejo correto, além de possibilitar a adoção de medidas que evitem a progressão da lesão que se associa a pior prognóstico (Segev *et al.*, 2008; Griffiths e Kanagasundaram, 2011; Ross, 2011).

## 2. Critérios de diagnóstico e classificação da IRA

### 2.1. Métodos tradicionais

A avaliação da função renal em cães envolve uma combinação de métodos diagnósticos associados ao exame clínico, sendo que a interpretação de testes individuais ou de uma única amostra apresenta baixa sensibilidade e grande variabilidade individual (Lees, 2004; Heine e Lefebvre, 2007; Grauer, 2009). A detecção e confirmação precoce de disfunção renal requer utilização criteriosa de exames complementares, incluindo testes de função renal, urinálise, exames de imagem e, se possível, a utilização de novos biomarcadores (Heine e Lefebvre, 2007; Griffiths e Kanagasundaram, 2011; Pressler, 2013; Cortellini *et al.*, 2015). O diagnóstico precoce de IRA favorece a implantação de estratégias para reduzir a morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos, contudo ainda representa um desafio tanto em medicina quanto em veterinária (Coca *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008; Lunn, 2011).

A TFG é a melhor maneira de mensurar a função renal, pois avalia com alta sensibilidade a capacidade de filtração e habilidade de excreção. Apesar de não poder ser determinada diretamente, pode ser calculados através da depuração de substâncias específicas, denominadas marcadores de filtração (Linnetz e Graves, 2010; Jayasundera e Macnab, 2012; Pressler, 2013). Sua mensuração é necessária para detectar, classificar o estágio da doença renal e avaliar a evolução, além de ser decisiva para adoção imediata de medidas de suporte como diálise (Bastos *et al.*, 2004; Regeniter *et al.*, 2009; Grauer, 2009; Silva e Brune, 2011). Redução da TFG ocorre antes dos sintomas de falência renal e antes do aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina e da diminuição da densidade urinária (Lees, 2004; Lefebvre, 2011).

Segundo Heine e Lefebvre (2007) e Hendy-Willson e Pressler (2011) a avaliação da TFG é útil naqueles animais com ascensão discreta, e ainda dentro da faixa de normalidade da creatinina sérica, suspeita de lesão renal após eventos específicos como tóxicos, choque e cirurgia extensa e na avaliação de drogas eliminadas pelos rins, ou potencialmente nefrotóxicas.

A TFG pode ser determinada por diversos métodos utilizando marcadores endógenos ou exógenos. Dentre estes se citam a depuração plasmática de inulina considerada “teste ouro” e a depuração de radioisótopos, dentre outros. As diversas técnicas utilizadas diferem quanto à sensibilidade, especificidade, disponibilidade, rapidez, custos e modelo farmacocinético usado, além de que algumas necessitam de licenças e instalações especializadas (Watson *et al.*, 2002; Linnetz e Graves, 2010; Gabriel *et al.*, 2011). De maneira geral, estes métodos são trabalhosos, requerem equipamentos sofisticados e de acesso limitado, o que restringe sua utilização na prática clínica (Fleck, 1999; Sodre *et al.*, 2007; Linnetz e Graves, 2010; Hendy-Willson e

Pressler, 2011; Pressler, 2013). Devido a estes fatores, a técnica mais usada para avaliação da TFG é a medida de depuração urinária da creatinina endógena. Este método consiste na coleta completa de urina no período de 24 horas e nas concentrações plasmática e urinária da creatinina. Contudo, a coleta urinária inadequada é um limitador da técnica, devido a erros e ao esvaziamento incompleto da bexiga. Também a utilização da creatinina sérica para o cálculo da TFG possui limitações por ser afetado por fatores não renais como idade, massa muscular, sexo, taxa de produção e volume de distribuição (Watson *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2003; Grauer, 2005). Portanto, considera-se que esta metodologia não é confiável e o tempo dispensado na sua estimativa desestimula o profissional a determiná-la rotineiramente ficando restrita a escolas e centros de pesquisa (Bastos *et al.*, 2004; Grauer, 2009; Silva e Brune, 2011; Hendy-Wilson e Pressler, 2013).

Além disso, a mensuração da TFG, apesar de ser mais indicada, possui outras limitações tais como grande intervalo de valores de referência em cães hípidos e influência de fatores extra renais, incluindo ingestão proteica, hidratação, e ritmo circadiano, os quais diminuem a sensibilidade e especificidade desta técnica (Kampa *et al.*, 2003; Hendy-Willson e Pressler, 2010; Linnetz e Graves 2010; Miyagawa *et al.*, 2010). De acordo com Linnetz e Graves (2010) e Lefebvre (2011) a TFG pode variar significativamente entre os animais, e os valores de referência variam devido às diferenças entre os laboratórios, protocolos de realização e técnicas analíticas o que torna difícil definir alterações na TFG e correlacioná-las a doença renal subclínica versus doença renal discreta, moderada ou severa. Portanto, os resultados da estimativa da TFG não devem ser interpretados isoladamente, mas sim dentro do contexto da história, sinais clínicos e resultados laboratoriais. Na medicina várias equações foram desenvolvidas para prever a TFG em pacientes com IRA, levando em conta fatores relacionados à geração de creatinina e o equilíbrio fluido e não apenas ao seu o valor sérico. Estudo comparando o desempenho destas equações não demonstrou diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que estas ferramentas são importantes na assistência prestada aos pacientes de risco para doença renal (Sodre *et al.*, 2007; Silva e Brune, 2011; Brown *et al.*, 2015). Em cães, a tentativa de validação de uma equação para determinar a TFG requer estudo amplo, que utilize animais doentes e saudáveis, de diferentes tamanhos, sexo, idade e raças, o que ainda não foi possível (Heine e Lefebvre, 2007).

Considerando as variações rápidas na função renal no paciente crítico, a medida da TFG representa um desafio ainda maior do que em pacientes em outras condições clínicas. Nesse cenário, a alteração na composição corporal e no equilíbrio fluido e a instabilidade hemodinâmica comprometem a produção e distribuição de creatinina, diminuindo a sensibilidade da técnica para avaliação da função renal. Além disso, a necessidade de coleta de urina durante 24 horas atrasa o diagnóstico e aumenta a chance de erros, de tal forma que sua aplicabilidade é limitada (Pong *et al.*, 2005; Murray, *et al.*, 2008; Kirwan *et al.*, 2013).

De acordo com alguns estudos, coletas de urina realizadas em tempos menores, como por exemplo, entre duas, quatro ou 12 horas, para o cálculo da TFG, podem apresentar resultados confiáveis e precoces em pacientes críticos, quando comparados aos valores obtidos de coleta em 24 horas e também de creatinina sérica, contornando assim as limitações da técnica (Bellomo *et al.*, 2004; Pong *et al.*, 2005).

Neste contexto, quando se considera a utilização de tempos menores de coleta, o problema encontrado é a existência de volume residual de urina na bexiga pós cateterização, o qual dificulta o cálculo correto da depuração. Na tentativa de resolver isto, estudos sugerem que o volume urinário vesical pode ser medido de maneira confiável, eficiente e não invasiva utilizando aparelhos de ultrassonografia. Esta técnica é considerada uma alternativa rápida, evita o risco de traumas uretrais, desconforto do paciente e a ocorrência de infecções iatrogênicas decorrentes de cateterizações excessivas além de reduzir o tempo para obtenção dos



resultados que no cenário da terapia intensiva é considerado prioridade (Silva *et al.*, 2013; Venkatraman *et al.*, 2014). Sendo assim, a validação de métodos práticos de medição da TFG, que possam ser aplicados em diferentes cenários clínicos, está em curso e representará um avanço significativo em nefrologia veterinária, principalmente no que se refere a pacientes críticos, nos quais a instabilidade clínica dificulta a avaliação precisa da TFG (Kirsztajn, 2007; Hendy-Willson e Pressler, 2011).

Devido aos fatores mencionados acima, na prática clínica, a função renal é normalmente avaliada através da dosagem sérica de creatinina, por ser uma técnica simples, de baixo custo e disponível. A creatinina é considerada marcador ideal de função renal, por ser produzido em ritmo constante, ser livremente filtrada nos glomérulos e não ser reabsorvida nos túbulos renais (Braun, *et al.*, 2003; Lees, 2004). Contudo, sofre influência de fatores extrarrenais como idade, sexo, estado nutricional e uso de medicamentos, os quais reduzem sua sensibilidade e especificidade, podendo em alguns casos superestimar a função renal, principalmente em pacientes muito jovens, idosos e de raças pequenas. Além disso, os valores de referência utilizados não consideram a influência do peso corporal e, portanto, são considerados inapropriados. Também, erro analítico decorrente da variabilidade entre os laboratórios diminui a sensibilidade e especificidade deste analito (Braun *et al.*, 2003; Lees, 2004; Concordet *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2010; Silva e Brune, 2011; Lefebvre, 2011).

A interpretação dos valores séricos de creatinina é um desafio para os clínicos em pacientes que apresentem valores próximos ao limite máximo de referência ou em casos com diminuição da TFG associada ao aumento gradativo dos valores de creatinina, sem exceder o limite de referência. Existe dissociação entre os valores séricos deste marcador e a taxa de filtração glomerular, dessa forma é possível observar pacientes com lesão renal em fase inicial, na qual a concentração sérica de creatinina permanece dentro dos valores de referência, e em estágios finais de disfunção renal, com pequenas alterações na TFG acompanhadas por maiores elevações de sua concentração sérica e manutenção da azotemia (Braun *et al.*, 2003; Lees, 2004; Grauer, 2005; Brown, 2007; Silva e Brune, 2011).

Os dados referentes à sensibilidade deste biomarcador variam na literatura. Alguns autores citam que valores de creatinina sérica superiores ao limite de referência só ocorrem quando existe perda de pelo menos 65-75% da massa renal funcional e outros sugerem que o acompanhamento longitudinal em um indivíduo assegura detecção de perdas discretas de função renal (Watson *et al.*, 2002; Dalton, 2011; Edelstein e Faubel, 2011; Lefebvre, 2011). Contudo, devido à sua pequena variação biológica intraindividual, considera-se que pequenas elevações podem estar associadas a decréscimo significativo da função renal. Neste contexto avaliações seriadas permitem o reconhecimento de estágios iniciais de disfunção (Lees, 2004; Bellomo *et al.*, 2004; Dalton, 2011, IRIS, 2013).

Quanto às interferências analíticas, estudos recentes relatam a possibilidade de variações nos valores da creatinina sérica devido a diferentes resultados entre laboratórios ou entre instrumentos dentro de um mesmo laboratório. Entretanto, não pode ocorrer uma diferença maior de 0,2 mg/dl em amostras de animais normais ou levemente azotêmicos (creatinina sérica < 2,0 mg/dl) quando a análise é realizada no mesmo laboratório e com estrito programa de qualidade, pois aumentos superiores a 0,2 mg/dl indicam significativo aumento deste marcador e estão associados à perda de função renal (Heine e Lefebvre, 2007; Andriollo *et al.*, 2013; IRIS, 2013).

A limitação da utilização da creatinina sérica é evidente em pacientes críticos, nos quais sua produção, volume de distribuição e eliminação renal não se encontram em estado de equilíbrio e sua utilização subestima a gravidade da disfunção renal. Nestes pacientes o aumento do volume extracelular devido à expansão volêmica determina atraso na sua elevação em relação à queda de filtração glomerular (Neguyen e Devarajan, 2008, Bellomo *et al.*, 2004; Shoukath e Patil,

2014). O balanço hídrico positivo é considerado comum na evolução de pacientes críticos, principalmente sépticos e pós-operados nos quais o volume corporal total de água pode aumentar mais que 10% em 72 horas. Como o volume de distribuição da creatinina é igual ao de água corporal total, há menor aumento detectável de creatinina na fase de desenvolvimento da IRA. Também, nestes pacientes, a perda muscular, má-nutrição e inflamação reduzem a produção de creatinina e, superestimam a função renal (Murray et al., 2008; Perianayagam *et al.*, 2009; Dirkes, 2011; Steinbach *et al.*, 2014). Outro ponto importante é que o aumento nos valores de creatinina só ocorre entre 48 a 72 horas após insulto inicial, o que acarreta um atraso no diagnóstico (Coca *et al.* 2008; Segev, 2012; Souza, 2012; Bragato, 2015). Portanto, no cenário da terapia intensiva, a utilização de novos biomarcadores pode auxiliar no diagnóstico precoce da IRA. Confirmando isso, Schneider e Bellomo (2013), Shoukath e Patil (2014) e Zhou *et al.* (2014) avaliaram a função renal de pacientes críticos, comparando o desempenho da creatinina com novos biomarcadores e demonstraram o aumento dos mesmos entre 12 e 24 horas após admissão em UTI e anteriores a creatinina sérica.

Assim, em pacientes com suspeita de IRA e principalmente em UTI, a creatinina sérica deve ser interpretada no contexto clínico, e as limitações citadas acima, indicam que sua sensibilidade e especificidade sejam questionáveis, principalmente em pacientes para os quais não há disponibilidade da hemodiálise. Porém, este analito ainda é o melhor marcador de função renal e seu aumento, ainda que discreto, se refere à gravidade e está associado a pior prognóstico (Barbosa *et al.*, 2006; Nguyen e Devarajan, 2008; Myagawa *et al.*, 2010; Dalton, 2011; Brown *et al.*, 2015).

A ureia sérica é formada como produto final do metabolismo de proteínas, filtrada pelo glomérulo, reabsorvida pelos túbulos e excretada principalmente pelos rins. Embora seja amplamente utilizada como marcador de função renal, possui algumas limitações como, por exemplo, não ser produzida de forma constante e ser reabsorvida de forma variável nos ductos coletores. Também, fatores extrarrenais podem elevar sua concentração sérica como hemorragia gastrointestinal, terapia com corticosteroide, dieta rica em proteínas, catabolismo tissular, obstrução uretral e ruptura de bexiga. Ao contrário, dieta pobre em proteínas, doenças hepáticas e má-nutrição podem levar a sua redução. Dessa forma, sua determinação constitui indicador grosseiro de função e não de injúria renal, uma vez que o aumento ocorre somente após perda de 66-75% dos néfrons, determinando assim menor sensibilidade e especificidade (Lees, 2004; Scally *et al.*, 2006; Myagawa *et al.*, 2010; Edelstein e Faubel, 2011; Lefebvre, 2011). Valores limítrofes são difíceis de precisar, pois devem ser avaliados dentro do contexto clínico, e sua utilidade clínica requer avaliação conjunta com a creatinina sérica (Brown, 2007; Grauer, 2010; Myagawa *et al.*, 2010; Geist e Langston, 2011; Polsin, 2011). A razão ureia/creatina pode indicar estados patológicos diferentes. A proporção normal entre estes analitos é em média trinta. A desproporção entre os valores com razão superior a 40 indica etiologia pré-renal, enquanto valores menores que 10, sugerem lesão renal, mas também insuficiência hepática ou baixa ingestão proteica. Entretanto quando a creatinina se encontra acima do valor normal, denota processos obstrutivos pós-renais (Dessen, 2001; Sodr e *et al.*, 2007).

Portanto, como as propriedades de filtração dos rins são capazes de compensar a perda de massa renal funcional, os marcadores supracitados são considerados insensíveis para detecção precoce ou súbita de função renal. Dessa forma, diversos parâmetros urinários também são usados na rotina os quais possuem precocidade em relação à dosagem sérica de ureia e creatinina (Goldstein, 2005; Wamsley e Alleman, 2007; Braun e Lefebvre, 2008; Mchahon e Waikar, 2013).

A urina é considerada o fluido corporal mais apropriado para fins de diagnóstico, pois existe relação direta entre dano renal e alterações urinárias, anteriores aos quadros de insuficiência renal. Além disso, a coleta de urina é um procedimento menos invasivo em relação à de sangue

(Fuchs e Hewitt, 2011; Parrah *et al.*, 2013). O exame de urina avalia capacidade de concentração urinária, permeabilidade glomerular, presença de infecção, inflamação e hemorragia. Além de ser custo efetiva, é importante na investigação etiológica da IRA, na avaliação da evolução e eficácia do tratamento e diagnosticar a lesão renal anterior às alterações nos valores de creatinina sérica ou débito urinário (Reine e Langston, 2005; Dibartola, 2010; Fry, 2011; Martin-Moreno, 2011 Parrah *et al.*, 2013; Bragato, 2015).

Neste exame, a análise do sedimento urinário auxilia no diagnóstico de IRA e está associada à gravidade do quadro, contudo, sua utilidade é incerta devido à falta de padronização dos resultados e da variabilidade inter e intra-observador (Mcmahon e Waikar, 2013). A lesão renal aguda é evidenciada através da existência de sedimento urinário ativo composto pela presença de células, hemácias, leucócitos e cilindros. Na IRA pré-renal e na pós-renal o sedimento é inativo, ou seja, sem celularidade, entretanto, nesta última, pode ocorrer hematúria ou piúria por doença prostática. A presença e diferenciação entre os tipos de cilindros podem ajudar a definir a causa da IRA. Neste sentido, cilindros amarronzados e com células epiteliais indicam necrose tubular aguda isquêmica ou nefrotóxica, os hialinos sugerem lesão leve, os leucocitários indicam infecção, os eritrocitários glomerulonefrite aguda, e os granulosos, degeneração tubular. O aumento de células epiteliais e de transição na urina pode estar associado à infecção, inflamação ou neoplasia do trato urinário. Piúria acentuada, hematúria, bacteriúria ou glicosúria na ausência de hiperglicemia também são indicativos de lesão renal (Heine e Langston, 2005; Nunes *et al.*, 2010; Martin-Moreno, 2011; Osborne *et al.*, 2013; Mchahon e Waikar, 2013; Mugford *et al.*, 2013).

Ainda no exame de urina, a medida da densidade urinária específica é uma das formas de se avaliar a capacidade de concentração e diluição do filtrado glomerular, é considerada como único método de avaliação de função renal na urinálise e importante para interpretação segura de outros testes. Alterações neste exame ocorrem antes das observadas na bioquímica sérica, porém, sua interpretação pode ser influenciada por fatores como hidratação, alimentação, medicação prévia, forma de coleta e armazenamento da amostra (Wamsley e Alleman, 2007; Dibartola, 2010, Geist e Langston, 2011).

A baixa e persistente densidade urinária associada à azotemia aguda possibilita o diagnóstico de IRA e ainda auxilia na localização da causa da azotemia, sendo que, em cães, com quadro de IRA pré-renal observa-se que a densidade é superior a 1.035. Na azotemia renal, seu valor varia entre 1008 e 1029 e na pós-renal é variável, logo, tem pouco valor nesta situação (Gaskell, 1988; Wamsley e Alleman, 2007; Ross, 2011; Osborne *et al.*, 2011; Watson, 2015). Contudo, em pacientes criticamente enfermos, a densidade urinária possui valor limitado no diagnóstico de IRA, principalmente devido a influência de fatores extrarrenais e/ou terapêuticas empregadas (Murray *et al.*, 2008).

O débito urinário (DU) é uma medida sensível para avaliar a hemodinâmica renal e suas alterações precedem os aumentos séricos de creatinina (Lees, 2004; Martin-Moreno, 2011; Pressler, 2013). Em pacientes com suspeita de IRA as variações do volume miccional e anúria sugerem obstrução parcial e total do trato urinário, respectivamente ou ainda, lesão intrínseca grave. Oligúria associada à agressão renal é mais comum na IRA nefrotóxica do que na isquêmica (Costa *et al.*, 2003; Segev, 2011; Brown *et al.*, 2015, Segev *et al.*, 2016). Considerando-se que os rins detêm a habilidade de produzir urina variável nos pacientes com IRA, torna-se essencial a monitoração constante do DU, principalmente em pacientes críticos, nos quais sua variação altera o tratamento dos mesmos. Vale ressaltar que, neste cenário, a interpretação dos valores de DU pode ser pouco confiável, devido à influência de fatores

extrarrenais como fluidoterapia intensa e utilização de diuréticos, que podem induzir mudança rápida de oligúrico a poliúrico. Portanto, nestes pacientes, a ocorrência de débito urinário normal, não exclui a possibilidade de dano renal, o que torna seu valor preditivo negativo baixo (Bellomo *et al.*, 2004; Geist e Langston, 2011; Martin-Moreno, 2011; Kaul e Ruhela, 2012). Mas, redução de DU associa-se a um pior prognóstico, conseqüente ao rápido acúmulo de toxinas urêmicas (IRIS, 2013; Brown *et al.*, 2015).

A proteinúria é considerada um dos principais marcadores de lesão renal e se relaciona a quantidades excessivas de proteínas na urina. A proteinúria pode ser fisiológica (transitória) decorrente de exercícios, febre e temperaturas extremas, ou patológica (permanente), sendo possível a diferenciação entre ambas através da repetição de testes (Lees, 2004). A proteinúria patológica pode ter origem pré-renal, causada por doenças sistêmicas, pós-renal, devido a infecções ou hemorragias do trato urinário e proteinúria renal. Esta última é decorrente de lesão intrínseca de glomérulos ou túbulos. A lesão glomerular ocorre por deposição de imuno-complexos, hipertensão glomerular ou inflamação nos capilares. A proteinúria tubular se dá por lesão nefrotóxica, que inviabiliza a reabsorção das proteínas do ultrafiltradas (Grauer, 2009; Regeniter *et al.*, 2009; Lefebvre, 2011).

Avaliação da proteinúria é utilizada principalmente nos pacientes com doença renal crônica, na qual detecta estágios iniciais anteriores ao desenvolvimento de azotemia ou do agravamento da lesão renal. Em pacientes com IRA, a proteinúria pode ser indício inicial de nefrite intersticial. Neste sentido, é marcador de injúria glomerular ou tubular e de progressão da lesão renal (Grauer, 2007; Regeniter *et al.*, 2009; Grauer, 2011; Segev *et al.*, 2015).

Sua medida pode ser realizada através da imersão de fitas reagentes, considerado teste de rastreamento, sendo restrita para avaliar os efeitos das intervenções terapêuticas e controlar a progressão das doenças renais. Logo, a detecção de proteinúria ao exame de fita, preconiza-se sua dosagem em amostra de urina coletada durante 24 horas, entretanto, esta metodologia é trabalhosa e demorada quando se necessita de um resultado rápido, principalmente em animais com lesão aguda. Por isto, adota-se a avaliação da razão proteína/creatinina (UPC), teste feito em amostra pontual de urina, cujos resultados correlacionam-se com proteinúria de 24 horas e quantifica a magnitude da perda proteica. Valores normais de UPC em cães saudáveis, são menores de 0,2; aqueles entre 0,2 e 0,5 são considerados *borderline* enquanto os maiores que 0,5 são proteinúricos. Lesões glomerulares usualmente resultam em proteinúria mais grave que as tubulares, com valores de UPC superior a dois. A mensuração da UPC é útil na avaliação da gravidade da lesão renal, em sua evolução, resposta ao tratamento e prognóstico. A proteinúria associa-se a maior mortalidade no paciente crítico. Considera-se que o sucesso terapêutico consiste em diminuir o grau de proteinúria, minimizando assim, o dano renal (Xin *et al.*, 2004; Grauer, 2007; Mendes e Bregman, 2010; Grauer, 2011; Segev *et al.*, 2015).

Microalbuminúria refere-se à concentração de albumina acima do normal, porém dentro do intervalo entre 30 a 300 mg/24h. Este teste deve ser realizado na suspeita de perda de pequenas quantidades de albumina, ou por resultados duvidosos no teste da fita reagente (Yaqoob, 2009; Regeniter *et al.*, 2009). Considerando-se a metodologia baseada em imuno-ensaio espécie-específica, estes testes são caros, o que configura desvantagem que desestimula seu uso na rotina veterinária (Grauer, 2011; Kisztajn *et al.*, 2011).

## 2.2. Ultrassonografia renal na avaliação do paciente com IRA

Atualmente, a ultrassonografia é um procedimento de rotina em medicina veterinária, especialmente na avaliação do paciente com suspeita de disfunção renal. Esta técnica é essencial

para diagnóstico e tratamento das doenças renais, bem como para guiar procedimentos invasivos como drenagem de cistos ou abscessos e realização de biópsia renal, a qual é necessária para se estabelecer o diagnóstico definitivo através da análise histopatológica (Hetch e Heine, 2011; O'Neill, 2014; Pennick e D'anjou, 2015). Esta técnica fornece informações importantes com 62 a 77% de sensibilidade e 58 a 73% de especificidade, além de valor preditivo positivo de 92% para detecção de alterações microscópicas no parênquima renal (Quaia e Bertolotto, 2002; Nyland *et al.*, 2005). Mesmo que o diagnóstico específico não seja alcançado pelo método, este propicia informações suficientes para direcionar procedimentos futuros (Silva *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Halasc Vac, 2014; Kristoffer *et al.*, 2016).

Para exploração ecográfica urológica utilizam-se transdutores, cuja frequência varia de acordo com o tamanho do animal e a profundidade do órgão. Para adequada avaliação renal devem ser realizadas imagens em planos longitudinal e transversal, obtendo informações sobre o tamanho renal, ecogenicidade e espessura cortical, diferenciação corticomedular, bem como avaliação dos demais segmentos do trato urinário e órgãos adjacentes (Nyland *et al.*, 2005).

O exame ultrassonográfico renal é usado com a finalidade de se avaliar tamanho, alterações estruturais renais e do sistema coletor (Halasc Vac, 2014). Em pacientes com suspeita de IRA, auxilia no diagnóstico e acompanhamento da evolução, sendo muito empregado na suspeita de nefropatias obstrutivas (Amber e Podol, 2013; Thompson e Bhatt, 2014). Dentre as vantagens em relação a outras modalidades de exame de imagem, citam-se sua rapidez, baixo custo, não utilização de contraste, não ser invasivo, possibilidade de repetição sem danos e realização à beira do leito sem necessidade de mover o paciente para outro local. Como desvantagens destacam-se a dificuldade de visualização adequada dos rins em pacientes agitados, obesos e com grande quantidade de gases intestinais, ser operador dependente e não avaliar a função renal (Quaia e Bertolotto, 2002; Halasc Vac, 2014).

A ultrassonografia pode evidenciar alterações renais, mesmo na ausência de suspeita de disfunção renal e nestes casos é considerada importante para estabelecer um diagnóstico precoce, além de possibilitar instaurar medidas necessárias com a finalidade de evitar a evolução do processo. Nos casos em que a disfunção renal já foi diagnosticada através de outros exames, o ultrassom auxilia na diferenciação entre processos agudos e crônicos e na detecção de alterações que exigem condutas clínicas diferenciadas como litíase e pionefrose. Também é uma ferramenta útil no acompanhamento de animais nefropatas, a fim de avaliar resposta ao tratamento e possíveis complicações (Yang *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010). Entretanto, algumas alterações estruturais renais evidenciadas neste exame, podem ser decorrentes do processo de envelhecimento sem presença de disfunção renal (Churchil *et al.*, 1999; Seoane, 2010; Pennick e D'Anjou, 2015).

As alterações ultrassonográficas não apresentam especificidade alta, e variam dependendo do estágio de disfunção renal e do quadro clínico do paciente. Também diferentes doenças podem ter mesma aparência, enquanto que uma mesma doença pode ter diferentes apresentações ultrassonográficas, (Nyland *et al.*, 2005; Amber e Podol, 2013). Este exame não é capaz de definir o tipo histológico de dano renal e, portanto, não pode substituir a biópsia para acessar o diagnóstico definitivo. Entretanto, é a técnica mais disponível e segura para avaliar pacientes com IRA, excluir provável obstrução ou de doença renal crônica (DRC), além de ser importante para o acompanhamento do paciente e evolução do tratamento. Deve-se ressaltar também a correlação significativa entre a presença de alterações ultrassonográficas e perda de função renal (Page *et al.*, 1994; Quaia e Bertolotto, 2002; Martins *et al.*, 2003; Beland *et al.*, 2010; Siddapa *et al.*, 2013).

Em pacientes com suspeita de IRA, considera-se que este exame é pouco sensível e específico, pois, o diagnóstico definitivo não pode ser realizado somente através das alterações ultrassonográficas encontradas (Page *et al.*, 1994; Quaia e Bertolotto, 2002; Riccabona, 2006;

Keyserling *et al.*, 2103). Em estágios iniciais da IRA, muitos pacientes apresentam rins normais ao exame, entretanto, após a progressão da lesão as alterações se manifestarão (Sivit, 2006; Licurse *et al.*, 2010; Siddappa *et al.*, 2013; Rivera, 2014). Estima-se que alterações ultrassonográficas renais ocorram em aproximadamente 10% dos pacientes com IRA. Como exemplo, Amber *et al.* (2013) observaram avaliação normal em 62% dos pacientes com IRA. Entretanto, apesar da baixa sensibilidade, a utilização da ultrassonografia nestes pacientes pode ter grande impacto no manejo dos mesmos, além de inferir sobre prognóstico, pois aqueles que apresentam muitas alterações ultrassonográficas, têm pior prognóstico (Yamaguchi *et al.*, 1991; Keyserling *et al.*, 2002). Sua utilização também é considerada essencial para excluir possibilidade obstrução do trato urinário e diferenciar IRA de DRC (Louis *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2010; Rivera, 2014; Thonpson e Bhatt, 2014). Como exemplos citam-se a possibilidade de visualização de diferentes graus de hidronefrose, presença de cálculos e ocorrência de piodronefrose, os quais requerem tratamentos diferenciados, além do acompanhamento da evolução através da ultrassonografia seriada (Vourganti *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2010; Martins *et al.* 2013).

Embora em casos de injúria renal aguda de etiologia pré-renal, o exame ultrassonográfico não apresente sinais específicos, observa-se o desenvolvimento de alterações quando a hipoperfusão é persistente (Rivera, 2014) e a sensibilidade da técnica aumenta com a gravidade da lesão renal podendo chegar a 93% em graus mais acentuados (Thompson e Bhatt, 2014; Licurse *et al.*, 2016). IRA renal intrínseca resulta em grave dano funcional e histológico (sepse, drogas, tóxicos), nestes casos, diversas alterações ultrassonográficas podem ser observadas (Quaia e Bertolotto, 2002; Rivera, 2014). Nos casos de IRA pós-renal, o exame ultrassonográfico é essencial, apresentando elevada sensibilidade de 98%, apesar da ocorrência de falso negativo em fases iniciais reduzir a mesma para 78% (Faubel *et al.*, 2014; Bochenk, 2007). Entretanto, a ocorrência de obstruções não é comum em pacientes com IRA (Licurse *et al.*, 2010; Rahman, 2012).

Diversas alterações estruturais podem ser visualizadas em pacientes com IRA. O tamanho renal é um parâmetro que deve ser medido cuidadosamente, pois é base para decisões clínicas importantes. Entretanto, ainda não há um método confiável para determinar dimensões renais em cães, uma vez que existe uma variação de tamanho e volume entre animais normais e de peso corporal semelhante, o que limita sua aplicação para detectar alterações discretas de tamanho (Barr *et al.*, 1990; Nyland *et al.*, 2005, Halasc Vac, 2014). Deve-se considerar também, que a pressão utilizada pelo operador durante a realização do exame pode influenciar este parâmetro, portanto, para aumentar a precisão esta medida deve ser realizada diversas vezes (Schmidt, 2015; Bragato, 2015). Devido a este fato, uma avaliação correta de aumento ou diminuição de tamanho muitas vezes é difícil pelo desconhecimento do tamanho normal naquele indivíduo particular (Kolber e Borelli, 2005; O'Neill, 2014). A medida longitudinal é considerada mais útil do que o volume para evidenciar mudanças de tamanho, pois é mais simples de se obter e menos afetada pela variabilidade inter observador (Faubel *et al.*, 2014; Rivera, 2014; Garreballah *et al.*, 2015). Em cães, um novo método foi proposto, no qual se utiliza a relação entre o comprimento renal e diâmetro da aorta, medida em sua distensão máxima durante o ciclo cardíaco. Consideram-se as relações maiores que 9,1 e menores que 5,5 como aumentadas e reduzidas, respectivamente, mas está ampla variação dificulta seu uso na prática clínica (Pennick e D'Anjou, 2015). Como ainda não existe uma forma confiável de se avaliar com precisão o tamanho renal, pode se considerar a avaliação da espessura cortical como estimativa de alteração do tamanho. Em cães saudáveis observa-se uma relação de 1:1 entre a região cortical e medular, em pacientes com IRA ocorre um aumento da espessura, evidenciando a ocorrência de alterações inflamatórias e em casos de DRC observa-se diminuição decorrente de atrofia intersticial e fibrose (Beland *et al.*, 2010; Pennick e D'Anjou, 2015; Yamashita *et al.*, 2015).

Em pacientes com IRA, a renomegalia é decorrente de processos infiltrativos ou inflamatórios, entretanto, em fases iniciais, os rins podem ter tamanho normal, o que indica dano potencialmente reversível e um melhor prognóstico. Entretanto, a presença ou não de rins aumentados de tamanho pode ser influenciada pela diurese e estado de hidratação do paciente (Schmidt, 2015). Na DRC em fase inicial os rins podem ter tamanho normal e na fase final ocorre diminuição do mesmo (O'Neill, 2014; Rivera, 2014). Outro fator é a redução fisiológica do tamanho renal com o envelhecimento, em humanos, não relacionado à presença de lesão renal, fato este ainda não bem elucidado em cães (Churchil *et al.*, 1999; Seoane, 2010; Faubel *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Yang *et al.* (2001) avaliando pacientes com infecção renal por leptospirose observaram que o aumento de tamanho renal foi achado característico indicando edema túbulo intersticial e que a redução de tamanho em avaliações seriadas indicou resposta adequada ao tratamento. Em outro estudo, (Carvalho *et al.*, 2010) avaliando as alterações ultrassonográficas em cães, considerou-se que 27% dos animais apresentaram alterações de tamanho renal.

Outro parâmetro avaliado é a ecogenicidade cortical renal, que é estabelecida pela comparação entre rins, baço e fígado, e somente é válida na ausência de doença hepática ou esplênica. Em cães normais, o parênquima renal apresenta aspecto homogêneo, a córtex do rim direito é hipo ou isoecoica ao fígado, embora, principalmente quando se utiliza transdutor de alta frequência, se apresentar hiperecoica ao fígado. Com relação ao rim esquerdo, a córtex é hipoeicoica ao baço. Alterações da ecogenicidade são observadas em diversas doenças renais parenquimatosas e em animais idosos sem evidencia clínica de disfunção renal, portanto, é um achado inespecífico, e requer biopsia para confirmação da presença de lesão (Nyland *et al.*, 2005; Ivancic e Mai, 2008; Penick e D'Anjou, 2015).

A hiperecogenicidade cortical é o achado mais comum em cães e humanos com doença renal aguda ou crônica (Siddappa *et al.*, 2013; Pennick e D'Anjou, 2015; Bragato, 2015; Garreballah *et al.*, 2015) e possui elevada especificidade (96%) e valor preditivo positivo (67%) para presença de alterações estruturais renais, entretanto não permite o diagnóstico etiológico (Faubel *et al.*, 2014; Siddappa *et al.*, 2013) pois processos inflamatórios agudos como na necrose tubular aguda nefrotóxica, pielonefrite, nefrite intersticial e glomerulonefrite e também processos crônicos, acarretam esta alteração (Nyland *et al.*, 2005; Garreballah *et al.*, 2015; Schmidt, 2015). Estudos evidenciaram hiperecogenicidade em 91% de cães com IRA, além de correlaciona-la ao aumento sérico de creatinina e anormalidades túbulo intersticiais ao exame histopatológico, demonstrando assim a sensibilidade ultrassonográfica no diagnóstico da IRA, bem como a relação entre hiperecogenicidade e alteração de função renal (Holloway e O'Brien, 2007; Carvalho *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2010; Vinayaka *et al.*, 2016), e também relação significativa com a intensidade e duração do processo, conforme observado sua ocorrência em 84,5 % dos pacientes com IRA, 96,6% com DRC e 100% dos pacientes com DRC em fase final (Siddappa *et al.*, 2013; Garreballah *et al.*, 2015). Em fases iniciais da IRA a ecogenicidade cortical pode permanecer normal, como relatado em estudo no qual, 11% de pacientes com disfunção renal evidenciada por exames laboratoriais não apresentaram alterações renais à ultrassonografia (Garreballah *et al.*, 2015).

A hipoeecogenicidade cortical renal também é observada nos casos de IRA e ocorre devido aumento de fluido intersticial, processos inflamatórios graves, consequente de isquemia severa, acometendo principalmente pacientes com sepse (Faubel *et al.*, 2014; Pennick e D'Anjou, 2015).

Nitidez da definição entre córtex e medula é esperada em rins de animais saudáveis (D'Anjou *et al.*, 2008; Hart *et al.*, 2013; Pennick e D'Anjou, 2015). Perda de definição corticomedular ocorre em processos inflamatórios renais agudos ou crônicos e, dessa forma, avaliações seriadas são importantes para diferenciá-los. Confirmando isso, autores relatam perda de diferenciação

entre córtex e medular em 85% dos pacientes humanos com IRA e, ainda, que 16% dos pacientes com DRC em fase inicial, mantiveram a definição corticomedular, (Garreballah *et al.*, 2015). Esta alteração também pode ser desencadeada por doenças sistêmicas como hiperparatireoidismo primário e hiperadrenocorticismo, nos quais se observa nefrocalcinose medular e cortical (O'Neill, 2014).

O sinal medular é observado em muitos casos de doença renal parenquimatosa aguda, sendo caracterizada por linha hiperecogênica visualizada na junção corticomedular e pode estar relacionada à mineralização, congestão, hemorragia e necrose. Esta alteração é decorrente de agressão aos túbulos localizados na medula renal a qual por ser metabolicamente mais ativa e mais susceptível a isquemia (Pennick e D'Anjou, 2015). Esse achado tem sido descrito em cães saudáveis de raças pequenas e naqueles acometidos por nefrocalcinose e leptospirose (Hart *et al.*, 2013; Halasc Vac, 2014). De acordo com Mantis e Lamb (2000), cães que ao exame ultrassonográfico renal apresentam apenas sinal medular sem evidencia de outras alterações ultrassonográficas, provavelmente esta alteração não se relaciona a presença de lesão renal. Portanto, deve-se correlacionar sua presença aos dados clínicos e laboratoriais para investigar seu significado (Pennick e D'Anjou, 2015).

Em pacientes com IRA o exame ultrassonográfico pode evidenciar a presença de dilatação pélvica a qual é denominada pielectasia, entretanto, pacientes em fluidoterapia intravenosa ou tratamento com diuréticos podem também apresentar esta alteração (D'Anjou *et al.*, 2011; Pennick e D'Anjou, 2015). Também, cães com pielonefrite aguda em fases iniciais a pelve renal pode permanecer normal, porém, com a evolução do processo, ocorre obstrução tubular parcial por debris celulares que resulta em pielectasia, a qual pode ocorrer em diferentes graus (Vourganti *et al.*, 2006; Holloway e O'Brien, 2007; Louis *et al.*, 2005). Em casos mais graves de infecção renal, como na pionefrose, além de dilatação, observa-se também aumento de ecogenicidade do conteúdo, nestes casos, o exame ultrassonográfico é essencial para o diagnóstico e avaliação do tratamento bem como para evidenciar a necessidade de intervenção cirúrgica (Choi *et al.*, 2010; Pennick e D'Anjou, 2015).

Diversas afecções renais agudas como pielonefrite podem afetar o espaço peri renal, provocando acúmulo de líquido e a avaliação ultrassonográfica é essencial para evidenciar e caracterizar a efusão através da aspiração guiada (Quaia e Bertolotto, 2002; Pennick e D'Anjou, 2015). Em estudo avaliando cães com IRA, Holloway e O'Brien (2007), observaram quantidade e aspecto variável de líquido e relataram correlação positiva entre esse volume e a gravidade da disfunção renal.

Em síntese, apesar das alterações ultrassonográficas encontradas em pacientes com IRA terem validade clínica, as mesmas apresentam baixa precisão, não podendo, portanto, serem validadas como parâmetros definitivos. Neste caso, informações obtidas em exames ultrassonográficos anteriores, bem como a realização de exames seriados, podem reduzir esta limitação, e auxiliar na diferenciação de IRA pré-renal e renal, e também entre IRA e DRC (Yamaguchi *et al.*, 1991; Rivera, 2014). Torna-se, portanto, necessário compreender as vantagens e limitações deste exame, para que seu uso auxilie no diagnóstico precoce, prognóstico e acompanhamento dos pacientes, evitando assim o aumento da morbidade e mortalidade associadas a esta síndrome (Keyserling *et al.*, 2002; Licurse *et al.*, 2010; Vourganti *et al.*, 2010).



## 2.3. Novas metodologias de diagnóstico de ira em cães

### a. Classificação da ira segundo o critério IRIS (2013)

A inexistência de consenso sobre a definição universal da IRA dificulta a avaliação sistemática dos fatores contribuintes desta patologia, uma vez que as definições utilizadas enfatizam o caráter imediato da perda de função renal e azotemia, independente da sua etiologia (Keeney *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Thoen e Kerl, 2011; Segev *et al.*, 2016).

Em veterinária, com objetivo de padronizar a definição, facilitar a detecção precoce, auxiliar no tratamento e início de terapia substitutiva renal bem como, fornecer prognóstico, a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) adaptou um esquema para classificar e graduar a severidade de IRA em cães e gatos, baseados nos critérios de RIFLE (risk, injury, failure and stage) e AKIN (acute kidney injury), utilizados em medicina humana. O sistema proposto pode ser utilizado em pacientes instáveis e classifica a injúria em cinco estágios, baseados na concentração sérica de creatinina e/ou débito urinário. Nesse critério, pequenos aumentos de creatinina sérica e ou alterações de fluxo urinário, identificam a disfunção renal, cabe ressaltar, que a alteração mais evidente é a considerada como forma de diagnóstico nestes pacientes (Segev, 2012; Cowgill, 2013; IRIS, 2013).

O diferencial dessa classificação é a inclusão de pacientes com menor variação basal de creatinina sérica e a introdução de um período de 48 horas para o diagnóstico de IRA. Diversos dados suportam que pequenos aumentos de creatinina sérica ou necessidade de terapia substitutiva renal definem a IRA em pacientes hospitalizados (Segev *et al.*, 2008; Souza, 2012; Rodrigo *et al.*, 2016). Contudo, considera-se que qualquer classificação depende da capacidade de distinguir entre função renal normal e diferentes fases da IRA, ter critérios fáceis de determinar e propriedades diagnósticas e prognósticas adequadas (Metha *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2008, Segev *et al.*, 2016)

O quadro 1 resume os critérios de classificação adotado no Sistema IRIS (2013). Neste sistema de classificação os animais são divididos em cinco estágios de acordo com o grau de disfunção renal

*Estágio 1:* compreende animais **não azotêmicos** (creatinina sérica <1,6 mg/dl) com injúria renal definida através de histórico, sinais clínicos e laboratoriais (glicosúria, cilindrúria, proteinúria, sedimento inflamatório), alterações em exames de imagem e que apresentem aumento progressivo da concentração sérica de creatinina > 0,3 mg/dl durante 48 horas e/ ou oligúria (<1ml/Kg/hora) ou anúria por mais de seis horas.

*Estágio 2:* caracteriza animais com **azotemia discreta** (creatinina sérica 1,7- 2,5 mg /dl) e oligúria fluido responsiva, com aumento na produção de urina >1ml/Kg em seis horas e inclui animais *com* doença renal crônica pré-existente com aumento de concentração sérica de creatinina > 0,3 mg/dl durante 48 horas.

*Estágios 3, 4 e 5:* define animais com **azotemia moderada a intensa**, com uremia, a creatinina sérica fica em 2,6 - 5,0 mg/dl; 5,1-10,0 mg/dl e > 10 mg/dl respectivamente.

Cada estágio é sub graduado com base na produção urinária como oligúrico (< 1ml /kg/h) ou anúrico por mais de 6 horas; ou não oligúrico. Este sub estadiamento é baseado na importância da inter-relação entre a produção urinária e as alterações patológicas ou funcionais que contribuem para IRA e influenciam as opções terapêuticas e os desfechos. Animais em *estágios* 4 e 5 apresentam maiores chances de óbito e também necessidade de terapia substitutiva renal por tempo prolongado.

Alguns estudos em cães já avaliaram este e outros sistemas de classificação com o objetivo de verificar sua aplicabilidade. Lee *et al.* (2011) utilizaram 853 cães com IRA de diferentes etiologias para avaliar o sistema RIFLE, que permitiu categorizá-los como animais em risco, injúria e falência renal, na ordem de prevalência, além de evidenciar elevada mortalidade, especialmente, entre os animais com azotemia grave. Kenney *et al.* (2010) e Thoen e Kerl (2011), analisando o critério IRIS, entretanto considerando elevações de 0,5 mg/dl de creatinina sérica, avaliaram cães com peritonite séptica observando elevada mortalidade naqueles com complicações e presença de IRA. O sistema IRIS (2013) foi avaliado por Segev *et al.* (2015) em cães com insolação, observaram que 63% tiveram o desenvolvimento de lesão aguda, com estadiamento dos pacientes até em estágio 4, ou seja, foi possível distinguir a ausência de injúria renal, bem como o aumento de sua gravidade até estágios de lesões discreta, moderada e intensa. Além disso, também relacionaram o grau de lesão com o desfecho. Estes estudos consideraram que estes sistemas de classificação são apropriados e de fácil realização, para utilização em cães, uma vez que se baseiam na concentração sérica de creatinina, o marcador mais utilizado em veterinária. Outro dado obtido refere-se à necessidade de início rápido de terapia adequada, mesmo naqueles animais com valores de creatinina dentro da referência. Contudo, apesar dos benefícios da utilização destes sistemas de classificação, os mesmos devem ser utilizados com cautela e flexibilidade em relação ao ponto de corte, não podendo substituir a avaliação clínica criteriosa e nem ser usados como ferramentas únicas para inferir sobre prognóstico. Além disso, mais estudos devem ser realizados a fim de validar e uniformizar sua utilização (Murray *et al.*, 2008; Segev, 2012).

Apesar do avanço no conhecimento epidemiológico da IRA proporcionado por estes sistemas de classificação, os critérios utilizados ainda são falhos, uma vez que se baseiam na dosagem sérica de creatinina e alteração de débito urinário, os quais detectam anormalidades funcionais de ocorrência tardia à injúria renal e não são marcadores de lesão. Portanto podem não permitir um diagnóstico precoce, principalmente em pacientes críticos. Neste sentido, considera-se que a utilização de outros biomarcadores pode aumentar a confiabilidade dos resultados (Bellomo *et al.*, 2004; Coca *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008; Steinbach *et al.*, 2014; Segev, 2012; Cortellini *et al.*, 2015).

Quadro 1. Critérios de classificação e estadiamento de cães com disfunção renal aguda segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS, 2013).

<b>Estágios</b>	<b>Creatinina sérica (mg /dl)</b>	<b>Considerações</b>
1	< 1,6	Não azotêmico, histórico, clínico, laboratorial ou imagem com evidencia de IRA, ou aumento progressivo de > 0,3 mg/dl de creatinina em 48 horas ou oligúria (<1 ml/kg/h) ou anúria acima de 6 horas
2	1,7 – 2,5	IRA moderada
3	2.6 – 5,0	IRA moderada a intensa
4	5,1 – 10,0	IRA intensa
5	> 10,0	Falência renal

## b. Novos biomarcadores de IRA

Nos últimos anos, pesquisas estão direcionadas para descoberta e validação de novos biomarcadores que permitam o diagnóstico precoce de IRA e anterior à manifestação da síndrome clínica proporcionando aumento das possibilidades de intervenções terapêuticas (Coca *et al.*, 2008, Martensson *et al.*, 2012; Segev, 2012). Em medicina, devido ao aumento de incidência de IRA e conseqüente aumento de gastos hospitalares, considera-se como prioridade pesquisas para o desenvolvimento e utilização de biomarcadores para detecção precoce da IRA (Parik e Vasan, 2007; Coca *et al.*, 2008; McMahon e Waikar, 2013).

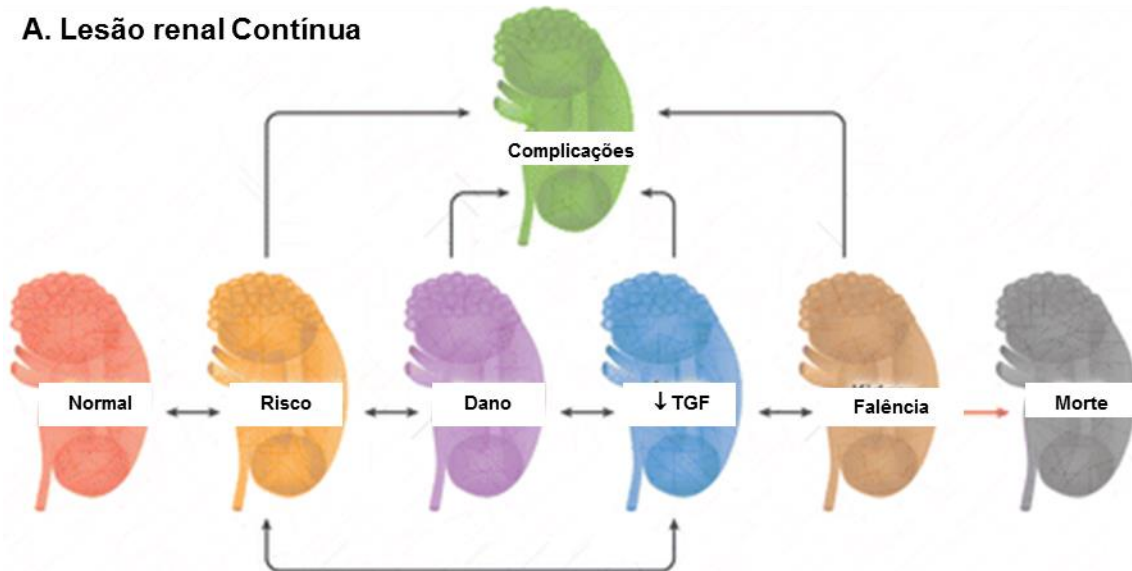
Biomarcadores são parâmetros biológicos que podem ser quantificados ou avaliados para determinar processos biológicos normais, alterações patológicas ou resposta farmacológica à intervenção terapêutica. São ferramentas que podem fornecer alguma informação necessária, especialmente quando usadas em conjunto com dados clínicos e laboratoriais (Bennett e Devajaran, 2011). Avaliação da disfunção renal através dos indicadores ureia, creatinina e débito urinário não propicia intervenções que diminuam a necessidade de diálise ou reduzam a mortalidade. Na IRA, como qualquer outra situação de exposição celular, a lesão se inicia a partir de distúrbios moleculares que evoluem para dano celular e expressão de marcadores anterior à síndrome clínica (Fig. 3). Desta forma a ineficiência para diagnosticar IRA de forma rápida e acurada acarreta aumento de custos hospitalares. Portanto, o uso de novos biomarcadores que detectem a lesão renal precocemente pode resultar em avanços diagnósticos e estadiamento desta síndrome. A indisponibilidade destes biomarcadores, como já comentado, contribui para baixa assertividade na indicação de terapias. A vantagem de se obter dados mais precisos e específicos relacionados a real situação funcional pode representar uma estratégia diagnóstica consistente para redução da mortalidade por afecções renais que não mostraram vulnerabilidade mesmo com medidas de resgate e substituição renal (Bastos e Kirsztajn, 2011; Dirkes, 2011; Doi *et al.* 2011; Palm, 2012; Cortellini *et al.*, 2015).

A ideia fundamental é separar a condição de “ter a doença renal” da de “desenvolver o estágio final da doença renal” (Fig. 3). Na ausência de possibilidade de intervenções a partir de um diagnóstico antecipado, pode-se meramente observar o agravamento da doença. Enfatizando a possibilidade de identificar animais nos quais um tratamento individual pode retardar ou parar a progressão do dano renal e então preservar função renal adequada por longo período (Lees, 2004; Edelstein e Faubel, 2011; Palm, 2012). Entretanto, resultados melhores para a recuperação dos pacientes dependem do uso e interpretação correta dos testes diagnósticos, uma vez que, erros de diagnóstico representam uma fonte importante de danos evitáveis nos cuidados de saúde e, muitas vezes são sub-reconhecidos (Berlitz, 2010).

O biomarcador ideal deve ser endógeno, mensurável através de amostras acessíveis e não invasivas, técnica de fácil realização próximo ao paciente ou no laboratório, medida confiável, rápida e padronizada. Com relação ao desempenho, é desejável que auxilie na identificação de pacientes de risco para lesão, bem como no diagnóstico precoce de injúria e lesões subclínicas, no prognóstico e na avaliação da resposta a tratamentos. Também, é desejável que possa apontar o local da lesão (túbulo proximal, distal, interstício e vasos), determinar a duração do processo (agudo, crônico ou agudo no doente crônico), determinar os subtipos fisiopatológicos de IRA (pré-renal, renal ou pós-renal), identificar as diferentes etiologias (isquemia, toxinas, sepse ou combinação) e diferenciar a IRA de outras formas de doença renal aguda (infecção trato urinário). Outro fator importante é que um bom biomarcador deve possuir capacidade de detecção da doença quando ela está realmente presente (sensibilidade) e de reconhecer verdadeiramente a ausência da doença (especificidade). Ambas devem ser relativamente altas, a fim de reduzir o número de falso-positivo e falso negativo. Porém, devido à complexidade da IRA certamente um único biomarcador não atende a todos estes objetivos (Coca *et al.*, 2003; Bennett e Devajaran, 2011; Edelstein e Faubel, 2011; Martensson *et al.*, 2012). Portanto, a

utilização e interpretação de novos biomarcadores para detectar pequena, mas significativa injúria renal, não detectada através da creatinina sérica ainda está em curso. Apesar de sua baixa sensibilidade, a creatinina ainda é o único marcador validado, qualquer substituto potencial precisa, portanto, demonstrar habilidade para identificar injúria e guiar intervenções ou alterar decisões (Bagshaw e Gibney, 2008; Molitoris *et al.*, 2008; Nguyen e Devarajan, 2008; Dalton, 2011).

### A. Lesão renal Contínua



### B. Biomarcadores

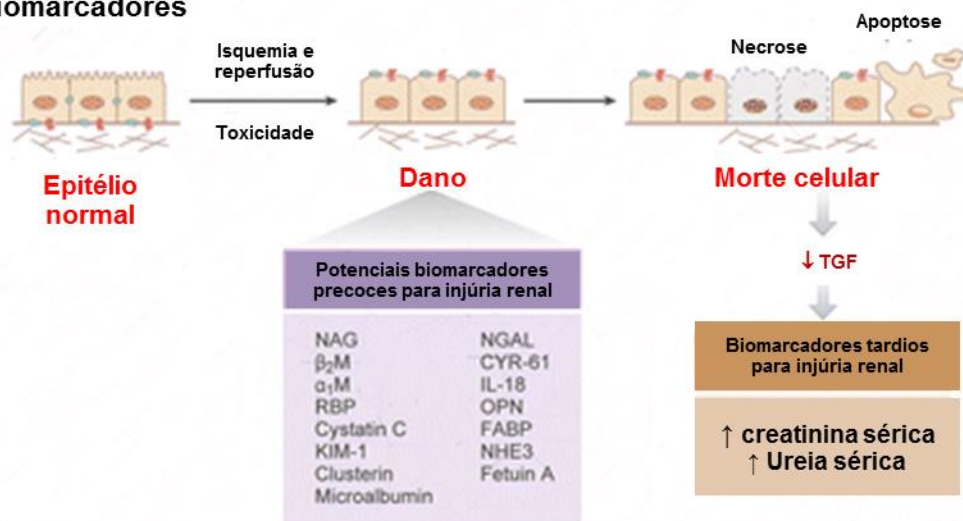


Figura 3. Modelo conceitual de desenvolvimento e evolução da lesão associado à expressão de marcadores precoces e tardios de função renal (Vaidya *et al.*, 2008).

Diversas substâncias têm sido identificadas tanto na urina quanto no plasma e são objetos de estudos para definir sua utilidade clínica. Os biomarcadores, quando utilizados e interpretados com devido rigor, poderão fornecer informações valiosas que serão revertidas para o seguimento e possível tratamento dos pacientes com doença renal. Porém, o processo de transição entre a descoberta e a utilização na rotina é complicado. Apesar dos *kits* comerciais para realização destes testes estarem cada vez mais disponíveis para uso, o conhecimento necessário para aplicação e utilização na prática clínica ainda está em evolução e sua adoção na rotina diária depende de investigação rigorosa em diferentes contextos clínicos. Cada

biomarcador possui suas próprias forças e fraquezas para determinar o início e gravidade da lesão renal. No entanto, em combinação, um painel de marcadores renais pode servir como ferramenta poderosa para o diagnóstico de lesão renal com alta acurácia (Parik e Vasan, 2007; Vaidya *et al.*, 2008; Koyner *et al.*, 2010; Bennett e Devajaran, 2011; Palm, 2012; Sharma, 2012).

Os biomarcadores para IRA podem ser classificados em cinco categorias: proteínas com atividade enzimática que são liberadas na urina após injúria renal, proteínas urinárias sem atividade enzimática as quais são reguladas ou especificamente liberadas na urina após injúria tubular, proteínas de baixo peso molecular que são filtradas, proteínas encontradas nos exossomos urinários e citocinas inflamatórias. A aplicabilidade destes testes é indiscutível em pacientes com risco para lesão renal, e paciente de terapia intensiva, por representar alternativas de identificação e intervenção precoces para o resgate da função renal (Murray *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008; Bennett e Devajaran, 2011). (Fig. 4)

Os principais biomarcadores e sua localização anatômica no néfron que estão sendo testados no momento estão resumidos na fig. 4, a seguir.

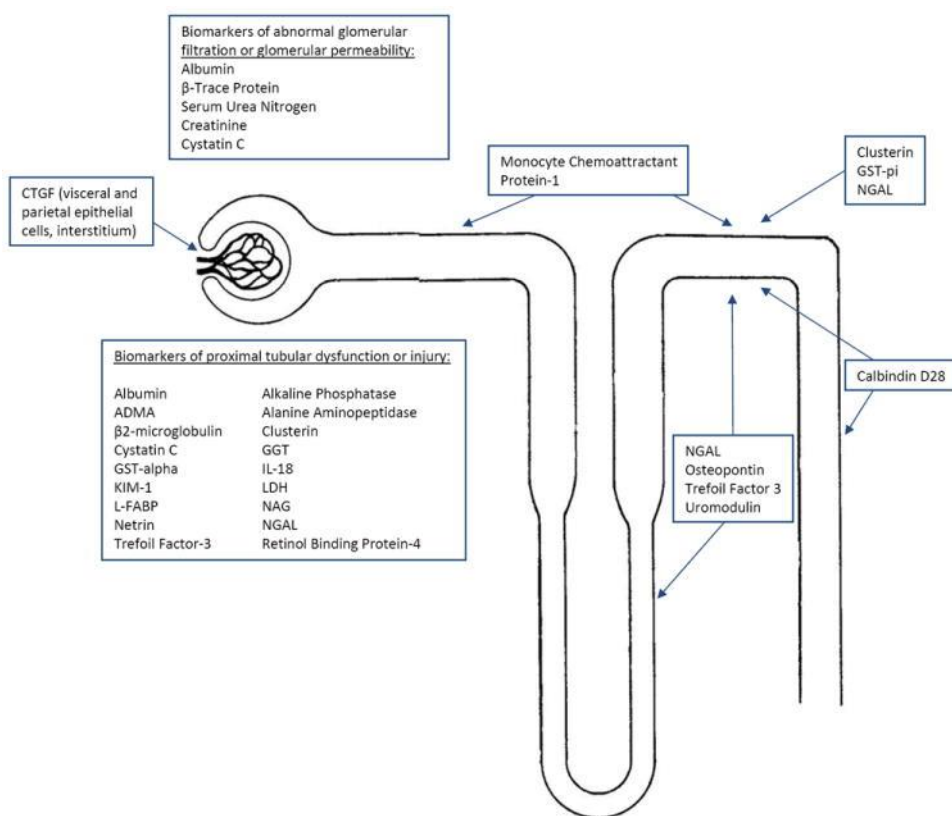


Figura 4. Desenho esquemático dos principais biomarcadores de função renal e sua localização anatômica no néfrons. Fonte: McMahon e Waikar (2013).

### b.1. Enzimas urinárias

A detecção da atividade de enzimas urinárias é um indicador precoce de lesão renal tubular. Essas enzimas quando no soro são muito grandes para serem filtradas pelo glomérulo, por isso, enzimúria indica vazamento de enzimas presentes nas células tubulares (Grauer, 2005; Segev, 2012).

As células epiteliais do túbulo proximal contêm numerosas micro-vilosidades, formando a borda em escova que secretam diversas enzimas após injúria ou necrose, sendo que a magnitude de elevação está associada com a severidade da lesão (Edelstein e Faubel, 2011). As técnicas

para avaliação da enzimúria são consideradas não invasivas, sensíveis, fáceis de realizar e de baixo custo. Talvez o ponto mais importante seja a instabilidade de muitas enzimas urinárias e o processamento necessário das amostras, e também a necessidade de validação de algumas metodologias, com normalização de seus valores a fim de corrigir fatores relacionados à taxa de fluxo urinário destas enzimas, uma vez que sua concentração na urina não depende exclusivamente de sua produção, mas também, do fluxo urinário, estado de hidratação do paciente e uso de diuréticos, sendo, portanto, inútil na presença de oligoanúria, quando a análise sérica assume particular importância. Também exames falso-positivos podem ocorrer devido a dano severo glomerular, o qual permite a filtração de enzimas séricas, e falso negativos podem ser decorrentes a dano severo tubular acarretando depleção dos estoques enzimáticos (Grauer, 2005; Koyner *et al.*, 2010; Segev, 2012; Loor *et al.*, 2013; McMahon e Waikar, 2013). Considera-se que a avaliação da razão entre as enzimas e a creatinina urinária é um método simples que se correlaciona à atividade enzimática em urina de 24 horas, entretanto, em pacientes com IRA a excreção da creatinina não é estável, dificultando assim esta normalização bem como a interpretação dos resultados (Loor *et al.*, 2013). Outro fator é que a taxa de excreção das enzimas varia dependendo do tipo e gravidade da injúria. Em cães, as enzimas urinárias são usadas para detectar IRA e são consideradas mais sensíveis que a presença de sinais clínicos e valores de creatinina sérica (Segev, 2012; Pressler, 2013; Sasaki *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014).

#### Gama-glutamil transferase (GGT)

A GGT é uma glicoproteína de peso molecular entre 90-120 KDa, localizada nas bordas em escova dos túbulos contorcidos proximais e alça de Henle, liberadas após lesão de células tubulares com aumentos de duas a três vezes o valor basal, sendo, portanto, considerada marcador precoce de dano tubular renal, além de fornecer informações sobre a progressão da lesão. Sua metodologia é de baixo custo, rápida e com alta sensibilidade e especificidade para detectar IRA em pacientes de alto risco (Fig. 4) (Heine *et al.*, 2001; Mello, 2006; Pressler, 2013). Em estudo prospectivo com 26 pacientes humanos admitidos em UTI, a concentração urinária de GGT estava aumentada, e foi útil para prever o desenvolvimento de IRA (Edeistein, 2011). Lesão renal e reversibilidade da mesma foram demonstradas, utilizando GGT urinária em cadelas com piometra, nas quais houve redução de GGT urinária após cirurgia (Heine *et al.*, 2001). Estudo realizado em cães avaliou, comparativamente, a atividade da enzima GGT urinária com os testes utilizados na rotina clínica, como a urinálise, ureia e creatinina séricas, durante a indução de IRA por agente nefrotóxico, a gentamicina, concluiu-se que a GGT é mais sensível e específica quando comparada aos testes de função renal convencionais (Hennemann *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2010; Bragato, 2015).

Entretanto, resultado controverso foi observado por Santin *et al.* (2006), ao pesquisar a atividade da GGT urinária em cães saudáveis submetidos à terapia com anfotericina B, fármaco nefrotóxico, relataram que este biomarcador não foi eficaz para o diagnóstico precoce de lesão renal, quando comparada a creatinina sérica.

#### N- acetyl- $\beta$ -D- glucosaminidase (NAG)

A NAG é uma enzima lisossomal presente nas células epiteliais tubulares, relativamente grande (130 KDa) e, portanto, não filtrada pelos glomérulos, indicando que elevações urinárias sejam de origem tubular (fig. 3 e 4), (Segev, 2012; Sharma, 2012). Aumento da concentração de NAG urinária ocorre após utilização de nefrotóxicos como gentamicina e cisplatina, permitindo avaliação e ajuste na terapia de maneira segura. Este biomarcador apresenta maior sensibilidade na detecção de IRA em pacientes críticos quando comparada a creatinina sérica, e está

associado a pior prognóstico (Vaidya *et al.*, 2008; Endre e Westhuyzen, 2008). Embora seja bom candidato para detecção precoce de IRA, pode-se observar aumento em condições diferentes como artrite reumatoide e hipertireoidismo, o que resulta em baixa especificidade. Além disso, pode ser inibida pela ureia endógena, metais pesados e outros agentes nefrotóxicos (Vaidya *et al.*, 2008). Em veterinária, estudos demonstraram que a NAG possui capacidade de predição de azotemia, na detecção de IRA e DRC, boa sensibilidade no diagnóstico de lesão tubular decorrente da utilização de gentamicina, na avaliação renal em cadelas com piometra sugerindo que a mesma deva ser utilizada na rotina clínica (Lapointe *et al.*, 2008; Jepson *et al.*, 2009; Maddens *et al.*, 2010; Nabity, 2012; Cobrin *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Contudo, é necessária a utilização de kits espécie específicos, o qual já foi padronizado por Tassini (2015) em ensaio espectrofotométrico e também determinado valores de referência em cães saudáveis, contudo ainda são necessários mais ensaios clínicos a fim de verificar seu desempenho.

#### Neutrófilo gelatinase-associada lipocaina (NGAL)

A NGAL é uma glicoproteína (25 KDa) sintetizada e secretada pelas células epiteliais tubular (Figs. 3, 4 e 5), que se eleva rapidamente após insulto isquêmico ou nefrotóxico (Devarajan, 2006; Segev, 2012). Quando ocorre injúria tubular sua quantidade aumenta tanto no plasma quanto na urina, mais precocemente que outros biomarcadores urinários como, NAG e microglobulina. O NGAL apresenta desempenho próximo do ideal para identificar IRA após cirurgia cardíaca, sendo considerado sensível e específico, preditor da severidade e duração da IRA, bem como do tempo de permanência hospitalar (Sharma, 2012). Elevação de NGAL na ausência de elevação da creatinina é de valor prognóstico e sugere que a creatinina deixa de classificar indivíduos com doença renal subclínica (Edelstein e Faubel, 2011; McMahan e Waikar, 2013). Embora seja o biomarcador mais estudado, os resultados ainda são controversos. Estudos em cães com sepse observaram sua superioridade na IRA nefrotóxica por gentamicina e sua capacidade de diferenciar IRA de DRC naqueles azotêmicos (Pressler, 2013; Steinbach *et al.*, 2014; Zhou *et al.* 2014; Cotellini *et al.*, 2015) ao contrário de Sasaki *et al.* (2014) que não observaram bons resultados neste contexto clínico, provavelmente devido à grande variabilidade dos valores obtidos, o que indica necessidade de estudos adicionais.

#### Kidney injury molecule-1 (KIM-1)

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) é uma glicoproteína (90 KDa) secretada na membrana apical de túbulos e apresenta expressão muito elevada após lesão isquêmica, tóxica ou séptica com desempenho superior aos marcadores tradicionalmente utilizados (Figs. 3, 4 e 5). Sua elevação prediz aumento de risco de mortalidade e de necessidade de diálise (Segev, 2012; Sharma, 2012; McMahan e Waikar, 2013). Em veterinária, há a necessidade de validação de kits para uso em cães e poucos estudos sobre sua utilidade no diagnóstico de IRA (Palm, 2012; Loor *et al.*, 2013; Pressler, 2013), dentre eles, Sasaki *et al.* (2014) não evidenciaram vantagens na sua utilização em cães com IRA nefrotóxica por gentamicina.

#### Interleucina-18 (IL-18)

A interleucina-18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória, com peso molecular de 24 KDa, considerada como biomarcador precoce de injúria renal aguda isquêmica (Figs. 3 e 4). Em pacientes após cirurgia cardíaca, sua concentração urinária atingiu pico 12 horas após e predisseram IRA. Em pacientes com sepse em UTI, apresentou valor preditivo para complicações dois dias antes da elevação da creatinina sérica. Além disso, seus valores se correlacionam com gravidade e mortalidade (Vaidya *et al.*, 2008; Segev, 2012; Sharma, 2012). Contudo, embora apresente baixa sensibilidade, mas boa especificidade, seu desempenho depende do tempo da coleta em relação à exposição ao dano renal. Elevações da IL-18 urinária

raramente são falso-positivos e sua principal limitação associa-se ao fato de ser considerada mais como marcador inflamatório do que de IRA (Coca *et al.*, 2008; McMahon e Waikar, 2013). Em veterinária ainda não existem estudos avaliando seu desempenho, logo, estudos são necessários para confirmar a utilização da IL-18 como biomarcador de lesão renal na rotina clínica (Edeilstein e Faubel, 2011; Pressler, 2013).

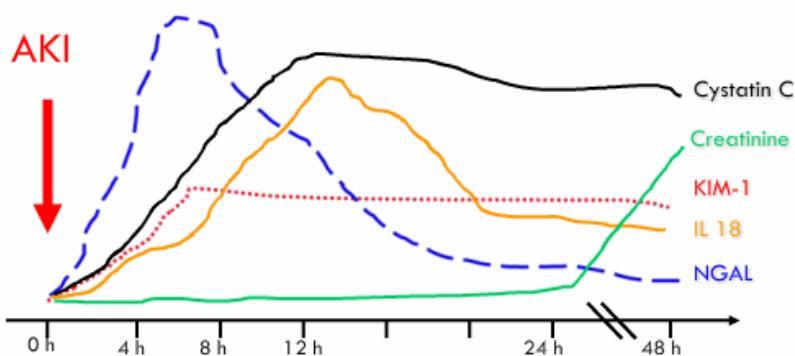


Figura 5. Comportamento de diferentes biomarcadores no diagnóstico de IRA em comparação com a creatinina sérica. AKI: Acute kidney injury. Fonte: Bennet e Devarajan (2011).

## b.2. Proteínas de baixo peso molecular (Cistatina C)

As cistatinas constituem uma superfamília de proteínas cujos membros são inibidores proteicos de cisteína-proteases do tipo papaína, as quais atuam intra e extracelularmente formando complexos com suas enzimas alvo na proteção dos tecidos contra destruição proteolítica. São importantes no catabolismo intracelular de peptídeos e proteínas, no processamento de pró-hormônios e na degradação do colágeno além de atuarem na modulação de atividade antiviral do sistema imune. Três famílias são conhecidas e englobam 12 proteínas: a primeira constituída pelas cistatinas intracelulares A e B, a segunda de atuação intra e/ou extracelular representada pelas C, D, E, F, G, S, AS e SN e a terceira, de ciminogênios, proteínas intravasculares envolvidas no processo de coagulação e produção de peptídeos vasoativos. Apesar de apresentarem ação modulatória e inibitória da atividade das proteinases, cada uma possui ação específica nos diversos tecidos biológicos (Martins *et al.*, 2003; Grubb, 2011).

Dentre estas, a cistatina C humana é a mais investigada e foi descoberta em 1961, como traço Y numa banda eletroforética de fluido cérebro espinhal. Sua sequência de aminoácidos foi determinada em 1981, mas já havia sido sugerida como marcador de filtração glomerular em 1979. Em 1994 foi desenvolvido o método rápido e preciso para sua detecção, sendo então observado desempenho diagnóstico melhor que a creatinina para avaliação de disfunção renal. Trata-se de proteína básica, não glicosilada, peso molecular de 13,4 KDa, ponto isoeletrico de 9,3 e carga positiva em pH fisiológico. Constituída por 120 aminoácidos dispostos em cadeia polipeptídica simples, sua estrutura é do tipo *housekeeping* ou genes constitutivos, que é compatível com ritmo de produção estável pela maioria das células nucleadas e cujos produtos de transcrição são necessários à manutenção das células (Fig. 6A e B) (Martins *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2010; Fuchs e Hewitt, 2011; Grubb, 2011).

Além de ser produzida em ritmo constante em todas as células nucleadas, a cistatina C humana é excretada quase que exclusivamente pelos rins (Fig. 6B). Pode ser encontrado em todos os



fluidos fisiológicos principalmente, no líquido seminal, cefalorraquidiano, na saliva, leite, lágrima e plasma sanguíneo. Em cães foi identificada principalmente no soro, líquido cefalorraquidiano, rins e sistema nervoso central. Esta ampla distribuição reforça seu papel de inibir proteases lisossomais de células doentes ou rompidas protegendo o tecido conjuntivo (Grubb, 2011).

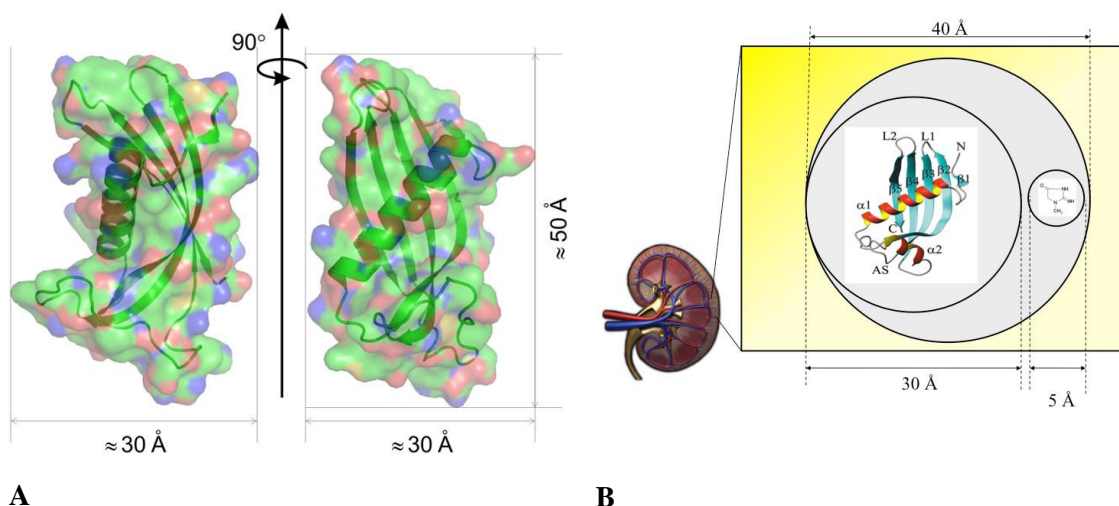


Figura 6. Estrutura proteica da Cistatina C humana (A e B). A) Representação bidimensional da molécula. B) Comparação entre as dimensões da estrutura proteica da cistatina C humana, creatinina e os poros da membrana de filtração. Fonte: Grubb (2011).

Poulik *et al.* (1981) comparando a sequência de aminoácidos da molécula de cistatina C humana com a de outras espécies, observaram alto grau de homologia (68 a 73%) com a de camundongo, rato e bovinos, mas na comparação com a canina, apenas uma pequena sequência terminal de 27 aminoácidos apresentou homologia variando de 46 a 79%.

A cistatina C é livremente filtrada pela membrana glomerular e completamente reabsorvida no túbulo proximal, onde é catabolizada (fig. 7). Esta proteína possui meia-vida de duas horas, não sofre influência de fatores extrarrenais como sexo, peso, idade e massa muscular e possui melhor correlação com a taxa de filtração glomerular do que a creatinina sérica. Seus valores aumentam em pacientes com disfunção renal, sendo particularmente útil em crianças, idosos e pacientes com massa muscular reduzida (Acuna *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2003; Martinez e Simon, 2003; Prates, 2007; Wehner *et al.*, 2008; Myagawa *et al.*, 2009; Grubb, 2011).

#### Determinação laboratorial da cistatina C

Uma vantagem da cistatina C sérica é ser mensurada através de técnicas rápidas, específicas, pouco invasivas e totalmente automatizadas que permitem maior agilidade na liberação dos resultados e contribuem para tomada rápida de decisão na prática clínica (Martinez e Simon, 2003; Neri, 2007; Berlitz, 2010; Gabriel *et al.*, 2011).

Para sua determinação laboratorial utilizam-se métodos imunológicos de diagnóstico por apresentarem instrumentação relativamente simples, alta precisão, boa amplitude de detecção e baixa ação de interferentes, porém resultados inconclusivos ainda podem ser evidenciados (Hermes, 2000; Bochenek, 2000; Silva, 2003).

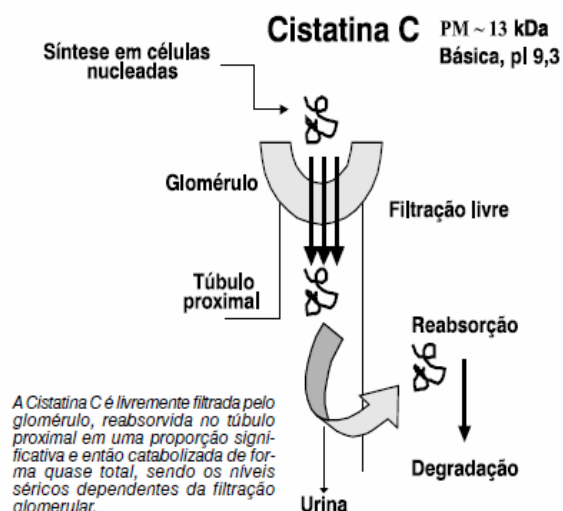


Figura 7. Desenho esquemático do processamento renal da cistatina C. Fonte: Martins *et al.*, 2003.

Técnicas como as espectrofotométricas baseadas na turbidimetria e nefelometria fundamentam-se na quantificação da energia dispersada (*Scattering light*) por soluções que contenham o complexo antígeno-anticorpo, onde a intensidade de dispersão da luz é proporcional à concentração do analito (fig. 8). Dessa forma, é possível determinar a concentração de cistatina C na amostra por comparação com padrão de concentração conhecida (Fig. 8) (Jensen *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003; Neri, 2007; Cobrin *et al.*, 2013).

O princípio destes ensaios se baseia na utilização de partículas de látex ligadas a anticorpos contra cistatina C. No método de nefelométrico, destacando a PENIA (Particle Enhanced Nephelometric Immunoassay), mede-se a turbidez e o desvio da luz ao passar em uma solução contendo complexos imunológicos. No ensaio turbidimétrico, como o PETIA (Particle Enhanced Turbidimetric Immunoassay), há formação de imunoprecipitados que turvam o meio e diminuem a intensidade do feixe de luz incidente ao atravessar a solução, assim a dispersão da luz é usada para quantificar os analitos no soro ou plasma. Esta análise pode ser feita em qualquer espectrofotômetro automatizado, ou analisador clínico, enquanto o PENIA só pode ser feito em analisadores do mesmo fabricante (Fig. 8) (Newman, 2002; Martins *et al.*, 2003; Bochenek, 2007).

Método como imunoturbidimetria requerem sistema tampão que proporciona condições ótimas, anticorpos ou antígenos, ligados ou não às partículas de látex, que determinam a sensibilidade e especificidade, calibradores que estabelecem a relação entre a concentração real e a medida, e os controles que verificam desvios de calibração. As leituras são feitas em unidades de absorbância, que refletem a relação entre luz incidente e transmitida (Avila, 2001). Nesta técnica, interferentes como lipemia, hemólise e bilirrubina que interferem na turbidez do meio, podem gerar resultados falsamente aumentados ou diminuídos. Deve-se considerar também a possibilidade de ocorrer reação cruzada com outros componentes, pois nem sempre os anticorpos utilizados nos reagentes têm sensibilidade e especificidade a um tipo específico de antígeno, que pode ocasionar erros. Para minimizar isto, alguns métodos usam proteínas em baixas concentrações que neutralizam ou bloqueiam estes interferentes sem impactar na qualidade analítica (Selby, 1999; Ismail e Barth, 2001; Brugts *et al.*, 2009). Outra desvantagem do ensaio turbidimétrico é o efeito pró-zona, que se refere à ausência de aglutinação, devido à

formação de imunocomplexos solúveis em regiões de excesso de anticorpo ou de antígeno na amostra, levando a resultado falsamente diminuído e grande variabilidade entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios (Fig. 9). Para evitar sua ocorrência, o imunoenensaio pode ser padronizado para funcionar na zona de equivalência, na qual anticorpo-antígeno estão em concentrações ideais de reação ou diluir previamente as amostras a serem analisadas, permitindo assim a medida do analito dentro da faixa de sensibilidade fornecida pelo fabricante (Selby, 1999; Hermens, 2000; Steward, 2003; Wendland *et al.*, 2007; Teva *et al.*, 2009).

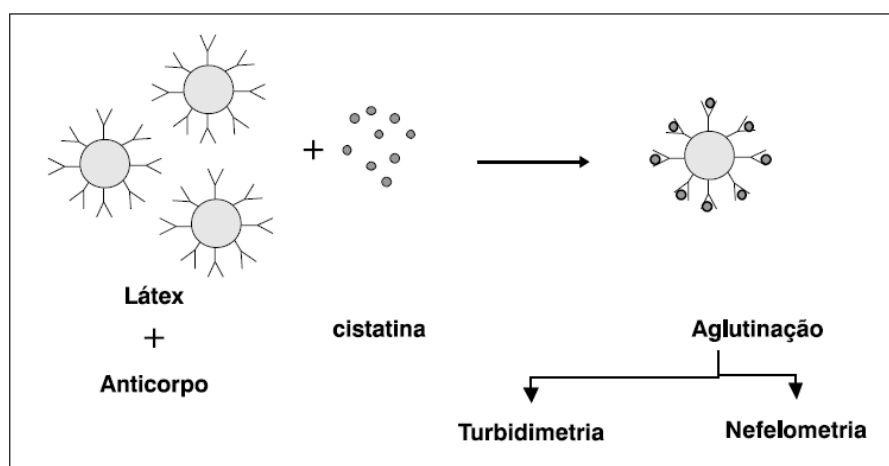


Figura 8. Representação esquemática do princípio de técnicas imunológicas utilizadas para detecção da cistatina C. Fonte: Martins *et al.*, 2003

A cistatina C também pode ser medida utilizando técnicas como a ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), considerada simples e de elevada sensibilidade para detecção de antígenos específicos. O princípio básico deste método consiste na identificação de antígenos por anticorpos marcados com uma enzima. Essa enzima reage com o substrato e modifica a cor do cromógeno. No entanto, os *kits* são usados para um grupo de amostras, que pode atrasar o diagnóstico laboratorial, e ainda têm elevado custo comercial (Pasa *et al.* 2009; Miyagawa *et al.*, 2009; Kavitha *et al.*, 2011).

Métodos específicos para medida da cistatina C, em veterinária, não estão disponíveis para utilização na rotina. Resultados obtidos utilizando *kits* designados para humanos e amostras de animais podem não refletir a concentração exata de cistatina C, tornando a utilização destas técnicas questionável (Braun *et al.* 2002; Myagawa *et al.*, 2009; Ghys *et al.*, 2014; Rodrigues, 2016). Entretanto, Uchhida *et al.* (1997) utilizaram a técnica de imunoturbidimetria e demonstraram a existência de reatividade entre anticorpos anti-cistatina C humana e canina em líquido cérebro espinhal, possibilitando a condução de estudos a fim de validar a utilização de kits humanos para amostra de cães e gatos. Comparação entre as técnicas imunoturbidimétrica e nefelométrica, para dosagem de cistatina C canina, considerou que a nefelometria produz resultados mais confiáveis (Jonkisz *et al.* 2010)

Como citado anteriormente, existe homologia entre a cistatina C humana e felina e a canina, de aproximadamente 70% e entre 46 e 79%, respectivamente (Poulik *et al.*, 1981; Nakata *et al.*, 2010). Como os ensaios utilizados se baseiam na quantificação da interação antígeno-anticorpo específica, a utilização de *kits* e equipamentos humanos para análise de amostras de espécies animais aumenta a possibilidade de erro associados à menor especificidade (Krimer, 2011). O

ideal seria a utilização de *kits* específicos para cada espécie avaliada, entretanto, nem sempre estão comercialmente disponíveis (Miyagawa *et al.*, 2009; Kavita *et al.*, 2011). Segundo Ghys *et al.* (2014), a demonstração da especificidade de anticorpos entre diferentes espécies como por exemplo, anticorpos humanos e antígenos de cães ou gatos tem que ser estabelecida através da validação dos imunodiagnósticos para as diferentes espécies.

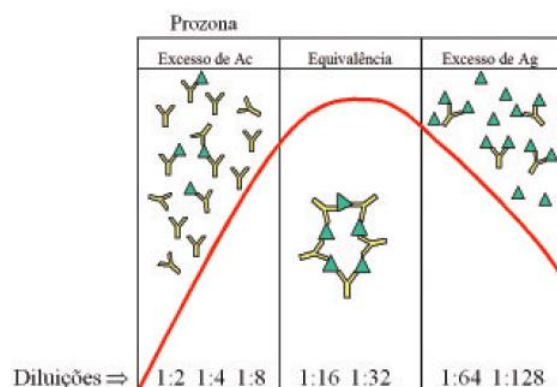


Figura 9. Representação esquemática do efeito pró-zona. Fonte: Teva *et al.*, 2009.

Jensen *et al.* (2001), Almy *et al.* (2002) e Braun *et al.* (2002), demonstraram que a cistatina C sérica pode ser medida de forma confiável em cães utilizando método imunoturbimétrico (PETIA) desenvolvido para determinação em humanos. Estes estudos consideraram as medidas obtidas lineares e o coeficiente de variação adequado. Além disso, animais com disfunção renal apresentaram valores superiores aos dos saudáveis. Entretanto, estes autores não realizaram a recuperação analítica da cistatina C através do método utilizado, alegando não haver cistatina C canina purificada disponível o que segundo os mesmos, pode questionar a especificidade analítica da técnica para uso em cães.

Braun *et al.* (2002) demonstraram a imunorreatividade entre o anticorpo anti-cistatina C humana e o antígeno canino devido ao decréscimo correspondente do sinal analítico em amostras diluídas de plasma de cães e que a concentração de cistatina C em plasma canino foi similar à do humano, sendo que valores maiores foram medidos em cães com creatinina plasmática elevada. A partir destas observações, estes autores concluíram que a proteína medida pela técnica em cães era de fato a cistatina C e apesar de não utilizarem outros métodos para comprovar isto, consideraram que o *Kit* humano poderia ser utilizado em cães.

Almy *et al.* (2002) validaram a turbidimetria para uso em cães, avaliando a concentração de cistatina C em 25 cães saudáveis e 25 com disfunção renal e demonstraram reatividade entre cistatina C humana e canina através da utilização da técnica de Western Blot. Esta técnica permite a identificação de antígenos com peso molecular definido (Hill, 2006). Estes dados validaram e fundamentaram a utilização desta técnica em cães por outros autores (Scally *et al.*, 2006; Pagitz *et al.*, 2007; Wehner *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2012).

Em contrapartida, estudo na espécie felina, Martin *et al.* (2002) concluíram que a turbidimetria não pode ser usada nesta espécie por não apresentar distribuição normal dos valores de cistatina C sérica em 99 gatos saudáveis e pela sobreposição de valores entre doentes e saudáveis. Além disso, não houve correlação significativa entre os valores de cistatina C sérica e creatinina sérica entre os animais doentes. Estes dados sugerem baixa especificidade entre os anticorpos anti

cistatina C humana e o antígeno felino, inviabilizando assim a utilização desta metodologia nesta espécie, contrapondo, entretanto, resultados obtidos por Ghys *et al.* (2014).

Pasa *et al.* (2009) utilizaram o método imunoenzimático ELISA *Kit* humano para dosagem de cistatina C sérica em cães com leishmaniose e observaram elevação de seus valores em relação aos animais saudáveis. Miyagawa *et al.* (2009) e Waki (2013) consideraram a técnica viável e aplicável para cães, apesar de não terem acessado a recuperação analítica da cistatina C canina através do método utilizado.

Alguns trabalhos utilizando estas metodologias mensuraram a concentração da cistatina C na urina de cães e relacionaram a ocorrência de lesão tubular (Monti *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2014; Garcia-Martinez, 2015) e concluíram que sua utilização juntamente com medida da TFG melhora o diagnóstico de IRA em cães.

Segundo Taylor (1981) a utilização de *kits* espécie específica é considerada ideal, uma vez que fornece maior precisão e confiabilidade nos resultados. Baseado nisto, Yathiraj e Ramachandra (2011); Tvarijonaviciute *et al.* (2013) e Sasaki *et al.* (2014), utilizaram a técnica ELISA específica para cães, entretanto estes autores consideraram que apesar de fornecerem resultados mais confiáveis, a necessidade de realização do teste em grupos de amostras o que atrasa o diagnóstico, bem como o alto custo dos *kits*, limitam seu uso na rotina clínica.

Diante de resultados divergentes, acredita-se que para que a metodologia humana seja utilizada em animais com resultados confiáveis considera-se imprescindível realizar procedimentos que verifiquem a precisão e confiabilidade dos resultados. Neste contexto, o processo de validação é condição necessária antes da aplicação dos mesmos na rotina (Kricka e Master, 2008; Schimke, 2009; Maddens *et al.*, 2010).

#### Estabilidade da amostra

Embora se recomende a utilização de amostras frescas para detecção da cistatina C para classificação e diagnóstico de IRA e DRC, conhecer a estabilidade das amostras em diferentes condições de armazenamento pode ser útil para definir prazo adequado para realização do exame e o máximo para sua repetição, impedimento técnico e estudos clínicos retrospectivos (Neri, 2007, Oliveira e Mendes, 2010)

Cistatina C humana sérica é estável no sangue, provavelmente devido a presença de inibidores de protease e preservativos naturais como a transferrina que evitam sua degradação e possibilitam a estocagem no plasma e soro por sete dias à temperatura ambiente, um a dois meses refrigerada e congelada (-80 graus) durante seis meses. As amostras resistem a pelo menos sete ciclos de congelamento e descongelamento e podem ser aliquotadas até 24 horas após a coleta, sem alterar sua concentração sérica (Neri, 2007; Grubb, 2011).

Estudos sobre a estabilidade da cistatina C canina consideraram este analito estável por três dias à temperatura ambiente, um mês refrigerada e congelada (-80 graus) durante três meses (Wehner *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2012). Outros autores, avaliando diferentes formas de armazenamento, utilizaram amostras mantidas a -20<sup>o</sup> C, -55<sup>o</sup> C e -80<sup>o</sup> por mais de nove meses e as consideraram aceitáveis para análise, entretanto, estes autores não analisaram a porcentagem de recuperação deste analito nas amostras conservadas (Jensen *et al.*, 2001; Almy *et al.*, 2002; Antognoni *et al.*, 2005; Pagitz *et al.*, 2007; Miyagawa *et al.*, 2009).

#### Valores de referência

Valores de referência são obtidos a partir de critérios bem definidos, pela mensuração do analito em indivíduos clinicamente hígidos e considerando todos os fatores intra e inter individuais que possam afetar os resultados (Lunsden, 1998; Andriolo *et al.*, 2013). Estudos comparativos entre

cistatina C humana e creatinina demonstram que a variação biológica intraindividual daquela é maior e a interindividual menor, o que faz com que seja um melhor marcador na identificação de pequenas mudanças da função renal (Grubb, 2011).

Segundo Uzum *et al.* (2005) a determinação dos valores de referências para cistatina C depende da realização de estudos com maior número de indivíduos de diferentes regiões e utilizando o mesmo procedimento analítico. A utilização de diferentes métodos analíticos, calibração, antissoros e distribuição de idades dificultam as comparações entre os resultados de diferentes estudos e demonstra a importância de se padronizar pesquisas tanto em medicina humana quanto em veterinária. Neste sentido, considera-se que os valores de referência variam conforme o *kit* utilizado e cada laboratório deve fazer a verificação dos mesmos (Prates, 2007; Miyagawa *et al.* 2009; Gabriel *et al.*, 2011; Grubb, 2011). Rigalleau *et al.* (2008) verificaram a necessidade de normalização dos valores de referências para que este biomarcador seja usado na prática clínica, e Salgado *et al.* (2010) observaram que a variação destes valores é uma grande desvantagem para sua utilização na rotina, observação que também é válida para veterinária. Portanto, ainda não existe uma conduta consensual sobre os valores de referência de acordo com os diferentes métodos utilizados.

Em veterinária, os estudos sobre variação biológica da cistatina C são escassos e são controversos. Pagitz *et al.* (2007) em estudo longitudinal, avaliaram a variação biológica em cães durante 6 meses e concluíram que a variação biológica entre a cistatina C e creatinina estão no mesmo intervalo e têm índice de individualidade intermediários e que devido a isto, ambas são apropriadas para o monitoramento longitudinal da função renal em cães. Entretanto, Wehner *et al.* (2008) consideraram a cistatina C mais vantajosa como marcador após observar menor variação intra individual com relação a creatinina. Frente a isto, há necessidade de mais estudos envolvendo maior número de animais, população diversificada com relação a peso e idade, além de maior tempo de acompanhamento a fim de se avaliar melhor a variação biológica intra e interindividual deste biomarcador nesta espécie (Braun *et al.*, 2002; Pagitz *et al.*, 2007; Miyagawa *et al.*, 2009; Ghys *et al.*, 2014).

A concentração sérica de cistatina C é menos dependente da massa muscular corporal do que a da creatinina. Este fato constitui a principal vantagem daquele analito, pois perda muscular decorrente de paralisias, imobilidade, anorexia, má nutrição e envelhecimento podem afetar a avaliação da função renal quando se utiliza a creatinina sérica. Estudos em humanos indicam que a concentração sérica de cistatina C não é afetada pela massa muscular e se altera pouco com a idade (Grubb, 2011; Martins *et al.*, 2003), entretanto, alguns autores observaram valores superiores em idosos e sugerem diferenciação entre idades, baseados no fato de que ocorre diminuição do volume renal em cerca de 20% a 30% a partir de 40 anos e 40% a partir de 80 anos, redução do número de glomérulos e da filtração glomerular justificam esta observação (Dunnill e Halley, 1973; Stowe, *et al.*, 2001; Prates *et al.*, 2007). Em veterinária, estudo em felinos, e em cães, não apresentaram diferenças decorrentes de idade, sexo e raça (Braun *et al.*, 2002; Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009; Ghys *et al.*, 2015).

Braun *et al.* (2002) observaram valores menores nos cães adultos jovens e de meia idade, do que em filhotes e idosos, bem como sobreposição de resultados entre as diferentes idades avaliadas. Apesar disto, considerou-se que a diferença entre as idades foi moderada, o que permite o uso do mesmo valor de referência. Esses dados corroboram os de Pagitz *et al.*, (2007); Wehner *et al.* (2008); Miyagawa *et al.* (2009) que não observaram variações com relação à idade. Em contrapartida, Monti *et al.* (2012) observaram elevação dos valores com o aumento da idade dos animais avaliados. Essa controvérsia indica a necessidade de estudos adicionais com maior número de animais saudáveis e associados à avaliação da taxa de filtração glomerular a fim de excluir animais com disfunção renal incipiente (Ghys *et al.*, 2014).

Quanto ao sexo e alimentação, estudos em humanos não demonstraram influência destes fatores na concentração da cistatina C sérica (Grubb, 2011; Alcivar *et al.*, 2007; Prates *et al.*, 2007). Em veterinária, também não observaram diferença entre machos e fêmeas (Braun *et al.*, 2002; Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009). Com relação à alimentação, observaram que em animais em jejum, a concentração permaneceu estável, mas após alimentação, houve decréscimo moderado provavelmente devido ao aumento da TFG após ingestão proteica. Por isto, preconiza-se jejum para determinação da mesma em cães (Braun *et al.*, 2002; Miyagawa *et al.*, 2009).

Braun *et al.* (2002) observaram menor concentração sérica de cistatina C em cães com peso inferior a 15 kg, enquanto Miyagawa *et al.* (2009) observaram valores maiores em cães pesando mais que 5 kg. Em contrapartida, Pagitz *et al.* (2007) não observaram alterações nos valores relacionadas ao peso, entretanto neste estudo utilizou-se uma população mais homogênea e com menor número de animais. Esta correlação com peso corporal, não ocorre em humanos, e provavelmente resulta da maior diferença de tamanho observada em cães. Apesar destas variações, estes autores consideram as diferenças pouco significativas, permitindo a utilização do mesmo valor de referência independente do peso.

Portanto, a diversidade de resultados observada nos estudos para se estabelecer os valores de referência da cistatina C canina podem ser consequência da variabilidade de métodos, reagentes, aparelhos utilizados e características da população utilizada. De acordo com estes estudos, os valores de referência da cistatina C de cães saudáveis podem variar entre 0,18 e 1,60 mg/L através do método imuno turbidimétrico (Jensen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Almy *et al.*, 2002; Pagitz *et al.*, 2007; Wehner *et al.*; 2008; Monti *et al.*, 2012), uma variação de 0,11 a 0,39 mg/L ocorre no método nefelométrico (Antagoni *et al.*, 2005) e de 0,28 a 0,99mg/L pelo imunoenzimático ELISA (Pasa *et al.*, 2009; Miyagawa *et al.*, 2009; Waki, 2013).

#### Cistatina C na avaliação da função renal

Segundo Prates *et al.* (2007), a avaliação da função renal é um dos pilares das decisões diagnósticas e terapêuticas frente às nefropatias agudas ou crônicas. Para isso, precisa-se de marcadores que forneçam informações precoces e precisas sobre eventuais perdas de função renal.

Cistatina C sérica apresenta características moleculares e metabólicas que permitem detectar pequenas alterações na função renal, com maior sensibilidade que os parâmetros habituais, sem necessidade de ajustes em relação à idade e composição corporal. Comparada com a creatinina, observa-se menor meia vida e distribuição exclusivamente extracelular (Grubb, 2011; Ghys *et al.*, 2014) (Fig.10)

Em medicina, Magro (2007) observou elevação discreta e proporcional à perda da função renal e mais precoce do que a creatinina, na avaliação de pacientes no pós-operatório de cirurgia cardíaca. Coca *et al.* (2008) estudando marcadores para o diagnóstico precoce de IRA constataram bom desempenho deste analito e diagnóstico precoce 24 a 48 horas antes de marcadores utilizados na rotina, além de apresentar valor preditivo para necessidade de terapia de substituição renal. A avaliação de pacientes graves em UTI e com sepse demonstrou maior sensibilidade na detecção de alterações da função renal na comparação com a creatinina e depuração em urina de 24 horas (Martins *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2005; Nejat *et al.*, 2010; Molitoris *et al.*, 2008). Acuña *et al.* (2009) e Foster *et al.* (2013) encontraram correlação entre concentração sérica de cistatina C e aumento do risco de mortalidade cardiovascular em pacientes com TFG normal. Consideraram que este analito pode apresentar maior capacidade que outros métodos para estratificar pacientes com alto risco de complicações durante a

hospitalização. Reforçando assim sua utilidade em situações nas quais é necessária melhor predição de risco associada ao decréscimo da TFG.

Entretanto, estudo avaliando indicadores prognósticos, concluíram que a cistatina C não foi superior a creatinina para diagnóstico de IRA, porém, nos pacientes com IRA detectada através da creatinina, o subgrupo confirmado pela cistatina C teve desfecho pior (Spahillari *et al.*, 2012). Contrapondo os resultados descritos, Chantrel *et al.* (2000) e Hamed *et al.* (2013) concluíram que apesar de não demonstrar bom desempenho, pode ser utilizado como teste confirmatório em pacientes com creatinina elevada. Perianayagam *et al.* (2009) avaliando sua utilidade prognóstica para necessidade de diálise, concluíram que ela apresenta desempenho similar a creatinina sérica.

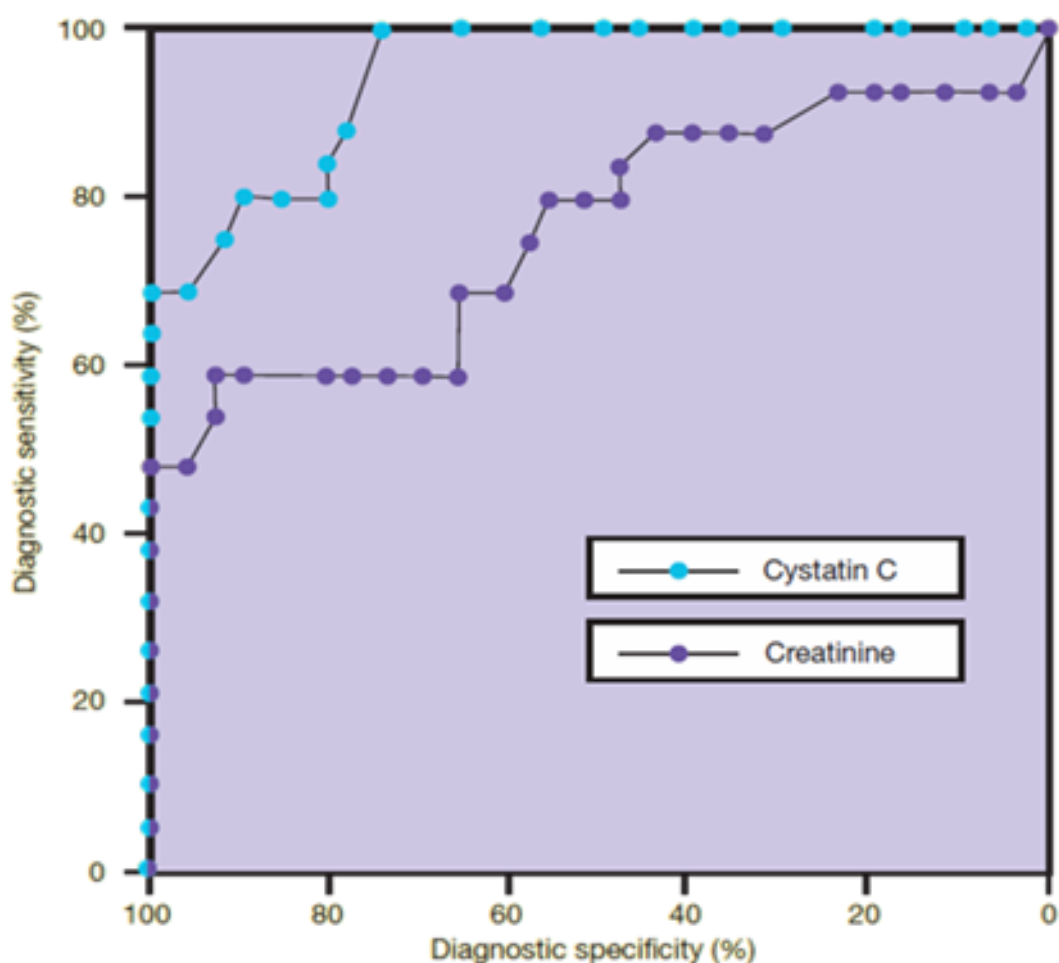


Figura 10. Sensibilidade e especificidade da cistatina C e creatinina na avaliação da função renal. Fonte. Grubb, 2011

Alguns estudos realizados em cães não observaram vantagens na utilização deste biomarcador (Scally *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2007; Waki, 2013; Rodrigues, 2016). Resultados conflitantes também foram observados em dois estudos avaliando o desempenho da cistatina C em cães com babesiose (Sally *et al.*, 2006; Didem *et al.* 2015). Contudo, outros autores demonstraram correlação significativa entre valores séricos de cistatina C e creatinina nos animais com disfunção renal caracterizando assim sua utilidade para este fim, mostrando ainda maior sensibilidade no diagnóstico naqueles animais com valores de creatinina ainda dentro da



normalidade, e correlação inversa e significativa com TFG (Jensen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Wehner *et al.*, 2008; Pasa *et al.*, 2009). Outro estudo, demonstrou sua utilização como teste confirmatório da presença de lesão em cães com ureia elevada e creatinina normal (Scally *et al.*, 2006), e que possui maior valor preditivo negativo quando comparada a creatinina (Wehner *et al.*, 2008). Contudo, a maior parte destes estudos foi realizada em animais portadores de doença renal crônica onde foi realizada uma avaliação pontual da cistatina C, e com foco principal em animais azotêmicos ou com azotemia discreta, indicando assim a necessidade de estudos adicionais que possam confirmar estes achados (Waki, 2013; Ghys *et al.*, 2014).

Neste sentido, considera-se que existem poucos estudos que analisam a utilidade da cistatina C no diagnóstico da injúria renal aguda os quais também apresentam resultados diferentes (Scally *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2007; Pasa *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2016). Como exemplo, Almy *et al.* (2002), ao avaliarem animais desidratados utilizando modelo experimental (aplicação de furosemida) observaram uma fraca correlação da cistatina C com TFG, o que pode refletir uma menor sensibilidade deste analito em cães com IRA. Porém neste estudo, não se pode definir que o modelo experimental utilizado realmente refletisse um quadro de IRA. Contrapondo este estudo, Scally *et al.* (2006) consideraram que este biomarcador pode ser usado como teste confirmatório de lesão renal em cães com creatinina normal. Contudo, apesar de se observar uma correlação significativa entre a cistatina C e a TFG em animais com suspeita de lesão renal, observou-se que ambos possuem mesmo valor diagnóstico (Hartmann *et al.*, 2007). Em outro trabalho, Pasa *et al.* (2008) avaliando cães criticamente doentes, observaram vantagem na utilização deste biomarcador com precocidade de detecção da IRA em relação a creatinina sérica nos animais com trauma, choque e alterações urogenitais. Um bom desempenho da cistatina C também foi observado por Choi *et al.* (2016) ao avaliarem cães cardiopatas.

Sendo assim, acredita-se que a mensuração da cistatina C é importante em pacientes que possuem alto risco de desenvolver doença renal. Considerando-se os resultados controversos descritos acima, tornam-se necessários estudos adicionais envolvendo maior número de animais com diferentes situações clínicas e o acompanhamento de sua concentração em pacientes de risco a fim de se avaliar sua precocidade (Ghys *et al.*, 2014).

Estudos em medicina apontam outras situações clínicas como diabetes, cirrose hepática e neoplasias, nas quais a utilização da cistatina C se mostrou mais indicada que a creatinina sérica, sugerindo que seja adicionada aos testes de rotina para avaliação da função renal nestes pacientes (Rigalleau *et al.*, 2008; Barakat e Khalil, 2011).

Pacientes com Diabetes Mellitus (DM) têm risco aumentado de desenvolver doença renal e cardiovascular. Nesta afecção há perda da qualidade da filtração glomerular devido à diminuição do tamanho dos poros nos glomérulos. Neste cenário clínico, o desempenho da cistatina C foi superior ao da creatinina sérica e depuração plasmática de EDTA e permitiu estratificar o risco de desenvolver doença renal (Perlemoine *et al.*, 2003; Rigalleau *et al.*, Grubb, 2011; Pavkov *et al.*, 2013).

A avaliação da função renal em pacientes cirróticos é importante para prognóstico, dosagem de drogas potencialmente nefrotóxicas, decidir em condutas como paracentese ou utilização de diuréticos. No entanto, a função renal aferida pela creatinina sérica pode ser superestimada devido à redução em sua produção associada à disfunção hepática, catabolismo proteico, e ao estado edematoso destes pacientes (Davenport *et al.*, 2011). Segundo Demirtas *et al.* (2001) e Barakat e Khalil (2011), a cistatina C forneceu diagnóstico precoce e prognóstico preditivo para o desenvolvimento de síndrome hepato renal, sugerindo que a mesma fosse adicionada aos testes de rotina nestes pacientes.

O desempenho deste biomarcador também foi avaliado em alguns estudos em cães com diferentes afecções. Antagoni *et al.* (2007); Pasa *et al.* (2009) e Choi *et al.* (2016) avaliaram cães com disfunção renal e azotemia associada à nefrite crônica, leishmaniose visceral, diabetes e cardiopatia e observaram correlação entre cistatina C e creatinina nos cães azotêmicos e melhor desempenho daquela na avaliação de cães não azotêmicos, demonstrando vantagem deste biomarcador nestas situações clínicas, corroborando estudos realizados em humanos.

Em medicina existem, entretanto, algumas situações que afetam a concentração da cistatina C sérica independente de alterações na função renal. Como exemplo cita-se pacientes com hipertireoidismo ou em tratamento com tiroxina, os quais apresentaram maiores concentrações deste biomarcador. Possivelmente devido à ação dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo geral, influenciando sua produção. Dessa forma, a função tireoidiana deve ser documentada quando este analito for usado como índice de função renal (Gabriel *et al.*, 2011). Outras situações são a utilização de corticoide e a ocorrência de processos inflamatórios sistêmicos, os quais podem aumentar a síntese de cistatina C e, conseqüentemente, subestimar a TFG (Gruev *et al.*, 2009). Alguns estudos também demonstram correlação significativa entre os níveis de proteína C reativa e cistatina C, sugerindo que inflamação sistêmica aumenta sua concentração sérica. Porém, os registros de pacientes individuais acompanhados por maior período de tempo não demonstraram esta correlação (Edelstein e Faubel, 2011; Grubb, 2011).

Estudos veterinários avaliando a interferência de fatores extrarrenais sobre a concentração de cistatina C ainda são escassos. Wenher *et al.*, (2008) e Miyagawa *et al.* (2009) não observaram influência de neoplasia, infecção, e insuficiência cardíaca congestiva na concentração sérica de cistatina C, entretanto, devido a utilização de pequeno número de animais, torna-se necessário estudos adicionais, para melhor acessar o impacto destas afecções na concentração sérica deste biomarcador.

Apesar dos diversos estudos supracitados, avaliando o desempenho da cistatina C como biomarcador de função renal que demonstraram correlação com a creatinina, maior sensibilidade e especificidade (Fig.10), valor preditivo e prognóstico da evolução da disfunção renal e pouca interferência de fatores extrarrenais, cabe ressaltar algumas desvantagens de sua adoção na rotina clínica, sendo a principal o maior custo do que o da creatinina sérica (Krieser *et al.*, 2002; Alcivar *et al.*, 2010; Brilha, 2011). No entanto, Grubb (2011) considera que o desenvolvimento de métodos automatizados pode reduzir os custos de análise. Dessa forma, é essencial estar atento a sua real contribuição no acompanhamento de diferentes doenças renais e solicitar apenas em situações já testadas e para as quais as pesquisas mostraram sua real contribuição (Gabriel *et al.*, 2011).

Por fim, os dados relacionados à cistatina C no contexto de biomarcador precoce são bastante heterogêneos, especialmente em veterinária. Variáveis como a população estudada, o tipo de insulto renal, o tempo de acompanhamento dos pacientes, o ponto de corte, o tipo de amostra (sangue ou urina) e a técnica utilizada podem ter contribuído para a grande diversidade dos resultados observados na literatura e limitam a generalização dos mesmos. Sendo assim, é importante definir critérios ou padrões para se avaliar corretamente seu desempenho em veterinária (Antagoni *et al.*, 2007; Hendy-Willson e Pressler, 2012; Waki 2013; Ghys *et al.*, 2014).

## MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo de número 56/2015 (Anexo 1 e 3).

Trata-se de um estudo utilizando cães atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG.

### 1. Animais

#### *Grupo Controle*

Para compor o grupo controle dezenove cães foram classificados como clinicamente hígidos, com idade entre dois a 14 anos ( $5,3 \pm 2,96$  anos), sendo nove machos e dez fêmeas, de diferentes raças e peso variando entre 1,9 e 33 Kg ( $14 \pm 9,6$  Kg). Todos os animais eram pertencentes a proprietários (domiciliados), em que os dados de anamnese e de exames clínicos e laboratoriais (hemograma completo, urinálise e perfil bioquímico) excluíram doenças preexistentes.

#### *Grupo com injúria renal aguda (IRA)*

Foram selecionados 24 animais com injúria renal aguda com idade entre dois a 17 anos (média 9,8 anos), ambos os sexos (16 machos e 8 fêmeas), de diferentes raças e peso entre dois a 40Kg (média de 12Kg). Provenientes do atendimento clínico do Hospital Veterinário/ UFMG, nos quais os dados de anamnese, exame clínico e alterações laboratoriais (bioquímica sérica) e ultrassonográficas foram compatíveis com a presença de IRA.

#### *Grupo da unidade de terapia intensiva (UTI)*

Foram selecionados 28 animais internados UTI do Hospital Veterinário/ UFMG no período de janeiro a junho de 2016, com idade entre dois a 16 anos ( $7,9 \pm 4,14$  anos), sendo 12 machos e 16 fêmeas, de diferentes raças e peso entre dois a 40 Kg ( $12,57 \pm 11,07$  kg), os quais apresentavam concentração sérica de creatinina  $< 1,6$  mg/dl. Não houve restrição para idade, sexo e raça. Foram excluídos pacientes que apresentaram alterações clínicas e laboratoriais e de exame de imagem compatível com doença renal crônica (DRC). Também, não fizeram parte deste estudo animais que estavam recebendo doses elevadas de corticosteroides ou terapia com hormônios tireoidianos.

Os cães da UTI apresentavam estado clínico crítico, cujas comorbidades, tais como doenças infecciosas, pós cirúrgicos complicados, iatrogênicas e sepse foram consideradas predisponentes para o desenvolvimento de IRA (Costa *et al.*, 2003; Stocker e Forrester, 2004; Metha *et al.*, 2011; Ross, 2011; Mugford *et al.*, 2013; Cortellini *et al.*, 2015).

A concentração sérica de creatinina foi considerada o “padrão ouro” para caracterização da função renal normal ( $< 1,6$  mg/dl) ou alterada ( $> 1,6$  mg/dl) em cães e para orientar a análise do comportamento dos outros marcadores. Valores estes estabelecidos de acordo com o critério IRIS (2013).

Realizou-se a monitoração diária da função renal através dos valores séricos de creatinina e cistatina C, os quais foram acompanhados durante no mínimo 48 horas. O primeiro valor obtido quando na entrada do UTI foi considerado valor basal de cada paciente.

## 2. Avaliação laboratorial

### Urinalise

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese ou cateterização uretral e processadas em até quatro horas. Cada amostra de urina foi avaliada fisicamente quanto a cor, aspecto, odor. A densidade urinária foi determinada através de um refratômetro clínico. O exame químico foi realizado pela imersão rápida em fita reagente (Roche®) com leitura contra padrão de cores estabelecido pelo fabricante. A sedimentoscopia foi obtida após a centrifugação da urina por 5-10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi separado em *ependorfs* e congelado (-20°) para determinação da GGT, creatinina e proteína urinária. A análise do sedimento foi realizada sob microscopia óptica, avaliando-se quantitativa e qualitativamente os elementos organizados /campo microscópico.

A bioquímica urinária foi determinada no período de até quatro horas após coleta, sendo mensurado creatinina (método enzimático), proteína total (método vermelho de pirogalol) e gama glutamil transferase (GGT) (método cinético). Todas as análises foram realizadas utilizando-se kits comerciais (Lab Max 560 Labtest®) com leitura em espectrofotômetro automatizado (COBAS MIRA PLUS- ROCHE®).

### Débito urinário

O débito urinário foi mensurado apenas nos animais do grupo UTI durante 72 horas. Os animais foram cateterizados em sistema fechado, sendo a urina armazenada em coletor para mensuração diária do débito urinário.

### Hemograma e Bioquímica sérica:

Foram coletadas cinco ml de sangue na veia jugular externa com a utilização de agulhas e seringas estéreis. Uma alíquota da amostra foi armazenada em frasco com anticoagulante (EDTA-10%) para realização do hemograma e outra em frasco sem anticoagulante, para separação de soro e determinação da bioquímica sérica e da cistatina C, as quais foram devidamente identificadas e refrigeradas para posterior análise.

No hemograma, as contagens celulares foram realizadas em aparelho automático (Diagno®) e a contagem diferencial (100 células) em microscopia óptica, utilizando-se esfregaços sanguíneos corados (Corante rápido Laborclin®) em objetiva de imersão.

As amostras de soro foram processadas para determinação da concentração de creatinina (método enzimático), ureia (método enzimático), proteína total (método Biureto), albumina (método Verde de bromocresol).

Para dosagem de cistatina C (método imunoturbidimétrico) *kit* Cistatina C turbiquet Plus Labtest®. O aparelho foi previamente calibrado com cistatina C canina (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100)<sup>1</sup>, cuja concentração era de 0,1 mg/L (anexo 2). As leituras foram realizadas no aparelho COBAS MIRA PLUS (Roche®) do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário/ UFMG.

### Taxa de filtração glomerular

A taxa de filtração glomerular (TFG) foi feita nos animais do grupo UTI. A mensuração foi realizada em período de 60 minutos, utilizando a ultrassonografia para cálculo do volume urinário vesical. Primeiramente o animal foi sondado, realizado esvaziamento da bexiga e cálculo do volume residual da urina utilizando o ultrassom, este tempo foi considerado inicial (T0). Após 60 minutos foi mensurada a quantidade de urina no coletor e novamente a quantidade de urina na bexiga através do ultrassom (T1). Para o cálculo do volume urinário

---

<sup>1</sup> BioVendor Researchs and Diagnostic products.

total, foi somada a quantidade de urina no coletor a quantidade de urina na bexiga (T1), subtraindo-se quantidade de urina na bexiga em T0. Foi então dosado a concentração sérica e urinária de creatinina. A TFG foi calculada pela fórmula:

$$\text{TFG} = \frac{\text{Creatinina urina (mg/dl)} \times \text{Volume de urina (ml)}}{\text{Creatinina sérica (mg/dl)} \times 60 \text{ min} \times \text{peso do animal}}$$

O valor considerado normal para cães foi de 2 a 3ml /min/kg (Grauer, 2009).

### 3. Exame ultrassonográfico

Os exames ultrassonográficos foram realizados pelo mesmo examinador, utilizando-se o aparelho (ESAOTE MY LAB 40). A técnica adotada para avaliação ultrassonográfica renal foi descrita por Nyland *et al.* (2005). Nos rins foram avaliados tamanho (normal, aumentado, diminuído), contorno renal (regular, irregular), ecogenicidade cortical (aumentada, normal) e definição corticomedular (normal, diminuída, ausente).

### 4. Análise estatística

Através do Excel foi realizado um banco com os dados dos animais e resultados de exames realizados. As variáveis quantitativas foram descritas através dos valores mínimos e máximos, do cálculo das médias, desvio-padrão (s) e mediana. A distribuição de normalidade foi verificada pelo Lilliefors e de homocedasticidade pelo teste de Bartlett. As variáveis qualitativas foram apresentadas em frequências absolutas (quantidade observada) e relativas (em percentual). Foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para comparação das médias entre os grupos, quando os dados se mantiveram não paramétricos.

Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos. A análise de distribuição das características individuais (sexo, raça e idade) foi efetuada com o teste não paramétrico de Qui-quadrado.

A análise entre as variáveis quantitativas avaliadas no estudo foi realizada através do coeficiente de correlação linear de Spearman e de Pearson. O nível de significância considerado para os testes foi de 5%.

A estatística foi realizada utilizando-se os programas SAS e SISVAR, para as variáveis não paramétricas foi utilizado o Action\_R (programado em linguagem R) usando o teste de Friedman.

## **RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.**

Os resultados, discussão e conclusão serão apresentados na forma de artigos para melhor compreensão.

*ARTIGO I:* Validação da técnica imunoturbidimétrica da cistatina C para avaliação da função renal de cães.

*ARTIGO II:* Cistatina C na injúria renal aguda: diagnóstico em cães criticamente enfermos em unidade de terapia intensiva

*ARTIGO III:* Cistatina C e classificação IRIS: avanços na avaliação da função renal em cães criticamente enfermos em unidade de terapia intensiva.

*ARTIGO IV:* Contribuição da ultrassonografia no diagnóstico de injúria renal aguda em cães criticamente enfermos em unidade de terapia intensiva

*ARTIGO V:* Marcadores urinários e séricos no diagnóstico de IRA de cães criticamente enfermos em unidade de terapia intensiva

## ARTIGO I

# VALIDAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOTURBIDIMÉTRICA DA CISTATINA C PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL DE CÃES

## INTRODUÇÃO

A injúria renal aguda (IRA) uma síndrome complexa associada muitas vezes a evolução desfavorável. É considerada uma doença do paciente hospitalizado, principalmente em unidades de terapia intensiva, com alta mortalidade e morbidade. Ao contrário da medicina humana, existem poucos estudos em veterinária que documentam a frequência e as etiologias de IRA em cães em UTI. Por isso observa-se elevada variabilidade dos dados, sendo que relatos indicam incidência de 12 a 63% com taxa de mortalidade entre 54,2 a 86% (Kenney *et al.*, 2010; Lunn, 2011; Thoen e Kerl, 2011, Segev *et al.*, 2015). Apesar de sua importância, o diagnóstico precoce de IRA ainda é um desafio. Vários fatores contribuem para esta dificuldade e os marcadores utilizados atualmente não possibilitam a detecção precoce, nem a classificam em estágios de gravidade, uma vez que os pacientes acometidos requerem terapia diferenciada (Bellomo *et al.*, 2004; Lees, 2004; Grauer, 2005; Lunn, 2011; Martensson *et al.*, 2012; Palm, 2012).

Tendo em vista estas dificuldades para avaliação confiável da função renal, houve nos últimos anos um grande esforço para desenvolver testes mais sensíveis e específicos que possam detectar pequenos declínios na função renal, eventualmente não perceptíveis com os atuais métodos (Sodre *et al.*, 2007). Investigações neste âmbito procuram indicadores sensíveis que traduzam alterações celulares nas fases de instalação da IRA, quando as alterações são potencialmente reversíveis. Vários candidatos promissores para biomarcador ideal surgiram, em sua maioria demonstrando uma capacidade de detecção da IRA 48 horas antes da elevação de creatinina sérica. (Eldestein e Faubel, 2011). Estudos com novos biomarcadores são ainda escassos em veterinária, e também são necessários testes em pacientes de risco antes que a falência renal seja evidente. Neste contexto, alguns estudos têm avaliado a utilização de proteínas de baixo peso molecular, como a cistatina C, cuja concentração depende exclusivamente da filtração glomerular, sendo, portanto, considerada mais sensível e específica que a concentração sérica de creatinina (Grubb, 2011; Myagawa *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2016; Segev, 2012).

Em veterinária, existem poucos estudos que avaliam o desempenho da cistatina C em cães com IRA, observando também, como na medicina, resultados controversos (Jensen *et al.*, 2001; Almy *et al.*, 2002; Scally *et al.*, 2006; Antagoni *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2007; Wehner *et al.*, 2008; Myagawa *et al.*, 2009; Pasa *et al.*, 2009; Rodrigues, 2016). Entretanto, como a metodologia utilizada nestes estudos é variável, bem como o tipo de população avaliada, torna-se necessário a continuidade destes estudos, a fim de verificar o desempenho deste biomarcador para diagnóstico precoce de IRA em cães em comparação aos métodos tradicionais (Braun *et al.*, 2002; Antagoni *et al.*, 2005; Miyagawa *et al.*, 2009; Ghys *et al.*, 2014).

Atualmente, a cistatina C pode ser medida através de métodos imunológicos como a nefelometria, imunoturbidimetria e ELISA, que são técnicas rápidas, específicas, pouco invasivas, precisas e totalmente automatizadas, o que é uma vantagem na rotina laboratorial, permitindo maior agilidade na liberação dos resultados e contribuindo para tomada de decisão na prática clínica (Avila, 2001; Martinez e Simon, 2003; Neri, 2007). Entretanto, nenhuma destas técnicas é específica para uso em veterinária, uma vez que utilizam anticorpos policlonais humanos (Ghys *et al.*, 2014). Sendo assim, para que testes laboratoriais com *Kits* humanos

possam ser realizados em espécies animais a fim de serem utilizados na prática clínica, torna-se necessária a realização de procedimentos que verifiquem a precisão e confiabilidade dos resultados (Berlitz, 2010; Hilstron *et al.*, 2014).

Diante do exposto, se faz necessário não só a padronização de um marcador de função renal de alta sensibilidade, capaz de detectar dano renal precocemente, bem como, sua análise em diferentes situações, nas quais possa ser utilizado com eficácia e confiabilidade. Neste contexto, a cistatina C poderia ser esse marcador.

Este trabalho teve como objetivos: validar o método imunoturbidimétrico existente para mensurar a cistatina C canina sérica; estabelecer valores de referência para cães hígidos; avaliar a estabilidade de amostras sob conservação e investigar se os níveis séricos de cistatina C canina são mais altos em cães com injúria renal aguda do que em cães hígidos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 43 cães divididos em dois grupos, sendo Grupo 1 controle (n=19) com idade entre dois a 14 anos ( $5,3 \pm 2,96$  anos), sendo nove machos e dez fêmeas, de diferentes raças e peso variando entre 1,9 e 33 Kg ( $14 \pm 9,6$  Kg). Todos os animais eram pertencentes a proprietários (domiciliados), em que os dados de anamnese e de exames clínicos e laboratoriais (hemograma completo, urinálise e perfil bioquímico) excluíram doenças preexistentes.

Grupo 2 (n=24) animais com IRA com idade entre dois a 17 anos (média 9,8 anos), ambos os sexos (16 machos e 8 fêmeas), de diferentes raças e peso entre dois a 40Kg (média de 12Kg). Provenientes do atendimento clínico do Hospital Veterinário/ UFMG, nos quais os dados de anamnese, exame clínico e alterações laboratoriais (bioquímica sérica) e ultrassonográficas foram compatíveis com a presença de IRA.

Nestes animais foram coletados sangue para análise de creatinina sérica (método enzimático) e cistatina C (método imunoturbidimétrico e *Kit Cistatina C turbiquet Plus Labtest®*).

A concentração da creatinina sérica foi considerada o “padrão ouro” para caracterização da função renal normal ( $<1,6$ mg/dl) ou alterada ( $> 1,6$ mg/dl) em cães e para orientar a análise do comportamento da cistatina C sérica. Todas as análises foram realizadas no aparelho COBAS MIRA locado no Laboratório de Patologia Clínica do HV/UFMG.

Todos os testes para validação da técnica foram realizados utilizando duas amostras de soro canino, bem como o soro padrão de cistatina C canina (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100)<sup>2</sup>, cuja concentração era de 0,1 mg/L (Anexo 2).

Para validação da técnica foram mensurados os valores de cistatina C canina em amostras de soro canino, contento valor baixo (1,48 mg/L) e alto (5,69 mg/L) deste analito, as quais foram utilizadas para determinação da precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade.

Os critérios seguidos como requisitos para o processo de validação foram avaliados de acordo com normas da ANVISA (2003) e INMETRO (2007). Em todos os testes foram calculadas: as médias, desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV) dos valores obtidos. Foram avaliadas calibração, linearidade, precisão, limite de quantificação, exatidão, efeito pro-zona e estabilidade das amostras.

Os valores de referência para cistatina C canina foram obtidos a partir de resultados dos animais do grupo 1 controle (n=19), considerados hígidos.

---

<sup>2</sup> BioVendor Researchs and Diagnostic products.



Para estabelecer a correlação entre os valores de cistatina C e creatinina em cães com injúria renal aguda foram utilizados 24 cães com injúria renal aguda (IRA) (concentração de creatinina maior que 1,6 mg/dl), os quais foram divididos em três grupos de acordo com o grau de injúria renal. Sendo G1- creatinina sérica entre 1,7 a 3,0 mg/dl (n=13); G2- creatinina sérica entre 3,1 a 5,0 mg/dl (n=5) e G3- creatinina sérica > 5,0 mg/dl (n=6).

Todas as variáveis, inicialmente, foram analisadas descritivamente. As variáveis quantitativas foram descritas através das médias e desvio padrão, e as variáveis qualitativas foram apresentadas em frequências absolutas e relativas (%). Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos. Foi aplicado o Teste de KRUSKAL WALLIS, correlação de Spearman, para variáveis não paramétricas e consideradas como significativo os resultados cujo  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Calibração

A curva de calibração com antígeno canino (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100; 0,1 mg) variou entre ponto 0 (solução salina 0,9%) até 10mg/L, com 6 pontos (0; 0,62mg/L; 1,25 mg/L; 2,5mg/L; 5,0 mg/L e 10,0 mg/L). Os resultados obtidos através da análise destas diferentes concentrações de cistatina C, resultou em uma curva de calibração que foi considerada adequada quando os valores medidos foram proporcionais à concentração conhecida do calibrador (Tab. 1 e Fig. 11).

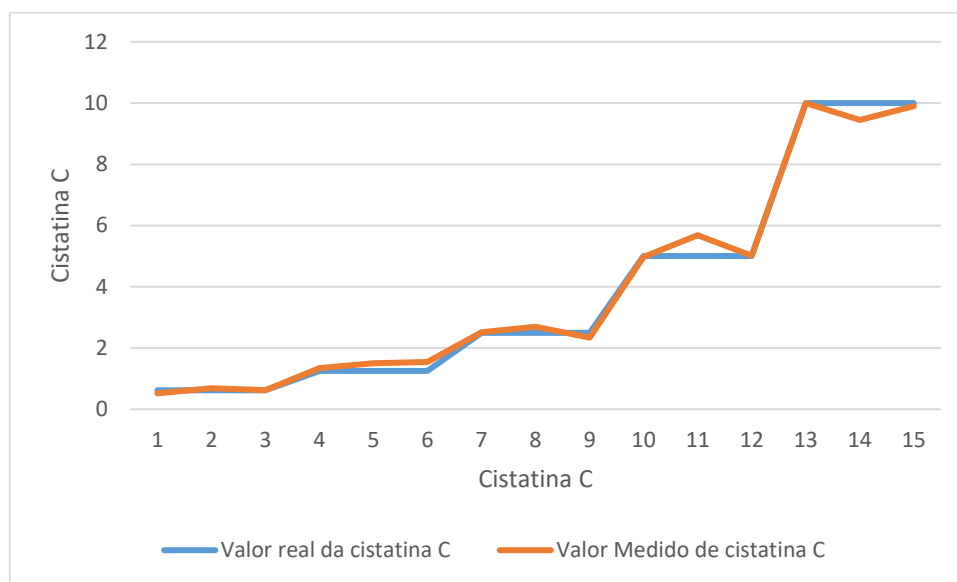


Figura 11. Relação entre os valores reais e os valores medidos da cistatina C canina purificada durante a calibração.

Tabela 1. Valores médios, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV) obtidos para calibração utilizando cistatina C canina purificada.

CISTATINA C CANINA PURIFICADA (mg/L)*			
Calibrador	Valor medido	Média ± s	CV (%)
0,62	0,52	0,61 ± 0,085	12
	0,69		
	0,62		
1,25	1,35	1,46 ± 0,10	6,8
	1,50		
	1,54		
2,5	2,52	2,51 ± 0,17	6,9
	2,69		
	2,34		
5,0	4,97	4,89 ± 0,18	3,7
	5,68		
	5,02		
10,0	10,0	9,78 ± 0,29	2,9
	9,45		
	9,90		

\*Cystatin C Canine E. coli; RD472009100, concentração de 0,1 mg/L

## 2. Precisão

A precisão intra ensaio (repetibilidade) do método imunoturbidimétrico para dosagem de cistatina C em cães foi avaliada através do cálculo da média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos em análises de duas amostras de soro refrigeradas: uma contendo alta concentração de cistatina C (5,69 mg/L) e outra baixa concentração (1,48 mg/L). Foram realizadas cinco dosagens em triplicata de cada amostra, no mesmo dia, no total de 30 dosagens não sendo admitido desvio superior a 15% (ANVISA, 2003 e INMETRO, 2007).

Para a amostra com valor alto de concentração da cistatina C, o coeficiente de variação foi de 5,3% e para a amostra com concentração baixa o coeficiente de variação foi de 8,5%. A tab. 2 sumariza os valores obtidos.

A precisão inter ensaio (reprodutibilidade) deste método foi avaliada através do cálculo da média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos nas amostras de soro refrigeradas contendo valores alto (5,69 mg/L) e baixo (1,48mg/L) de cistatina C canina, fazendo três dosagens em triplicada de cada amostra, em três dias diferentes no total de 18 dosagens. Para amostra de valor alto (5,69 mg/L) o coeficiente de variação foi de 3,7% e para amostra de valor baixo (1,48 mg/L) o CV foi de 7% (Tab.2).

Tabela 2. Valores médios seguidos do desvio padrão, da cistatina C sérica em amostras de soro canino com altas e baixas concentrações, utilizadas para avaliação da precisão intra e inter ensaios.

CISTATINA C CANINA (mg \L)				
	Precisão intra ensaio**		Precisão inter ensaio***	
	Alta Concentração	Baixa Concentração	Alta Concentração	Baixa Concentração
Amostras	5,69	1,48	5,69	1,48
Médias	5,13 ± 0,67	1,65 ± 0,25	5,53 ± 0,207	1,46 ± 0,104
CV*	5,3	8,5	3,7	7
N	15	15	9	9

\*CV= Coeficiente de variação; \*\* Análises realizadas em amostras 24 horas após coleta;

\*\*\* Análises realizadas em amostras com intervalos de 24, 72 horas e sete dias.

### 3. Recuperação

Observaram-se elevados níveis de recuperação, sendo que todas as dosagens apresentaram índices de acordo com a recomendação da ANVISA (2003), que estabelece a recuperação média de 100% ± 20% para cada concentração. A tab. 3 apresenta as concentrações iniciais e as obtidas em determinações em triplicata de duas concentrações diferentes (5,69 mg/L e 1,48 mg/L). Para obtenção do percentual de recuperação, calculou-se a razão entre a média dos resultados obtidos e a concentração teórica correspondente.

Tabela 3. Valores médios e porcentagem de cistatina C sérica recuperada, em amostras de soro canino com alta e baixa concentração, utilizadas para avaliação da recuperação.

CISTATINA C CANINA (mg /L)		
Concentração inicial (mg/L)	Média obtida (mg/L)	Taxa de Recuperação (%)
1,48	1,46	98
5,69	5,53	97

### 4. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido através de dosagens realizadas em amostra de soro padrão (Cystatin C Canine E. coli) diluída até a menor concentração de leitura (0,62 mg/L) de cistatina C canina. Em dosagens realizadas com diluições superiores observou-se imprecisão analítica, ou seja, coeficiente de variação acima dos 15% preconizados.

## 5. Efeito pró-zona

A verificação do efeito pró-zona, foi realizada com o aparelho calibrado para o valor máximo de leitura (10mg/L). Foram realizadas análises em triplicatas do soro padrão (Cystatin C Canine E. coli) com valores de cistatina C canina, contendo 10mg/L; 12 mg/L e 25 mg/L. Para as amostras com 10mg/L a leitura se mostrou exata. Concentrações superiores resultaram em leitura proporcional, superior a 10mg/L. Não houve efeito pró-zona em amostras contendo até 25mg/L de cistatina C canina.

## 6. Estabilidade das amostras

Verificou-se perda da estabilidade da cistatina C em amostras de soro canino, de acordo com a forma de armazenamento utilizada. Amostras conservadas a temperatura ambiente apresentaram perda de até 40%, em 12 horas, naquelas congeladas a -20° C, durante sete dias houve perda em torno 30% e a menor perda ocorreu em amostras refrigeradas durante sete dias, nas quais se observou redução de 15% na concentração sérica de cistatina C.

## 7. Intervalo de referência

Os intervalos de referências adotados neste estudo basearam-se nas mensurações de cistatina C sérica de 19 cães (nove machos e 10 fêmeas), de diferentes raças, com peso variando entre 1,9 a 33 Kg (média de 14 Kg) e idade entre 2 a 14 anos (média de cinco anos), considerado grupo controle.

Os valores séricos de creatinina variaram entre 0,38 mg /dl a 1,44 mg/dl, com média 0,82 mg/dl e SD 0,29 no grupo controle (Tab.4, Fig.12)

A distribuição da cistatina C no grupo controle está demonstrada na Tab. 4 e fig. 12. Não houve correlação entre creatinina e cistatina C sérica no grupo controle ( $p>0,05$ ).

A concentração de cistatina C variou de 0,63 a 1,19 mg/L (média de 0,93 mg/L e desvio padrão de 0,18). Para obter valores de referência, utilizou-se os quintis 0,025 e 0,0975, determinado como média  $\pm$  2 SD. Portanto, os valores de referência obtidos foram de 0,57 mg/L a 1,29 mg/L para cães hígidos (Tab.4).

Tabela 4. Valores médios, desvios padrão e correlação entre creatinina e cistatina C de cães do grupo controle e do grupo IRA.

GRUPOS	Creatinina (mg/dl)	Cistatina C (mg/L)	Correlação
Controle (n=19)	0,82 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	0,92 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	r = 0,14 ( $p>0,05$ )
IRA* (n=24)	3,98 $\pm$ 2,69 <sup>b</sup>	2,82 $\pm$ 1,46 <sup>c</sup>	r = 0,94 ( $p<0,0001$ )

\* Injúria renal aguda; valores com letra em diferentes apresentam diferença estaticamente significativa ( $p<0,05$ , Teste Kruskal Wallis. Valores de referência: creatinina sérica  $<1,6$  (mg /dl)

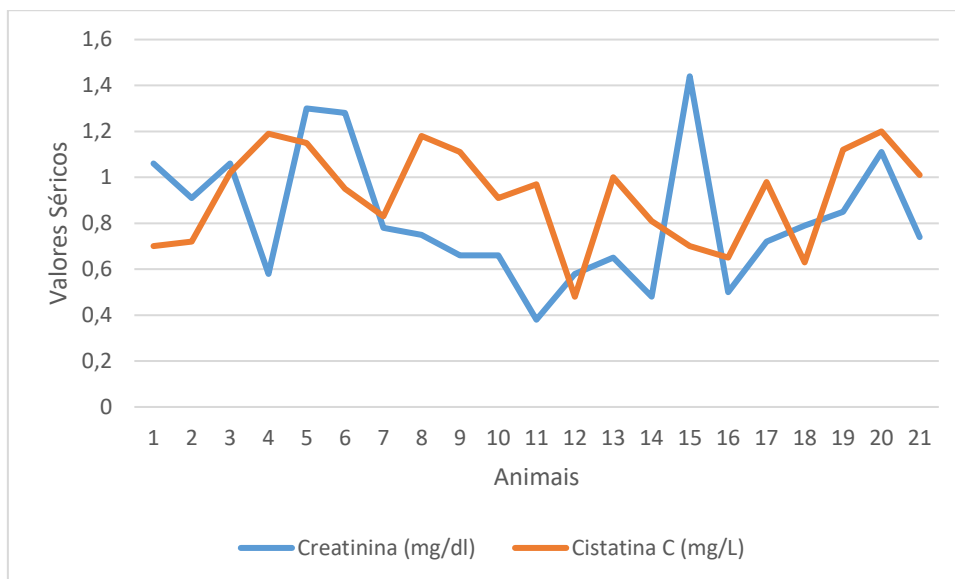


Figura 12. Valores das concentrações séricas de creatinina e cistatina C nos cães do grupo controle

Não houve correlação significativa entre os valores de cistatina C e sexo, idade nem peso, conforme resume a Tab. 5.

Tabela 5. Correlação entre cistatina C canina o peso corporal, idade e sexo dos animais grupo controle.

Correlação de Spearman		
	Cistatina C	p > 0,05
Peso	r = 0,26	0,2538
Idade	r = -0,07	0,7719
Sexo	r = 0,17	0,4484
Creatinina	r = 0,14	0,5579

#### 8. Correlação entre os valores de cistatina C e creatinina séricas no diagnóstico de ira

Os valores médios e desvios padrão de creatinina e de cistatina C foram respectivamente,  $3,98 \pm 2,69$  mg/L e  $2,82 \pm 1,46$  mg/L no grupo com IRA (tab. 4). Houve correlação forte e significativa entre a creatinina sérica e a cistatina C ( $r=0,94$ ) nos animais com IRA.

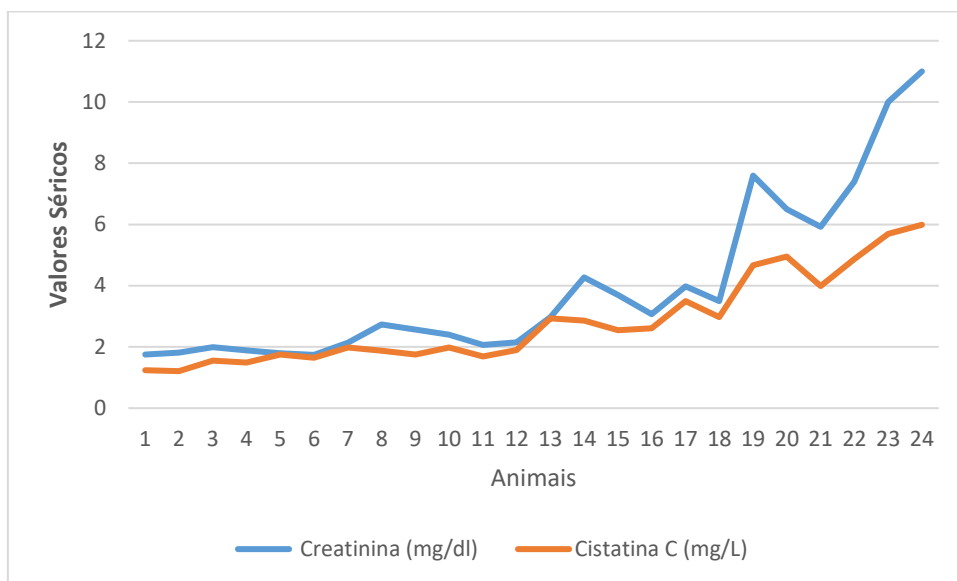


Figura 13. Valores séricos de creatinina (mg/dl) e cistatina C (mg/L) de cães com Injúria Renal Aguda.

#### 9. Desempenho da cistatina C como biomarcador de injúria renal em animais com diferentes graus de IRA

Os valores médios de creatinina e de cistatina C entre os diferentes grupos avaliados encontram-se na tab. 6. No grupo controle (n=19) a média de creatinina foi de  $0,82 \pm 0,29$  mg/dl, no G1,  $2,4 \pm 0,40$  mg/dl, no G2,  $3,7 \pm 0,45$  mg/dl e no G3,  $8,1 \pm 2,0$  mg/dl. Os valores de cistatina C foram  $0,92 \pm 0,18$  mg/L,  $1,76 \pm 0,42$  mg/L,  $2,99 \pm 0,43$  mg/L e  $5,02 \pm 0,72$  mg/L, respectivamente (Tab. 6).

Ambos os marcadores apresentaram valores médios superiores aos de referência, independentemente do grau de disfunção renal (Tab. 6).

Tabela 6. Valores médios e desvios padrão de creatinina e cistatina C séricas de cães saudáveis e com injúria renal aguda.

GRUPOS (n)	Creatinina (mg/dl)	Cistatina C (mg/L)
Controle (19)	$0,82 \pm 0,29^{aD}$	$0,92 \pm 0,18^{aD}$
IRA G1(13)	$2,4 \pm 0,40^{aC}$	$1,76 \pm 0,42^{aC}$
IRA G2 (5)	$3,7 \pm 0,45^{aB}$	$2,99 \pm 0,43^{aB}$
IRA G3 (6)	$8,1 \pm 2,0^{aA}$	$5,02 \pm 0,72^{aA}$

Letras maiúsculas comparam colunas e letras minúsculas comparam linhas. Valores com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). G1- creatinina entre 1,7 e 3,0 mg/dl; G 2- creatinina entre 3,1 e 5,0 mg/dl e G3- creatinina maior que 5,0mg/dl. Valor de referência da creatinina  $< 1,6$  mg/dl e cistatina C  $< 1,29$  mg/L

## DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliou-se a técnica de dosagem de cistatina C através do método imunoturbidimétrico para utilização em cães, além de estabelecer valores de normalidade para animais saudáveis e sua correlação com a creatinina sérica em cães com diferentes graus de injúria renal aguda (IRA). Este trabalho contribui para fundamentar novas propostas à rotina de diagnóstico de animais com suspeita de disfunção renal aguda e também para redução da lacuna hoje existente na literatura sobre este assunto no Brasil.

Diversos estudos em humanos têm sugerido que a cistatina C seja um marcador de disfunção renal superior a creatinina sérica (Martinez e Simon, 2003; Magro, 2007; Acuna *et al.*, 2009). Outros, entretanto, não evidenciaram diferenças significativas entre estes dois biomarcadores (Kresier, 2002; Medeiros, 2007; Neri, 2007). Também, estudos conduzidos em veterinária apresentam resultados diversos e sinalizam a necessidade de trabalhos adicionais para avaliar o desempenho, limitações e situações em que está de fato indicada a aplicação da dosagem sérica de cistatina C (Almy *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2002; Antagoni *et al.*, 2005; Scally *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2007; Wehner *et al.*, 2008; Monti *et al.* 2011, Waki, 2013; Rodrigues, 2016).

Ensaio imunoturbidimétrico automatizado são considerados métodos rápidos, específicos e precisos, requisitos importantes na rotina laboratorial, uma vez que permitem rapidez na liberação de resultados contribuindo para tomada de decisão rápida na prática clínica (Hermes, 2000; Silva, 2003; Bochenek, 2000; Neri, 2007; Krimer, 2011). Neste estudo, realizou-se a padronização da técnica imunoturbidimétrica para dosagem de cistatina C canina com resultados satisfatórios. Corroborando assim, estudos veterinários anteriores que utilizaram esta e outras técnicas (Jensen *et al.*, 2001; Wehner, *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009; Monti *et al.*, 2011). Validar métodos analíticos nas condições de cada laboratório antes de implantá-los em sua rotina, bem como quando há necessidade de adaptá-la às espécies diferentes, garante a uniformidade dos resultados, sendo, portanto, preconizado pelas normas nacionais e internacionais de sistemas de qualidade (ANVISA, 2003, Neri, 2007).

Segundo Hillstrom *et al.* (2014) quando se utiliza *kit* humano para dosagem em outras espécies, utilização de um calibrador espécie específico purificado pode melhorar o desempenho do método, porém a reação cruzada com outros anticorpos permanece imprevisível. Neste caso, o uso de *kit* espécie específico é o ideal, entretanto nem sempre estes se encontram disponíveis. Dessa forma, a utilização de métodos humanos pode ser adaptada, ajustada ou validada para outras espécies, como foi realizado no presente experimento.

A cistatina C em cães, utilizando-se *kits* imunoturbidimétrico com anticorpo humano baseia-se no grau de homologia entre a sequência de aminoácidos da cistatina C humana e canina, a que varia de 46 a 79% (Poulik *et al.*, 1981). Entretanto pode acarretar em diferentes respostas dependendo da imunogenicidade e antigenicidade destas proteínas, tornando assim mais evidente, a necessidade de demonstrar esta especificidade (Monti *et al.*, 2012; Miyagawa *et al.*, 2009; Ghys *et al.*, 2014). Para assegurar a interação entre o anticorpo anti-cistatina C humana e a cistatina C canina, optou-se pela calibração do aparelho com a cistatina C canina purificada (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100; 0,1mg). Este procedimento se justifica também pelo fato de que o aparelho utiliza diferentes absorvâncias de acordo com o antígeno utilizado. Embora haja interação entre o anticorpo humano e antígeno canino, alguns os autores consideraram como desvantagem a não utilização da cistatina C canina para acessar a recuperação analítica, pois pode resultar em resultado falso negativo (Almy *et al.*, 2002; Miyagawa *et al.*, 2009).

Os valores obtidos neste trabalho geraram uma calibração adequada, com coeficiente de variação entre 2,9% a 12%, o que indica baixa dispersão dos dados.

Foi determinada a precisão intra ensaio (repetibilidade) que é a concordância dos resultados dentro de 24 horas, com mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão inter ensaio (reprodutibilidade) que é a concordância dos resultados do mesmo laboratório realizada em dias diferentes por no mínimo dois dias (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Os níveis de precisão intra e interensaio compatíveis com dados encontrados na literatura e naqueles descritos pelo fabricante do conjunto diagnóstico, com coeficiente de variação entre 5,3 a 8,5% para precisão intra ensaio e de 3,7 a 7% para precisão inter ensaio, não sendo observado nenhum valor zero conforme encontrado por Braun *et al.* (2002) ao validar a mesma técnica. Tal variação foi variação superior as mostradas em trabalhos anteriores (Jensen *et al.*, 2001; Almy *et al.*, 2002; Whener *et al.*, 2008), contudo, se mantiveram inferiores a 15%, compatível com a preconizada para validação (ANVISA, 2003 e INMETRO, 2007). Esta diferença pode ser justificada pela utilização de diferentes *kits* que podem apresentar diferenças na imunogenicidade da proteína utilizada, bem como variações de equipamentos.

Observou-se correspondência entre os valores medidos e os presentes nas amostras com concentrações decrescentes de cistatina C canina. Esses achados estão em conformidade aos exigidos para validação de métodos e a determinação da linearidade, e aos encontrados por Monti *et al.*, (2011); Jensen *et al.* (2001) e Wehner *et al.*, (2008) ao avaliarem este método, o que indica que a técnica imunoturbidimétrica mede a cistatina C canina de maneira proporcional.

A concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico, definida como exatidão, calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito foi considerada satisfatória, apresentando índices de recuperação de 97%, valores considerados acurados segundo a literatura consultada (ANVISA, 2003 e INMETRO, 2007).

Amostras com valores inferiores a 0,62 mg/L apresentam grande coeficiente de variação entre as medidas, ou seja, alta dispersão de valores, não apresentando, portanto, resultados confiáveis. Estudos anteriores, também observaram maior imprecisão em amostras contendo baixas concentrações de cistatina C sérica (Jensen *et al.*, 2001). Dessa forma considera-se que o limite inferior de detecção de cistatina C canina seja 0,62 mg/L.

Para avaliação do efeito pró-zona foram avaliadas amostras com concentrações superiores a 10mg/L (12,5 e 25 mg/L) de cistatina C. Leituras foram obtidas em amostras até a concentração 25 mg/L, sem redução da absorbância ou resultado falsamente diminuído do analito. Achado que seria considerado efeito pró-zona por Hermes (2000). Dessa forma, pode-se dizer que não há efeito pró-zona nas amostras com concentração até 25mg/L de cistatina C canina. Apesar de se considerar improvável a existência de amostras com valores tão altos, este achado permite tranquilidade a cerca de avaliações de amostras com prováveis valores elevados.

Conhecer a estabilidade das amostras em diferentes condições de armazenamento pode ser útil em diversas situações, como por exemplo, reteste, impedimento técnico e estudos clínicos retrospectivos (Neri, 2007). Entretanto, estudos sobre a estabilidade das amostras, não têm sido realizados. Tal fato pode ser justificado uma vez que a recomendação da utilização da cistatina C é para o diagnóstico de IRA e DRC em amostras frescas. Estudos anteriores realizados em cães utilizaram amostras em diferentes formas de armazenamento, congeladas a  $-20^{\circ}$  e  $-55^{\circ}$  graus e até  $-80^{\circ}$  por mais de 9 meses. Todos estes trabalhos consideraram as amostras aceitáveis para análise, entretanto, estes autores não realizaram a comparação entre tempos e temperatura e a porcentagem de recuperação das mesmas em relação a concentração inicial (Jensen *et al.*, 2001; Almy *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2002; Antognoni *et al.*, 2005; Pagitz *et al.*, 2007; Miyagawa *et al.*, 2009).



No presente estudo, para análise da estabilidade, utilizaram-se alíquotas a temperatura ambiente, refrigeradas e congeladas. Observou-se que a refrigeração foi o melhor método de conservação, uma vez que houve redução de apenas 15% da concentração inicial. Já para amostras mantidas à temperatura ambiente por 12 horas e congeladas durante sete dias, a redução foi de 40% e 30%, respectivamente. Portanto, não houve perda significativa da imunorreatividade ou degradação importante, durante a estocagem sob-refrigeração em período de sete dias, corroborando os dados relatados por Neri (2007). Já amostras congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou mantidas a temperatura ambiente por tempo igual ou superior a 12 horas não devem ser utilizadas para dosagem de cistatina C canina.

A literatura consultada apresenta grande variação de valores de referência, justificada pelos diferentes tipos de reagentes e métodos. Nota-se valores médios variando entre 0,18 a 1,60 mg/L através do ensaio imunoturbidimétrico (Jensen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Almy *et al.*, 2002; Pagitz *et al.*, 2007; Wehner *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2012). Os resultados deste estudo foram semelhantes aos citados acima, e valor de referência obtido foi de 0,57 mg/L a 1,29 mg/L, observou-se também que a distribuição da cistatina C seguiu a curva Gaussiana e, portanto, a probabilidade de a população avaliada apresentar valores dentro deste intervalo é de 95%. Entretanto, de acordo com Uzum *et al.* (2005) para se determinar os valores de referências para cistatina C devem ser realizados estudos com maior número de indivíduos, em diferentes regiões utilizando o mesmo procedimento analítico. Baseado nisto e, devido aos diferentes métodos analíticos, calibração, antissoros e distribuição de idades ficam difíceis fazer comparações entre os resultados de diferentes estudos, o que demonstra a importância de padronizar pesquisas recentes tanto em Medicina quanto em Veterinária (Prates, 2007; Miyagawa *et al.*, 2009). Rigalleau *et al.* (2008) verificaram a necessidade de normalização dos valores de referências para que a cistatina C seja usada na prática clínica, e Salgado *et al.* (2010) observaram que a variação destes valores é uma grande desvantagem para sua utilização na rotina, observação está também válida para Veterinária.

Acredita-se que a principal vantagem da cistatina C em relação à creatinina é de não ser dependente da massa muscular corporal e que por isso, a perda muscular decorrente de paralisias, imobilidade, anorexia, má-nutrição e envelhecimento não afetam seus valores na avaliação da função renal, além de alterar-se pouco com a idade, sexo ou alimentação (Martins *et al.*, 2003; Grubb, 2011). Os dados obtidos nesse estudo estão de acordo com a literatura pois, não houve correlação significativa entre a cistatina C, idade, sexo e peso dos animais avaliados (tab. 5). Vale ressaltar que o número de animais utilizados neste estudo foi menor do que outros consultados na literatura. Outra consideração é que Braun *et al.* (2002) ao avaliarem 179 cães divididos em 89 filhotes (<1 ano), 39 adultos (1-8 anos) e 51 idosos (8-16 anos), apesar de encontrarem valores de cistatina C menores nos cães adultos jovens e de meia idade, do que em filhotes e idosos e também uma sobreposição de resultados entre as diferentes idades avaliadas, consideraram que a diferença foi moderada o que permite o uso do mesmo valor de referência independentemente da idade. Miyagawa *et al.* (2009) verificaram que animais com menos de 5Kg apresentaram valores menores do que cães com peso superior a 5Kg e, para Monti *et al.* (2011) houve aumento dos valores com o aumento da idade. Dessa forma, Ghys *et al.* (2014) apontam a necessidade de estudos adicionais incluindo maior número de animais, devido aos resultados contraditórios encontrados na literatura.

Para avaliar o desempenho da cistatina C em diferentes graus de disfunção renal, os animais com IRA foram divididos em três grupos: grupo 1 (n=13) e creatinina sérica de 1,7 a 3,0 mg/dl, grupo 2 (n=5) e creatinina sérica de 3,1 a 5,0 mg/dl e grupo 3 (n=6) e creatinina sérica > 5,0 mg/dl (Tab. 6). Como era de se esperar, todos apresentaram concentração plasmática de creatinina acima dos valores de referência, devido à diminuição da TFG (Lefebvre, 2011). Observaram-se valores séricos de cistatina C significativamente maiores nos cães com disfunção renal (tab. 6). Além disso, houve correlação forte e significativa ambos analitos nesta condição ( $r=0,94$ ),

(Fig.13), portanto, confirma-se que em cães, assim como em humanos, a cistatina C é um bom marcador de TFG em pacientes com injúria renal aguda estabelecida, o que vai de encontro aos achados de estudos anteriores utilizando cães com doença renal crônica (Braun *et al.*, 2002; Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009; Monti *et al.*, 2011). Entretanto, contrapõe os resultados encontrados por Almy *et al.* (2002) que concluíram que este biomarcador não apresenta sensibilidade para o diagnóstico de IRA em cães, pois em seu estudo, apenas um cão com IRA apresentou valor de cistatina C acima da referência. Contudo, precisa ser considerado que o modelo experimental utilizado por estes autores não reflete exatamente quadro de IRA.

A divisão dos animais com injúria renal aguda em grupos demonstrou o bom desempenho da cistatina C em cães com diferentes graus de lesão renal (Tab. 6 e Fig. 13). Porém, a análise individualizada dos animais demonstrou menor sensibilidade deste biomarcador para detectar lesão renal em animais com perda leve de função renal, evidenciando que dois animais do grupo G1 ainda apresentavam valores de cistatina C dentro dos limites de referência (< 1,29 mg/L), apesar de injúria renal, detectada pela creatinina sérica (1,7 a 3,0 mg/dl). Este fato sugere menor sensibilidade deste biomarcador quando comparada a creatinina sérica para avaliar animais com IRA em fase inicial, entretanto, apresentando especificidade semelhantes para ambos analitos, o que vai de encontro ao estudo realizado por Almy *et al.* (2002) e Antagoni *et al.* (2005). Entretanto, como no presente estudo não realizada comparação entre os marcadores utilizados (Cistatina C e creatinina séricas) com a mensuração da taxa de filtração glomerular, não podemos afirmar a inferioridade da cistatina C. Os resultados controversos apresentados pela literatura e a menor sensibilidade da cistatina C em cães com perda discreta de função renal, refletem a necessidade da avaliação do uso deste biomarcador em cães com IRA, pois a maioria dos dados da literatura refere-se a animais com doença renal crônica onde foi realizada uma análise pontual. Portanto, estudos adicionais para determinar o papel da cistatina C neste cenário clínico, são necessários.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi realizado, pode-se concluir que:

A técnica imunoturbidimétrica utilizando anticorpo humano é eficiente para dosagem de cistatina C canina, desde que a mesma seja calibrada com a cistatina C canina purificada.

Este procedimento mostrou que este método atende os critérios preconizados para validação de métodos laboratoriais, apresentando precisão e exatidão/recuperação adequadas, portanto, sua implantação na rotina laboratorial é factível.

A melhor forma para armazenamento das amostras até análise é a refrigeração.

Os resultados também demonstraram que a cistatina C é um marcador confiável de disfunção renal aguda em cães, sem influência de sexo, idade e peso, além de apresentar correlação forte e significativa com a creatinina sérica, podendo ser alternativa confiável para diagnóstico e acompanhamento destes animais.

## ARTIGO II

# CISTATINA C NA INJÚRIA RENAL AGUDA: DIAGNÓSTICO EM CÃES CRITICAMENTE ENFERMOS EM UTI

## INTRODUÇÃO

A injúria renal aguda (IRA) é uma doença multifatorial, extremamente frequente em unidades de terapia intensiva (UTI), que complica várias condições clínico-cirúrgicas, além de estar associada à elevada taxa de morbimortalidade (Costa *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2010; Mehta *et al.*, 2011; Mugford *et al.*, 2013). Entretanto, seus efeitos podem ser minimizados quando diagnosticada e tratada precoce e adequadamente. A medida da taxa de filtração glomerular (TFG) é considerada “teste ouro” para avaliar a função renal, entretanto, é um método trabalhoso e de difícil execução nesse cenário clínico (Linnetz e Graves, 2010; Gabriel *et al.*, 2011; Silva e Brune, 2011). Classicamente, os biomarcadores utilizados para o diagnóstico de IRA (ureia e creatinina séricas), são marcadores funcionais e não refletem diretamente a lesão celular. Por isso, são considerados pouco sensíveis e inespecíficos para detecção de perda discreta da função renal e limitam a intervenção em tempo hábil (Bellomo *et al.*, 2004; Lees, 2004; Grauer, 2005; Lunn, 2011; Martensson *et al.*, 2012; Palm, 2012).

A inabilidade clínica caracterizada pela ausência de métodos diagnósticos capazes de sinalizar a instalação da IRA têm estimulado esforços para identificar e implantar o uso de marcadores mais sensíveis (Bellomo *et al.*, 2004; Coca *et al.*, 2008). Neste contexto, nos últimos anos vários biomarcadores têm sido estudados, dentre estes, destaca-se a cistatina C, uma proteína de baixo peso molecular que apresenta boa correlação com a taxa de filtração glomerular (TFG) e com um desempenho superior à creatinina sérica, por ser menos influenciada por fatores extrarrenais. Portanto, apresenta-se como candidato promissor para conceituar e definir a lesão renal aguda em substituição ou adição aos parâmetros atualmente utilizados (Myagawa *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2014; Shoukath e Patil, 2014; Cortellini *et al.*, 2015).

O objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho da cistatina C sérica comparando-a com a creatinina sérica para diagnóstico da injúria renal aguda em cães criticamente enfermos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 47 cães de diferentes sexos, idades e raças. Estes foram divididos em dois grupos, sendo o controle GC (n=19) constituído de animais hígidos e grupo UTI (n=28) com cães criticamente enfermos admitidos na UTI do Hospital Veterinário da UFMG, no período de janeiro a junho de 2016. Neste grupo os animais apresentaram valores séricos de creatinina inferior a 1,6 mg /dl. Animais azotêmicos, creatinina sérica > 1,6mg dl ou portadores de doença renal crônica (DRC) na admissão na UTI foram excluídos deste trabalho.

Nos animais do grupo UTI, foi coletado sangue para análise de creatinina sérica (método enzimático) e dosagem de cistatina C sérica. Esta última foi medida utilizando o método imunoturbidimétrico (Cistatina C turbiquet Plus Labtest®), calibrado com cistatina C canina purificada (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100)<sup>3</sup>.

Todas as análises foram realizadas no aparelho COBAS MIRA PLUS (Roche®) locado no Laboratório de Patologia Clínica do HV/UFMG.

---

<sup>3</sup> BioVendor Researchs and Diagnostic products.

Realizou-se a monitoração diária da função renal nos animais do grupo UTI, através dos valores séricos de creatinina e cistatina C, os quais foram acompanhados durante no mínimo 48 horas totalizando três coletas. O primeiro valor obtido quando na entrada do UTI foi considerado valor basal de cada paciente.

A concentração da creatinina sérica foi considerada o “padrão ouro” para caracterização da função renal normal (<1,6mg/dl) ou alterada (> 1,6mg/dl) e para orientar a análise do comportamento da cistatina C canina, valores estes estabelecidos de acordo com o critério IRIS (2013)

O valor de referência para cistatina C utilizado foi de 0,57 a 1,29 mg/L o qual foi obtido após análise de sua concentração sérica em 19 animais clinicamente hígidos (Grupo controle), sem alterações laboratoriais compatíveis com disfunção renal e com valores séricos de creatinina dentro da normalidade (0,5 a 1,6 mg/dl), de acordo com a literatura.

## RESULTADOS

O grupo controle foi composto por 47,3 % (9/19) machos e 52,7% (10/19) fêmeas. No grupo UTI a composição foi de 42,9% (12/28) machos e 57,1% (16/28) fêmeas. Quanto à idade, a média foi de  $5 \pm 2,96$  e  $7,9 \pm 4,14$  anos com variação de 2 a 14 e 2 a 16 anos nos grupos controle e UTI respectivamente. Os cães grupo controle pesavam em média  $14,07 \pm 9,69$  (1,9 a 33) Kg e os do UTI pesavam entre  $12,57 \pm 11,07$  (2 a 40) kg (Tab. 7).

Tabela 7. Frequências absolutas e relativas, médias e desvio padrão das características demográficas (sexo, peso e idade), dos cães clinicamente hígidos (GC) e admitidos na unidade de terapia intensiva (UTI) do HV-UFMG entre os meses de janeiro a junho de 2016.

GRUPOS	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)
GC	47,3% (9/19) machos	$5 \pm 2,96$ (2 a 14)	$14,07 \pm 9,69$ (1,9 a 33)
	52,7% (10/19) fêmeas		
UTI	42,9% (12/28) machos	$7,9 \pm 4,14$ (2 a 16)	$12,57 \pm 11,07$ (2 a 40)
	57,1% (16/28) fêmeas		

As avaliações laboratoriais constaram de dosagens de creatinina e de cistatina C séricas, sendo que a primeira foi considerada como o padrão ouro para diagnóstico de injúria renal aguda. A tabela 8 resume os resultados obtidos. Cães saudáveis apresentaram valores médios de  $0,82 \pm 0,29$ mg/dl e  $0,93 \pm 0,18$  mg/L de creatinina e cistatina C, respectivamente. Entre os animais admitidos na UTI, as médias observadas foram de  $1,04 \pm 0,65$ mg/dl e  $1,28 \pm 0,35$ mg/L para os analitos avaliados respectivamente.

Nos animais do grupo controle, os valores séricos de creatinina e cistatina C não apresentaram diferença estatística e nem correlação ( $r=0,14$ ). Já no grupo UTI, observaram-se valores significativamente maiores de cistatina C e correlação moderada ( $r=0,44$ ) e significativa ( $p=0,0001$ ) entre está e creatinina (Tab.8).

Na comparação entre os grupos, para os analitos isoladamente, observou-se que não houve diferença significativa entre os valores séricos de creatinina, mas que os valores de cistatina C foram significativamente maiores no grupo de animais de UTI (Tab. 8).

Para a creatinina, admitiu-se como valor de corte 1,6mg/dl, de acordo com a literatura (IRIS, 2013). Baseando-se nos valores séricos de cistatina C, obtidos a partir da análise de amostras de 19 cães do grupo controle, estabeleceu-se o valor de 1,29mg/L para corte, considerando a média e a variação para mais ou menos dois desvios padrão (Tab. 8).

Tabela 8. Concentrações médias e desvios padrão da creatinina e cistatina C séricas de cães saudáveis e admitidos no UTI do HV-UFGM.

	Creatinina (mg/dl)	Cistatina C (mg/L)	Correlação
Controle	0,82±0,29 <sup>Aa</sup>	0,93±0,18 <sup>Aa</sup>	r= 0,14 (p>0,56)
UTI	1,04±0,65 <sup>Aa</sup>	1,28±0,35 <sup>Ba</sup>	r= 0,44 (p=0,0001)

\* Para letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não há diferença estatística significativa (p>0,05).

Após estabelecer os valores de referência de cistatina C sérica em cães hígidos, foram avaliados 28 cães gravemente enfermos internados na UTI do Hospital Veterinário/UFGM, durante os meses de janeiro a junho de 2016. Para verificar seu desempenho na detecção precoce de injúria renal aguda avaliaram-se as concentrações séricas deste analito e da creatinina em diferentes tempos, conforme demonstram a Tab. 9. Embora tenha havido variação discreta dos valores séricos de ambos os analitos, não houve diferença significativa, quando se comparou a média dos três tempos analisados (Tab. 9). Contudo, a análise dos valores individuais comparadas ao valor de referência demonstrou variação precoce, indicando alteração da função da renal. Esse comportamento foi diferente entre os dois biomarcadores (Tab.11).

A análise da creatinina não foi eficiente para diagnosticar lesão renal em nenhum animal no tempo inicial (admissão na UTI), enquanto a avaliação da cistatina C aponta para injúria renal em 32,1% (9/28) dos animais. Após 48 horas, houve azotemia discreta em 25% (7/28) dos cães evidenciada pela creatinina e em 47,4% (9/19) evidenciada pela cistatina C. Finalmente, no tempo de 72h, houve redução do número de animais avaliados, por limitação de colheita da amostra. Contudo, foram avaliados 16 animais. Neste tempo, observou-se que a creatinina detectou um e a cistatina C quatro novos casos entre os onze cães que ainda permaneciam sem lesão renal (Tab. 9 e 10).

Tabela 9. Concentrações médias e desvios padrão nos tempos 24, 48 e 72h da creatinina e cistatina C séricas durante a permanência dos cães na UTI do HV-UFGM.

Tempo (h)	Creatinina (mg/dl)	Cistatina C (mg/L)	n
24	0,96±0,37 <sup>Aa</sup>	1,21±0,21 <sup>Aa</sup>	28
48	1,23±0,86 <sup>Aa</sup>	1,37±0,49 <sup>Aa</sup>	28
72	0,89±0,59 <sup>Aa</sup>	1,25±0,26 <sup>Aa</sup>	16

\* Para letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não há diferença estatística significativa (p>0,05).

Para comparar o desempenho dos biomarcadores no monitoramento longitudinal da lesão renal, consideraram-se apenas os cães que apresentavam dosagens nos três tempos avaliados. Pode-se observar o comportamento diferenciado da cistatina C, com desempenho superior, uma vez que detectou maior número de indivíduos e mais precocemente, além de permitir acompanhar a evolução do quadro clínico (Tab. 10 e 11).

Tabela 10. Percentual de detecção injúria renal aguda pelos biomarcadores, creatinina e cistatina C séricas, em cães durante a permanência na UTI do HV-UFMG

Referência	CREATININA		CISTATINA C	
Normal*	71,4%	(20/28)	21,4%	(6/28)
Aumentada	28,5%	(8/28)	78,6%	(22/28)
24 horas	0,0%	(0/28)	32,1%	(9/28)
48 horas	25,0%	(7/28)	47,4%	(9/19)
72 horas	4,7%	(1/21)	40,0%	(4/10)

\* Valores normais de creatinina  $\leq 1,6$ mg/dl e de cistatina C  $< 1,29$  mg/L.

Tabela 11. Concentração de cistatina C e creatinina séricas individuais dos cães às 24, 48 e 72 horas após admissão na UTI do HV – UFMG.

ANIMAL	CISTATINA C (mg/L)			CREATININA (mg/dl)		
	Tempo (Horas)			Tempo (Horas)		
	24	48	72	24	48	72
1	1,27	<b>1,32</b>	-	1,08	1,20	-
2	1,23	1,28	1,04	1,11	1,44	0,72
3	0,95	0,99	0,92	0,79	0,71	0,51
4	<b>1,51</b>	0,96	1,03	0,41	0,96	0,6
5	1,11	1,29	<b>1,33</b>	0,54	0,94	<b>1,82</b>
6	<b>1,42</b>	1,28	1,24	1,20	0,75	0,77
7	1,19	1,09	1,20	1,18	0,81	0,90
8	<b>1,42</b>	<b>1,48</b>	-	1,43	1,52	-
9	<b>1,38</b>	<b>1,71</b>	<b>1,46</b>	1,09	<b>2,41</b>	1,60
10	<b>1,60</b>	1,28	-	0,89	0,98	-
11	1,10	<b>3,61</b>	0,71	0,56	0,12	0,25
12	0,84	0,80	<b>1,33</b>	0,94	0,51	0,83
13	<b>1,52</b>	<b>1,69</b>	<b>1,85</b>	1,40	<b>2,06</b>	<b>1,98</b>
14	1,19	<b>1,37</b>	<b>1,42</b>	0,57	0,58	0,94
15	1,16	<b>1,30</b>	-	0,29	1,09	-
16	<b>1,40</b>	<b>1,34</b>	-	1,35	<b>1,70</b>	-
17	1,18	1,28	-	0,55	0,98	-
18	<b>1,33</b>	<b>1,43</b>	-	1,57	<b>3,38</b>	-
19	1,10	1,24	-	1,05	0,71	-
20	<b>1,39</b>	<b>1,42</b>	-	1,44	<b>1,93</b>	-
21	0,98	<b>1,35</b>	1,10	0,55	0,13	0,45
22	1,11	1,27	<b>1,32</b>	0,61	0,25	0,20
23	1,24	1,22	-	1,38	0,94	-
24	1,22	<b>1,31</b>	-	1,28	1,40	-
25	1,28	<b>1,40</b>	-	1,38	<b>1,77</b>	-
26	0,98	<b>1,38</b>	<b>1,45</b>	0,65	0,45	0,35
27	0,75	0,77	<b>1,39</b>	0,89	1,04	0,46
28	0,95	<b>1,55</b>	<b>1,35</b>	0,59	<b>3,60</b>	<b>1,77</b>

- Indica não mensuração. \* Valores de referência: creatinina sérica  $< 1,6$ mg/dl e cistatina C sérica  $< 1,29$  mg/L

## DISCUSSÃO

As condições clínicas dos animais criticamente enfermos os quais se apresentam hemodinamicamente instáveis e com perfil de elevada gravidade, não permitiram abordagem inicial idêntica entre os animais. Enfatizando assim a necessidade de utilização de métodos auxiliares de diagnóstico, uma vez que nestes pacientes existe a necessidade de exames rápidos que auxiliem na conduta clínica dos mesmos, pois fatores citados acima dificultam avaliação clínica adequada (Byrne e Hwang, 2011).

A metodologia permitiu a observação de diferenças do desempenho entre os biomarcadores avaliados. O monitoramento longitudinal da cistatina C comparada à creatinina em cães criticamente enfermos não foi descrito anteriormente na literatura. Porém, a avaliação pontual da cistatina C em animais com doença renal crônica (DRC) apresenta relatos (Antagoni *et al.*, 2007; Whener *et al.*, 2008; Myagawa *et al.*, 2009).

Diversos estudos em medicina têm sugerido que a cistatina C como marcador de disfunção renal superior à creatinina sérica (Martinez e Simon, 2003; Magro, 2007; Acuna *et al.*, 2009; Alcivar *et al.*, 2010; Nejat *et al.*, 2010; Gabriel *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2013; Shoukath *et al.*, 2014). Outros, entretanto, não evidenciaram diferenças significativas entre os dois (Chantrel, 2000; Kresier, 2002; Medeiros, 2007; Neri, 2007; Perianyagam *et al.*, 2009; Spahillari, 2012; Hamed *et al.*, 2013). Em veterinária, os estudos também apresentam resultados diversos e poucos avaliaram cães com IRA, fato que sinaliza a necessidade de trabalhos adicionais para avaliar o desempenho, limitações e situações nas quais a dosagem da cistatina C realmente é indicada (Almy *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2002; Antagoni *et al.*, 2005; Scally *et al.*, 2006; Wehner *et al.*, 2008; Myagawa *et al.*, 2009; Monti *et al.*, 2012; Waki, 2013; Rodrigues, 2016).

Nesse estudo utilizou-se o ensaio imunoturbidimétrico humano, devidamente calibrado com a cistatina C canina purificada (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100; 0,1mg) para aumentar a acurácia da técnica (Oliveira e Mendes, 2010; Killen *et al.*, 2014). Esse cuidado está referendado por Almy *et al.* (2002) e Miyagawa *et al.* (2009) que consideraram desvantagem a não utilização da cistatina C canina na recuperação analítica do método. Todos os procedimentos de validação da técnica seguiram os protocolos da ANVISA (2003) e INMETRO (2007), atendendo às normas estabelecidas.

De acordo com trabalhos realizados em cães a fim de se estabelecer valores de referência, observa-se uma grande variação dos mesmos, atribuída a diferentes tipos de reagentes e aparelhos utilizados. Contudo, de acordo com os mesmos, cães hígdos podem apresentar valores de referência de cistatina C sérica entre 0,18-1,60mg/L (Jensen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Almy *et al.*, 2002; Pagitz *et al.*, 2007; Wehner *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2012) pelo método imunoturbidimétrico. Nesse estudo, os valores de referência foram semelhantes aos supracitados, diferenças mínimas de valores podem ser justificadas pela utilização de diferentes *kits* utilizados entre os estudos. A concentração de cistatina C em cães hígdos variou de 0,63 a 1,19mg/L (média de 0,93 e desvio padrão de  $\pm 0,18$ ). O quintil 0,025 e 0,0975 (determinado como  $\text{media} \pm 2 \text{SD}$ ) foi de 0,57mg/L e 1,29mg/L, respectivamente, indicando, portanto, este intervalo como referência (Tab. 8).

Uma das principais características de um biomarcador é que sofra pouca influência de fatores extrarenais. Nesse sentido, neste estudo, observou-se que não houve correlação entre sexo, idade, peso com as concentrações medidas de cistatina C nos cães do grupo controle (Tab.5, ArtigoI). Portanto, pode-se utilizar faixa única de referência independente destas variáveis. Esses resultados são observados em humanos (Martinez e Simon, 2003; Grubb, 2011), assim como em cães (Braun *et al.*, 2002; Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009). Esses dados indicam nítida vantagem deste biomarcador quando comparado a creatinina, que é fortemente

influenciada pelos fatores mencionados (Lees 2004; Grauer, 2005; Heine e Lefebvre, 2007; Lefebvre, 2011).

As características clínicas e demográficas dos pacientes neste estudo (tab.7), apresentaram similaridade com as da amostra avaliada por Lee *et al.*, (2011) no cenário de terapia intensiva. Ambos os estudos demonstram a inexistência de relação entre as características individuais (sexo, idade, raça) e o desenvolvimento de injúria renal aguda.

A maioria dos cães (67,8%), utilizados nesse estudo, era jovem e adulta (< 10 anos). Entretanto, de acordo com a literatura, idade avançada é um fator de risco para o desenvolvimento de IRA, pois agrava doenças pré-existentes e desencadeia novas patologias devido ao emprego de fármacos com potencial risco para nefro toxicidade (Nunes *et al.*, 2010; Ross, 2011; Wang *et al.*, 2014). Sendo assim, alterações estruturais e funcionais nos rins, associadas a doenças crônicas, tornam os idosos mais susceptíveis a lesão renal (Grauer, 2005; Nunes *et al.*, 2010; Ross, 2011; Mugford *et al.*, 2013). O atual estudo demonstrou que animais jovens também podem apresentar grande incidência de IRA, ao contrário da maioria das citações da literatura. Acredita-se que esse achado esteja associado ao perfil dos animais avaliados, que apresentaram estado clínico crítico, cujas comorbidades, tais como doenças infecciosas, pós-cirúrgicos complicados, causas iatrogênicas e sepse foram consideradas predisponentes para o desenvolvimento de IRA (Costa *et al.*, 2003; Stocker e Forrester, 2004; Metha *et al.*, 2011; Ross, 2011; Mugford *et al.*, 2013; Cortellini *et al.*, 2015).

Portanto, atenção especial deve ser dada ao desenvolvimento de IRA durante hospitalização, quando vários procedimentos executados são potencialmente lesivos ao rim (Garcia *et al.*, 2005; Armitage e Tomson, 2007; Santos e Marinho, 2013; Cortellini *et al.*, 2015). Os animais neste estudo tiveram como diagnóstico primário pós-cirúrgicos complicados (28,6%), piometra (14,2%), cetoacidose diabética (10,7%), hemoparasitose (10,7%), encefalite (10,7%), intoxicação por anti-inflamatórios não esteroides (7,1%), discoespondilite (3,6%), leishmaniose (3,6%), pancreatite (3,6%), doença periodontal (3,6%) e insuficiência cardíaca congestiva (3,6%). Outra observação foi a ocorrência de complicações clínicas importantes durante sua permanência na UTI, como sepse (53,6%) peritonite (33,3%), hipotensão (33,3%), e hipoxemia (7,4%). Dados etiológicos estes, em conformidade com a literatura consultada, a qual enfatiza que a IRA na UTI é de origem multifatorial, associada a outras comorbidades e complicações (Costa *et al.*, 2003; Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Mugford *et al.*, 2013; Cortellini *et al.*, 2015).

Não houve diferença significativa entre os valores de creatinina sérica entre cães saudáveis e do grupo UTI no momento da admissão nem entre os diferentes períodos de tempo analisados (Tab. 9). Este fato provavelmente, se deve às características clínicas da população avaliada, na qual os animais eram pacientes não azotêmicos na admissão e apresentaram azotemia moderada durante a permanência na UTI.

Neste estudo, observou-se que 28,6% (8/28) dos animais avaliados desenvolveram IRA, segundo o critério adotado (creatinina sérica >1,6mg/dl), durante o período avaliado. Esse parâmetro permitiu identificar o desenvolvimento da IRA somente a partir de 48 horas de avaliação (Tab. 10). Demonstrando que existe uma evolução dissociada entre decréscimo de TFG e valores séricos de creatinina (Lefebvre, 2011). Neste contexto, ao utilizarmos somente este parâmetro como forma de diagnóstico de IRA observou que, embora os animais avaliados em estado grave e com risco elevado de lesão, apresentaram baixa prevalência desta afecção. Dados sobre a prevalência de IRA em cães são escassos em veterinária e a incidência depende do critério utilizado. Entretanto espera-se maior prevalência em pacientes graves (Griffiths e Kanagasundaram, 2011; Okamoto *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012; Santos e Mendonca, 2015), como descrito por Segev *et al.* (2015) que avaliaram cães com insolação e observaram a ocorrência de IRA em 63% deles, utilizando o critério IRIS. Outros estudos analisando IRA em



pacientes graves relatam incidência entre 12 e 14% (Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Cortellini *et al.*, 2015), utilizando critérios diferentes para diagnóstico.

Essa controvérsia pode ser justificada pela baixa sensibilidade da creatinina sérica para evidenciar graus leves de lesão renal (Nguyen e Devarajan, 2008, Bellomo *et al.*, 2004; Cobrin, 2013). Como observado neste estudo e também descrito pela literatura, aumentos nos valores de creatinina, só ocorreram a partir de 48 horas após a admissão, portanto, no tempo de detecção da lesão renal, utilizando este biomarcador, é possível que já tenha ocorrido perda significativa da função renal, o que reduz a eficiência da intervenção terapêutica para corrigi-la. Portanto, a utilização de biomarcadores mais sensíveis e específicos, que possibilitem diagnóstico precoce são preconizados pela literatura (Coca *et al.*, 2008; Segev, 2012; Souza, 2012; Bragato, 2015; Cortellini *et al.*, 2015) bem como necessidade de uniformizar o diagnóstico através de uma definição e classificação padrão conforme proposto por Bellomo *et al.* (2004) e Segev *et al.* (2008).

Tradicionalmente o melhor indicador de avaliação de função renal é a medida da TFG. Esse biomarcador avalia a capacidade de filtração, a habilidade de excreção e relaciona-se diretamente com o parênquima renal funcional. Contudo, sua mensuração envolve técnicas trabalhosas, dispendiosas e morosas e, por isso tem sido pouco utilizada na prática clínica e, principalmente, no cenário da terapia intensiva, onde a função renal tende a alterar rapidamente (Lees, 2004; Sodre *et al.*, 2007; Linnetz e Graves, 2010; Myagawa *et al.*, 2010; Bastos e Kirsztajn, 2011; Hendy-Willson e Pressler, 2011; Pressler, 2013). Justifica-se, portanto, o emprego de biomarcadores que apresentem correlação com a TFG (Bennet e Devarajan, 2011; Foster *et al.*, 2013; Cortellini *et al.*, 2015). Neste estudo a TFG não pode ser realizada em todos os pacientes, devido as suas condições instáveis e à sobrecarga hídrica instituída no tratamento, conforme apresentado e discutido no Artigo V desta tese.

Diferentemente da creatinina, os valores séricos de cistatina C foram significativamente maiores nos animais de UTI com relação aos animais do grupo controle. Vale ressaltar que na análise entre os diferentes tempos não houve diferença significativa. Esses dados indicam maior sensibilidade da cistatina C na identificação dos pacientes acometidos com IRA. Nesse sentido, observou-se que o mesmo detectou 78,6% (22/28) de cães acometidos enquanto a creatinina apontou apenas 28,5% (8/28) de ocorrência de IRA (Tab. 9 e 10). Dados estes em conformidade com estudos anteriores (Pasa *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2014; Shoikath e Patil, 2014; Choi *et al.*, 2016)

O biomarcador avaliado também se revelou superior na precocidade da detecção. Foram detectados nove, nas primeiras 24, nove em 48 horas e quatro animais com lesão renal aguda em 72 horas de observação. Em contrapartida, a creatinina detectou menor número e mais tardiamente, sendo sete casos às 48 horas e um após 72 horas (Tab.10). Sendo assim a cistatina C apresentou um comportamento diferenciado e confirma maior impacto clínico quando mensurada precocemente. Portanto, sua utilização demonstrou maior precocidade e sensibilidade para detectar diminuições discreta da TFG e melhor poder discriminatório na predição de IRA, principalmente quando mensurada na admissão à UTI. Os dados indicam também maior acurácia no monitoramento individual, uma vez que, independentemente do tempo analisado, resultou em maior número de casos detectados (Tab.10 e 11).

Esses dados são importantes, pois de acordo com a literatura a cistatina C apresenta alta especificidade e correlação com a TFG. Considerando-se isso, discretas alterações devem ser valorizadas, pois podem representar mudanças significativas no quadro clínico e exercerem influência no prognóstico, da mesma forma que Neri (2007) e Grubb (2011) mencionaram em seus estudos. A precocidade e a correlação entre a concentração sérica de cistatina C e TFG foram demonstradas anteriormente em cães com disfunção renal (Jensen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009; Pasa *et al.*, 2009; Didem *et al.*, 2015).

Kavitha *et al.* (2011) ao avaliarem cães com suspeita de lesão renal observaram aumento da cistatina C em 35%, e corroboraram sua superioridade comparada à creatinina, dados semelhantes foram encontrados por Choi *et al.* (2016) ao avaliarem cães cardiopatas. Entretanto, estes estudos fizeram uma avaliação pontual deste biomarcador, não sendo realizado um monitoramento longitudinal e em pacientes críticos.

Dado interessante obtido nesse estudo foi o aumento da correlação positiva entre os biomarcadores utilizados (Tab. 8). Esta correlação é fraca e não significativa em animais saudáveis ( $r=0,14$ ), mas à medida que se detecta a IRA, torna-se moderada e significativa ( $r=0,44$ ;  $p<0,05$ ). Deve-se considerar também, que a avaliação individual dos dados sugere essa tendência (Tab.11). Esses dados corroboram os de Braun *et al.* (2002), Kavitha *et al.* (2011) e Choi *et al.* (2016).

Neste sentido, observa-se a necessidade de mudar valores diagnósticos da creatinina com a finalidade de aumentar a sensibilidade deste biomarcador na detecção de alterações discretas de função renal (Bellomo *et al.*, 2004; Dalton, 2011; IRIS, 2013) ou, na ausência dessas mudanças, a cistatina C pode ser utilizada devido ao melhor desempenho evidenciado neste estudo, o qual facilita a utilização de ações preventivas e de tratamento, favorecendo evolução e prognóstico dos animais acometidos (Segev *et al.*, 2015). Entretanto, a literatura aponta como restrições custo e disponibilidade, que dificultariam sua adoção na prática clínica (Krieser *et al.* 2002; Alcivar *et al.*, 2010). Contudo, este estudo demonstra que um bom custo benefício em sua utilização. O presente experimento utilizou *kit* comercial (Labtest ®) de fácil uso, com leitura em aparelhos disponíveis na maioria dos laboratórios de rotina, fornecendo resultados rápidos e confiáveis.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi conduzido, pode-se concluir que:

A cistatina C aumenta precocemente e indica IRA subclínica, não evidenciada pela creatinina sérica.

A cistatina C foi mais sensível na detecção precoce de IRA em cães instáveis e criticamente enfermos quando comparada com a creatinina sérica.

A cistatina C é mais eficiente e com maior poder discriminatório, sendo uma opção promissora para diagnóstico e acompanhamento de cães acometidos com IRA.

### ARTIGO III

## CISTATINA C E CLASSIFICAÇÃO IRIS: AVANÇOS NA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL EM CÃES EM CRITICAMENTE ENFERMOS EM UTI

### INTRODUÇÃO

Como complicação comum em pacientes hospitalizados, principalmente em unidades de terapia intensiva, a injúria renal aguda (IRA) apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade (Costa *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2010; Mehta *et al.*, 2011; Mugford *et al.*, 2013). Segundo Lamieire *et al.* (2005) cinco a 20% dos pacientes em UTI apresentam pelo menos um episódio de IRA associado a falência de múltiplos órgãos e sistemas. Existe grande divergência sobre sua prevalência em cães criticamente enfermos. A literatura cita incidência de 60% em estudo avaliando cães com insolação (Segev *et al.*, 2015), e de 12 a 14% em cães com sepse (Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Cortellini *et al.*, 2015). Apesar dos avanços no tratamento de pacientes em UTI, a taxa de mortalidade ainda é elevada, variando de 20 a 86% (Hoste *et al.*, 2006; Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Cortellini *et al.*, 2015; Segev *et al.*, 2015).

Neste sentido, apesar de sua importância, o diagnóstico precoce de IRA ainda é um desafio e é influenciado por fatores como a ausência de definição consensual e uniformização do sistema de classificação para cães acometidos e pelo fato de que, os marcadores utilizados atualmente não possibilitam a detecção precoce nem a classificam em estágios de gravidade os pacientes que requerem terapia diferenciada (Bellomo *et al.*, 2004; Lees, 2004; Grauer, 2005; Lunn, 2011; Martensson *et al.*, 2012; Palm, 2012).

Tradicionalmente o melhor indicador de avaliação de função renal é a medida da TFG. Esse biomarcador avalia a capacidade de filtração, a habilidade de excreção e relaciona-se diretamente com o parênquima renal funcional. Contudo, sua mensuração envolve técnicas trabalhosas, e dispendiosas e, por isso, tem sido pouco utilizada na prática clínica e principalmente, no cenário da terapia intensiva, onde a função renal tende a alterar rapidamente (Fleck, 1999; Dessen, 2001; Kampa *et al.*, 2003; Pong, 2005; Kirsztajn, 2007; Linnetz e Graves, 2010; Miyagawa *et al.*, 2010; Lefebvre 2011; Hendy-Willson e Pressler, 2011). Dessa forma, os parâmetros avaliados são as concentrações séricas de ureia e creatinina, que são pouco sensíveis para detecção de redução discreta de função renal, uma vez que somente se tornam alterados após comprometimento de 66 a 75% dos néfrons, além de serem afetados por fatores extrarenais. Entretanto, embora a dosagem de creatinina sérica não seja o marcador ideal para diagnóstico de IRA, acredita-se que variações súbitas desse analito apresentam relação direta com a evolução desfavorável da doença (Watson *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2003; Lees, 2004; Bagshaw e Gibney, 2008; Dalton, 2011; Polsin, 2011; Pressler, 2013; Segev *et al.*, 2015).

Como citado anteriormente, não há consenso sobre a definição de IRA, em veterinária. Com objetivo de uniformizar sua caracterização e diagnóstico e também facilitar a avaliação e tratamento de animais com IRA, a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS, 2013) adaptou um esquema para classificar e graduar a severidade de IRA em cães e gatos, baseados nos critérios de RIFLE (Risk, Injury, Failure, End stage of renal disease) e AKIN (Acute Kidney Injury), utilizados em medicina. Este sistema, considerado um instrumento para o diagnóstico precoce e facilitador do manejo de cães, baseia-se em alterações discretas da creatinina sérica e/ou na redução do débito urinário, em que o pior valor em relação a estes critérios é utilizado para identificar a disfunção renal, além de distinguir cinco estágios de evolução (Quadro1). O principal diferencial desta classificação é a inclusão de pacientes com menor variação basal de creatinina sérica e a introdução de um período de 48 horas para o

diagnóstico de IRA. O objetivo desta classificação é padronizar os parâmetros dos estudos e estratificar a disfunção renal, permitindo a identificação de graus variáveis de comprometimento (Bellomo *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011; Segev, 2012; Mugford *et al.*, 2013; Shoukath e Patil, 2014; Segev *et al.*, 2016). Entretanto, apesar dos benefícios da utilização destes sistemas de classificação os mesmos devem ser utilizados com cautela e flexibilidade em relação ao ponto de corte. Portanto, não podem substituir a avaliação clínica criteriosa e nem ser usados como ferramentas únicas para inferir sobre prognóstico (Segev, 2011; Rodrigo *et al.*, 2016).

Entretanto, os critérios utilizados por estas classificações ainda são considerados falhos, uma vez que se baseiam essencialmente na dosagem sérica de creatinina e alteração de débito urinário que detectam anormalidades funcionais de ocorrência tardia à injúria renal e não são marcadores de lesão. Portanto, não permitem diagnóstico precoce, principalmente na avaliação de pacientes críticos. Neste sentido, considera-se que a utilização de outros biomarcadores poderia aumentar a confiabilidade dos resultados (Bellomo *et al.*, 2004; Coca *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009; Steinbach *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Cortellini *et al.*, 2015).

Neste sentido, a busca de um biomarcador não invasivo que possa auxiliar na estimativa de função renal em pacientes críticos e que seja correlacionado com a taxa de filtração glomerular é importante, uma vez que se buscam exames laboratoriais preditivos na identificação precoce de lesão renal. Diversas proteínas de baixo peso molecular foram analisadas, com esse objetivo, dentre as quais a cistatina C se destacou, sendo considerada uma substância promissora por alguns autores (Almy *et al.*, 2002; Martini *et al.*, 2003; Pagitz *et al.*, 2007; Nejat *et al.*, 2010; Grubb, 2011; Shoukath e Patil, 2014; Choi *et al.*, 2016).

A cistatina C é uma proteína catiônica, com peso molecular 13 KDa, composta de 120 aminoácidos, sintetizada de forma constante por todas as células nucleadas, livremente filtrada pelos glomérulos e catabolizada no túbulo proximal. Sua concentração sérica independe de idade, sexo, dieta, massa muscular e peso corporal (Martins *et al.*, 2003; Grubb, 2011). Estudos em medicina a têm considerado um biomarcador endógeno de taxa de filtração glomerular, superior a creatinina sérica (Martinez e Simon, 2003; Magro, 2007; Bagshaw *et al.*, 2008; Acuña *et al.*, 2009; Gabriel *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2013; Shoukath *et al.*, 2014) e em cães estudos também evidenciam sua superioridade (Jensen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2016). Porém, alguns os estudos ainda apresentam resultados controversos e alguns não evidenciaram um melhor desempenho desta proteína (Kresler, 2002; Antagoni *et al.*, 2005; Martin, 2005; Scally *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2007; Medeiros, 2007; Neri, 2007; Alcivar *et al.*, 2010; Waki, 2013; Rodrigues, 2016). Por isso, é necessário testá-la em diferentes cenários clínicos e principalmente em cães em UTI, onde a dosagem sérica de creatinina apresenta muitas limitações (Perinayagam *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Harrisson *et al.*, 2012; Palm e Davis, 2012; Doi, 2016).

Dessa forma, a hipótese deste estudo é de que a cistatina C pode representar uma alternativa de identificação e intervenção precoce para restabelecimento da função renal. O presente estudo é motivado pela falta de consenso quanto à definição de IRA, escassez de estudos sobre sua incidência em cães hospitalizados, principalmente em UTI e pelo fato de se utilizar indicadores bioquímicos pouco sensíveis. Assim têm-se como objetivos: realizar a classificação e acompanhamento da função renal pelo método IRIS (2013) e comparar esse critério com utilização de cistatina C para diagnóstico precoce de disfunção renal em cães internados em UTI do Hospital Veterinário da UFMG, no período de janeiro a junho de 2016.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se 28 cães de diferentes sexo, idade e raça, admitidos na UTI do Hospital Veterinário da UFMG, no período de janeiro a junho de 2016, que apresentavam valores séricos de creatinina  $< 1,6\text{mg/dl}$ , mas com fatores de risco para o desenvolvimento de IRA, descritos na literatura como estado clínico crítico, cujas comorbidades, tais como doenças infecciosas, pós cirúrgicos complicados, causas iatrogênica, sepse dentre outras, foram consideradas predisponentes para o desenvolvimento de IRA (Costa *et al.*, 2003; Stocker e Forrester, 2004; Metha *et al.*, 2011; Ross, 2011; Mugford *et al.*, 2013; Cortellini *et al.*, 2015).

A idade dos cães variou de dois a 16 anos ( $7,9 \pm 4,14$ ), sendo 12 machos e 16 fêmeas, de diferentes raças e peso entre dois a 40 Kg ( $12,57 \pm 11,07$ ). Animais azotêmicos, ou seja, creatinina sérica  $> 1,6\text{mg/dl}$  na admissão na UTI e aqueles portadores de doença renal crônica (DRC) foram excluídos deste trabalho. Também, não fizeram parte deste estudo animais que estavam recebendo doses elevadas de corticosteroides ou terapia com hormônios tireoidianos.

Nestes animais foram coletados sangue para análise de creatinina sérica (método enzimático) Esse biomarcador foi considerado o “padrão ouro” para caracterização da função renal normal ( $< 1,6\text{mg/dl}$ ) ou alterada ( $> 1,6\text{mg/dl}$ ) em cães e para orientar a análise do comportamento da cistatina C sérica. Valores estes estabelecidos de acordo com o critério IRIS (2013).

Para classificação dos pacientes de acordo com o Sistema IRIS (2013) (Quadro 1), realizou-se a monitoração diária da função renal através dos valores séricos de creatinina os quais foram acompanhados durante no mínimo 48 horas. O primeiro valor de creatinina sérica obtido quando na entrada do UTI foi considerado valor basal de cada paciente. Para aqueles com mais de duas medidas durante a hospitalização o valor máximo de creatinina foi utilizado para calcular as alterações de valores. O débito urinário foi mensurado através da monitoração diária, a partir da urina coletada por sistema fechado, sendo a urina armazenada em coletor.

A cistatina C sérica foi medida utilizando o método imunoturbidimétrico (Cistatina C turbiquet Plus Labtest®), calibrado com cistatina C canina purificada (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100)<sup>4</sup>. O valor de referência para cistatina C foi obtido após análise de sua concentração sérica em 19 animais clinicamente hígidos, sem alterações laboratoriais compatíveis com disfunção renal (valores séricos de creatinina de 0,5 a 1,6 mg/dl). O intervalo de referência obtido para cistatina C foi de 0,57mg/L a 1,29 mg/L.

Amostras de sangue para determinação da concentração sérica de creatinina e de cistatina C séricas foram coletadas através de punção na veia jugular externa no momento de admissão na UTI – 24 horas e durante 48 a 72 horas, no total de três coletas para cada animal.

Todas as análises foram realizadas no aparelho COBAS MIRA PLUS (Roche®) locado no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG.

---

<sup>4</sup> BioVendor Researchs and Diagnostic products.

Quadro 1. Critérios de classificação e estadiamento de cães com disfunção renal aguda segundo a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS, 2013).

Estágios	Creatinina sérica (mg/dl)	Considerações
1	< 1.6	Não azotêmico, histórico, clínico, laboratorial ou imagem com evidencia de IRA, ou aumento progressivo de > 0,3 mg/dl de creatinina em 48 horas ou oligúria (<1 ml/kg/h) ou anúria acima de 6 horas
2	1,7 – 2.5	IRA discreta
3	2.6 – 5.0	IRA moderada a intensa
4	5,11 – 10.0	IRA intensa
5	>10	Falência renal

## RESULTADOS

Dentre os cães avaliados havia 42,9% (12/28) machos e 57,1% (16/28) fêmeas. Quanto à idade, a média foi de  $7,9 \pm 4,14$  anos com variação de 2 a 16 anos e peso em média  $12,57 \pm 11,07$  (dois a 40) kg. Não houve relação entre as características individuais (sexo, idade, raça) e o desenvolvimento de injúria renal aguda (Tab.7 do Artigo II).

Entre os animais admitidos no UTI, as médias de creatinina e cistatina C séricas, nos tempos avaliados, foram de  $1,04 \pm 0,65$  mg/dl e  $1,28 \pm 0,35$  mg/L para os analitos avaliados, na ordem. Observaram-se valores significativamente maiores de cistatina C e correlação moderada ( $r=0,43$ ) entre está e a creatinina (Tab.8 do Artigo II).

Durante o período de permanência na UTI (24, 48 e 72h) as medidas avaliadas apresentaram valores estatisticamente semelhantes ( $p>0,05$ ), como apresentado na Tab.12.

Tabela 12. Concentrações médias e desvios padrão nos tempos 24, 48 e 72h da creatinina e cistatina C durante a permanência dos cães no UTI do HV-UFGM.

Tempo (h)	Creatinina (mg/dl)	Cistatina C (mg/L)	n
24	$0,96 \pm 0,37^{Aa}$	$1,21 \pm 0,21^{Aa}$	28
48	$1,23 \pm 0,86^{Aa}$	$1,37 \pm 0,49^{Aa}$	28
72	$0,89 \pm 0,59^{Aa}$	$1,25 \pm 0,26^{Aa}$	16

\* Para letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas iguais nas linhas não há diferença

O parâmetro diagnóstico de alterações do débito urinário é sua redução para valores inferiores a 1,0 ml/kg/h (IRIS, 2013). Débito urinário diminuído foi encontrado em 39,3% (11/28) dos cães

analisados, destes sete apresentaram redução nas primeiras 24 horas e quatro animais em 48 horas de avaliação (Tab.13).

Tabela 13. Valores absolutos e percentuais de normalidade e alteração do débito urinário dos cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM

Debito urinário	ANIMAIS
Normal*	60,7% (17/28)
Diminuído	39,3% (11/28)

\*Débito urinário normal > 1ml /Kg/h (IRIS, 2013).

Os valores séricos individuais de creatinina e de cistatina C, nos diferentes tempos demonstrou variação discreta dos valores séricos da ambos os analitos, não houve diferença significativa, quando se comparou a média dos três tempos analisados (Tab. 12). Contudo, a análise dos valores individuais comparadas ao valor de referência demonstrou comportamento diferenciado e variação precoce da cistatina C, indicando alteração da função renal. Esse comportamento foi diferente entre os dois biomarcadores, uma vez que a creatinina somente elevou-se acima dos valores de referência, a partir de 48 horas em sete animais (Tab. 11, Artigo II).

A análise dos dados individuais demonstrou aumentos de 0,3mg/dl de creatinina sérica em 12 cães (42,8%), indicando IRA. Entretanto, isso foi observado a partir de 48 horas de avaliação. Constatou-se também, que o fluxo urinário foi variável durante a permanência dos animais na UTI, sendo que 11 animais apresentaram déficit, evidenciando boa capacidade discriminatória deste parâmetro (Tab. 13). Contudo, esses parâmetros são utilizados em conjunto como critério classificatório pelo sistema IRIS (2013). Nesse estudo os animais foram classificados em três estágios (Tab. 14). Dessa forma, observa-se que 32,1% (9/28) dos animais avaliados não apresentaram lesão renal e que os 19 restantes, os quais foram diagnosticados com IRA, se distribuíram respectivamente 57,8% (11/19), 31,5%(6/19) e 10,5% (2/19) nos estágios 1, 2 e 3 respectivamente (Tab. 14).

O percentual de animais acometidos por IRA foi estabelecido a partir dos critérios classificatórios do sistema IRIS – aumentos de 0,3mg/dl de creatinina sérica em 48 horas e/ou redução de débito urinário, e a concentração sérica de cistatina C > 1,29mg/L. Eles detectaram 67,9% (19/28) e 78,6% (22/28), respectivamente (Tab. 15).

Aumento dos valores séricos de cistatina C ocorreram nas primeiras 24 horas enquanto a creatinina não se alterou e, entretanto, houve redução de débito urinário em sete animais o que possibilitou a detecção de lesão renal pelo critério IRIS (2013). Contudo, a elevação da cistatina C foi progressiva e associada à piora do estágio de gravidade evidenciado pelo critério IRIS, a partir das 48 horas (Tab.11 do Artigo II).

Tabela 14. Estadiamento da IRA pelo critério IRIS (2013) em valores percentuais e absolutos dos cães durante a permanência na UTI do HV-UFGM

Estágios		IRIS*
1	Creatinina sérica <1,6mg/dl	57,8% (11/19)
2	Creatinina sérica 1,7– 2,5mg/dl	31,5% (6/19)
3	Creatinina sérica 2,6- 5,0mg/dl	10,5% (2/19)
4	Creatinina sérica 5,1-10 mg/dl	zero
5	Creatinina sérica > 10mg/dl	zero

\*critério IRIS aumentos de 0,3mg/dl de creatinina sérica em 48 horas e/ou redução de débito urinário apresentam IRA.

Tabela 15. Percentual de detecção de injúria renal aguda segundo a classificação IRIS (2013) e a concentração de cistatina C, em cães durante a permanência na UTI do HV-UFGM.

Referência	IRIS**		CISTATINA C	
Normal *	32,1%	(9/28)	21,4%	(6/28)
Aumentada (IRA)	67,9%	(19/28)	78,6%	(22/28)

\* Valores de Cistatina C  $\leq$  1,29 mg/L.

\*\*critério IRIS aumentos de 0,3mg/dl de creatinina sérica em 48 horas e/ou redução de débito urinário apresentam IRA.

O critério IRIS (2013) foi eficiente para diagnosticar lesão renal 36,8% (7/19) dos animais no tempo inicial, enquanto a avaliação da cistatina C aponta para injúria renal em 40,9% (9/22) dos animais. Após 48 horas, houve azotemia discreta em sete animais juntamente com redução de débito urinário, o que permitiu a classificação pelo critério IRIS em quatro deles e a cistatina C aumentou em nove animais. Finalmente, no tempo de 72h, houve redução do número de animais avaliados, por limitação de colheita da amostra. Contudo, foram avaliados 16 animais. Neste tempo, observou-se que o IRIS diagnosticou um animal e a cistatina C quatro animais (Tab. 16).



Tabela 16. Percentual de detecção injúria renal aguda pelo critério IRIS e pela cistatina C sérica em cães durante a permanência na UTI do HV-UFGM

Referência	IRIS **		CISTATINA C	
	%	Números absolutos	%	Números absolutos
Normal *	32,2	(9/28)	21,4	(6/28)
Aumentada (IRA)	67,9	(19/28)	78,6	(22/28)
24 horas	36,8	(7/19)	40,9	(9/22)
48 horas	57,8	(11/12)	40,9	(9/13)
72 horas	5,2	1	18,2	4

\* Valores de Cistatina C  $\leq$  1,29 mg/L.

\*\*critério IRIS aumentos de 0,3 mg/dl de creatinina sérica em 48 horas e/ ou redução de débito urinário apresentam IRA.

## DISCUSSÃO

O modelo experimental foi eficiente e permitiu a observação de diferenças do desempenho entre os dois biomarcadores avaliados. Embora o critério IRIS de classificação já tenha sido utilizado (Segev *et al.*, 2008, 2015 e 2016), a comparação entre o monitoramento longitudinal da cistatina C e a creatinina em cães criticamente enfermos em UTI não foi descrito na literatura veterinária. Neste estudo, o sistema IRIS (2013), que utiliza o aumento sérico da creatinina e/ ou redução do débito urinário, foi utilizado para classificar e estagiar a lesão renal, e foi comparado ao desempenho de cistatina C, como proposta de biomarcador de diagnóstico precoce de IRA em cães em UTI.

Lesão renal aguda pode estar presente em diferentes cenários clínicos, entretanto, atenção especial deve ser dada ao seu desenvolvimento durante hospitalização, quando diversos procedimentos executados são potencialmente lesivos ao rim (Garcia *et al.*, 2005; Armitage e Tomson, 2007; Santos e Marinho, 2013; Cortellini *et al.*, 2015). Os animais neste estudo tiveram como diagnóstico primário pós-cirúrgicos complicados (28,6%), piometra (14,2%), cetoacidose diabética (10,7%), hemoparasitose (10,7%), encefalite (10,7%), intoxicação por anti-inflamatórios não esteroides (7,1%), discoespondilite (3,6%), leishmaniose (3,6%), pancreatite (3,6%), doença periodontal (3,6%) e insuficiência cardíaca congestiva (3,6%). Outra observação foi a ocorrência de complicações clínicas importantes durante sua permanência na UTI, como sepse (53,6%) peritonite (33,3%), hipotensão (33,3%), e hipoxemia (7,4%). Dados etiológicos estes, em conformidade com a literatura consultada, a qual enfatiza que a IRA na unidade de terapia intensiva (UTI) é de origem multifatorial, associada a outras comorbidades e complicações (Costa *et al.*, 2003; Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Mugford *et al.*, 2013; Cortellini *et al.*, 2015).

Neste estudo, constatou-se que apesar de se avaliar pacientes graves, a amostra evoluiu favoravelmente com elevada taxa de alta 66,7% (19/28). A literatura cita que a mortalidade na UTI é muito variável, e depende do estágio de evolução da doença, do tratamento clínico, das condições físicas dos pacientes, idade avançada, existência de comorbidades, e de fatores relacionados à função renal como azotemia grave e oligúria (Hoste *et al.*, 2006; Kenney *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2012; Okamoto *et al.*, 2012; Souza, 2012; Schneider e Bellomo, 2013; Brown *et al.*, 2015). A baixa mortalidade evidenciada nesse estudo pode estar relacionada à predominância de cães jovens adultos, na baixa prevalência de animais com azotemia acentuada e oligúria e também na utilização de tratamento intensivo acarretando melhor resposta clínica e consequentemente, melhor desfecho.

Apesar do avanço no tratamento e na compreensão da patogênese da IRA, muitos aspectos geram confusão e falta de consenso. Esse fato demonstra a necessidade da utilização de sistema único de classificação (Bellomo *et al.*, 2004; Kenney *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Cogwill, 2012, Rodrigo *et al.*, 2016). Neste sentido, com objetivo de uniformizar sua caracterização, diagnóstico e avaliação, além de favorecer o tratamento em veterinária, a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS, 2013) adaptou um esquema que se baseia no aumento sérico da creatinina e ou redução do débito urinário para determinar cinco estágios de evolução da IRA (Bellomo *et al.*, 2004; Cogwil, 2012; Segev *et al.*, 2016). Este classifica os pacientes em diferentes graus de disfunção renal de acordo com os critérios supracitados. O estágio 1 engloba animais não azotêmicos; o segundo estágio com azotemia discreta e o restante com azotemia moderada a grave (Quadro 1).

Os resultados do presente estudo indicam que, assim como na medicina, o método IRIS de classificação é uma ferramenta promissora, devido à facilidade de execução e por se basear nos valores séricos de creatinina, marcador mais utilizado, tanto em humanos quanto em veterinária, por ser um método disponível e de baixo custo e também considerar alterações de débito urinário, um método factível em animais de UTI pois os mesmos sempre estão cateterizados (Braun *et al.*, 2003; Bellomo *et al.*, 2004; Dalton, 2011; Lee *et al.*, 2011; Segev *et al.* 2015; Rodrigo *et al.*, 2016). A utilização deste método diagnosticou lesão renal precocemente quando comparada ao método tradicional, que utiliza o valor de creatinina sérica acima de referência para a espécie. Vale ressaltar que os valores séricos de referência da creatinina não permitem diagnóstico de lesão renal, o que dificulta a utilização de ações preventivas e de tratamento, prejudicando a evolução e prognóstico dos pacientes (Braun *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2012; Martensson *et al.*, 2012; Shoukath e Patil, 2014; Segev *et al.*, 2016).

A classificação IRIS (Tab.16), refletiu o aumento da creatinina sérica em 42,8% (12/28) dos cães. Este critério utiliza também alterações do fluxo urinário. Neste estudo foi possível quantificar adequadamente a produção urinária uma vez que os animais estavam cateterizados. Houve redução deste parâmetro em 39,3% (11/28) (Tab. 13). O débito urinário é considerado uma medida sensível para avaliação da hemodinâmica renal, e suas alterações precedem aos aumentos séricos de creatinina (Martin-Moreno, 2011, Kaul e Ruhela, 2012; Pressler, 2013; Brown *et al.*, 2015). Considera-se que o mesmo deve ser sempre monitorado em pacientes de alto risco de lesão renal, pois seu decréscimo indica necessidade de intervenção imediata (Grauer, 2005). Embora a utilização do fluxo urinário como medida de função renal seja uma técnica usual em pacientes de UTI, a lesão renal nem sempre se manifesta com alterações de fluxo urinário (Geist e Langston, 2011; Martin-Moreno, 2011; McMahon e Waikar, 2013).

Ressalta-se que pacientes acometidos pela IRA, principalmente em fase inicial, podem ou não apresentar diminuição de volume de diurese, entretanto, a oligúria é forte indicativo de que os rins estão começando a falhar (Neveu *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2003; Grauer, 2005; Brown *et al.*, 2015). Neste estudo, o critério fluxo urinário mostrou-se melhor sensibilidade à identificação dos estágios iniciais de IRA do que a creatinina sérica. Esse fato provavelmente se

deve à baixa sensibilidade deste analito neste cenário clínico, onde seus valores são muito influenciados por fatores extrarrenais, como administração de fluidoterapia intensa e drogas diuréticas, além de fatores relacionados à diminuição de sua produção como processos inflamatórios e desnutrição, comuns em pacientes críticos (Nguyen e Devarajan, 2004; Perianayagan *et al.*, 2009; Lefebvre, 2011). Contudo, contrapõe a literatura que considera que a estimativa de fluxo urinário é pouco confiável em pacientes criticamente enfermos, nos quais seus valores mudam rapidamente de oligúrico a poliúrico e, portanto, possui valor preditivo negativo baixo. Contudo, como demonstrado neste estudo, sua especificidade para denotar comprometimento da função renal, é elevada quando o débito está reduzido (Grauer, 2005; Geist e Langston, 2011; Martin-Moreno, 2011). Este estudo também corrobora estudos anteriores avaliando a função renal de cães realizados por Lee *et al.* (2011) e Harrison *et al.* (2012) que consideraram como limitação o fato de não se poder fazer uma estimativa confiável de débito urinário para avaliação de função renal.

Portanto, os dados deste estudo, reiteram a afirmação de Bellomo *et al.* (2004) e Grauer (2005) em que a sensibilidade do fluxo urinário para mudanças hemodinâmicas renais se mostrou maior quando utilizado juntamente com outros marcadores bioquímicos. Neste sentido, confirma que a utilização associada do débito urinário e creatinina sérica, constitui-se em um diferencial para classificação de IRA, conforme determina o critério IRIS (2013). Este estudo evidenciou, portanto, maior percentual, 67,8% dos animais como portadores de IRA, pela classificação proposta e reforça que aumentos discretos de creatinina sérica estão associados à perda significativa de função renal em pacientes de UTI, conforme já evidenciado em estudos anteriores (Shoukath e Patil, 2014; Segev *et al.* 2015).

A prevalência de IRA em cães criticamente enfermos demonstrados neste estudo foi alta (67,9% pelo critério IRIS e 78,6% pela creatinina C) quando comparada aos dados mencionados pela literatura, que foi de 12,3% (Kenney *et al.*, 2010) e de 14,2% (Thoen e Kerl, 2011). Justifica-se esta alta prevalência, pelo critério utilizado para classificação e também do perfil epidemiológico da população, que se constituiu de animais criticamente enfermos com perfil de elevada gravidade. Dados semelhantes foram obtidos em estudos humanos (Gomes, 2014; Shoukath e Patil, 2014; Rodrigo *et al.*, 2016) e em veterinária (Segev *et al.*, 2015).

Kenney *et al.* (2010) e Thoen e Kerl (2011) consideraram como critério diagnóstico de IRA, aumentos de 0,5mg/dl de creatinina sérica e não avaliaram o débito urinário. O que demonstra que a real incidência de IRA varia de acordo com a metodologia utilizada no diagnóstico de cada estudo, dificultando a comparação entre resultados. Dessa forma, torna-se essencial a padronização do diagnóstico de IRA em cães, bem como, a utilização de biomarcadores de lesão renal, a fim de compor um painel que possa diagnosticar em tempo hábil e prevenir sua ocorrência, possibilitando assim o manejo adequado e evitando a evolução para doença renal crônica ou óbito (Sodré *et al.*, 2007; Perianayagan *et al.*, 2009; Thoen *et al.*, 2011; Martensson *et al.*, 2012; Mugford *et al.*, 2013; Steinbach *et al.*, 2014).

Analisando o estadiamento proposto, observou-se que a maioria dos cães encontravam em estágio I ou seja, animais não azotêmicos (Tab. 14). Este fato reforça a importância de não se basear em valores de referência de creatinina sérica para diagnóstico de IRA em animais de UTI, uma vez que, nestes pacientes, os determinantes de sua concentração, ou seja, produção, volume de distribuição e eliminação não se encontram em equilíbrio, devido às condições instáveis dos mesmos (Dirkes, 2011; Shoukath e Patil, 2014; Steinbach *et al.*, 2014). Neste cenário verifica-se que o balanço hídrico positivo, considerado comum na evolução de pacientes críticos, principalmente sépticos e pós-operados nos quais o volume corporal de água pode aumentar mais que 10% em 72 horas, o que determina menor aumento detectável da creatinina sérica na fase de desenvolvimento de IRA. Também a perda muscular e má nutrição associadas aos pacientes de UTI e a ocorrência de sepsis, reduzem a produção de creatinina, com

consequente superestimação da função renal, atrasando ainda mais o diagnóstico (Murray *et al.*, 2008; Perianayagan *et al.*, 2009; Martensson *et al.*, 2012; Rodrigo *et al.*, 2016). Neste estágio, apesar da inobservância de elevação da concentração sérica de creatinina além da referência, considera-se que pequenos aumentos sejam significantes e este conceito seja importante para este sistema de estadiamento, pois correspondem a grandes perdas da taxa de filtração glomerular, como mencionado pela literatura (Vaidya *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2010; Segev *et al.*, 2008; Shoukath e Patil, 2014).

De acordo com Biesen *et al.* (2006), o estágio 1 de classificação é o mais importante, uma vez que um teste positivo alerta sobre a presença de risco de injúria renal e da importância do monitoramento do paciente no momento em que a situação é ainda reversível através da prevenção ou intervenção terapêutica. Animais classificados e tratados, nos estágios 1 e 2, geralmente recuperam adequada função renal entre dois e cinco dias. Entretanto, o início de terapia substitutiva renal que pode ser empregada em qualquer estágio de disfunção (Segev *et al.*, 2008; IRIS, 2013; Segev *et al.*, 2013 e 2016). Portanto, a validade da classificação depende de o fato da mesma ser capaz de distinguir entre função renal normal e diferentes fases da IRA, ter critérios fáceis de determinar e ter propriedades diagnósticas (Belomo *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2008).

Azotemia discreta a moderada foi observada nos demais animais a partir de 48 horas de acompanhamento (Tab.11 do artigo II e Tab.14). Corroborando assim a literatura, que relata aumentos nos valores séricos de creatinina só ocorrem 48 a 72 após o insulto inicial. Em adição pode existir disfunção renal com alterações mínimas nos seus valores devido à capacidade de reserva funcional (Coca *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008, Shoukath e Patil, 2014; Bragato, 2015). Nenhum dos animais acompanhados atingiu os estágios quatro e cinco de classificação durante sua permanência na UTI (Tab. 14). Demonstrando mais uma vez, as limitações do uso dos valores de referência da creatinina sérica no diagnóstico da IRA. Reforçando também, que terapias direcionadas para injúria renal, devem ser iniciadas ainda que os valores séricos de creatinina ainda estejam normais (Segev *et al.*, 2015). Contudo, vale ressaltar que, embora a aplicação do intervalo de referência para creatinina sérica em cães não seja apropriada e as alterações de seus níveis sejam tardias em relação ao comprometimento da função renal, ela é um bom marcador evolutivo de disfunção renal e seu monitoramento longitudinal, em um indivíduo, assegura a detecção precoce do declínio da TFG e de doença renal incipiente devido a sua pequena variação biológica intraindividual (Lunsden, 1998; Heine e Lefebvre, 2007; Dalton, 2011). Essa característica é considerada pelo sistema IRIS (2013) em conjunto com diminuição do débito urinário, o que justifica sua maior capacidade de detecção da IRA, também observada neste estudo. Sendo assim, este critério mostrou-se promissor na identificação precoce uma vez que, na rotina clínica, observa-se que este diagnóstico, é feito somente quando os animais apresentam valores de creatinina sérica acima da referência e, portanto, as alterações sutis da creatinina e diurese parecem ainda não serem encaradas com a devida importância. Contudo, a relevância da classificação IRIS é frequentemente questionada e pouco utilizada, mas sua importância foi demonstrada neste estudo.

Tradicionalmente, o melhor indicador de avaliação de função renal é a medida da TFG (Linnetz e Graves 2010; Miyagawa *et al.*, 2010; Hendy-Willson e Pressler, 2011; Lefebvre, 2011). Atualmente, a creatinina sérica é o que apresenta melhor correlação com a TFG e, conseqüentemente, tem sido rotineiramente usado, embora muitos fatores limitem sua precisão (Lees, 2004; Parik e Vasan, 2007; Silva e Brune, 2011). Portanto, é necessária a utilização de marcadores precoces e mais sensíveis, que detectem pequenas reduções da TFG e não seja afetado pela idade, sexo e massa muscular. Muitas proteínas de baixo peso molecular vêm sendo propostas como marcadores de TFG, entre elas a cistatina C, que tem se mostrado mais promissora e potencialmente superior a creatinina (Villa *et al.*, 2005; Magro, 2007; Grubb, 2011; Spahillari *et al.*, 2012; Shoukath e Patil, 2014). Em veterinária existem poucos estudos

analisando a utilidade da cistatina C no diagnóstico da IRA sendo que, nenhum deles aborda o cenário de terapia intensiva (Palm *et al.*, 2012; Ghys *et al.*, 2014). Assim, este estudo avaliou o desempenho da cistatina C em prever o desenvolvimento de IRA em uma população selecionada de cães criticamente enfermos, em UTI, comparando-a a metodologia de classificação IRIS para cães com IRA.

Diferentemente da creatinina, os valores séricos de cistatina C estavam acima da referência entre a maioria dos animais da UTI. Nesse sentido, observou-se que a mesma detectou 78,6% (22/28) de cães acometidos enquanto o critério IRIS apontou 67,8% (19/28) de ocorrência de IRA (Tab. 15). Esses dados indicam um comportamento diferenciado da cistatina C e sua maior sensibilidade na identificação dos pacientes acometidos com IRA, o que também foi demonstrado por Shoukath e Patil (2014) ao avaliarem pacientes graves.

Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre as medias dos valores de cistatina C na análise entre os diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Contudo, o monitoramento individual mostrou tendência ao aumento dos valores, já nas 24 horas de observação inicial, sugerindo maior impacto clínico quando mensurada na admissão na UTI. Neste sentido, 40,9% dos animais apresentaram valores de cistatina C acima da referência quando na entrada no UTI e após 48 horas e 18,2% após 72 horas (Tab.16). Ressalta-se que nenhum dos animais apresentou valores de creatinina acima da referência quando na entrada no UTI, entretanto, o critério IRIS identificou 36,8 % na avaliação inicial dos pacientes, 57,8% após 48 horas e 5,2% em 72 horas. Cabe salientar, portanto, que o início da alteração da creatinina ocorreu 24 horas após aumento da cistatina C, evidenciando assim o comportamento diferenciado deste biomarcador, demonstrando precocidade e sensibilidade para detectar diminuições discretas da TFG. Pode-se dizer que a cistatina C apresenta caráter discriminatório melhor para prever IRA, principalmente quando mensurada na admissão da UTI, além de aumentar a acurácia conforme aumento do grau de lesão, conforme apresentado neste estudo onde todos os cães classificados pelo critério IRIS em estágios dois e 3, também apresentaram aumentos de cistatina C (Tab. 11 do artigo II). Ressalta-se que considerada a especificidade descrita para este marcador, discretas alterações devem ser valorizadas, pois podem representar mudanças significativas no quadro clínico e exercerem influência no prognóstico (Neri, 2007; Grubb, 2011). Correlação negativa e significativa entre a concentração sérica de cistatina C e TFG também foi demonstrada em estudos anteriores em cães com doença renal crônica (Hartmann, 2007; Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009), bem como sua precocidade na avaliação da função renal (Jensen *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Miyagawa *et al.*, 2009; Pasa *et al.*, 2009; Didem *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016). Kavitha *et al.* (2011) ao avaliarem 60 cães com suspeita de lesão renal observaram 35% com aumento de cistatina C sérica. Portanto, considerando que a medida da TFG é uma técnica trabalhosa e com baixa acurácia em pacientes críticos, ressalta-se a importância da utilização de um marcador mais apropriado e de fácil mensuração (Dessen, 2001; Pong *et al.*, 2005; Langston, 2009; Miyagawa *et al.*, 2009; Hendy-Wilson e Pressler, 2011). Embora haja poucos estudos que avaliaram a incidência de IRA em animais em UTI segundo esses critérios, os dados desse estudo corroboram os da literatura, a qual indica alta incidência de lesão renal aguda, com taxa variando entre 30 a 60% dos pacientes sob cuidados críticos (Lunn, 2011; Gomes, 2014; Shoukath e Patil, 2014; Cortelini *et al.*, 2015; Segev *et al.*, 2016).

Neste contexto, observou-se que o tempo mínimo necessário para diagnóstico de IRA utilizando o critério IRIS foi de 24 horas, além da necessidade de uma monitoração contínua da creatinina sérica e débito urinário durante este período enquanto a dosagem única de cistatina C na admissão da UTI é suficiente. Logo, o bom desempenho da cistatina C e sua correspondência com estágios de disfunção renal, evidenciados pelo critério IRIS, reforçam nesse estudo, sua sensibilidade e especificidade na detecção de lesão renal em cães criticamente enfermos. Entretanto, a despeito do seu bom desempenho numérico, a ausência de referência de normalidade consensual dificulta a comparação deste com outros estudos já divulgados.

Nesse aspecto, observou-se correlação positiva e moderada entre os níveis de cistatina C e creatinina sérica durante a permanência na UTI ( $r=0,44$ ). Possivelmente devido à baixa sensibilidade da creatinina sérica na avaliação de graus discretos de perda de função renal, pois a mesma só se encontra alterada após perda de 60 a 75% da função renal (Brown *et al.*, 2007; Heine e Lefebvre, 2007). Aumentos precoces, porém, discretos de cistatina C podem indicar falha renal não evidenciada pela creatinina sérica, isso sugere que na ausência de mudanças diagnósticas da creatinina, a cistatina C pode detectar provável IRA subclínica. Neste sentido, reforça-se a necessidade de mudança dos valores diagnósticos da creatinina no sentido de se aumentar sua sensibilidade para detecção de alterações discretas de função renal, tal como sugerido por Bellomo *et al.* (2004) e IRIS (2013). Este estudo confirma que terapias direcionadas a proteção renal, devem ser iniciadas imediatamente, mesmo se os valores de creatinina estiverem dentro do intervalo de referência conforme também evidenciado por Segev *et al.*, 2015.

Deste modo, este estudo contribuiu para salientar a importância do consenso sobre a definição de IRA em cães, pois esta padronização pode homogeneizar condutas, permitir comparação entre os estudos e propiciar intervenções terapêuticas mais apropriadas assegurando as chances de controle desta síndrome, antes de sua manifestação e até mesmo evolução para estádios mais avançados onde o prognóstico é pior. Além disso, a cistatina C demonstrou ser o melhor biomarcador dentre os aqui avaliados, sendo uma ferramenta diagnóstica promissora.

Entretanto, restrições como custo e disponibilidade dificultam sua adoção na prática clínica, contudo, o desenvolvimento de métodos automatizados pode reduzir os custos de análise. Esses fatos enfatizam a necessidade de se conhecer suas limitações, para que seja solicitada em situações em que sua utilidade já tenha sido evidenciada e que apresentem custo benefício de sua utilização (Krieser *et al.* 2002; Alcivar *et al.*, 2010; Gabriel *et al.*, 2010; Grubb, 2011). Embora seu uso na prática clínica dependa de estudos adicionais, a cistatina C possui características que facilitam sua utilização, como o fato de poder ser realizada pelo método imunoturbidimétrico, técnica rápida e de fácil execução e seu bom desempenho observado neste estudo confirma o custo-benefício de sua utilização.

Este trabalho contribuiu para fundamentar novas propostas de diagnóstico de IRA em cães em UTI e também para redução da lacuna hoje existente na literatura sobre este assunto no Brasil.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi realizado, pode-se concluir que:

A incidência de IRA é de 67,9 % baseado no critério IRIS e de 78,6% baseada na cistatina C, nos pacientes criticamente enfermos internados na UTI do Hospital Veterinário da EV-UFMG.

A aplicação do intervalo de referência para creatinina sérica isoladamente, na avaliação de IRA em cães criticamente enfermos não é apropriada.

O monitoramento longitudinal em um indivíduo através da mensuração da creatinina sérica e do débito urinário assegura a detecção precoce do declínio da TFG e de disfunção renal incipiente.

O critério IRIS mostrou-se eficiente para classificar cães com diferentes estágios de função renal internados em UTI.

A dosagem de cistatina C sérica imediatamente na admissão à UTI, mostrou-se superior na identificação precoce dos pacientes com IRA quando comparada a classificação IRIS e a creatinina sérica em cães criticamente enfermos.

## ARTIGO IV

# CONTRIBUIÇÃO DA ULTRASSONOGRAFIA NO DIAGNÓSTICO DE INJÚRIA RENAL AGUDA EM CÃES EM UTI

## INTRODUÇÃO

Atualmente a ultrassonografia é parte integrante da avaliação do paciente com suspeita de disfunção renal e já se tornou um procedimento de rotina em medicina veterinária, constituindo um dos primeiros exames de imagem executados para analisar os rins (Nyland *et al.*, 2005, Halasc Vac, 2014; O'Neill, 2014; Pennick e D'Anjou, 2015). Vários estudos mostram a acurácia da ultrassonografia em acessar alterações renais com boa sensibilidade apesar de sua baixa especificidade (Riccabona, 2006, Santos *et al.*, 2012; Bragato, 2015; Vinayaka *et al.*, 2016). Este exame pode ser utilizado na detecção, caracterização e acompanhamento de diversas alterações renais agudas ou crônicas, sendo considerada a modalidade de exame de imagem de escolha na emergência como método auxiliar de diagnóstico no paciente crítico e naqueles com suspeita de nefropatias obstrutivas (Byrne e Hwang, 2011; Thompson e Bhatt, 2014). Esta técnica possui vantagens em relação a outras modalidades de exame de imagem por fornecer detalhes sobre o parênquima, acessar possíveis alterações extrarrenais, poder ser realizada a beira do leito sem necessidade de mover o paciente para outro local, não ser invasiva, rápida, baixo custo, não necessitar de contraste e poder ser repetida sem acarretar danos ao paciente. Possui como desvantagens a dificuldade de visualização adequada dos rins em pacientes agitados, obesos e com grande quantidade de gases intestinais, ser operador dependente e de não inferir sobre a função renal (Quaia e Bertolotto, 2002; Noble e Brown, 2004; Byrne e Hwang, 2011; Halasc Vac, 2014). Em pacientes criticamente enfermos, o exame ultrassonográfico fornece informações que podem auxiliar no diagnóstico e tratamento uma vez que nestes pacientes existe a necessidade de exames rápidos que auxiliem na conduta clínica dos mesmos, uma vez que a instabilidade hemodinâmica e a urgência por condutas rápidas dificultam uma avaliação clínica adequada (Sivit, 2005; Amber *et al.*, 2013; Faubel *et al.*, 2014; Segev *et al.*, 2016).

O objetivo deste trabalho é caracterizar as principais alterações ultrassonográficas renais e correlacioná-las com os diferentes estágios de disfunção renal estabelecido através do critério IRIS (2013) e do biomarcador cistatina C, em cães criticamente enfermos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Veterinário da UFMG, no período de janeiro a junho de 2016.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 28 cães de diferentes raças, sexo e idade admitidos na UTI do hospital Veterinário da UFMG, no período de janeiro a junho de 2016, os quais apresentavam valores séricos de creatinina < 1,6mg/dl e fatores de risco para o desenvolvimento de IRA. Animais azotêmicos, creatinina sérica > 1,6mg/dl ou portadores de doença renal crônica (DRC) na admissão na UTI foram excluídos deste trabalho.

Realizou-se a monitoração diária da função renal através do débito urinário e dos valores séricos de creatinina e de cistatina C, os quais foram acompanhados por 72 horas. O primeiro valor obtido quando na entrada do UTI foi considerado valor basal de cada paciente.

A cistatina C sérica foi medida utilizando o método imunoturbidimétrico (Cistatina C turbiquet Plus Labtest®), calibrado com cistatina C canina purificada (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100)<sup>5</sup>.

O valor de referência para cistatina C foi obtido após análise de sua concentração sérica em 19 animais clinicamente saudáveis, sem alterações laboratoriais compatíveis com disfunção renal (valores séricos de creatinina de 0,5 a 1,6mg/dl), os valores de referência obtidos foram de 0,57 mg/L a 1,29 mg/L de cistatina c sérica.

Amostras sanguíneas para determinação da concentração de creatinina e de cistatina C séricas foram coletadas no momento de admissão no CTI – 24 horas e durante 48 a 72 horas.

Todas as análises foram realizadas no aparelho COBAS MIRA PLUS (Roche®) locado no Laboratório de Patologia Clínica do HV/UFMG.

Os exames ultrassonográficos renais foram realizados, diariamente por um período de 72 horas, pelo mesmo examinador, utilizando-se o aparelho ESAOTE MY LAB 40. A técnica adotada para avaliação ultrassonográfica renal foi descrita por Nyland *et al.*, 2005 e Pennick e D' Anjou, 2015). Nos rins foram avaliados tamanho (normal, aumentado, diminuído), contorno renal (regular, irregular), ecogenicidade cortical (normal, aumentada, diminuída), espessura cortical (normal, aumentada, diminuída) e definição e relação corticomedular (normal, diminuída, ausente).

As alterações ultrassonográficas renais observadas foram descritas e correlacionadas aos diferentes estágios de IRA classificados pelo critério IRIS (2013) e pelo biomarcador cistatina C sérica.

## RESULTADOS

Dentre os cães avaliados havia 42,9% (12/28) machos e 57,1% (16/28) fêmeas. Quanto à idade, a média foi de 7,9±4,14 anos com variação de 2 a 16 anos e peso em média 12,57 ±11,07 (2 e 40) kg. Não houve relação entre as características individuais (sexo, idade, raça) e o desenvolvimento de injúria renal aguda.

Também não foram observadas correlações significativas entre idade, sexo e peso e presença de alterações ultrassonográficas ( $p>0,05$ ). Entretanto, houve uma correlação fraca ( $r=0,25$ ), porém significativa ( $p=0,03$ ) entre a presença de alterações ultrassonográficas e os valores séricos de creatinina e de cistatina C.

Os animais avaliados compreenderam cães não azotêmicos (creatinina sérica <1,6 mg/dl) quando na entrada do UTI e com injúria renal definida pelo aumento progressivo da concentração sérica de creatinina, superior a 0,3 mg/dl, durante 48 horas de acompanhamento e/ou redução do débito urinário, os quais foram divididos em estágios de acordo com a classificação IRIS (2013) (Quadro 1 do artigo 3).

De acordo com o Sistema IRIS 67,8% (19/28) dos cães era portador de IRA. Desses, 57,9% foram classificados em estágio I (não azotêmicos), azotemia leve foi observada em 31,5% e classificados em estágio 2 e 10,5% com azotemia moderada em estágio 3 e nenhum dos animais acompanhados atingiu os estágios 4 durante a permanência na UTI (Tab.17).

A concentração média de cistatina C sérica dos cães durante a permanência na UTI foi de 1,28±0,35mg/L. Como critério de detecção da IRA, utilizou-se o valor de 1,29 mg/L para corte

---

<sup>5</sup> BioVendor Researchs and Diagnostic products.



O critério IRIS (2013) detectou lesão renal em 19 animais, dos quais 14 apresentaram alterações ultrassonográficas. Considerando a esta classificação, pode-se observar que dos 11 animais do primeiro estágio oito apresentaram alterações estruturais evidenciadas pelo ultrassom. Entre os seis animais do estágio dois, cinco apresentaram ultrassom alterado e metade dos animais do estágio 3 apresentaram alterações. Dentre os animais que não apresentaram IRA (9/28) seis apresentaram alterações ultrassonográficas renais (Tab. 17).

Analisando o desempenho do ultrassom comparado ao da cistatina C, observou-se que dentre os 22 animais com aumento deste analito, 17 apresentaram alterações estruturais ultrassonográficas. Sendo que essas alterações foram evidenciadas em oito animais detectados nas primeiras 24 horas, em seis animais dos nove com aumento de cistatina C após 48 e em dois animais detectados após 72 horas (Tab.18).

Tabela 17. Percentual de detecção de injúria renal aguda pelo critério IRIS e pelas alterações ultrassonográficas em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFMG

Referência	IRIS*		ALTERAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	
	%	Nº absoluto	Presença	Ausência
Normal	32,2	(9/28)	(6/9)	(3/9)
IRA	67,8	(19/28)	(14/19)	(5/19)
Estágio 1	57,8	(11/19)	(8/11)	(3/11)
Estágio 2	31,5	(6/19)	(5/6)	(1/6)
Estágio 3	10,5	(2/19)	(1/2)	(1/2)

\*Critério IRIS: aumento de 0,3mg/ dl de creatinina séricas em 48 horas e/ ou redução de débito urinário apresentam IRA.

Neste estudo nove animais apresentaram rins normais ao exame ultrassonográfico. Nestas avaliações observou-se eco textura homogênea e córtex renal hipocóico em relação ao baço, contorno regular e manutenção da relação e definição corticomedular. Entre os 19 animais com alterações estruturais, a hiperecogenicidade caracterizou-se pelo aumento da ecogenicidade cortical renal em relação ao baço ou fígado. Aumento da espessura cortical refere-se ao aumento da relação entre as duas regiões, cortical e medular. Alteração de tamanho foi determinada a partir de exames ultrassonográficos seriados, os quais foram realizados a cada 24 horas. Sinal medular reflete a observação de linha hiperecogênica na transição córtico medular. A hipocogenicidade apesar de ser considerada de difícil detecção, pois não há um parâmetro de comparação com outros órgãos, como no aumento da ecogenicidade, também foi observada (Nyland *et al.*, 2005; Pennick e D'Anjou, 2015) (Tab. 19).

Tabela 18. Percentual de detecção de injúria renal aguda pela cistatina C e alterações ultrassonográficas em cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM

Referência	CISTATINA C		ALTERAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	
	%	Nº absoluto	Presença	Ausência
Normal *	21,4	(6\28)	(2\6)	(4\6)
IRA **	78,6	(22\28)	(17\22)	(5\22)
24 horas	40,9	(9\22)	(8\17)	(1\17)
48 horas	40,9	(9\13)	(6\9)	(3\9)
72 horas	18,2	(4\4)	(2\3)	(1\3)

\* Normal: Cistatina C < 1,29 mg/L; \*\* IRA: cistatina C >1,29

As características ultrassonográficas renais observadas variaram entre os animais e foram hiperecogenicidade, aumento de espessura cortical, alteração de tamanho, sinal medular, redução da definição corticomedular e hipocogenicidade cortical. Sendo que os valores percentuais foram na ordem 89,5%, 23,5%, 17,6%, 17,6%, 11,8% e 10,5% (Tab. 19).

Tabela 19. Percentual de detecção de injúria renal aguda pelas alterações ultrassonográficas em cães durante a permanência na UTI do HV-UFGM.

ALTERAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS (n=19)	Valores percentuais (%) e absolutos
Hipocogenicidade cortical	10,5 (2/19)
Hiperecogenicidade cortical	89,5 (17/19)
Hiperecogenicidade	29,4 (5/17)
Aumento da espessura cortical + Hiperecogenicidade	23,5 (4/17)
Alteração de tamanho + Hiperecogenicidade	17,6 (3/17)
Sinal medular + Hiperecogenicidade	17,6 (3/17)
Redução da definição córtico medular + Hiperecogenicidade	11,8 (2/17)

## DISCUSSÃO

Atualmente, a ultrassonografia é um procedimento de rotina em medicina veterinária, especialmente na avaliação do paciente com suspeita de disfunção renal (Pennick e D'Anjou, 2015). Em pacientes criticamente enfermos é necessário a utilização de exames rápidos que auxiliem no diagnóstico e conduta clínica dos mesmos, uma vez que a instabilidade hemodinâmica e a urgência por condutas rápidas dificultam uma avaliação clínica adequada, sendo a ultrassonografia uma ferramenta promissora para este fim (Sivit, 2005; Byrne e Hwang, 2011; Amber *et al.*, 2013; Faubel *et al.*, 2014; Segev *et al.*, 2016).

As comparações entre presença de alterações ultrassonográficas o Sistema IRIS e a cistatina C, sugerem boa sensibilidade da ultrassonografia, apesar, da baixa especificidade já citada pela literatura (Nyland *et al.*, 2005; Riccabona, 2006; Keyserling *et al.*, 2103). Como demonstrado por Quiaia e Bertolotto (2002) que consideraram que a mesma possui 62 a 77% de sensibilidade e 58 a 73% de especificidade, além de valor preditivo positivo de 92% para detecção de alterações microscópicas no parênquima.

Neste estudo, observou-se que dentre os animais classificados pelos critérios supracitados, alguns apresentaram ultrassonografia normal (Tab. 17 e 18). Essa contradição aparente pode ser justificada uma vez que em estágios iniciais da disfunção renal, muitos pacientes apresentam rins normais ao ultrassom, entretanto, após a progressão da lesão, alterações se manifestarão (Sivit, 2006; Licurse *et al.*, 2010; Siddappa *et al.*, 2013). Estima-se que alterações ultrassonográficas renais ocorram em aproximadamente 10% dos pacientes com IRA (Rivera, 2014). Entretanto Amber, *et al.*, (2013) observaram alterações em 38% dos pacientes. Já Bragatto (2015) observou que a maioria dos animais tratados com gentamicina apresentaram alterações ultrassonográficas.

Dentre os 28 pacientes avaliados na UTI apenas um animal apresentou alteração somente ao exame ultrassonográfico. Este achado não pôde ser correlacionado à presença de lesão renal dentre os marcadores utilizados, permanecendo assim, a possibilidade de que esta alteração possa está relacionada àquelas descritas em animais idosos sem doença renal (Seoane, 2010; Pennick e D'Anjou, 2015) indicando neste caso, a necessidade de uma avaliação mais criteriosa.

A maioria dos animais deste estudo foi classificada no estágio 1 de IRA pelo o critério IRIS (2013) durante sua permanência na UTI, ou seja, os valores séricos de creatinina estavam abaixo da referência (Tab. 15 do ArtigoIII). Esses dados corroboram outros relatos da literatura a qual demonstra que a maioria dos cães críticos, com diagnóstico de IRA, encontrava-se nos estágios iniciais de lesão renal (Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Segev *et al.*, 2015). Nesse estudo, a cistatina C foi mais eficiente e precoce no diagnóstico do que o critério IRIS. Estes achados enfatizam as dificuldades de diagnóstico precoce de IRA em animais criticamente enfermos, uma vez que estes biomarcadores, cistatina C e critério IRIS, não estão disponíveis na rotina clínica, o que também sinaliza a necessidade de uso de biomarcadores mais acessíveis (Coca *et al.*, 2008, Endre e Westhuyzen, 2008; Bennet e Devarajan, 2011). E também demonstram que terapias direcionadas para disfunção renal devem ser iniciadas imediatamente, mesmo se a creatinina sérica estiver dentro do intervalo de referência, conforme relatam Segev *et al.* (2015).

Neste sentido, a prevalência de animais em estágio iniciais de disfunção renal evidenciada pelo critério IRIS, enfatiza a necessidade de utilização de outras modalidades de diagnóstico, com a finalidade de auxiliar o clínico a reconhecer mais precocemente os pacientes acometidos. Deve-se considerar ainda, que o Sistema IRIS (2013) não é o critério de rotina para classificação de IRA, uma vez que é utilizado apenas por nefrologistas, reforçando, portanto, a utilização da ultrassonografia como método complementar em pacientes de risco, por sua maior

disponibilidade e rapidez. Esse dado é demonstrado nos animais do “estágio 1”, nos quais os valores de creatinina estão dentro dos limites de referência. Neste grupo havia onze animais, dos quais oito apresentaram alterações ultrassonográficas, reforçando mais uma vez a sensibilidade deste exame para evidenciar presença de lesão renal, conforme também demonstrado por Bragato (2015). Neste estudo, em relação aos animais em estágios mais avançados de classificação (estágios 2 e 3), nos quais a azotemia já estava estabelecida e aumentou proporcionalmente com a gravidade da lesão, o exame ultrassonográfico apresentou correlação significativa com os estágios de IRA, corroborando a literatura a qual considera que a sensibilidade da técnica aumenta com a gravidade da lesão renal podendo chegar a 93% em graus mais acentuados (Thompson e Bhatt, 2014; Licurse *et al.*, 2016). A ultrassonografia também acrescenta informações acerca da provável etiologia, prognóstico e evolução do tratamento através de exames seriados (Yang *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010).

Neste estudo, ao comparar à presença de alteração ultrassonográfica com critério IRIS a avaliação ultrassonográfica foi apresentada boa sensibilidade, (Tab.17), uma vez que detectou lesão renal em seis animais inicialmente classificados como “normais” pelo sistema IRIS (2013). Entretanto, cinco destes animais apresentaram elevação dos níveis séricos de cistatina C, um biomarcador com maior correlação com a TFG (Grubb, 2011), o qual confirma a presença de lesão renal, não evidenciada pelo critério IRIS. Portanto, neste estudo, o ultrassom revelou-se um método eficiente e sensível na detecção precoce de IRA em pacientes críticos.

A ultrassonografia também apresentou boa sensibilidade quando se comparou com biomarcador cistatina C (Tab. 18). Entretanto, dentre os seis animais classificados como “normais”, dois apresentaram alterações ao ultrassom, sendo que um destes foi classificado em estágio I pelo critério IRIS, justificando assim a presença da alteração evidenciada pelo ultrassom. Vale ressaltar, que a cistatina C, foi um marcador precoce que o critério IRIS, detectando IRA em nove animais nas primeiras 24 horas após admissão no UTI, sendo que oito apresentaram alterações ultrassonográficas. Segundo a literatura, a ultrassonografia possui valor preditivo positivo de 67% para detecção de lesão renal, além de estar associada a processos inflamatórios confirmados pela análise histológica (Araújo *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Garreballah *et al.*, 2015).

Os dados deste estudo demonstram que alterações ultrassonográficas refletem a gravidade das anormalidades funcionais renais e, portanto, a percepção de que a ultrassonografia auxilia na avaliação da função renal, deve ser considerada (Page *et al.*, 1994; Beland *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Licurse *et al.*, 2010; Vinayaka *et al.*, 2016).

Apesar da elevada sensibilidade da avaliação ultrassonográfica, evidenciada neste estudo, o desempenho de um biomarcador deve analisar também sua especificidade, neste sentido, este método não foi capaz de distinguir patologias específicas, tornando necessária a avaliação histológica para diagnóstico definitivo. Logo, esta técnica apresenta baixa especificidade, embora seja importante para direcionamento da coleta de material histológico (Nyland *et al.*, 2005; Keyserling *et al.*, 2003; O’Neill, 2014). Entretanto, este estudo evidenciou que apesar de pouco específica, sua importância não deve ser questionada, pois é a técnica mais disponível e segura para avaliar pacientes com IRA e principalmente aqueles criticamente enfermos, a qual pode ser realizada a beira do leito (Araujo *et al.*, 2010; Byrne e Hwang, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Vinayaka *et al.*, 2016). Portanto, mesmo que o diagnóstico específico não seja alcançado pelo método, este propicia informações suficientes para direcionar procedimentos futuros (Silva *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Halasc Vac, 2014; Kristoffer *et al.*, 2016).

Diferentes alterações ultrassonográficas foram evidenciadas neste estudo (Tab.19 e Fig.14). Dentre as alterações morfológicas avaliadas, houve prevalência da hiperecogenicidade cortical (Fig.14 A). Esta é descrita como a alteração mais frequentemente encontrada em animais e

humanos com disfunção renal aguda ou crônica, contudo não é específica, pois se correlaciona a diversas patologias como glomerulonefrite, necrose tubular aguda, nefrocalcionose, dentre outras. A literatura considera que nos casos de IRA, a hiperecogenicidade se deve à presença de infiltrado inflamatório, proteínas, cilindros e cálcio, e está diretamente relacionada à presença de alterações intersticiais e perda de função renal (Halloway e O'Brien, 2007; Bokhari *et al.*, 2012; Thompson e Bhatt, 2014; Pennick e D'Anjou, 2015; Garreballah *et al.*, 2015; Schmidt, 2015). Correlação entre a hiperecogenicidade cortical, anormalidades histológicas e aumentos de creatinina sérica foram relatadas em estudos anteriores, sugerindo que pacientes de alto risco podem ser identificados como portadores de lesão renal, através da alteração (Araujo *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Bragato, 2015; Vinayaka *et al.*, 2016). Portanto, devido à sua alta prevalência a hiperecogenicidade cortical pode representar um sinal sentinela de disfunção renal, naqueles animais com valores séricos de creatinina dentro da normalidade (<1,6mg/dl), se os mesmos possuem fatores de risco para o desenvolvimento de disfunção renal, como observado neste estudo com animais do estágio 1 de classificação IRIS e aqueles detectados precocemente pelo biomarcador cistatina C, ressaltando mais uma vez, que estas metodologias não são ainda utilizadas na rotina clínica. Nestes pacientes, a presença de córtex hiperecoica à ultrassonografia, confirmou a ocorrência de alterações intersticiais em fase inicial, evidenciada pelos critérios utilizados e anteriores aos aumentos séricos de creatinina.

Dentre os animais em estágios 2 e 3 de IRA, classificados pelo critério IRIS, a presença de rins hiperecoicos se correlacionou às elevações de creatinina sérica e/ou de cistatina C. Corroborando assim estudos anteriores, a qual considera que a hiperecogenicidade possui elevada especificidade e valor preditivo positivo para presença de doenças renais (Faubel *et al.*, 2014) e também que avaliações ultrassonográficas foram capazes de detectar lesão renal antes dos exames laboratoriais de rotina se tornarem alterados (Mirjana *et al.*, 2001; Bragato, 2015; Vinayaka *et al.*, 2016).

Outra alteração ultrassonográfica renal evidenciada neste estudo foi a hipoeecogenicidade cortical, que ocorreu em dois animais, os quais estavam em estágio 1 de classificação IRIS e ambos com cistatina C elevada (Tab.19; Fig.14B)). Esse achado, de acordo com a literatura reflete a presença de edema intersticial, processos inflamatórios graves ou de isquemia e acomete principalmente pacientes com sepse (D'Anjou, 2008; Faubel *et al.*, 2014).

Neste estudo, evidenciou-se a dificuldade de caracterização precisa do tamanho renal, uma vez que esta variável está sujeita a maior imprecisão técnica devido ao grande intervalo de referência proposto pela literatura veterinária, além de ser influenciada pelo peso, raça e conformação corporal do animal. Esses fatores limitam sua aplicação na prática clínica (Nyland *et al.*, 2005; D'Anjou e Pennick, 2015). Deve-se considerar que a avaliação do tamanho renal nos pacientes com IRA tem valor limitado, devido ao desconhecimento do tamanho renal normal para aquele indivíduo. Portanto, a avaliação renal seriada é essencial para detectar aumentos discretos de tamanho além de servir como indicador prognóstico (O'Neill, 2014; Bragato, 2015; Pennink e D'Anjou, 2015). Neste estudo, dentre os animais com renomegalia, não houve aumento de tamanho renal superior aos valores de referência propostos pela literatura (Barr *et al.*, 1990). Além disso, visando aumentar a confiabilidade das medidas renais, obteve-se a média, a partir de três mensurações longitudinais renais, as quais se tornaram referência individual, da mesma forma que sugerem alguns trabalhos (Santos *et al.*, 2012; Bragato, 2015). Para o diagnóstico de renomegalia, considerou-se a variação do tamanho em comparação com o valor inicial obtido, como sugerido pela literatura (Yang *et al.*, 2001; Hechte e Henry, 2011; Bragato, 2015). A renomegalia foi observada em apenas três animais deste estudo, frequência está menor do que a relatada pela literatura, e pode ser justificada pelas limitações citadas anteriormente e pela fase aguda e inicial do processo inflamatório, quando os rins podem ter tamanho normal (Vourganti *et al.*, 2006; O'Neill, 2014; Rivera, 2014). Contudo, os cães com renomegalia foram classificados nos estágios 1 ou 2 pelo critério IRIS e também apresentaram

elevação de cistatina C sérica, justificando assim uma associação entre esta alteração e a presença de lesão renal, fato esse também observado por Bragato (2015) ao avaliar cães com injúria nefrotóxica. Alterações de tamanho renal, como renomegalia, são consideradas comuns em pacientes com IRA, geralmente decorrente da presença de edema intersticial, inflamação e congestão renal (Vourganti *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2010; Rivera, 2014, Thompson e Bhatt, 2014; Pennick e D'Anjou, 2015). Entretanto, a ocorrência da mesma varia de acordo com a intensidade e duração do insulto, bem como o grau de hidratação do paciente (Bokhari *et al.*, 2012; Schmidt, 2015).

Interessante observar que, aumento de espessura cortical ocorreu em quatro animais neste estudo (Tab.19). A hipertrofia da cortical refere-se à aumento da relação entre o córtex e a medula renal e indica a ocorrência de edema associada a inflamação (Fig. 14-C e D). Portanto, este parâmetro evidencia que houve variação difusa do tamanho da região cortical, sem aumento direto do rim. Essa observação sugere que esta alteração, pode ser um bom indicador para avaliação de tamanho renal, uma vez que ainda não existe uma forma confiável de se avaliar com precisão este parâmetro em cães. Além disso, esse achado corrobora a literatura que aponta a correlação entre aumento de espessura cortical e presença lesão renal aguda (Pennick e D'Anjou, 2015; Yamashita *et al.*, 2015).

A alteração ultrassonográfica denominada de sinal medular foi observada em três animais (Tab. 19; Fig. 14 B e E), os quais também apresentaram elevação de cistatina C e o Sistema IRIS (2013) classificou dois. Embora sua ocorrência seja considerada comum em cães saudáveis e de raças pequenas, os dados observados neste estudo evidenciam sua correlação com a presença de lesão renal, justificada por alterações nos valores dos marcadores utilizados. Reiterando assim a necessidade de associar este parâmetro com dados clínicos e laboratoriais para avaliar seu real significado clínico (Mantis e Lamb, 2000; Hart *et al.*, 2013; Halasc Vac, 2014; Pennick e D'Anjou, 2015).

Neste estudo, observou-se que dois animais apresentaram diminuição da definição corticomedular, e que ambos estavam em estágio 2 pela classificação IRIS, e também apresentaram elevação sérica de cistatina C sérica (Tab. 19; Fig. 14F). Perda de diferenciação entre o córtex e a medula renal é uma alteração ultrassonográfica que pode ocorrer tanto em cães com IRA quanto com DRC, entretanto por mecanismos diferentes (Pennick e D'Anjou, 2015). A análise desta diferenciação depende da presença e da intensidade da lesão renal em ambas, cortical e medular. Gareeballah *et al.* (2015), em estudo sobre alterações ultrassonográficas renais em humanos, observou que 85% dos pacientes com IRA apresentaram redução da definição cortico medular. Provavelmente, a menor prevalência de animais com esta alteração nesse estudo, reflete menor intensidade do insulto renal, bem como a prevalência de lesões glomerulares em cães, as quais afetam predominantemente a região cortical não acarretando perda na diferenciação entre córtex e medula (Lees, 2004; Mugford *et al.*, 2013; Pennick e D'Anjou, 2015). Consequentemente, justifica também o achado, mais comum de hiperecogenicidade cortical observada nos animais deste estudo (Tab. 19).

Este estudo demonstrou correlação positiva entre as alterações ultrassonográficas o critério IRIS e elevações de cistatina C, e, portanto, que as mesmas estão associadas ao desenvolvimento de lesão renal. Também foram mais precoces que elevações de creatinina sérica acima da referência, critério usado na rotina clínica como forma de diagnóstico de IRA em cães. Logo, a ultrassonografia é uma ferramenta útil no diagnóstico e acompanhamento de animais com IRA, a qual pode avaliar também resposta ao tratamento e possíveis complicações através de exames seriados (Yang *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2010).

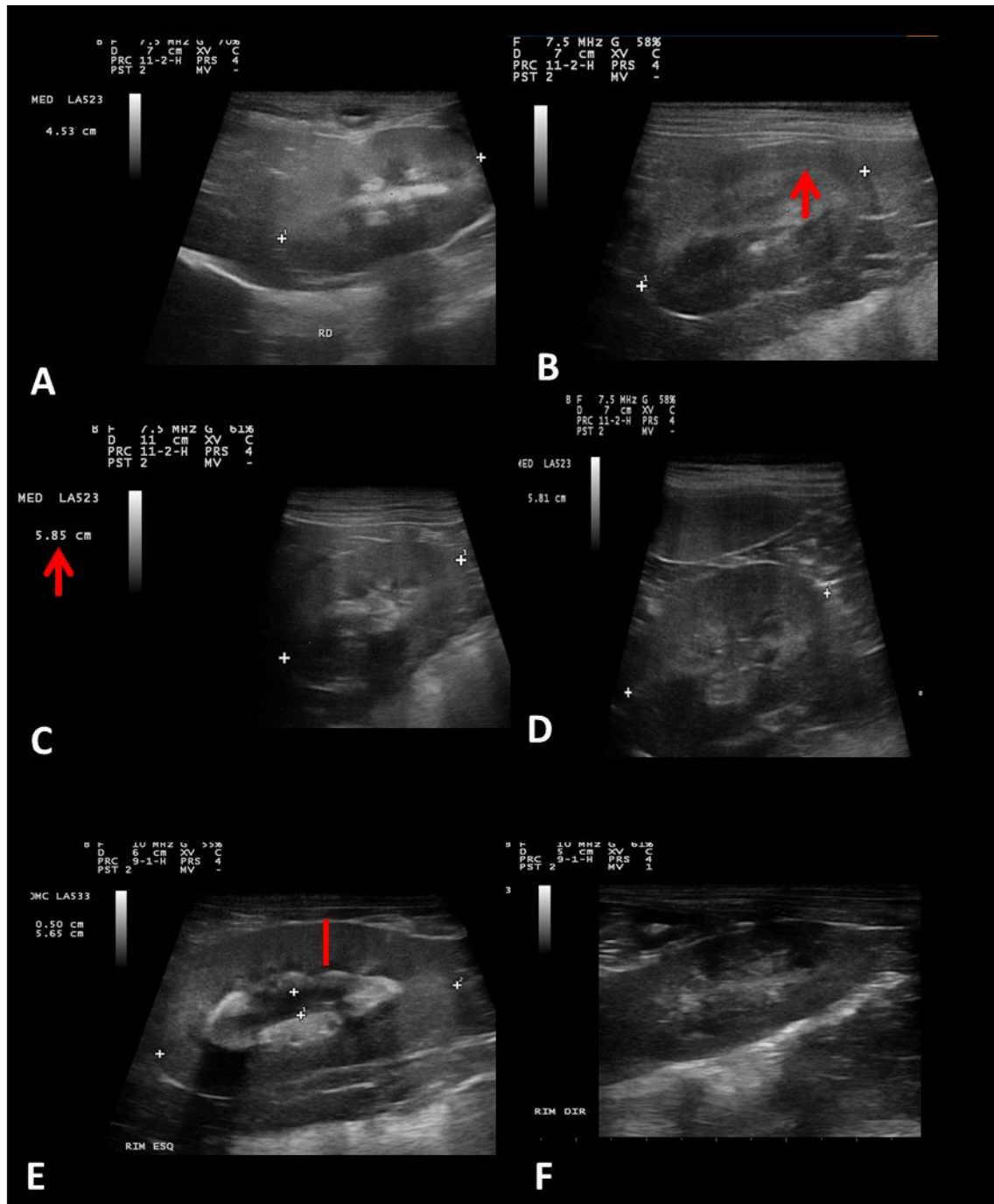


Figura 14. Fotografias de ultrassonografias em cortes longitudinais (A - F). A) Animal 4, SRD, fêmea, 08 anos. Intoxicação por anti-inflamatório. Rim direito. Córtex hiperecoica e manutenção da definição córtico medular. CTI, 24 horas. B) Animal 26, SRD, macho, 05 anos. Pós cirúrgico de ruptura intestinal. Rim esquerdo. Hipoeogenicidade associada a linha hiperecoica entre a região cortical e medular (sinal medular; seta vermelha). CTI, 72 horas. C e D) Animal 2, Fox Paulistinha, macho, 12 anos. Pós-cirúrgico de abscesso hepático. Rim esquerdo. C) Renomegalia (seta vermelha) com córtex hiperecoica, aumento de espessura da região cortical e integridade córtico medular. CTI, 24 horas. D) Córtex hiperecoica, aumento de espessura da região cortical e integridade córtico medular. CTI, 72 horas. E) Animal 5, Yorkshire, fêmea, 10 anos. Pielonefrite. Rim esquerdo. Aumento de espessura cortical (barra vermelha), córtex hiperecoica, sinal medular, dilatação discreta de pelve renal. F) Animal 13, Poodle, macho, 05 anos. Doença periodontal. Rim direito. Hipereogenicidade das regiões cortical e medular resultando em redução da sua definição.

## CONCLUSÕES

A comparação do desempenho da avaliação das alterações ultrassonográficas renais com o sistema IRIS (2013) e a cistatina C sérica, na detecção precoce de IRA em cães críticos em UTI, permite concluir que a ultrassonografia pode ser usada na investigação inicial do paciente com suspeita de lesão renal, por demonstrar evidência de alteração parenquimatosa e por ser um procedimento seguro, não invasivo, disponível e eficiente em pacientes de UTI. Entretanto, a mesma não deve ser utilizada isoladamente, como forma de diagnóstico.

Aumento de ecogenicidade cortical renal é a alteração mais prevalente em pacientes criticamente enfermos e possui correlação com aumentos séricos de creatinina e cistatina C e está associada a presença de lesão estrutural renal.

Aumento de tamanho renal é indicador de lesão renal aguda, em avaliações seriadas.

A hipocogenicidade cortical renal, sinal medular e diminuição da definição cortico medular são elementos importantes no diagnóstico de lesão renal e precisam ser correlacionados com alterações laboratoriais.



## ARTIGO V

# MARCADORES URINÁRIOS E SÉRICOS NO DIAGNÓSTICO DE IRA EM CÃES CRITICAMENTE ENFERMOS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

## INTRODUÇÃO

A injúria renal aguda (IRA) é uma complicação comum em cães internados na unidade de terapia intensiva (UTI, com uma taxa de mortalidade entre 54% a 86%, a qual está associada a causa e severidade da lesão renal, as comorbidades e complicações existentes nestes pacientes, bem como a disponibilidade de tratamento adequado (Kenney *et al.*, 2010; Ross, 2011; Shoukath e Patil, 2014; Segev *et al.*, 2015). Apesar de sua importância clínica, seu diagnóstico ainda é um desafio, principalmente devido a utilização de parâmetros pouco sensíveis e específicos. O que torna necessário a utilização de metodologias que detectem pequenos declínios da função renal quando as alterações são potencialmente reversíveis (Sodrè *et al.*, 2007; Eldestein e Faubel, 2011)

Dentre os testes laboratoriais para avaliação da função renal, a taxa de filtração glomerular é considerada “teste ouro”. Porém, o método é trabalhoso e de difícil realização na rotina clínica, principalmente em unidades de terapia intensiva onde a função renal tende a alterar rapidamente (Linnetz e Graves, 2010; Myagawa *et al.*, 2010; Hendy-Willson e Pressler, 2011; Kirwan *et al.*, 2013). Neste sentido, os métodos mais utilizados são dosagem de ureia e a creatinina séricas, consideradas, entretanto, pouco sensíveis e específicas para detecção de graus leves de perda de função renal, limitando a intervenção adequada com maiores opções terapêutica. Esses marcadores são funcionais e não reflete diretamente a lesão celular, o que justifica o atraso na sua elevação. Por este motivo, o estudo e emprego de parâmetros bioquímicos e urinários que detectem estádios iniciais e acompanham a evolução da função renal, tem se tornado cada vez mais frequente (Lefebvre, 2011; Martenson *et al.*, 2012; Steinbach *et al.*, 2014).

Devido às dificuldades de se estabelecer o diagnóstico preciso da IRA em pacientes de UTI baseado apenas na avaliação clínica, enfatiza-se a necessidade de utilização conjunta de vários parâmetros bioquímicos e urinários visando a detecção precoce uma vez que a IRA pode ter seu curso minimizado quando reconhecida e tratada adequadamente (IRIS, 2013; Segev *et al.*, 2016).

O presente estudo foi motivado pela alta incidência de IRA em cães hospitalizados, principalmente em UTI e pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade, que dificultam o desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento desta condição clínica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de metodologias disponíveis na rotina clínica como urinálise, débito urinário, relação proteína creatinina urinária (UPC) e gama glutamil transferase (GGT) urinária para diagnóstico de injúria renal aguda em cães em unidade de terapia intensiva.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 28 cães internados na UTI do HV/UFMG com idade entre 2 a 16 anos (média 7,9 ±4,4), pesos entre 2 a 40 kg (média 12,57 ±11,07), sendo 12 machos e 16 fêmeas, de diferentes raças. Estes apresentavam fatores de risco para IRA, entretanto, com creatinina sérica < 1,6 mg/dl. Os animais foram acompanhados por 72 horas, durante este período foram coletados sangue e urina para análise.

Foram coletadas amostras de urina por cistocentese ou sonda uretral para exame de urinálise e bioquímica urinária. Na bioquímica urinária foi mensurada creatinina (método enzimático), proteína total (vermelho de pirogalol) para avaliação da razão proteína e creatinina urinárias (UPC) e também foi avaliada a concentração de gama glutamil transferase (GGT) (método cinético), utilizando-se kits comerciais (Labtest®) com leitura em espectrofotômetro automatizado (COBAS MIRA PLUS- ROCHE®).

Foram coletados sangue e armazenados em frascos com anticoagulante (EDTA-10%) para hemograma e sem anticoagulante para bioquímica sérica. Nesta foram mensuradas creatinina (método enzimático), ureia (método enzimático), proteína total (método biureto), albumina (método verde de bromocresol).

Para dosagem de cistatina C foi utilizado o *Kit Cistatina C turbiquet Plus Labtest®*, com calibrador canino (Cystatin C Canine E. coli; RD472009100), as leituras foram realizadas no aparelho COBAS MIRA PLUS (Roche®) do Laboratório Patologia Clínica do HV/UFGM.

A taxa de filtração glomerular (TFG) foi realizada em período de 60 minutos, utilizando a ultrassonografia para cálculo do volume urinário vesical. Primeiramente o animal foi sondado, realizado esvaziamento da bexiga e cálculo do volume residual da urina utilizando o ultrassom, este tempo foi considerado inicial (T0). Após 60 minutos foi mensurada a quantidade de urina no coletor e novamente a quantidade de urina na bexiga através do ultrassom (T1). Para o cálculo do volume urinário total, foi somada a quantidade de urina no coletor mais a quantidade de urina na bexiga (T1), subtraindo-se quantidade de urina na bexiga em T0. Foi então dosado a concentração sérica e urinária de creatinina. A TFG foi calculada pela fórmula:

$TFG = \frac{\text{Creatinina urina (mg/dl)} \times \text{Volume de urina (ml)}}{\text{Creatinina sérica (mg/dl)} \times 60 \text{ min} \times \text{peso do animal}}$

O valor considerado normal para cães foi de 2 a 3ml/min/kg (Grauer, 2009).

## RESULTADOS

Dentre os cães avaliados haviam 44% (12/28) machos e 56% (16/28) fêmeas. Quanto à idade, a média foi de  $7,9 \pm 4,14$  anos com variação de 2 a 16 anos e peso em média  $12,57 \pm 11,07$  kg (2 a 40 Kg). Não houve relação entre as características individuais (sexo, idade, raça) e o desenvolvimento de injúria renal aguda

Quanto à avaliação de parâmetros hematológicos, consideraram-se as médias de hemácias e leucócitos. As amostras apresentavam valores médios de  $4.008.000/\text{mm}^3$  de hemácias e  $31.427/\text{mm}^3$  de leucócitos. Houve redução significativa dos valores de hemácias, nos diferentes tempos avaliados. Não houve diferença significativa entre os tempos analisados, para as contagens de leucócitos (Tab. 20)

Tabela 20. Médias seguidas de desvio padrão (s) de hemácias e leucócitos de cães admitidos no UTI do HV-UFGM.

Analito	Tempo de análise		
	24h	48 h	p
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	$5,05 \pm 1,6^a$	$4,39 \pm 1,7^b$	$p=0,036$
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	$18,91 \pm 15,33^a$	$35,107 \pm 31,571^a$	$p=0,17$

Para letras minúsculas iguais na mesma linha, não há diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). Valores de referência: Hemácias ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ): 5,5 a 8,5; Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ): 6-17 (Trall, 2007)

Os valores de referência para albumina sérica são descritos na literatura entre 2,3 a 3,1 mg/dl. Neste estudo, hipoalbuminemia foi observada em 60,7% (17/28) dos pacientes (Tab. 24). Não houve diferença significativa entre os valores médios de albumina sérica, nos diferentes períodos (0, 24 e 48 horas) avaliados (Tab. 25).

Tabela 21. Concentrações médias e desvios padrão da creatinina, ureia e albumina séricas de cães admitidos no UTI do HV-UFGM.

Analito	Valores séricos
Creatinina (mg/dl)	1,04±0,65
Ureia (mg/dl)	72,00 ±49,26
Albumina (mg/dl)	1,97±0,59

Valores de referência: creatinina < 1,6 mg/dl; ureia: 20-56 mg/dl; Albumina 2,3-3,1 mg/dl (Trall, 2007)

Dentre os animais avaliados ocorreu aumento relação proteína creatinina urinária (UPC) em 78,5% (22/26) e aumentos de GGT urinária em 53,6% (15/28) (Tab.22). Não houve diferença significativa entre os valores médios destes analitos nos diferentes períodos (0, 24 e 48 horas) avaliados (Tab. 25)

Tabela 22. Percentual de detecção de injúria renal aguda considerando relação proteína creatinina urinária (UPC) e gama glutamil tranferase (GGT) urinária de cães admitidos no UTI do HV-UFGM.

Referência*	UPC URINÁRIA		GGT URINÁRIA	
Normal	15,4%	(4/26)	46,4%	(13/28)
Aumentada	78,5 %	(22/26)	53,6%	(15/28)

\* Valores normais de UPC normal <0,5 (Grauer, 2011); de GGT 13-92 UI/L (Deschepper *et al.*, 1989).

O monitoramento longitudinal da creatinina evidenciou azotemia a partir de 48 horas em 28,6% (8/28) dos pacientes e aumentos de cistatina C foi observado em 78,6% (22/28) dos animais (tab.23). Não houve diferença significativa entre os valores médios destes analitos nos diferentes períodos (0, 24 e 48 horas) avaliados (Tab. 25)

Tabela 23. Percentual de detecção de injúria renal aguda considerando creatinina sérica e cistatina C de cães admitidos no UTI do HV-UFGM.

Referência*	CREATININA SÉRICA		CISTATINA C SÉRICA	
Normal	71,4%	(20/28)	21,4%	(6/28)
IRA	28,5%	(8/28)	78,6%	(22/28)

\* Valores normais de creatinina  $\leq 1,6$  mg/dl (IRIS, 2013); cistatina C  $<1,29$  mg/L

Tabela 24. Percentual de pacientes com hipoalbuminemia durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM.

Referência	Albumina (sérica)	
Normal *	39,3 %	(11/28)
Diminuído	60,7 %	(17/28)

\* Valores normais de albumina: 2,3 – 3,1mg/dL (Trall, 2007)

Tabela 25. Concentração de creatinina, cistatina C e albumina séricas; relação proteína creatinina urinárias (UPC) e gama glutamil transferase (GGT) urinária de cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM.

Analito	Tempo de análise		
	24h	48h	72 h
Creatinina sérica (mg/dl)	0,96 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	1,23 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	0,89 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>
Cistatina C sérica (mg/L)	1,21 $\pm$ 0,217 <sup>a</sup>	1,37 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>
Albumina sérica (g/dl)	2,28 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	2,03 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	1,74 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>
UPC urinária	1,04 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	1,12 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>
GGT urinária (UI/L)	125,09 $\pm$ 90,42 <sup>a</sup>	154,17 $\pm$ 189,49 <sup>a</sup>	61,89 $\pm$ 37,73 <sup>a</sup>

\* Para letras minúsculas iguais na mesma linha, não há diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ). Valores de referência: creatinina  $\leq 1,6$  mg/dl (IRIS, 2013); cistatina C  $<1,29$  mg/L; UPC normal  $<0,5$  (Grauer, 2011); de GGT 13-92 UI/L (Deschepper *et al.*, 1989); albumina: 2,3 – 3,1mg/dl (Trall, 2007).

O sedimento urinário ativo foi observado em 78,6% (22/28) dos animais (Tab.26).

Tabela 26. Percentual de pacientes com sedimento urinário ativo durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM

Referência	Sedimento urinário	
Normal*	21,4%	(6/28)
Ativo **	78,6 %	(22/28)

\*Normal: ausência de cilindros, hemácias, leucócitos e células renais ou vesicais; \*\*Ativo: presença de cilindros, hemácias, leucócitos e células renais ou vesicais

A TFG foi realizada em 8 cães e apresentou-se reduzida em 62,5% (Tab. 27). O débito urinário estava reduzido em 39,3% (11/28) dos pacientes (Tab. 27).

Tabela 27. Percentual de pacientes com alterações na TFG e débito urinário, durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM

Referência	TFG		Débito urinário	
Normal *	37,5%	(3/8)	60,7%	(17/28)
Diminuída	62,5%	(5/8)	39,3%	(11/28)

\* Valores normais de débito urinário: 1mL/kg/h (IRIS, 2013)

\* Valores normais de TFG: 2,8 a 3,71mL/min/Kg (Grauer, 2009)

A taxa de mortalidade observada neste estudo foi 32,1% (9/28). Foram observadas correlações significativas entre desfecho (alta ou óbito) e o tempo de permanência na UTI, valores séricos de creatinina, albumina, hemácias, leucócitos. Correlação negativa moderada e significativa entre a taxa de mortalidade e os valores séricos de creatinina ( $r = -0,44$ ), bem como com o de albumina ( $r = -0,51$ ) e hemácias ( $r = -0,41$ ). Também houve correlação fraca, porém significativa entre a taxa de mortalidade e a contagem global de leucócitos ( $r = 0,35$ ). Observou correlação positiva, moderada e significativa entre a taxa de mortalidade e maior gravidade do diagnóstico ( $r = 0,63$ ). Observou-se correlação moderada e significativa entre UPC e sedimento urinário ativo ( $r = 0,46$ ), e também correlação positiva, forte e significativa entre o débito urinário e a TFG ( $r = 0,79$ ). Entre as demais variáveis analisadas não houve associação de relevância estatística (Tab. 28).

Tabela 28. Correlação ( $r$ ) entre as variáveis analisadas nas amostras de cães durante a permanência na unidade de terapia intensiva do HV-UFGM

VARIÁVEL (1)	VARIÁVEL (2)	CORRELAÇÃO	
		$r$	p (valor)
CREATININA SÉRICA	Mortalidade	-0,44	0,0001
ALBUMINA SÉRICA	Mortalidade	-0,51	0,001
HEMÁCIAS	Mortalidade	-0,41	0,004
LEUCÓCITOS	Mortalidade	0,35	0,014
DIAGNÓSTICO	Mortalidade	0,63	0,001
SEDIMENTO URINÁRIO	UPC	0,46	0,0019
DÉBITO URINÁRIO	TFG	0,79	0,011
CREATININA SÉRICA	ALBUMINA	0,42	0,0009

## DISCUSSÃO

A lesão renal aguda (IRA) é uma síndrome complexa que ocorre em situações clínicas variadas e muitas vezes, associada a evolução desfavorável. Existe grande variação nos números relativos às incidência e prevalência da IRA, a qual pode ser explicada pela diversidade de definições utilizadas (Bellomo *et al.*, 2004; Grauer, 2009; Sharma, 2012). Atualmente, tem-se observado o aumento da incidência, taxa de mortalidade e custos de tratamento, apesar do avanço no conhecimento sobre sua fisiopatologia, principalmente em veterinária para a qual a diálise nem sempre é uma opção terapêutica disponível. Vale ressaltar que detectar precocemente e tratar efetivamente permitem intervenções reno protetoras a fim de evitar sua progressão (Sodre *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2012; Segev *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008; Buvic, 2009; Veado *et al.*, 2010; Mugford *et al.*, 2015).

Neste estudo foram avaliados 28 cães internados na UTI do Hospital Veterinário da UFMG, durante o período de janeiro a junho de 2016. As características clínicas e demográficas dos pacientes neste estudo apresentam similaridade com as da amostra avaliada por Lee *et al.* (2011) no cenário de terapia intensiva. Ambos estudos demonstram a inexistência de relação entre as características individuais (sexo, idade, raça) e o desenvolvimento de injúria renal aguda.

A IRA hospitalar, em especial em pacientes de UTI, é considerada grave com predomínio de insuficiência múltipla de órgãos e complicações de outras doenças (Bucuvic, 2009; Okamoto *et al.*, 2012; Rodrigo *et al.*, 2016). O motivo da internação foi clínico em 53,6% e cirúrgico em 42,8% dos casos. Observou-se uma correlação positiva e significativa entre a gravidade diagnóstica e a mortalidade (Tab. 28) sendo que 70% dos animais graves vieram a óbito. A evolução desfavorável nestes pacientes justifica-se pela gravidade diagnóstica dos mesmos corroborando os dados da literatura (Metha *et al.*, 2011; Thoen e Kerl, 2011; Harrisson *et al.*, 2012; Souza, 2012; Santos e Marinho, 2013; Gomes, 2014). Portanto, a mortalidade evidenciada neste estudo não pode ser creditada à disfunção renal, uma vez que os valores séricos de creatinina não apresentaram aumento significativo na maioria dos pacientes (71,4%; 20/28), o que também justifica a ocorrência de lesão renal leve nestes (Tab. 23). Segundo a literatura, o prognóstico dos animais afetados com IRA está diretamente relacionado a sua etiologia, severidade da doença e as comorbidades apresentadas (Harrisson *et al.*, 2012; Segev *et al.*, 2016).

Nesse estudo, observou-se uma associação negativa ( $r = -0,44$ ) e significativa entre valores de creatinina e mortalidade (Tab. 28). Redução de creatinina sérica prevaleceu entre os animais que vieram a óbito. Este fato já foi descrito anteriormente em medicina e é justificado pela desnutrição, sobrecarga volêmica e menor produção associada ao processo inflamatório; fatores que influenciam diretamente na diminuição da creatinina sérica e na taxa de mortalidade (Souza, 2012). Ressalta-se que esta relação ainda não foi relatada em veterinária, o que torna necessário outros estudos, com maior número de animais a fim de se confirmar esta possibilidade.

Não há na literatura, consenso sobre a definição de IRA, o que dificulta a realização de estudos epidemiológicos comparativos, permitindo uma grande variedade dos resultados (Bellomo *et al.*, 2004; Vadya *et al.*, 200; Segev *et al.*, 2015; Rodrigo *et al.*, 2016). A função renal é normalmente avaliada através da dosagem sérica de creatinina, por ser uma técnica simples e barata e amplamente disponível, entretanto, a medida deste analito apresenta limitações, como interferência de fatores extra renais (Lees, 2004; Dalton, 2011; Lefebvre, 2011). A interpretação deste parâmetro permanece um desafio para os clínicos, especialmente em valores próximos do limite máximo de referência, onde alguns animais podem ter diminuição da TFG e ocorrer aumento dos valores de creatinina, porém, sem exceder o limite de referência. Isto significa que uma doença renal inicial pode ainda apresentar concentração sérica de creatinina dentro do

intervalo de referência para a espécie, dificultando sua utilização na detecção de estágios iniciais da doença renal (Braun *et al.*, 2003; Lees, 2004; Brown, 2007; Silva e Brune, 2011). Em pacientes críticos, considera-se que a utilização dos valores de creatinina sérica é pouco sensível e seu aumento, defasado em relação à piora da TFG e subestima a gravidade da disfunção renal (Murray *et al.*, 2008; Perianayagam *et al.*, 2009; Dirkes, 2011; Steinbach *et al.*, 2014; Shoukath e Patil, 2014). Nestes pacientes, a instabilidade hemodinâmica faz com que os determinantes da concentração de creatinina sérica, como produção, volume de distribuição e eliminação alterem devido as condições instáveis dos mesmos e a fatores como expansão volêmica e estado inflamatório, provocando assim, atraso na elevação da creatinina em relação a queda de filtração glomerular (Bellomo *et al.*, 2004; Coca *et al.* 2008; Nguyen e Devarajan, 2008). O balanço hídrico positivo é considerado comum na evolução de pacientes críticos, o que determina menor aumento detectável de creatinina na fase de desenvolvimento da IRA. Além disso, a perda muscular e má-nutrição associada aos pacientes internados reduz sua produção com consequente superestimação da função renal (Dirkes, 2011; Santos *et al.*, 2012; Souza, 2012).

Neste estudo, utilizou-se diferentes critérios para detecção de IRA, como valores de creatinina sérica superiores a 1,6mg/dl, sendo que 28,5% (8/28) dos animais foram diagnosticados com lesão renal durante a permanência na UTI. Outro critério utilizado foi a concentração sérica de cistatina C, a qual segundo a literatura, possui maior sensibilidade e especificidade. Este biomarcador diagnosticou IRA em 78,6% (22/28) dos animais (Tab.23). Considerando-se que a população avaliada foi constituída de animais em estado grave e com risco elevado de lesão renal, a incidência de IRA foi elevada, entretanto com prevalência variada de acordo com o critério adotado. Apesar disto, esta incidência foi maior do que a descrita em estudos anteriores, ao avaliarem animais em estado grave nos quais a prevalência variou de 12 a 14% (Kenney *et al.*, 2010; Thoen e Kerl, 2011; Cortellini *et al.*, 2015). Entretanto Segev *et al.* (2015) encontraram uma incidência de 63%. Essa divergência de dados encontra-se descrita na literatura e é considerada um fator limitante para tratamento adequado dos pacientes (Metha *et al.*, 2007; Segev *et al.*, 2008).

Entretanto, a menor incidência foi observada quando se utilizou como referência os níveis séricos de creatinina >1,6mg/dl. Este fato é justificado pela baixa sensibilidade deste analito para evidenciar graus leves de lesão renal, como citado anteriormente, a qual subestima a gravidade da disfunção renal (Nguyen e Devarajan, 2008, Bellomo *et al.*, 2004; Edelstein e Faubel, 2011; Bragato, 2015). Portanto, no tempo que a lesão renal é detectada, uma substancial porção da função renal já pode ter sido perdida sendo que intervenções podem não ser mais possíveis para corrigi-la. Dessa forma, a utilização, de biomarcadores mais sensíveis e específicos como a cistatina C sérica, melhora o desempenho diagnostico, além de um tempo menor para reconhecimento dos pacientes acometidos (Coca *et al.* 2008; Segev, 2012; Shoukath e Patil, 2014), e demonstra também, que terapias direcionadas para proteção renal, devem ser iniciadas imediatamente, mesmo se a creatinina estiver dentro da faixa de referência (Segev *et al.*, 2015).

Contudo, como mensuração da cistatina C sérica não é utilizada na rotina clínica, este estudo avaliou o desempenho de outros marcadores rotineiramente utilizados para o diagnóstico de IRA, os quais serão discutidos a seguir.

Análise urinária é exame essencial para evidenciar alterações renais e constitui um método não invasivo, disponível e de baixo custo. Neste, o sedimento urinário ativo é caracterizado pela presença de células renais, cilindros, leucócitos ou hemácias na urina, e é fortemente sugestivo de uma causa intra-renal de IRA, e pode mostrar evidencias de lesão renal antes de mudanças significativas nos valores de creatinina sérica ou débito urinário (Wamsley e Alleman, 2007; Geist e Langston, 2011; Martin -Moreno, 2011; McMahon e Waikar, 2013). Nesse estudo, a urianálise demonstrou alta prevalência de sedimento urinário ativo (Tab. 26), demonstrando

assim a presença de lesão renal intrínseca (Jayasundera e Macnab, 2012; Kaul e Ruhela, 2012). Dessa forma, este estudo demonstrou que em cães criticamente enfermos na UTI, o sedimento urinário indica a presença de IRA em maior número de animais do que a creatinina sérica e sua sensibilidade foi semelhante a cistatina C (Tab. 23 e 26). Esses dados corroboram os de Nunes *et al.* (2010), Geist e Langston (2011) e Lunn (2011) que também descrevem alta sensibilidade dessa metodologia para evidenciar lesão renal em relação a creatinina sérica, enfatizando assim sua utilização. Apesar das vantagens evidenciadas neste estudo, pouca literatura consultada discute os achados da urianálise na veterinária, confirmando sua subutilização na prática clínica, talvez pela falta de padronização e subjetividade de resultados, da mesma forma que McMahon e Waikar (2013) destacaram em seu trabalho.

Outro biomarcador utilizado foi a gama glutamil transferase (GGT), o qual evidencia dano tubular e fornece informações sobre início e progressão de um insulto renal. Esta enzima está presente nas células dos túbulos renais, sendo liberada na urina como resultado de uma lesão nefrotóxica, acarretando aumento de seus valores (Oliveira *et al.*, 2004; Grauer, 2005; Melo, 2006; Veado *et al.*, 2010). Nesse estudo, observou-se que a GGT urinária estava aumentada em 53,6% (15/28) dos animais, o que demonstra a ocorrência de nefrotoxicidade e dano tubular em animais criticamente enfermos (Tab. 22). Nos pacientes críticos, as drogas nefrotóxicas são fatores contribuintes para o desenvolvimento de IRA em até 25% dos casos. Entretanto, sua gravidade tende a ser menor, provavelmente devido a seu caráter transitório da agressão tecidual, por sua vez insuficiente para levar a um dano irreversível (Vaidya *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2009). Este estudo demonstrou que a GGT foi mais sensível que a creatinina sérica para diagnosticar lesão renal em cães de UTI, contudo, foi menos sensível que a cistatina C (Tab. 22 e 23). Esses dados estão de acordo com outros trabalhos em cães que evidenciaram a superioridade deste biomarcador (Oliveira *et al.*, 2004; Veado *et al.*, 2010). Contudo, em pacientes críticos, deve-se considerar que os valores de GGT urinária podem ser influenciados pelo estado de hidratação e uso de diuréticos (Koyner *et al.*, 2010; McMahon e Waikar, 2013; Looor *et al.*, 2013; Sasaki *et al.*, 2014) o que pode justificar sua menor sensibilidade em relação a cistatina C sérica.

A média de UPC (relação proteína/creatinina urinária) em cães na UTI foi de 1,1, sendo o valor de referência <0,5. Neste estudo a análise de UPC não foi realizada apenas em dois animais, devido a limitações técnicas, contudo observou-se elevada prevalência de proteinúria durante permanência dos cães na UTI (tab. 22), o que demonstra que elevações de UPC estão associadas a presença de lesão renal, fato também observado por Segev *et al.* (2015). Dentre as 26 amostras analisadas, observou-se correlação moderada ( $r=0,46$ ) e significativa com sedimento urinário ativo (Tab. 28). Essa correlação pode ser justificada pela provável interferência do sedimento urinário nos valores da UPC, o que pode acarretar resultado falso positivo, conforme relatam dados da literatura. Entretanto, este fato ainda é controverso, pois alguns cães com hematuria e piúria podem não apresentar proteinúria e, além disso, condições inflamatórias intra-renais como a pielonefrite, podem acarretar sedimento urinário ativo (Grauer, 2011). Entre os animais neste estudo, sete apresentaram UPC >2,0, indicando lesão glomerular e 15 animais valores entre 0,5 e 2,0, sugerindo lesão tubular. Na comparação com outros biomarcadores avaliados, observou-se que a UPC foi mais sensível que a creatinina sérica e com sensibilidade semelhante a cistatina C, fato este que evidencia a presença de lesão renal nestes pacientes. Portanto, esses dados corroboram a literatura e enfatizam o uso da UPC como indicador precoce de alterações inflamatórias e ou nefrotóxicas, sendo que o mesmo foi mais sensível que aumentos de creatinina sérica, por evidenciar lesão renal em maior número de cães (Grauer, 2011; Segev *et al.*, 2015).

Tradicionalmente o melhor indicador de avaliação de função renal é a medida da TFG, contudo, envolve técnicas trabalhosas, dispendiosas, exigindo muito tempo para sua realização e dessa forma, se encontra em desuso na prática clínica e principalmente no cenário da terapia intensiva,



onde a função renal tende a alterar rapidamente, além da influência de fatores não renais, principalmente associados a sobrecarga hídrica, muito comum em pacientes criticamente enfermos (Bellomo *et al.*, 2004; Kirsztajn, 2007; Myagawa *et al.*, 2010; Hendy-Wilson e Pressler, 2011). Neste estudo, a instabilidade hemodinâmica significativa inviabilizou o uso desse biomarcador na maioria dos pacientes. Dessa forma, a TFG foi mensurada apenas em oito cães, não sendo possível realizar análise estatística quanto ao nível de significância, pois o número de cães foi pequeno, sendo somente possível fornecer dados descritivos. A mensuração da TFG baseou-se na depuração de creatinina endógena, durante 60 minutos. Esta redução de tempo deveu-se ao fato de que em pacientes críticos, a função renal altera-se rapidamente e a necessidade de um diagnóstico mais rápido inviabiliza a avaliação por 24 horas (Bellomo *et al.*, 2004; Dessen, 2001; Pong *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2013). Houve diminuição da TFG em 37,5% dos animais (3/8) (Tab. 27) e nesses pacientes a concentração sérica de creatinina estava abaixo da referência utilizada ( $< 1,6$  mg/dl). Esses dados enfatizam que níveis de creatinina sérica não detectam precocemente variações pequenas de função renal da mesma forma que discutido anteriormente e pela literatura (Myagawa *et al.*, 2010; Hendy-Wilson e Pressler, 2011; Lefebvre, 2011; Shoukath e Patil, 2014; Segev *et al.*, 2015). Todos animais com redução da TFG apresentaram valores elevados de cistatina C sérica ( $>1,29$  mg/L), evidenciando uma melhor correlação entre a TFG e a cistatina C do que a creatinina sérica. Essa correlação já foi evidenciada em outros estudos com cães com doença renal crônica (Wehner *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2009).

Houve correlação positiva, forte ( $r=0,79$ ) e significativa entre a TFG e o débito urinário (Tab. 28), sendo assim, nenhum animal com débito urinário normal apresentou diminuição da TFG, no entanto, dois animais com débito urinário diminuído apresentavam TFG normal. Isso sugere maior sensibilidade do débito urinário na avaliação da função renal quando comparado à TFG, neste cenário clínico. Provavelmente, isso se deve à utilização da creatinina sérica endógena no cálculo da TFG. Entretanto, para confirmação desses achados faz-se necessário mensurar a TFG utilizando marcadores exógenos e, em maior número de cães com a finalidade de se obter resultados estaticamente significativos.

A ureia normalmente se eleva em pacientes com IRA, dado também observado nesse estudo, embora o aumento médio tenha sido discreto, com valor médio de 71,5mg/dl (Tab. 21). Esse fato pode ser justificado pela sua baixa sensibilidade como marcador de IRA em fases iniciais, bem como pela influência de fatores extra renais prevalentes nesse cenário clínico, como aumento do metabolismo proteico, disfunção hepática, hidratação, terapia com diurético, dentre outros, como já apontado pela literatura consultada (Cowgill e Langston, 2011; Lefebvre, 2011). Este achado reforça que a ureia é indicador grosseiro de função renal e não de injúria, uma vez que seu aumento ocorre após perda de 65 a 75% da função renal, justificando assim sua menor sensibilidade (Scally *et al.*, 2006; Lefebvre, 2011).

Hipoalbuminemia foi observada na maioria dos cães na UTI onde o valor médio foi de 2,1 mg/dl (Tab.21 e 24). Este fato é considerado comum em pacientes críticos, e relaciona-se ao aumento da permeabilidade capilar que altera sua distribuição, volemia, nutrição, oscilações hormonais e processos inflamatórios (Uhing, 2004; Pacheco *et al.*, 2007). Detectou-se correlação negativa, moderada e significativa com a taxa de mortalidade (Tab. 28). Dessa forma, quanto menor o nível de albumina sérica maior foi a ocorrência de óbito, o que está de acordo com o que descreve a literatura (Pacheco *et al.* 2007). Este estudo demonstra a correlação entre albumina sérica e desfecho em pacientes críticos. Contrapondo este achado, Lee *et al.* (2011) não encontraram correlação entre os níveis de albumina e mortalidade, ao avaliarem 853 cães com IRA, porém hipoalbuminemia não foi um achado comum, provavelmente devido ao perfil de menor gravidade da população por eles avaliada.

Embora o perfil hematológico tenha sido analisado, somente os dados de contagem global de hemácias e leucócitos foram utilizados. Houve redução significativa dos valores das hemácias durante o tempo de permanência dos animais na UTI, com valores menores após 48 horas de internação (Tab. 20). Em geral, a anemia no paciente crítico é multifatorial e pode refletir anormalidades causadas pelas condições primárias ou comorbidades, os quais tem relevância para diagnóstico etiológico, entretanto são raramente específicas para IRA. Contudo, quando presente nestes pacientes, pode estar associada a reduzida resposta a eritropoietina renal ou depressão da hematopoese relacionada a resposta inflamatória (Cowgill e Langston, 2011). Outras causas são perdas sanguíneas, decorrente de múltiplas punções venosas a que os pacientes são submetidos, depleção nutricional de fatores hematopoiéticos, hemólise e perdas pelo trato intestinal (Cheyron *et al.*, 2005). Também se observou uma correlação negativa, moderada e significativa entre valores de hemácias e mortalidade (Tab. 28), a qual se deve, possivelmente, pela menor capacidade de recuperação nos pacientes anêmicos associada a maior demanda metabólica (Barbosa *et al.*, 2006). Com relação aos leucócitos não foram observadas diferenças significativas entre seus valores durante o tempo de internamento, entretanto, a leucocitose foi prevalente (Tab. 20). Aumentos de leucócitos são indicativos de causa inflamatória, comumente infecciosa, principalmente em animais com sepse e, não estão correlacionados com injúria renal propriamente dita. Houve correlação significativa, porém fraca entre os valores de leucócitos e a taxa de mortalidade (Tab. 28), a qual pode ser justificada pelo quadro clínico inicial do animal, ou a comorbidades, o que indicou maior gravidade clínica e portanto, pior desfecho (Barbosa *et al.*, 2006; Cowgill e Langston, 2011; Segev, 2011 Okamoto *et al.*, 2012).

Evidências desse estudo corroboram a literatura, a qual enfatiza que apesar de melhorias terem sido conseguidas e incorporadas à prática clínica, nenhum marcador atualmente disponível é completamente eficaz em analisar função e lesão de forma precisa, sendo imprescindível o conhecimento de todos eles, para uma correta avaliação dos pacientes com risco de desenvolver lesão renal (Sodre *et al.*, 2007). Dessa forma, é esperado que cada biomarcador tenha sensibilidade e especificidade diferentes de acordo com o contexto clínico do paciente. Neste sentido, é provável que um painel de biomarcadores venha proporcionar maior compreensão da natureza e gravidade da lesão renal a qual permitirá implementação clínica de terapias para diminuir a ocorrência e a severidade da IRA e, portanto, melhorar o desfecho.

## CONCLUSÕES

Pacientes criticamente enfermos apresentam redução do débito urinário, sedimento urinário ativo, aumento de UPC e de GGT urinária, anemia, leucocitose e hipoalbuminemia, além de azotemia discreta a moderada.

Marcadores tradicionais de IRA, a ureia e creatinina são menos eficientes na detecção da lesão renal em fase inicial quando comparados ao débito urinário, UPC, urianálise, GGT urinária e cistatina C.

A hipoalbuminemia e a redução da creatinina sérica se correlacionam à mortalidade em pacientes criticamente enfermos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As dificuldades de se identificar as diversas situações clínicas que podem causar uma injúria renal aguda em cães, bem como o diagnóstico precoce da mesma, torna-se evidente devido ao fato de se utilizar indicadores bioquímicos pouco sensíveis e, portanto, tardios para esta finalidade. Este estudo demonstrou claramente essas limitações ao se avaliar cães criticamente enfermos internados em unidade de terapia intensiva, os quais apresentam alterações hemodinâmicas graves e, sem diagnóstico estabelecido e cuja avaliação clínica é dificultada pela gravidade clínica dos mesmos. Neste cenário é de grande importância detectar pequenas alterações na função renal a modo de impedir a insuficiência renal aguda, pois o diagnóstico precoce permite estabilizar o paciente e assim obter maiores chances de sucesso no tratamento. Neste estudo, a utilização conjunta de parâmetros laboratoriais, já utilizados na rotina clínica, e também novos biomarcadores como a cistatina C sérica, a classificação IRIS e as alterações ultrassonográficas, demonstraram melhor desempenho, além de proporcionar maior compreensão da natureza e gravidade da lesão renal. Permitindo assim diagnóstico precoce, acompanhamento da evolução do paciente além da possibilidade de implementação de terapias para diminuir a ocorrência e a severidade da IRA e, portanto, melhorar o desfecho.

Conhecer os fatores e os distúrbios clínicos resultantes da IRA é a melhor opção para diminuir suas complicações e conseqüentemente sua mortalidade, reforçando a necessidade de uma prevenção efetiva com monitorização clínica e laboratorial cuidadosa, são medidas profiláticas para retardar a instalação da insuficiência renal aguda, aumentando a expectativa de vida desses pacientes que estão internos em UTI. Esse estudo enfatiza a importância da avaliação de biomarcadores imediatamente após a admissão na UTI, pois seus valores são essenciais para avaliação clínica e planejamento terapêutico. E demonstra que terapias direcionadas à IRA deve ser iniciada imediatamente, ainda que a creatinina esteja dentro dos valores de referência

É necessário considerar as limitações deste estudo que poderiam afetar os resultados obtidos e, portanto, devem ser observadas na sua interpretação. Dentre elas, cita-se a utilização de amostra em uma única instituição hospitalar, envolvendo número reduzido de cães. Há necessidade de maior abrangência, como a realização em multicentros, envolvimento de maior número de animais e acompanhamento dos valores de cistatina C por período maior, para que a interpretação dos resultados seja mais fidedigna. Além disso, a cistatina C no contexto da IRA foi comparada apenas com a creatinina, mais comumente utilizada na prática clínica, não havendo mensuração direta da TFG, o que possibilitaria a melhor avaliação do seu desempenho.

Também, os custos inerentes a avaliação laboratorial, tempo de acompanhamento dos animais em estudo, impediram a realização de um estudo mais detalhado, assim como estatisticamente mais significativo. Portanto, faz-se necessário a realização de pesquisas contínuas sobre a utilização de novos biomarcadores, capazes de detecção precoce lesão renal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, J.M.G.; BABARRO, E. G.; SHAMAGIAN, L.G. La cistatina C aporta más information que otros parâmetros de funcion renal em La estratificacion del riesgo de los pacientes com síndrome coronária agudo. *Ver. Esp. Cardiol.* v. 62, n. 5, p. 510-519, 2009.
- ALCIVAR, J.V.; PUIG, G. C.; JEANI, W.L. FLOR, M. Determinacion de cistatin C como marcador de funciton renal en pacientes normo albuminúricos com Diabetes Mellitus tipo 2. *Ver. Med. FCM-UCSG*, v. 16, n .4, p. 250-256, 2010.
- ALMY, F.S.; CHRISTOPHER, M. M; KING, D.R.; BROWN, S. A. Evaluation of cystatin C as an endógenos marker of glomerular filtration rate in dogs. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 16, n.1, p. 45-51; 2002.
- ALVES, C. M. P.; BARROS, M.C.; FIGUEIREDO, P.V.T. Diferentes abordagens na detecção de disfunção renal aguda em pacientes graves. *Revista Brasileira de Clínica Medica*, v. 10, n. 3, p. 183-188, 2012.
- AMBER, P.; CARL, W.; PODOLL, F. K. Clinical utility of gray scale renal ultrasound in acute kidney injury. *Nephrology*, v. 14, n. 1, p. 188, 2013.
- ANDRADE, D. M. T. *Validação de ensaios laboratoriais quantitativos automatizados de dosagem do peptídeo natriurético tipo B e a fração amino terminal*. 2009. 108f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.
- ANDRIOLO, A.; BALLARATI, C. A. F.; MELO, M. R. *et al.* Diretriz para gestão e garantia da qualidade dos testes laboratoriais remotos (TLR) da sociedade brasileira de patologia clínica e medicina laboratorial (SBPC). São Paulo:Manole, 2013. p.17-65.
- ANTOIGNONI, M. T.; SIEP, D.; PORCIELLO, F. *et al.* Use of serum cystatin C determination as a marker of de renal function in the dog. *Veterinary Research Communications*, v. 29, n. 2, p. 265-267, 2005.
- ANTAGONI, M. T.; SIEPI, D.; PORCIELO, F.; FRUGANTI, G. Use of serum cistatin C determination as a marker of renal function in the dog. *Veterinary Research Communications*, v. 31, n.1, p. 269-271, 2007.
- ANVISA- Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução 899, 29 de maio de 2003. Disponível em <portal.anvisa.gov.br/documents/.../RE.../10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42>. Acesso em jan.2017.
- ARAÚJO, N. C.; RIOJA, L. S.; REBELO, M. A. P. A. Clinical predictor index for renal survival. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 32, n. 1, p. 27-32, 2010.
- ARMITAGE, A. J.; TOMSON, C. Acute renal failure. *Renal Failure*, v. 3, n. 2, p. 79-84, 2007.
- ÁVILA, M. L. S. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes*, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.
- BAGSHAW, S. M.; GIBNEY, N. Conventional markers of kidney function. *Critical Care Medicine*, v. 36, n. 4, p. 152-158, 2008.
- BARAKAT, M.; KHALIL, M. Serum cystatin C in advanced liver cirrhosis and different stages of hepatorenal syndrome. *Arab journal of Gastroenterology*, v. 12, n. 3, p. 131-135, 2011.
- BARBOSA, D. A.; GUNJI, C. K.; BITTENCOURT, A. R. C. Co-morbidade e mortalidade de pacientes em início de diálise. *Acta Paulista Enfermagem*, v. 19, n. 3, p. 304-309, 2006.
- BARR, F. J.; HOLT, P. E.; GINNS, C. Ultrasonographic measurement of normal renal parameters. *Journal Small Animal Practice*, v. 31, n. 4, p. 180-184, 1990.

- BARROS, E.; FILHO, L. *Medicina Interna na prática clínica*. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- BASTOS, M. G.; CARMO, W. B.; ABRITA, R. R. Doença renal crônica: problemas e soluções. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 26, n. 4, p. 93-202-205, 2004.
- BASTOS, M. G. e KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 33, n. 1, p. 93-108, 2011.
- BELAND, M. D.; WALLE, N.L; MACHAN, J. T. *et al.* Renal cortical thickness measure at ultrasound: is better than renal length as an indicator of renal function in chronic kidney disease? *American Journal Roentgenology*, v. 195, n. 2, p. 46-49, 2010.
- BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J.A. *et al.* Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care*, v. 8, n. 4, p. R204-R2012, 2004.
- BENNET, M.; DEVARAJAN, P. Characteristics of an Ideal Biomarker of Kidney Disease. In: EDELSTEIN, C. L. *Biomarkers of kidney disease*. London: Saunders Elsevier, 2011. p. 10–30.
- BERLITZ, F. A. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. *J.Bras.Patol.Med. Lab.*, v. 46, n. 5, p. 353-363, 2010.
- BIESEN, W. V.; VANHOLDER, R.; LAMEIRE, N. Defining acute renal failure: RIFLE and Beyond. *Clinical Journal American Society Nephrology*, v. 1, n. 6, p. 1314-1319, 2006.
- BOCHENEK, D. P. *Comparação entre os métodos de Imunoturbidimetria e Quimioluminescência para dosagem sérica de ferritina*. Novo Hamburgo: Centro Universitário Fevale. 2007. Disponível em < <https://www.fag.edu.br/upload/graduacao/tcc/53024c97bad5a> > Acesso fev. 2017.
- BOKHARI, S. G.; HOU, J.; IQBAL, M. *et al.* Influence of renal ultrasonographic findings on GRF during chronic unilateral ureteral obstruction in dogs. *Journal of Animal & Plant Sciences*, v. 22, n. 3, p. 576-583, 2012.
- BRAGATO, N. *Ultrassonografia em modo b e Doppler pulsado para a avaliação da injúria renal aguda induzida em cães adultos*. 2015. 81f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. Disponível em <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5714>> Acesso em janeiro 2017.
- 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*, v. 11, n. 1, p. 44-49, 2002.
- BRAUN, J. P., LEFEBVRE, H.; WATSON, A. D. Creatinine in the dog: a review. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 32, n. 4, p. 162-179, 2003.
- BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P. Kidney function and damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6 ed., San Diego: Elsevier, 2008. p. 485-528.
- BROWN, S. A. Management of chronic kidney disease. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. *BSAVA Manual of canine and feline nephrology and urology*. 2 ed. London: BSAVA, 2007. p. 223-230.
- BROWN, N.; SEVEG, G.; FRANCEY, T. *et al.* Glomerular filtration rate, urine production, and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 39, n. 1, p. 28-34, 2015.

- BRUGTS, M. P.; LUERMANS, J. C. L.; LENTJES, E. G. W. M. *et al.* Heterophilic antibodies may be a cause of falsely low total IGF1 levels. *European Journal of Endocrinology*, v. 161, n. 4, p. 561-565, 2009.
- BUCUVIC, E. M. *Evolução de pacientes clínicos e cirúrgicos com injúria renal aguda*. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP.
- BYRNE, M. W.; HWANG, J. Q. Ultrasound in the critically ill. *Ultrasound Clinic*, v. 6, p. 235-259, 2011.
- CARVALHO, A. P. M.; SALAVESSA, C. M.; SILVEIRA, L. S. *et al.* Ultrassonografia e histopatologia renal em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 4, p. 1015-1017, 2010.
- CHANTREL, F.; AGIN, A.; OFFNER, M. *et al.* Comparison of cystatin C versus creatinine for detection of mild renal failure. *Clinical Nephrology*, v. 54, n. 5, p. 374-381, 2000.
- CHEYRON, D.; PARIENTI, J. J.; FEKIH-HASSEN, M. *et al.* Impact of anemia on outcome in critically ill patients with severe acute renal failure. *Intensive Care Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1529-1536, 2005.
- CHOI, J.; JANG, J.; CHOI, H. *et al.* Ultrasonographic features of pyonephrosis in dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 51, n. 5, p. 548-553, 2010.
- CHOI, B. S.; MOON, H. S.; SEO, S. H. *et al.* Evaluation of serum cystatin C and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with heart failure from chronic mitral valvular insufficiency. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 79, n.1, p. 41-46, 2016.
- CHURCHIL, J. A.; FEENEY, D. A.; FLETCHER, T. F. *et al.* Age and diet effect on renal echogenicity in geriatric bitches. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 40, n. 6, p. 642-647, 1999.
- CLARKSON, C. E. E FLETCHER, T. F. Anatomy of kidney and proximal ureter. In: BARTGES, J. E POLSIN, D. J. *Nephrology and urology of small animals*. Iowa: Willey-Blackwell, 2011. p. 3-9.
- COBRIN, A. *Measurement of serum and urine NGAL in dogs with CDK, lymphosarcoma, carcinoma and induced endotoxemia to asses' diagnostic utility of NGAL in dog with chronic kidney disease*. 2013. 127f. These (Doutorado). Ontario/Canadá. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27112380>>. Acesso março 2017.
- COCA, S.G.; YALAVARTHY, R.; CONCATO, J. *et al.* Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney International*, v. 73, n. 9, p. 1008-1016, 2008.
- CONCORDET, D.; VERGEZ, F.; TUMEL, C. *et al.* A multicentric retrospective study of serum/plasma urea and creatinine concentrations in dogs using univariate and multivariate decision rules to evaluate diagnostic efficiency. *Vet Clin. Pathol.* v. 37, n. 1, p. 96-103, 2008.
- CORTELLINI, S.; PELLIGAND, L.; SYME, H. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocain in dogs with sepsis undergoing emergency laparotomy: a prospective case control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 29, n. 6, p. 1595-1602, 2015.
- COSTA, J. A. C.; VIEIRA-NETO, O. M.; NETO, M. M. insuficiência renal aguda, Simpósio: Urgências e Emergências Nefrológicas. *Medicina*, v. 36, n. 2-4, p. 307-324, 2003.
- COWGIL, L. D.; LANGSTON, C. Acute kidney Insuficiency. In: BARTGES, J. E POLSIN, D. J. *Nephrology and urology of small animals*. Iowa: Wiley-Blackwell. 2011. p. 472-523.
- COWGILL, L. D. Clinical staging of kidney Injury. Advanced renal therapies symposium. February, New York, 2012, Disponível em <[www.amcny.org/sites/](http://www.amcny.org/sites/)>. Acesso março 2017.

- D' ANJOU, M. A.; BEDARD, A.; DUNN, M. E. Clinical significance of renal pelvic dilatation on ultrasound in dogs and cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 52, n. 1, p. 88-94, 2011.
- DALTON, R. N. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 11, p. 10-11, 2011.
- DAVENPORT, A.; CHOLONGITAS, E.; XIROUCHAKIS, E. *et al.* Pitfalls in assessing renal function in patients with cirrhosis-potential inequity for access to treatment of hepatorenal failure and liver transplantation nephrology. *Dial. Transplant*, v. 26, n. 9, p. 2735-2742, 2011.
- DESSEN, M. Abordagem da insuficiência renal aguda. *Rev. SOCERJ*, v. 14, n. 2, p. 74-81, 2001.
- DESCHEPPER, J.; DE COCK, I.; CAPIAU, E. Urinary gama glutamil transferase and the degree of renal dysfunction in 75 bitches with pyometra. *Research in Veterinary Science*, v. 46, n. 3, p. 396-400, 1989.
- DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute renal failure. *Journal of the American Society Nephrology*, v. 17, n. 6, p. 1503-1520, 2006.
- DiBARTOLA, S. P. clinical Approach and Laboratory Evaluation of renal Disease In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 7 ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2010. v. 2. p. 1955-1968.
- DIDEM P.; KEREM U.; NURAN A.; MURAT G.; GULAY C. Assessment of renal function using canine cystatin-c levels in canine babesiosis and ehrlichiosis. *Acta Vet. Beograd*. v. 65, n. 1, p. 56-65, 2015.
- DIMIRTAS, S.; BOZBAS, A.; AKBAY, A. *et al.* Diagnostic value of serum cystatin C for evaluation of hepatorenalsyndrome. *Clinical Chimica Acta*, v. 311, n. 2, p.81-89, 2001.
- DIRKES, S. Acute kidney injury: not just acute renal failure anymore. *Critical Care*, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2011.
- DOI, K. Role of kidney injury in sepsis. *Journal of Intensive Care*, v. 4, n. 17, p. 2-6, 2016.
- DUNNIL, M. S.; HALLEY, W. Some observations on the quantitative anatomy of the kidney. *J. Pathol.*, v. 110, n. 2, p. 113-121, 1973.
- EDELSTEIN, C. L.; FAUBEL, S. Biomarkers in acute kidney injury. In: EDELSTEIN, C. L. *Biomarkers of kidney disease*, London: Saunders Elsevier, 2011. p. 179-222.
- ENDRE, Z. H.; WESTHUYZEN, J. Early detection of acute kidney injury: emerging new biomarkers. *Nephrology*, v. 13, n. 2, p. 91-98, 2008.
- FAUBEL, S.; PATEL, N. U.; LOCKHART, M. *et al.* Renal relevant radiology: use of ultrasonography in patients with AKI. *Clin Am Soc Nephrology*, v. 9, n. 2, p. 382-394, 2014.
- FLECK, C. Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and influence of different drugs and toxic substances. *Physiol. Res*. v. 48, p. 267-279, 1999.
- FOSTER, M. C.; INKER, L.A.; LEVEY, A. S. *et al.* Novel filtration markers as predictors of all cause and cardiovascular mortality in US adults. *American Journal Kidney Disease*, v. 62, n. 1, p. 42-51, 2013.
- FRY, M. M. Urinalysis. In: BARTGES, J.; POLSIN, D. J. *Nephrology and urology of small animals*. Iowa: Blackwell, 2011. p. 46-57.
- FUCHS, T. C.; HEWITT, P. Preclinical perspective of urinary biomarkers for detection of nephrotoxicity: what we know and what we need to know. *Biomarkers in Medicine*, v. 5, n. 6, p. 763-775, 2011.

- GABRIEL, I. C.; NISHIDA, S. K.; MASTROIANNI, K. cistatina C sérica uma alternativa pratica para avaliação da função renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 33, n .2, p. 262-267, 2011.
- GARCIA, T. P. R.; ROMERO, M.P.; POLETTI, N. A. *et al.* Principal motivo de internação do paciente com insuficiência renal aguda na UTI. *Arquivo de Ciência e Saúde*, v. 12, n. 3, p. 146-150, 2005.
- GARCIA-MARTINEZ, J. D.; SUBIELA, M.; TVARIJONAVICIUTE, A. *et al.* Urinary ferritin and cystatin c concentrations at diferente stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*, v. 4, n. 99, p. 204-207, 2015.
- GAREEBALLAH, A.; GAMERADDIN, M.; MUSTAFA, H. *et al.* Sonographic findings in renal parenchymal diseases at Sudanese. *Journal of Radiology*, v. 5, p. 243-249, 2015.
- GASKELL, C. J. Sistema Urinário. In: CHANDLER, E. A. e GASKELL, C. J. *Medicina e terapêutica de felinos*. São Paulo: Manole, 1988. p. 149-169.
- GEIST, M.; LANGSTON, C. Laboratory evaluation of kidney disease: the results of routine blood and urine evaluation can reveal early indicators of renal disease. Know what to be on the lookout for to help you intervene before life-threatening damage occurs. *Veterinary Medicine*, n. 1, v. 1, p. 242-246, 2011.
- GHYS, L. F.; PAEPE, D.; SMETS, P. Cystatin C: a new renal marker and its potential use in small animal medicine. *Journal Veterinary Medicine*, v. 4, n. 28, p. 1152-1164, 2014.
- GHYS, L. F.; PAEPE, D.; DUCHTEAU, L. *et al.* Biological validation of feline serum cystatin C: The effect of breed, age and sex and establishment of a reference interval. *The Veterinary Journal*, v. 204, n. 2, p. 168-173, 2015.
- GOLDSTEIN, R. E. Feline chronic renal failure- why do urinalysis. 2005. Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference. Orlando- Florida, 2005, January, p. 8-12. Disponível em <[www.worldcat.org/.../proceedings...north-american-veterinary-conference](http://www.worldcat.org/.../proceedings...north-american-veterinary-conference)> Acesso em jan.2017.
- GOMES, T. M. *Estadiamento da injuria renal aguda na sepse*. 2014. 42f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia). Universidade de Brasília. DF. Disponível em <[bdm.unb.br/bitstream/10483/9912/1/2014](http://bdm.unb.br/bitstream/10483/9912/1/2014)> Acesso fev. 2017.
- GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal*. v. 35, n. 3, p. 581-596, 2005.
- GRAUER, G. F. Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v. 37, n. 2, p. 283-295, 2007.
- GRAUER, G. F. Acute failure and chronic kidney disease, In: NELSON, R. W.; COUTO, C.G. *Small Animal Internal Medicine*, 4 ed., Missouri: Mosby Elsevier, 2009. p. 645-660.
- GRAUER, G. F. Proteinuria; measurement and interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 26, n. 3, p. 121-127, 2011.
- GRIFFITHS, L.; KANAGASUNDARAM, N.S. Assessment and initial management of acute kidney injury. *Medicine*, v. 37, n .2, p. 390-398, 2011.
- GRUBB, A. Cystatin C as a biomarker in kidney disease, IN: EDELSTEIN, C. L. *Biomarkers in kidney disease*, London: Elsevier, 2011. p. 291-305.
- GRUEV, T.; CHAKALAROVSKI, K.; TANEVA, O. S. *et al.* Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C levels. *JMB*, v. 28, n. 3, p. 191-196, 2009.
- HALASC VAC, M. Sistema urinário, rins, ureteres, bexiga e uretra In: CARVALHO, C. F. *Ultrassonografia em Pequenos Animais*. 2 ed. São Paulo: Editora Roca, 2014. p. 133-182.



- HAMED, H. M.; SHERBINI, S. A.; BARAKAT, N. A. Serum cystatin C is a poor biomarker for diagnosing acute kidney injury in critically-ill children. *Ind J Crit Care Med*, v. 17, n. 2, p.92- 98, 2013.
- HARISON, E.; LANGSTON, C.; PALMA, D.; LAMB, K. Acute azotemia as a predictor of mortality in dogs and cats. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 26, n. 5, p. 1093-1098, 2012.
- HART, D. V.; WINTER, M. D.; CONWAY, J. *et al.* Ultrasound appearance of the outer medulla in dogs without renal dysfunction. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 54, n. 6, p. 652-658, 2013.
- HARTMANN, H.; BIGLER, B.; MOHR, S. *et al.* Serum cistatyn C as a marker for the diagnosis of renal disease in dogs. *Tierarztliche Praxis Kleintiere*, v. 1, n. 1, p. 59-66, 2007.
- HARTMANN, M.; ROERADE, J.; STOLL, D. *et al.* Protein microarrays for diagnostic assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 393, n. 5, p. 1407-14016, 2009.
- HECHT, S.; HENRY, G. A. Ultrasonography of the urinary tract. In: BARTGES, J. e POLSIN, D. J. *Nephrology and urology of small animals*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2011. p. 128-145.
- HEINE, R.; LEFEBVRE, H. P. Assessment of renal function. In: ELLIOT, J.; GRAUER, G. F. *Manual of canine and feline nephrology and urology*. 2 ed. London: BSAVA, 2007. p. 117-126.
- HEINE, R.; MOE, L.; MOLMEN, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. *Res. Vet. Sci.*, v. 70, n. 2, p. 129-137, 2001.
- HEINE, N. J.; LANGSTON, C. L. Urinalysis Interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 20, n.1, p 2-10, 2005.
- HENDY-WILLSON, V. E. V.; PRESSLER, B. M. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Vet. Journal*, v. 18, n. 2, p. 156-165, 2011.
- HENNEMANN, C. R. A.; SILVA, C. F.; SCHOENAU, W. *et al.* Atividade da GGT urinaria, dosagens séricas de ureia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por gentamicina em cães. *Ciência Rural*, v. 27, n. 2, p. 237-244, 1997.
- HERMENS, A. A. M. Dilution protocols for detection of Hook effects and prozone phenomenon. *Clinical Chemistry*, v. 46, n. 10, p. 1719-1721, 2000.
- HILLSTROM, A.; HAGMAN, R.; TVEDTEN, H. *et al.* Validation of commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for measuring canine C-reactive protein. *Veterinary Clinic Pathology*, v. 43, n. 2, p. 235-242, 2014.
- HOLLOWAY, A; O`BRIEN, R. Perirenal effusion in dogs and cats with acute renal failure. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 48, n. 6, p. 574-579, 2007.
- HOSTE, E. A.; CLERMONT, G.; KERSTEN, A. *et al.* RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Critical Care*, v. 10, n. 3, p. 73, 2006.
- INMETRO DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, 2007. Disponível em<[www.inmetro.gov.br/legislação/rtac/pdf/RTAC001161.pdf](http://www.inmetro.gov.br/legislação/rtac/pdf/RTAC001161.pdf)>. Acesso em 15 Jan. 2017.
- IRIS Grading of Acute Kidney Injury (AKI) in dogs and cats (2013). Disponível em:<[http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging\\_ckd.shtml](http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml)> Acesso em: 05 de novembro de 2016.
- ISMAIL, A. A.; BATH, J. H. Wrong biochemistry results. *BMJ*, v. 29, n. 323, p. 705-706, 2001.

- ISOLA, J.G. Estudo da incidência de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico, diagnosticados no atendimento de emergência em cães hospitalizados em gastroenterite. *Revista de Educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 12, n. 2, p. 12-17, 2014.
- IVANCIC, M.; MAI, W. Qualitative and quantitative comparison of renal vs hepatic ultrasonographic intensity in healthy dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 49, n. 4, p. 368-373, 2008.
- JAYASUNDERA, S.; MACNAB, R. Laboratory tests of renal function. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, v. 13, n. 7, p. 328-331, 2012.
- JENSEN, A. L.; BOMHOLT, M.; MOE, L. Preliminary evaluation of a Particle-enhanced Turbidimetric Immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like Immunoreactivity in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 30, n. 2, p. 86 -90, 2001.
- JONKISZ, P.; KUNG, K.; SIKORSKA, A. *et al.* Cystatin C analysis in the dog: a comparison of turbidimetric and nephelometric assay results. *Acta Veterinaria Hungarica*. v. 58, n.1, p. 59-57, 2010.
- KAMPA, N.; BOSTROM, I.; LORD, P. *et al.* Day-a day variability in glomerular filtration rate in normal dogs by scintigraphy technique. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 50, n. 1, p. 37-41, 2003.
- KAUL, A.; RUHELA, V. Approach to a patient with acute kidney injury. *Clinical Queries: Nephrology*, v. 1, n. 1, p. 6-12, 2012.
- KAVITHA, K.; YATHIRAJ, S.; RAMCHANDRA, S. G. Serum cystatin C as a marker for renal dysfunction and its correlation with creatinine and blood urea nitrogen (BUN). *Journal of Common Health Veterinary Association*, v. 27, n. 1, p. 15-17, 2011.
- KENNEY E. M.; ROZANSKI, E. A.; RUSH, J. E. *et al.* Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007). *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 236, n. 1, p. 83–7, 2010.
- KEYSERLING, H. F.; FIELDING, J. R., MITTELSEDT, C. A. Renal sonography in the intensive care unit: when is it necessary? *Journal Ultrasound Medicine*, v. 21, n. 5, p. 517-520, 2002.
- KILLEEN, A. A., LONG, T., SOUERS, R. *et al.* Verifying performance characteristics of quantitative analytical systems, calibration verification, linearity, and analytical measurement range. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 138, n. 9, p. 1173-1181, 2014.
- KIRSZTAJN, G. M. Avaliação do ritmo de filtração glomerular. *Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial*, v. 43, n. 4, p. 257-264, 2007.
- KIRWAN, C. J.; PHILIPS, B. J. MACPHEE, I. A. Estimated glomerular filtration rate correlates poorly with four-hour creatinine clearance in critically patients with acute kidney injury. *Critical Care Research and Practice*, v. 13, p. 2-10, 2013.
- KOLBER, M.; BORELLI, V. Dimensões dos rins de cães da raça Pastor Alemão-ultrassonografia. *Revista Inst. Ciência e Saúde*, v. 23, n. 1, p. 19-24, 2005.
- KOYNER, J.; VAIDYA, V. S.; BENNET, M. R. *et al.* Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 5, n. 12, p. 2154-2165, 2010.
- KRIESER, D.M.Z.; ROSEMBERG, A. R.; KAINER, A. R.; NAIDOO, D. The relationship between serum creatinine, serum cystatin C and glomerular filtration rate in pediatric renal transplant recipients: a pilot study. *Pediatric Transplantation*, v. 6, n. 5, p. 392-395, 2002.
- KRIMER, P. M. Generating and interpreting tests results: test validity, quality, control, reference values, and basic epidemiology, In: DUNCAN & PRASSE'S., *Veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. 5 ed., New Jersey: Willey-Blackwell. 2011. p. 365-382.

- KRISTOFFER, L. H. NIELSEN, M. B.; EWERTSEN, C. *et al.*, Ultrasonography of the kidney: a pictorial review. *Diagnostics Basel*, v. 6, n. 1, p. 2-8, 2016.
- LAMEIRE, N.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. *Lancet*, v. 4, n. 365, p. 417-30, 2005.
- LAPOINTE, C.; BELANGER, M. C.; DUNN, M. NAG index as an early biomarker of chronic kidney disease in cats with hyperthyroidism. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 22, n. 5, p. 1103-1110, 2008.
- LARA, G. M. *Nefropatia diabética: aspectos laboratoriais da determinação da albuminúria*. 2006, 58 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RGS, Disponível em <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10607/000598114.pdf>> Acesso em janeiro 2016.
- LEE, Y. J.; CHANG, J. P. W.; HSU, W. L. *et al.* Prognosis of acute kidney injury in dogs using RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage renal failure) -like criteria, *Veterinary Record*, v. 168, n. 10, p. 264- 269, 2011.
- LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v. 34, n. 4, p. 867-885, 2004.
- LEFEBVRE, H. Renal function testing In: BARTGES, J.; POLSIN, D. *Nephrology and urology of small animals*, London: Wiley-Blackwell, 2011. p. 91-97.
- LICURSE, A.; KIM, M. C.; DZIURA, J. *et al.* Renal Ultrasonography in the Evaluation of Acute Kidney Injury Developing a Risk Stratification Framework. *Arch. Intern. Med.*, v. 170, n. 21, p. 1900-1907, 2010.
- LINETZ, E. H. e GRAVES, T. K. Glomerular filtration rate in general small practice. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, v. 32, n. 10, p. E1- 5, 2010.
- LOOR, J.; DAMINET, S.; SMETS, P. *et al.* Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *Journal Veterinary Medicine*, v. 27, n.5, p. 998-1010, 2013.
- LOUIS, G. J.; GENNADY, B.; BARRY, K. Febrile urinary tract infections in infants: renal ultrasound remains necessary. *The Journal of Urology*, v. 173, n. 2, p. 568-570, 2005.
- LUM, G.; THOLEN, D. W.; FLOERING, D. A. The usefulness of calibration verification and linearity surveys in predicting acceptable performance in graded proficiency tests. *Arch. Pathol. Lab. Med.* v. 119, n. 5, p. 401-408, 1995.
- LUNSDEN, J. Normal of reference values: question and comments. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 27, n.4, p. 102- 106, 1998.
- LUNN, K.F. The kidney in critically ill small animals. *Veterinary Clinics Small Animal*, v.41, n.4, p. 727-744, 2011.
- MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; CIPRIANO, A. *et al.* Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 38, n. 2, p. 93-103, 2002.
- MADDENS, B., DAMINET, S., SMETS, P. *et al.* Escherichia coli pyometer induces transient glomerular and tubular dysfunction in dogs. *J. Vet. Med.*, v. 24, n.6, p. 1263-1270, 2010.
- MAGRO, M. C. S. *Cistatina C e RIFLE: avanços na avaliação da função renal em pós-operatório de cirurgia cardíaca*. 2007. 75f. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, SP. Disponível em<[www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/7139/tde-22032007-092317/.../Marcia\\_Magro.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/7139/tde-22032007-092317/.../Marcia_Magro.pdf)> Acesso em jan.2017.
- MANTIS, P.; LAMB, C. R. Most dogs with medullary rim sign on ultrasound have no demonstrable renal dysfunction. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v. 41, n. 2, p. 164-166, 2000.

- MARTENSSON, J.; MARTLING, C. R.; BELL, M. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability. *British Journal of Anesthesia*, v. 109, n. 6, p. 843-850, 2012.
- MARTIN, C.; PECHEREAU, D.; FARGE, D. *et al.* Plasma cystatin C in cat: current technique do not allow to use it for de diagnosis the renal failure. *Revue de Medicine Veterinaire*, v. 153, n. 5, p. 305-310, 2002.
- MARTIN-MORENO, P. L. Interpretacion del urinanálisis: protocolos de prática assistencial. *Medicine*, v. 10, n. 79, p. 5383-5385, 2011.
- MARTINEZ, I. K. H.; SIMON, D. J. J. Utilidad clínica de la cistatina C como marcador de función renal. *An. Med. Assoc. Med. Hosp. ABC*, v. 48, n. 4, p. 216-222, 2003.
- MARTINS, R. T.; FADEL-PICHETH, M. T.; ALCANTARA, V. M. *et al.* Cistatina C: um novo marcador para filtração glomerular comparada ao clearance da creatinina e a creatinina sérica. *RBAC*, v. 35, n. 4, p. 207-2013, 2003.
- MARTINS, G. S.; MARTINI, A. C.; MEIRELLES, Y. S. *et al.* Avaliação clínica, laboratorial e ultrassonográfica de felinos com doença do trato inferior. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 5, p. 2349-2356, 2013.
- McMAHON, G. M.; WAIKAR, S. Biomarkers in Nephrology: core curriculum 2013. *American Journal Kidney Disease*, v. 62, n. 1, p. 165-178, 2013.
- MEDEIROS, F. S. R. *Avaliação da dosagem s de cistatina C para detecção precoce de alterações na função do enxerto após transplante renal.* 2007. 137f. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo. SP, Disponível <[www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5148/tde-04042008](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5148/tde-04042008)> Acesso em jan.2017.
- MELO, M. B. *Avaliação da técnica de Doppler e cálculo do índice resistivo das artérias renais em cães sadios infectados experimentalmente por Erlichia canis.* 2004. 47f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MENDES, R. S.; BREGMAN, R. Avaliação e metas do tratamento da proteinúria. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 17, n. 3, p. 174-177, 2010.
- MEHTA, R. L.; BOUCHARD, J.; SOROKO, S. B. *et al.* Sepsis as a cause e consequence of acute kidney injury: program to improve care in acute renal disease. *Intensive Care Medicine*, v. 37, n.2, p. 242-250, 2011.
- METHA, R. L.; KELLUM, J. A.; SHAH, S. V. *et al.* Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care*, v. 11, n. 2, p. R31, 2007.
- MIRJANA, M.; ANICA, J.; LISAMIN, L. J. *et al.* Nephrosonographic examinations in dogs with gentamicin induced acute renal failure. *Acta Veterinaria*, v. 51, n. 2-3, p. 115-124, 2001.
- MIYAGAWA, Y.; TAKEMURA, N.; HIROSE, H. Evaluation of the measurement of the serum Cystatin C by Enzyme-linked Immunosorbent assay for humans as a marker of the glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 71, n. 9, p. 1169-1176, 2009.
- MIYAGAWA, Y.; TAKEMURA, N.; HIROSE, H. Factors that affect glomerular filtration rate and indireters markers of renal function in dogs and cats. *Journal of Veterinary Medicine Science* v. 72, n. 9, p. 1129-1136, 2010.
- MOLITORIS, B. A.; MELNIKOV, V. Y.; OKUSA, M. D Technology insight: biomarker development in acute kidney injury- what can we anticipate. *Nature Clinical Practice nephrology*, v. 4, n. 3, p. 154-165, 2008.
- MONAGHAN, K.; NOLAN, B.; LABATO, M. Feline acute injury: pathophysiology, etiology and etiology-specific management considerations. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 14, n. 11, p. 775-784, 2012.

- MONTEIRO, S. C.; FROES, T. R. Utilização da ultrassonografia no diagnóstico das nefromegalias em pequenos animais: revisão de literatura. *Clínica Veterinária*, São Paulo, v. 14, p. 54-58, 2009.
- MONTI, P.; BENCHEKROUN, G.; BERLATO, D.; ARCHER, J. Initial evaluation of canine urinary cystatin C as marker of renal tubular function. *Journal of Small Animal Practice*, v. 53, n.5, p. 254-259, 2011.
- MUGFORD, A.; LI, R.; HUMM, K. Acute kidney injury in dogs and cats: pathogenesis and diagnosis. *In Practice*, v. 35, n.5, p. 253-264, 2013.
- MURRAY, P. T.; DEVARAJAN, P.; LEVEY, A. S. *et al.* A framework and key research questions in AKI diagnosis and staging in different environments. *Clinical Journal American Society Nephrology*, v. 3, n.3, p. 864-868, 2008.
- MUSTONEN, S. *Effect of acute urinary retention on renal function, clinical studies in men.* 2001. 77f, Academic Dissertation (Academic) - Faculty of Medicine of University of Tampere, Finland.
- NABITY, M. B. *Urine protein analysis and correlation of urinary biomarkers with renal disease progression in dogs with X-linked hereditary nephropathy.* 2010. 165f. Tese (Doutorado)- A&M University. Texas. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22356524>> Acesso em Jan.2017.
- NAKATA, J.; NAKAHARI, A.; TAKAHASHI, C. *et al.* Molecular cloning, expression in *Escherichia coli*, and development of monoclonal antibodies to feline cystatin C. *Veterinary Immunology and Immunopathol*, v. 138, n.3, p. 231-234, 2010.
- NEJAT, M.; PICKERING, J. W.; WALKER, R. J.; ENDREL, Z. H. Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant*, v. 25, n. 10, p. 3283-3289, 2010.
- NERI, L.A. *Validação do método de imunonefelométrico para dosagem de cistatina C, como marcador de função renal.* 2007. 90f, Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina São Paulo. SP. Disponível em <[www.scielo.br/pdf/jbpm/v46n6/a04v46n6.pdf](http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v46n6/a04v46n6.pdf)> Acesso em jan.
- NEVEU, H.; KLEINKNECHT, D.; BRIVET, F. *et al.* Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis: results of a prospective multicenter study. *Nephrol. Dial. Transplant*, v.11, n.2, p. 293-299, 1996.
- NGUYEN, M. T.; DEVARAJAN, P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr. Nephrol.* v. 23, n.12, p. 2151-2157, 2008.
- NOBLE, V. E; BROWN, D. F. M. Renal Ultrasound. *Emergency Medicine Clinics of North America*, v. 22, n.3, p. 641-659, 2004.
- NUNES, T. F.; BRUNETTA, D. M.; LEAL, C. M. *et al.* Insuficiência renal aguda. *Medicina*, v. 43, n. 3, p. 272-282, 2010.
- NYLAND, T.G.; MATTON J. S.; HERRSELL E. J.; WISNER E. R. Trato Urinário. In: NYLAND T. G.; MATTON J. S. *Ultrassom diagnóstico em pequenos animais.* 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 161-198.
- OKAMOTO, T. Y, DIAS Y.; CHRISTIANE, J. *et al.* Insuficiência renal aguda em pacientes com sepse grave: fatores prognósticos. *Scientia Medica*, v. 22, n. 3, p.138-141, 2012.
- OLIVEIRA, J.; PALHARES, M. S.; MAGALHAES, M. A. B. *et al.* Avaliação urinária e pesquisa de GGT em cães submetidos ao envenenamento crotálico e tratados com hemodiálise e soro anti-ofídico. *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR*, v. 7, p. 14- 16, 2004.
- OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M. E. Gestão da fase analítica do laboratório como assegurar a qualidade na prática. *Control Lab*, v. 1. 2010. Disponível em <[https://controllab.com/pdf/gestao\\_fase\\_analitica\\_vol1.pdf](https://controllab.com/pdf/gestao_fase_analitica_vol1.pdf)> Acesso fev.2107

- O'NEILL, W. C. Renal relevant radiology: use of ultrasound in kidney disease and nephrology procedures. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* v. 9, n. 2. p. 373-381, 2014.
- OSBORNE, C.A., LULICH, J. P., ALBASAN, H. The ins and outs of urine collection In: BARTGES, J. E POLSIN, D. J. *Nephrology and urology of small animals*. Iowa: Willey-Blackwell. 2011, p. 28-42.
- PACHECO, S. V.; WEGNER, A. A.; GUEVARA, R. Q. *et al.* Albumina em el paciente critico: mito ou verdade. *Ver. Chil. Pediatr.* v. 78, n. 4, p. 403-423, 2007.
- PAGE, J. E.; MORGAN, S. H.; EASTWOOD, J. B. *et al.* Ultrasound findings in renal parenchymal disease: comparasion with histological appearances. *Clinical Radiology*, v. 49, n.12, p. 867-870, 1994.
- PAGITZ, M.; FROMMLET, F.; SCHWENDENWEIN, I. Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *Journal Vet. Intern. Med.*, v. 21, n.5, p. 936-942, 2007.
- PALM, C.A., DAVIS, C. Application of novel biomarkers in dogs with experimental acute kidney injury. 2012. *Advanced Renal Therapies Symposium*, New York. Disponivel em <[www.amcny.org/sites/.../files/ARTS%202012%20Proceedings.pdf](http://www.amcny.org/sites/.../files/ARTS%202012%20Proceedings.pdf)> Acesso em janeiro de 2017.
- PARIKH, C. R.; VASAN, N. I. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomarkers in Medicine*, v.1, n.3, p. 419-444, 2007.
- PARRAH, J. D.; MOULVI, B. A.; MOHSIN. A. *et al.* Importance of urianalysis in veterinary practice: a review. *Veterinary Wosx*, v. 6, p. 640-646, 2013.
- PASA, S.; KILIE, N.; ATASOY, A. *et al.* Serum Cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 7, n.11, p. 1410-1412, 2008.
- PASA, S.; BAYRAMLI, G.; ATASOY, A. *et al.* Evaluation of serum cystatin C in dogs with visceral leishmaniosis. *Vet. Res. Commun.*, v. 33, n.6, p. 529 -534, 2009.
- PAVKOV, M.E.; KNOWLER, W. C.; HANSON, R. L. *et al.* Comparison of serum cystatin C, serum creatinine, measured of GFR, and estimated GFR to assess the risk of kidney failure in American Indian with diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.*, v. 62, n. 1, p. 33-41, 2013.
- PENNICK, D.; D'ANJOU, M. Kidneys and Ureters. In: *Atlas of small animal ultrasonography*, 2 ed., Oxford: Willey Blackwell. 2015. p. 331-362.
- PEREIRA, A. B. Exame de urina e avaliação da função renal in: BARROS, E.; MANFRO, R. C.; THOMAS, F. S. *et al.* *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento*, 3 ed., São Paulo:Artmed Editora. 2006, p.47-57.
- PERIANAYAGAM, M. C.; SABRA, V. F.; TIGHIOUART, H. Serum cystatin C for prediction of dialysis requirement or death in acute kidney injury: a comparative study. *Am. Journal Kidney Disease*, v. 54, n.6, p. 1025-1033, 2009.
- PERLEMOINE, C.; BEAUVIEUX, M. C.; RIGALLEAU, V. *et al.* Interest of cystatin C in screening diabetic patients for early impairment of renal function. *Metabolism*, v. 52, n.10, p. 1258-1264, 2003.
- PERRONE, R. D.; MADIAS, N.E.; LEVEY, A. S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin. Chem.* v. 3, n. 10, p. 1933-1953, 1992.
- PINTO, P. S.; CARMINATTI, M.; LACET, T. *et al.* Insuficiência renal aguda nefrotóxica: prevalência, evolução clínica e desfecho. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 31, n. 3, p.183-189, 2009.

- PINTO, C. F.; WATANABE, M.; FONSECA, C. D. *et al.* A sepse como causa de lesão renal aguda: modelo experimental. *Revista Escolar Enfermagem USP*, v. 46, p. 86-90, 2012.
- PODOLL, A.; WALTHER, C.; FINKEL, K. Clinical utility of gray scale renal ultrasound in acute kidney injury. *Nephrology*, v.14, n.8, p. 188-193, 2013.
- POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. *Veterinary Clinical Small Animal*, v. 41, n.1, p. 15-30, 2011
- PONG, S.; SETO, W.; ABDOLELL E. T. M. *et al.* 12-hour versus 24-hour creatinine clearance in critically ill pediatric patients. *Pediatric Research*, v. 58, n. 1, p. 83-89, 2005.
- POULIK, M. D.; SHINNICK, C. S.; SMITHIES, O. Partial amino acid sequences of human and dog post-gamma globulins. *Mol. Immunol.* v. 18, n.6, p. 569-572, 1981.
- PRATES, A. B.; AMARAL, F. B.; VACARO, M. Z. Avaliação da filtração glomerular através da medida de cistatina C sérica. *Jornal Bras. Nefrol.* V.29, n. 1, p. 49-55, 2007.
- PRESSLER, B. M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. *Vet. Clin. Small Anim.*, v. 43, n.6, p.1193-1208, 2013.
- QUAIA, E.; BERTOLOTTI, M. Renal parenchymal diseases: is characterization feasible with ultrasound? *European Radiology*, v.12, n.8, p. 2006-2020, 2002.
- RAHMAN, M.; SHAD, F.; SMITH, M. C. Acute kidney injury: A guide to diagnosis and management. *American Family Physician*, v. 86, n. 7, p. 632-639, 2012.
- REGENITER, A.; FREIDANK, H.; DICKENMANN, M. *et al.* Evaluation of proteinuria and GFR to diagnose and classify kidney disease: systematic review and proof of concept. *European Journal Medicine*, v. 20, n.6, p. 556-561, 2009.
- REINE, N. J.; LANGSTON, C. E. Urinalysis Interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 20, n.1, p. 2-10, 2005.
- RICCABONA, M. Renal failure in neonates, infants, and children: the role of ultrasound. *Ultrasound Clinics*, v. 1, p. 457-469, 2006.
- RIGALLEAU, V.; BEAUVIEUX, M. C.; LE MOIGNE, F. *et al.* Cystatin C improves the diagnosis and stratification of chronic kidney disease, and the estimation of glomerular filtration rate in diabetes. *Diabetes Metab.* v. 34, n. 5, p. 482-489, 2008.
- RIVERA, R. F. Renal ultrasound in acute kidney disease. *OMICS Group e Books*, p. 2-22, 2014. Disponível em <<https://www.pinterest.co.uk/pin/302304193725733754/>> Acesso jan.2017
- RODRIGO, E.; SUBERVIOLA, B.; ALBINE, Z. *et al.* Comparacion de los sistemas de clasificacion del fracasso renal agudo en la sepsis. *Nefrologia*, v.36, n. 5, p. 530-534, 2016.
- RODRIGUES, R. D. *Estudo das alterações hematológicas e urinárias em cães em diferentes estágios de disfunção renal e avaliação do biomarcador cistatina C.* 2016. 52 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária de Uberlândia. Uberlândia, MG. Disponível em <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17782>> Acesso em fev. 2017.
- ROSS, L. A. Acute renal failure. *Standarts of Care Emergency and Critical Care Medicine*, v. 8, n. 4, p.1-9, 2006.
- ROSS, L. A. Acute kidney injury in dogs and cats. *Vet. Clin. Anim.*, v. 41, n.1, p. 1-14, 2011.
- SALGADO, J. V.; NEVES, F. A.; BASTOS, M. G. *et al.* Monitoring renal function: measured and estimated glomerular rates- a review. *Braz J. Med. Biol Res.*, v. 43, n. 6, p. 528-536, 2010.
- SANTIN, F.; MOUTINHO, F. Q.; TAKAHIRA, R. K. A Acompanhamento laboratorial da função renal de cães saudáveis tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina B. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1816-1823, 2006.

- SANTOS, E. S.; MARINHO, C. M. S. Principais causas de insuficiência renal aguda em unidades de terapia intensiva: intervenção de enfermagem. *Revista de Enfermagem*, v.3, n. 9, p. 181-189, 2013.
- SANTOS, J. C. O.; MENDONÇA, M. A. O. Fatores predisponentes para lesão renal aguda em pacientes em estado crítico: revisão integrativa. *Revista Sociedade Brasileira Clínica Médica*, v. 31, n. 1, p. 69-74, 2015.
- SANTOS, R.V.; MERLINE, N. B.; SOUZA, L. P. *et al.* Ultrassonografia Doppler na avaliação renal de cadelas diagnosticadas com piometra antes e após tratamento com ovariossalpingohisterectomia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 5, p. 635-642, 2012.
- SASAKI, A., SASAKI, Y.; IWAMA, R. *et al.* Comparison of renal biomarkers with glomerular filtration rate in susceptibility to the detection of gentamicin induced acute kidney injury in dogs. *Journal Comp. Pathology*, v. 151, n. 2-3, p. 264-270, 2014.
- SCALLY, M. P.; LEISEWITZ, A. L.; LOBETTI, R. G. THOMPSON, P. N. The elevated serum urea: creatinine ratio in canine babesiosis in South Africa is not of renal origin. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 77, n. 4, p. 175-178, 2006.
- SCHIMKE, I. Quality and timeliness in medical laboratory testing. *Analytical and Bio Analytical Chemistry*, v. 393, n. 5, p. 1499-1509, 2009.
- SCHLEICHER, E. Diagnosis assay. *Analytical and Bio Analytical Chemistry*, v. 393, n.5, p. 1391-1392, 2009.
- SELBY, C. Interference in immunoassay. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 36, n. 6, p.704-721, 1999.
- SCHMIDT, G. Kidneys In: SCHMIDT, G.; GREINER, L.; NUERNBERG, D. *Differential diagnosis in ultrasound imaging*, 2 ed. New York: Thieme, 2015. p. 322-329.
- SCHNEIDER, A. G.; BELLOMO, R. Acute kidney injury: new studies. *Intensive Care Medicine*, v. 39, n. 4, p. 569-571, 2013.
- SCHRIER, R. W.; WANG W.; POOLE B. *et al.* Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. *J. Clin. Invest.*, v. 114, n. 5, p. 14. 2004.
- SEOANE, M. P. R *Avaliação da ocorrência das alterações ultrassonográficas na cavidade abdominal, detectadas em cães idosos clinicamente saudáveis atendidos no hospital veterinário a Universidade Federal do Paraná.* 2010. 113f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba. PR.
- SEGEV, G.; KASS, P. H.; FRANCEY, T. *et al.* A novel clinical scoring system for outcome prediction in dogs with acute kidney injury managed by hemodialysis. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n.2, p. 301-308, 2008.
- SEGEV, G. Outcome prediction of acute kidney injury in dogs and cats. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 66, n. 3, p. 82-88, 2011.
- SEGEV, G. Scoring systems in acute kidney injury. *Advance Therapies Symposium*. New York, p.78-80, 2012. Disponível em <[www.amcny.org/sites/.../files/ARTS%202012%20Proceedings.pdf](http://www.amcny.org/sites/.../files/ARTS%202012%20Proceedings.pdf)> Acesso em jan. 2017.
- SEGEV, G.; NIVY, R.; KASS, P. H. COWGILL, L. D. A retrospective study of acute kidney injury in cats and development of a novel clinical scoring system for predicting outcome for cats managed by hemodialysis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 27, n.4, p. 830-839, 2013.
- SEGEV, G.; DAMINET, S.; MEYER, E. *et al.* Characterization of kidney damage using several renal biomarkers in dogs with naturally occurring heatstroke. *The Veterinary Journal*, v. 206, n. 2, p. 231-235, 2015.



- SEGEV, G.; LANGSTON, C.; TAKADA, K. Validation of a clinical scoring system for outcome prediction in dogs with acute kidney injury managed by hemodialysis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 30, n.3, p. 803-807, 2016.
- SHARMA, R. K. Biomarker of acute kidney injury. *Clinical Queries: Nephrology*, v. 1, n. 1, p. 13-17, 2012.
- SHOUKATH, A. R.; PATIL, S. Serum Cystatin C concentration levels as a marker of acute renal failure in critical ill patient. *Al Ameen Journal Medicine Science*, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2014.
- SIDDAPPA, J. K.; SINGHA, S.; AMMEN, M. *et al.* Correlation of ultrasonography parameters with serum creatinine in chronic kidney disease. *Journal of Clinical Imaging Science*, v. 30, n. 3, p.28-30, 2013.
- SILVA, W. D. A interação antígeno-anticorpo In: SILVA, W. D.; MOTA, B. *Imunologia básica e aplicada*, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003, p. 68-97.
- SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. *ENQUALAB*, Congresso e Feira de Qualidade em Metrologia, Rede Metrológica do Estado de São Paulo, REMEST, SP, 30 de maio a 01 de junho, p.8-15, 2006.
- SILVA, V. C.; MAMPRIM, M. J.; VULCANO, L. C. Ultrassonografia no diagnóstico das doenças renais de pequenos animais. *Veterinária e Zootecnia*, v. 15, n. 3, p. 435-444, 2008.
- SILVA, M. M. H.; BRUNE, M. F. S. S. Importância do cálculo da taxa de filtração glomerular na avaliação da função renal de adultos. *Revista Brasileira Farmácia*, v. 92, n. 3, p.160-165, 2011.
- SIVIT, C. J. Sonographer of pediatric urinary tract emergencies. *Ultrasound Clinics*, v. 1, p. 67-75, 2005.
- SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. *O Imunodiagnóstico em medicina veterinária*. Brasília: EMBRAPA, 2001. p. 143-177.
- SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e lesão renal: um desafio laboratorial. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.
- SOUZA, S. P. *Preditores de diálise e mortalidade em pacientes críticos*. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. Disponível em <[https://repositorio.ufba.br/ri/.../Dissertacao\\_Med\\_Sergio%20Pinto%20de%20Souza.pdf](https://repositorio.ufba.br/ri/.../Dissertacao_Med_Sergio%20Pinto%20de%20Souza.pdf)> Acesso em jan.2017.
- SPAHILLARI, A.; PARIKH, C.R.; SINT, K. *et al.* Serum cystatin C versus creatinina-based definitions of acute kidney injury following cardiac surgery. *Am. Journal Kidney Disease*, v. 60, n. 6, p. 922-929, 2012.
- STABUC, B.; VRHOVEC, L.; STABUC-SILIH, M. *et al.* Improved prediction of decreased creatinine clearance by serum cystatin C: Use in cancer patients before and during chemotherapy. *Clinical Chemistry*, v. 46, n.2, p. 193-197, 2000.
- STEINBACH, S.; WEIS, J.; SCHWEIGHAUSER, A. *et al.* Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 28, n. 2, p. 264-269, 2014.
- STEWART, M. Técnicas Imunológicas. In: OITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., *Imunologia*, 6 ed., São Paulo: Manole, 2003, p. 417-433.
- STOKES, J. E.; FORRESTER, S. D. New and unusual causes of acute renal failure in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal*, v. 34, n. 4, p. 909-922, 2004.
- STOWE, H.; LAWRENCE, D.; NEWMAN, D. J.; LAMB, E. J. Analytical performance of a particle-enhanced nephelometric immunoassay for serum cystatin C using rate analysis. *Clinical Chemistry*, v. 47, n. 8, p. 1482-1485, 2001.

- SWARTZ, M.; KRULL, I. Analytical Method Development. *Journal Am. Chem. Soc.*, v. 120, n. 14, p. 3540-3545, 1997.
- TASSINI, L. E. *NAG: Padronização de ensaio espectrofotométrico automático em urina de cães*. 2015. 67f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. MG.
- TAYLOR, J. K. Quality assurance of chemical measurements. *Anal. Chem.*, v. 53, n. 14, p. 1588-1596, 1981.
- TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J. Bras. Pneumol.* v. 33, n. 3, p. 323-42, 2007.
- TEVA, A.; MORAES, A. M. L.; RIBEIRO, F. C. *et al.* Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2009. p.19-124.
- THOEN, M. E.; KERL, M. E. Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 21, n. 6, p. 648-657, 2011.
- THONPSON, J. P.; BHATT, S. Renal ultrasound. *Abdominal Ultrasound*, v. 9, n. 4, p. 653-681, 2014.
- TRALL, M. A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Editora Roca, 2007.
- TRIPATHI, R.; METHA, R. H. Diagnosis of renal disorders in dogs using ultrasound technique. *Biosci. Biotech. Res. Comm.*, v. 2, n. 2, p. 213-214, 2010.
- UCHIDA, K.; KUROKI, K.; YOSHINO, T. *et al.* Immunohistochemical study of constituents other than beta-protein in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*, v. 93, n. 3, p. 49-59, 1997.
- UHING, M. R. A controvérsia da albumina. *Clin. Perinatol.* v. 31, p. 475-488, 2004.
- UZUM, H.; KELES, M.O; ATAMAN, R. *et al.* Serum cystatin C level as a potentially good marker for impaired kidney function. *Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 9, p. 792-798, 2005.
- VAIDYA, V. S., FERGUSON, M. A.; BONVENTRE, J. B. Biomarker of acute kidney injury. *Annual Rev. Pharmacology Toxicology*, v. 48, p. 463-493, 2008.
- VEADO, J. C.; ROCHA, D. F.; COBUCCI, G. C. *et al.* Gama glutamil transferase urinária, proteína urinária e fósforo sérico no diagnóstico precoce da insuficiência renal aguda induzida em cães. In: Conferência Sulamericana De Medicina Veterinária, outubro, 2010, Rio de Janeiro.
- VENKATRAMAN, K.; SANKARANARAYANAN, S.; MOHANRAJ, K. *et al.* Ultrasound scanning and bladder urine measurement. *International Journal of Pharmacy e Technology*. v. 6, n. 3, p. 7031- 7034, 2014.
- VINAYAKA, U. S.; SHIVALLI, S.; PAI, B. H. S. *et al.* A comparative study of sonographic grading of renal parenchymal changes and estimated glomerular filtration rate using MDRD formula. *Journal of Clinical and Diagnosis Research*, v. 10, n. 2, p. 09-11, 2016.
- VOURGANTI, S.; AGARWAI, K. P.; BODNER, D. R. *et al.* Ultrasonography evaluation of renal infections. *Radiology Clinics*, v. 44, n.6, p. 763-775, 2006.
- WAKI, M. F., *Estudo da progressão da doença renal crônica em cães, segundo a classificação em estágios, pela avaliação sequencial da proteinúria pela eletroforese urinária e determinação de albuminúria*. 2013. 194f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo. SP. Disponível em < [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-14052013-112906](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-14052013-112906)> Acesso em fev.2017.
- WAMSLEY, H.; ALLEMAN, R. Complete Urinalysis In: ELLIOT, J.; GRAUER, G. F. *Manual of canine and feline nephrology and urology*. 2 ed., London: BSAVA, 2007. p. 87-116.

- WANG, X.; BONVENTRE, J. V.; PARRISH, A. R. *et al.* The aging kidney: increased susceptibility to nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Science*, v. 15, n. 9, p. 15359-15376, 2014.
- WATSON, A. D. J.; LEFEBVRE, H.P.; ELLIOTT, J. Using urine specific gravity, 2015. Disponível em <www.iris-kidney.com.> acesso em 19 nov 2016.
- WATSON, A. D. J.; LEFEBVRE, H. P.; CONCORDET, D. *et al.* Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v.16, n.1, p.22-33, 2002.
- WEHNER, A.; HARTMAN, K.; HIRSCHBERGER, J. Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *Journal American Animal Hospital Association*. v. 44, n. 3, p.131-138, 2008.
- WENDLAND, A. E.; AZEVEDO, M. J.; GROSS, J. L. Avaliação de diferentes métodos imunoturbidimétricos para determinação de albumina urinária: impacto na classificação dos estágios da nefropatia diabética. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 43, n. 6, p. 393-398, 2007.
- XIN, G.; WANG, M.; JIAO, L. L. *et al.* Protein-to-creatinine ratio in spot urine samples as a predictor of quantitation of proteinuria. *Clinica Chimica Acta*, v. 350, n.1-2, p. 35-39, 2004.
- YANG, C.; WU, M.; PAN, M. Leptospirosis renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 16, n. 5, p. 73-77, 2001.
- YAMAGUCHI, S.; FUJI, H.; KANEKO, S. *et al.* ultrasonographic study on kidneys in patients with acute renal failure. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, v. 82, n. 10, p. 1561-1567, 1991.
- YAMASHITA, S. R.; ATZINGEN, A. C.; LARED, W. *et al.* value of renal cortical thickness as a predictor of renal function impairment in chronic renal disease patients. *Radiol. Bras.*, v. 48, n. 1, p. 12-16, 2015.
- YAQOOB, M. M. Renal Disease In: KUMAR, P.; CLARK, M. *Clinical medicine*. 2 ed. London: Saunders Elsevier, 2009. p. 571-648.
- YARLAGADDA, S.; PERAZELLA, M. A. Acute renal failure in the hospital: diagnosis and management. *Hospital Physician*, v. 3, n. 2, p. 51-58, 2006.
- ZHOU, X.; MA, B.; QU, Z. *et al.* Evaluation of the usefulness of novel biomarkers for drug-induced acute kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 280, n. 1, 2014.

## ANEXO 1



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Eu, \_\_\_\_\_, carteira de identidade \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_ proprietário (a) do cão \_\_\_\_\_, da raça \_\_\_\_\_, com a idade de \_\_\_\_\_, pelagem \_\_\_\_\_ tenho o conhecimento de que meu animal será submetido a exames laboratoriais e ultrassonográfico para diagnóstico de doença renal e autorizo sua inclusão em Projeto de Pesquisa “Cistatina C como biomarcador precoce e diagnóstico de lesão renal em cães, orientado pela prof. Antônio Último de Carvalho. Que tem como objetivo estabelecer alternativas para diagnosticar doenças renais em fase precoce possibilitando a instituição de medidas de prevenção e tratamento que possam retardar a progressão e prevenir o desenvolvimento de complicações. Nesta pesquisa serão realizadas avaliações clínicas e exames laboratoriais com coleta de sangue e urina. Durante a permanência do animal para realização dos procedimentos o mesmo será acompanhado pela médica veterinária Eliana Matias de Souza, podendo a mesma ser contatada pelo telefone (31) 99027824, para quaisquer esclarecimentos. Salienta-se também que não haverá custos financeiros para o proprietário, podendo o mesmo retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do proprietário

## ANEXO 2



### Cystatin C Canine E. coli

#### Product Data Sheet

Type: Recombinant  
Source: E. coli  
Species: Canine  
Other names: Post G-globulin, Cystatin-3, Neuroendocrine basic polypeptide, Gamma-trace, Post-gamma-globulin, CST3

Cat. No.:  
RD472009100 (0.1 mg)

#### Description

Total 133 AA. MW: 14,85 kDa (calculated). N-Terminal His-tag, 8 extra AA (highlighted).

#### Introduction to the Molecule

Cystatin C is a non-glycosylated basic single-chain protein consisting of 120 amino acids with a molecular weight of 13.36 kDa and is characterized by two disulfide bonds in the carboxy-terminal region. It belongs to the cystatins superfamily which inactivates lysosomal cysteine proteinases, e.g. cathepsin B, H, K, L and S. Imbalance between Cystatin C and cysteine proteinases is associated with inflammation, renal failure, cancer, Alzheimer's disease, multiple sclerosis and hereditary Cystatin C amyloid angiopathy. Its increased level has been found in patients with autoimmune diseases, with colorectal tumors and in patients on dialysis. Serum Cystatin C seems to be better marker of glomerular filtration rate than creatinine. On the other hand, low concentration of Cystatin C presents a risk factor for secondary cardiovascular events.

#### Research topic

Renal disease

#### Amino Acid Sequence

**MGHHHHH**AS FGAGRRGSRF GAUGGAVDAD VGEEGVQQAL DFAVREYNRA SNDAYHSRAL RVLRRARKQVV SGQNYFLEVE  
IGRTRCTKIQ PNLINCPFHD QPHLMKRLC SPQIYTFWL GKTSLVKSSC QDV

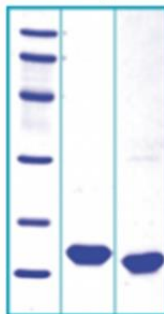
#### Source

E. coli

#### Purity

Purity as determined by densitometric image analysis: >95%

#### SDS-PAGE gel



14% SDS-PAGE separation of Canine Cystatin C  
1. M.W. marker - 14, 21, 31, 45, 66, 97 kDa  
2. reduced and heated sample, 5µg / lane  
3. non-reduced and non-heated sample, 5µg / lane

#### Endotoxin

< 1.0 EU/µg

**Formulation**

Filtered (0,4 µm) and lyophilized in 0.5 mg/mL in 20mM TRIS, 50mM NaCl, pH 7.5

**Reconstitution**

Add deionized water to prepare a working stock solution of approximately 0.5 mg/mL and let the lyophilized pellet dissolve completely. Product is not sterile! Please filter the product by an appropriate sterile filter before using it in the cell culture.

**Storage, Stability/Shelf Life**

Store lyophilized protein at -20°C. Lyophilized protein remains stable until the expiry date when stored at -20°C. Aliquot reconstituted protein to avoid repeated freezing/thawing cycles and store at -80°C for long term storage. Reconstituted protein can be stored at 4°C for a limited period of time; it does not show any change after one week at 4°C.

**Quality Control Test**

BCA to determine quantity of the protein.  
SDS PAGE to determine purity of the protein.  
LAL to determine quantity of endotoxin.

**Applications**

Western blotting

**Note**

This product is intended for research use only.

<b>HEADQUARTERS:</b> BioVendor Laboratorní medicina, a.s.	Karasek 1767/1	621 00 Brno CZECH REPUBLIC	Phone: +420-549-124-185 Fax: +420-549-211-460	E-mail: info@biovendor.com Web: www.biovendor.com
<b>EUROPEAN UNION:</b> BioVendor GmbH	Im Neuenheimer Feld 583	D-69120 Heidelberg GERMANY	Phone: +49-6221-433-9100 Fax: +49-6221-433-9111	E-mail: infoEU@biovendor.com
<b>USA, CANADA AND MEXICO:</b> BioVendor LLC	1463 Sand Hill Road Suite 227	Candler, NC 28715 USA	Phone: +1-828-670-7807 +1-800-404-7807 Fax: +1-828-670-7809	E-mail: infoUSA@biovendor.com
<b>CHINA - Hong Kong Office:</b> BioVendor Laboratories Ltd	Room 4008 Hong Kong Plaza, No.188	Connaught Road West Hong Kong, CHINA	Phone: +852-2803-0523 Fax: +852-2803-0525	E-mail: infoHK@biovendor.com
<b>CHINA - Mainland Office:</b> BioVendor Laboratories Ltd	Room 2917, 29F R & F Ying Feng Plaza No.2 Huaqiang road	Pearl River New Town Guang Zhou, CHINA	Phone: +86-20-38065519 Fax: +86-20-38065529	E-mail: infoCN@biovendor.com

## ANEXO 3



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 56 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Cistatina C como biomarcador precoce e diagnóstico de lesão renal em cães", que tem como responsável Antonio Ultimo de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 28/04/2015. Este certificado espira-se em 28/04/2020.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 56 / 2015, related to the Project entitled "Cystatin C as early biomarker and diagnostic of kidney disease in dogs", under the supervision of Antonio Ultimo de Carvalho, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 28/04/2015. This certificates expires in 28/04/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 28/04/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)