



Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) como um biomarcador de lesão renal: uma revisão

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker of kidney damage: a review

RIALA6/1684

Matheus Wagner LAGO, Rafael Noal MORESCO, Guilherme Vargas BOCHI*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima 1000, Prédio 26, 1401, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900. Tel: 55 3220 8941. Fax: 55 3220 8018. E-mail: bochiguilherme@gmail.com

Recebido: 28.10.2015 - Aceito para publicação: 28.01.2016

RESUMO

Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) é uma molécula proteica predominantemente expressa na parte distal do néfron após a ocorrência de lesão renal. Diferentemente da creatinina sérica e da taxa de filtração glomerular, que são marcadores de função renal, os níveis aumentados de NGAL, tanto no soro quanto na urina, estão intimamente ligados a lesões estruturais do néfron. Os estudos clínicos indicam que poucas horas após a ocorrência da lesão renal aguda os níveis séricos e urinários de NGAL já se apresentam significativamente elevados, enquanto os níveis séricos de creatinina e a sua depuração renal apenas sofrem alterações significativas entre 24-48h após a lesão. Assim, a utilização de marcadores de função renal, usualmente avaliados na prática clínica, pode apresentar algumas limitações além de dificultar a aplicação de medidas precoces que visam a proteção renal. Esta revisão da literatura tem por objetivo analisar os aspectos biológicos e as aplicações da mensuração de NGAL em algumas condições clínicas, incluindo injúria renal, nefropatias e isquemia renal.

Palavras-chave. NGAL, doença renal, prognóstico, biomarcador.

ABSTRACT

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a protein molecule predominantly expressed in the distal nephron after the occurrence of renal injury. Unlike the serum creatinine and the glomerular filtration rate, which are the renal function markers, the increased levels of NGAL, both in serum and urine, are closely linked to the structural injury to the nephron. Clinical studies indicate that a few hours after the occurrence of acute renal injury, the serum and urinary levels of NGAL are already significantly elevated, while the serum creatinine levels and renal clearance only undergo significant changes between 24-48h after injury. Thus, the use of renal function markers, usually assessed in the clinical practice, they may have some limitations also hindering the implementation of early measures aimed at protecting the kidneys. This literature review aims at examining the biological aspects and the applications of NGAL measurement in some clinical conditions, including kidney failure, kidney diseases and renal ischemia.

Keywords. NGAL, kidney disease, prognosis, biomarker.

INTRODUÇÃO

A lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), também conhecida como lipocalina-2, siderocalina, 24p3, ou LCN2, é uma pequena molécula proteica com peso molecular aproximado de 25 kDa e foi primeiramente descrita em grânulos de neutrófilos humanos¹. Além de ser componente dos grânulos de neutrófilos², o NGAL também é expresso em células epiteliais renais em resposta ao processo inflamatório e em células tumorais durante o desenvolvimento de neoplasias³, bem como em outros tecidos, como pulmão, traqueia, estômago e colón⁴. Esta proteína tem como principal ligante os grupos sideróforos, que são pequenas moléculas não peptídicas carreadoras de ferro produzidas por bactérias, plantas e provavelmente em mamíferos, envolvidas no crescimento e na sobrevivência celular, sendo responsáveis pelo suprimento de ferro⁵.

Estudos *in vitro* indicam que o NGAL pode desempenhar uma importante função sobre o desenvolvimento renal⁶. Segundo Rubinstein et al⁷, o NGAL apresenta dois papéis principais: ligar-se a grupos sideróforos presentes na circulação sanguínea, e formar o complexo Holo-NGAL que é transportado para o meio intracelular a fim de nutrir as células, e atuar nos mecanismos de crescimento e diferenciação celular. O NGAL também atua como indutor de apoptose, pois quando está no meio intracelular sob a forma de Apo-NGAL, livre de qualquer ligante, é capaz de transportar o ferro para o meio extracelular, que provoca deficiência de ferro no meio intracelular, e sinaliza a célula a iniciar o processo apoptótico. Além disso, faz parte do sistema imune inato em resposta contra agentes infecciosos, a partir da depleção das reservas de ferro do agente infeccioso⁷.

O NGAL, além de ser uma proteína envolvida nos processos fisiológicos celulares, atua como um biomarcador em várias condições patológicas, e seus níveis estão elevados em certos tipos de neoplasias, inflamação grave,

aterosclerose e doença de Kawasaki⁷. Além disso, a mensuração dos níveis de NGAL, tanto no soro quanto na urina, é considerada como excelente ferramenta na identificação precoce de lesão renal^{5,8,9}. Foi demonstrado que em situações fisiológicas normais há pequena secreção de NGAL¹⁰. Porém, poucas horas após um estímulo danoso à estrutura renal, como os processos de isquemia e inflamação, há aumento da produção deste biomarcador. Tem sido sugerido que este aumento pode ocorrer devido ao seu envolvimento nos processos de bacteriostase e proliferação de túbulos renais, que constituem possíveis vias para a proteção mediada pelo NGAL ao tecido renal¹¹.

Atualmente, a investigação de lesão renal é baseada nos níveis de creatinina sérica e taxa de filtração glomerular, que são marcadores usualmente empregados para avaliar a função renal¹¹, bem como nos níveis de albumina urinária¹². No entanto, um vasto número de condições renais agudas pode existir sem induzir aumento significativo nos níveis de creatinina sérica. Já foi evidenciado que é necessário que ocorra prejuízo de 50 % na função renal para que possa ser identificado o aumento da creatinina sérica¹³. De maneira semelhante, há estudos que indicam que a albuminúria, mesmo sendo considerada como padrão ouro na avaliação de lesão renal, apresenta-se inalterada mesmo após o acometimento à estrutura glomerular¹⁴.

Em contrapartida, já foi demonstrado que o NGAL é considerado como marcador sensível e específico para detectar a lesão renal em vários distúrbios renais, como injúria renal agudo (IRA), nefropatia diabética (ND), nefropatia mediada por IgA (NIgA) e nefrite lúpica (NL). Neste contexto, a avaliação dos níveis de NGAL mostra-se como bom indicador de lesão renal em estágios iniciais antes que haja o comprometimento total do rim, e pode ser empregado como marcador precoce. Embora exista uma série de estudos científicos publicados em periódicos internacionais que avaliam os níveis de NGAL em doenças

renais, não há conhecimento de trabalho de revisão em periódico nacional referente ao envolvimento deste biomarcador em doenças renais agudas e crônicas; tampouco, há evidências científicas da acurácia do teste diagnóstico do NGAL. Baseado nestes aspectos, o objetivo principal deste estudo é realizar a revisão sistemática atual da literatura sobre o papel do NGAL como biomarcador diagnóstico e prognóstico de lesão renal, bem como sua associação com outras doenças renais.

METODOLOGIA

Para efetuar a revisão da literatura foram consultadas as bases *PubMed* e *ScienceDirect*, e a pesquisa foi realizada com a utilização dos seguintes MeSH termos e suas associações: “Neutrophil gelatinase associated lipocalin”, “NGAL”, “Kidney injury”, “Acute kidney injury”, “IgA”, “Lupus”, “Diabetic nephropathy” e “Renal schemia”. Após definir os limites (artigos publicados nos últimos 10 anos), foram obtidos 1.926 artigos quando o MeSH termo “Neutrophil gelatinase associated lipocalin” foi consultado na base *ScienceDirect* e 1.659 artigos quando consultado na base *PubMed*.

Os critérios de relevância para a seleção dos trabalhos utilizados de base neste artigo de revisão foram fundamentados no ano de publicação dos estudos, na relevância científica, a frequência em que estes estudos têm sido citados na literatura internacional. Foram excluídos os trabalhos cuja qualidade de evidência tenha sido classificada como baixa ou muito baixa quando avaliados pelo sistema GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*). Os estudos de maior relevância clínica sobre o NGAL foram classificados de acordo com o delineamento do estudo e qualidade de evidência baseados no sistema GRADE, que estão apresentados na **Tabela 1**. Os artigos publicados há mais de 10 anos que constam na presente revisão foram selecionados em função de sua importância científica sobre o tema.

Tabela 1. Relação dos trabalhos de acordo com o delineamento do estudo e classificação pelo sistema GRADE

Autor	Delineamento do estudo	Classificação GRADE
Mishra et al ⁹	Coorte prospectivo	Alta
Bennett et al ²³	Coorte prospectivo	Alta
Kim et al ²⁵	Coorte prospectivo	Moderada
Dói et al ²⁷	Coorte prospectivo	Moderada
Moon et al ²⁸	Coorte prospectivo	Alta
Rostami et al ²⁹	Coorte prospectivo	Alta
Ding et al ³¹	Coorte prospectivo	Moderada
Peters et al ³²	Coorte retrospectivo	Moderada
Yang et al ³⁴	Coorte prospectivo	Moderada
Brunner et al ³⁵	Coorte prospectivo	Moderada
Fanning et al ³⁸	Coorte prospectivo	Alta
Nielsen et al ⁴⁵	Cross-sectional	Alta
Carvalho et al ⁴⁷	Coorte prospectivo	Alta

GRADE = *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*

Biologia do NGAL

A lipocalina associada à gelatinase de neutrófilo, também conhecida como NGAL, é uma pequena molécula de aproximadamente 25 kDa resistente a proteases que pertence à família das lipocalinas. As lipocalinas constituem um grupo diverso e amplo de proteínas que apresentam variabilidade tanto funcional quanto estrutural. Os membros desta família compreendem as proteínas tipicamente pequenas, secretadas em diferentes processos caracterizados pelo reconhecimento celular, tais como a habilidade de ligação com pequenas moléculas, principalmente hidrofóbicas, ligação com receptores específicos de superfície celular e formação de complexos macromoleculares. Entre alguns papéis fisiológicos desempenhados por proteínas desta superfamília, incluem o

transporte de retinol, transporte de sideróforos, síntese enzimática de prostaglandinas, regulação da resposta imune e homeostase celular¹⁵.

Goetz et al¹⁶, descreveram as principais características do NGAL e demonstraram que seus ligantes de maior importância são os sideróforos. Sideróforos são pequenas moléculas não peptídicas que contêm ferro e que são produzidas por uma grande quantidade de seres vivos, como bactérias, plantas e possivelmente mamíferos. Estas moléculas carreadoras de ferro estão envolvidas no crescimento e diferenciação celular por meio de transporte e suprimento de ferro. Quando complexado com algum sideróforo, o NGAL apresenta coloração vermelha característica e exerce suas principais funções biológicas⁵.

O NGAL se apresenta sob duas formas, o Holo-NGAL e o Apo-NGAL, que são respectivamente a proteína ligada a algum grupo sideróforo e a proteína livre de qualquer ligante⁵. As atividades do NGAL são mediadas pela sua interação com receptores de superfície específicos tais como o 24p3R, que é um transportador de cátions orgânicos, e o complexo megalina-scavenger, que é um ligante proteico não específico encontrado principalmente na borda em escova das células do túbulo renal⁴. Sugere-se que estes dois receptores desempenham um papel fundamental na endocitose e na movimentação do NGAL no meio intracelular. Além disso, o NGAL também pode interagir com outros receptores e ligantes, como o fator de crescimento hepático, gelatinase B e proteínas quinases extracelulares².

A ação deste biomarcador pode ser descrita na seguinte forma: o NGAL presente no plasma interage com receptores específicos (24p3R ou megalina) e é internalizado na célula como um complexo com sideróforos (Holo-NGAL) ou sozinho (Apo-NGAL). Depois da internalização, o Holo-NGAL é capaz de liberar o ferro em que estava ligado no citoplasma, e levar ao acúmulo de ferro intracelular e regular os caminhos genéticos específicos dependentes de ferro. O NGAL pode então ser degradado no interior da célula ou reciclado e ser enviado para o meio extracelular como Apo-NGAL. A maioria dos

efeitos protetores atribuídos a esta proteína, provavelmente, é realizada por meio desse mecanismo. Inversamente, Apo-NGAL pode capturar os sideróforos intracelulares e transportá-los para o espaço extracelular, que priva a célula de suas reservas de ferro. Isso provavelmente representa a forma pela qual o NGAL exerce fortes propriedades antibacterianas e sob condições particulares podem promover a apoptose celular⁵.

O NGAL é expresso em pequenas concentrações em múltiplas células. Deste modo, em indivíduos saudáveis, os baixos níveis de NGAL são detectáveis na circulação sistêmica. Os níveis deste biomarcador no organismo dependem do gênero, idade, função hepática e da sua correlação com parâmetros inflamatórios. Tomonaga et al¹⁷, demonstraram que níveis urinários elevados deste biomarcador foram encontrados em 6,5 % de pacientes que não possuíam IRA, baseada nos critérios convencionais¹⁷. No rim, o NGAL é filtrado pelo glomérulo e então reabsorvido no túbulo proximal pela via dependente de megalina^{4,18}. Imediatamente após a lesão renal aguda, o NGAL é produzido massivamente na parte distal do néfron, o que causa aumento nos níveis plasmáticos e urinários, e a excreção urinária pode ser potencializada pela diminuição da reabsorção desse biomarcador em virtude de lesão tubular proximal¹⁸. Dessa maneira, as células tubulares renais são consideradas uma importante fonte de NGAL em resposta ao processo inflamatório ou lesão tecidual¹⁹.

Estudos *in vitro* indicam que o NGAL pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento renal. Neste contexto, após a incubação de NGAL purificado com células progenitoras epiteliais renais, foi observado que esta proteína induziu um efeito proliferativo sobre estas células, seguido de processo de diferenciação destas com a subsequente formação de estruturas semelhantes a néfrons, com a expressão de marcadores de superfície celular indicativos de células glomerulares e tubulares⁶. Entretanto, este mecanismo não parece ser essencial para induzir a diferenciação celular e o desenvolvimento renal *in vivo*, pois foi

demonstrado que a inativação genética da expressão de NGAL não levou ao bloqueio da maturação renal, provavelmente pela existência de vias alternativas envolvidas nestes processos de maturação²⁰.

ASPECTOS CLÍNICOS: NGAL E PATOLOGIAS

Injúria renal aguda

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome complexa que ocorre em uma ampla variedade de situações, com manifestações clínicas desde as mínimas elevações da creatinina até a falência renal anúrica⁸. Esta condição é diagnosticada principalmente quando há elevação dos níveis séricos de creatinina, o que indica a perda da função excretora renal⁸. Esta doença pode afetar de 20 % a 30 % dos pacientes hospitalizados, o que representa o alto custo financeiro e a direta correlação com o aumento de morbidade e mortalidade²¹.

Vários estudos clínicos têm sugerido que os níveis de NGAL na urina podem servir como marcador precoce de IRA. Mishra et al²² observaram aumento da expressão de NGAL nos túbulos renais pouco tempo após a ocorrência de lesão tecidual, o que sugere que o aumento deste marcador ocorre de maneira precoce na IRA²². Além disso, outra característica deste biomarcador é a correlação com a gravidade e duração da lesão, sendo possível observar o aumento dos seus níveis tanto no soro quanto na urina^{22,23}.

Em uma meta-análise que avaliou 19 estudos, envolvendo-se um total de 2.538 pacientes, foi demonstrado que os níveis aumentados de NGAL precederam o diagnóstico de IRA²⁴. Além disso, Haase et al⁸ também investigaram o papel diagnóstico e prognóstico de NGAL em amostras de urina e de plasma. Neste estudo, foi demonstrado que os níveis aumentados de NGAL e taxas normais de creatinina sérica identificaram 40 % a mais de pacientes com IRA, quando comparados com aqueles que apresentaram apenas os níveis séricos de creatinina elevados. Além disso, foi evidenciado que níveis aumentados de creatinina sérica e níveis normais de NGAL indicavam apenas o decréscimo da função renal, sem

apresentar lesão tubular. Foi também demonstrado que níveis elevados de NGAL na IRA, com ou sem aumento de níveis de creatinina, estavam associados com maior risco de morte e necessidade de terapia de substituição renal. Assim, o aumento da concentração de NGAL indica a ocorrência de lesão tubular que precede a diminuição da função renal, o que sugere que este é um biomarcador precoce no diagnóstico de IRA, e como uma importante ferramenta no prognóstico de desfechos negativos⁸.

Kim et al²⁵ conduziram um estudo em que analisaram indivíduos em estado crítico e com suspeita de sepse; e do total de 231 pacientes, 18 desenvolveram IRA e 98 tiveram sepse confirmada. A relação entre sepse e IRA ainda não é totalmente compreendida, mas considera-se que esta esteja associada com hipoperfusão, frequente trombose de microvasos, infiltração de células do sistema imune e apoptose, o que sugere o significativo papel da sepse na toxicidade imune renal²⁶. Neste estudo foi observado que os pacientes que desenvolveram IRA apresentaram níveis mais elevados de NGAL. No entanto, não foi encontrada diferença estatística nos níveis de NGAL quando foram comparados os pacientes com sepse e que desenvolveram IRA e os pacientes com apenas sepse. Este resultado sugere que aumento na produção de NGAL extrarrenal pode ter ocorrido em resposta a sepse²⁵.

Doi et al²⁷ analisaram pacientes adultos que seriam submetidos à cirurgia cardíaca; e do total de 146 pacientes, 68 receberam diagnóstico de doença renal crônica (DRC). E em até três dias após o procedimento operatório, a IRA foi diagnosticada em 53 pacientes. Os níveis plasmáticos de NGAL e de creatinina foram significativamente elevados em amostras coletadas de pacientes antes da cirurgia cardíaca, e que posteriormente desenvolveram IRA, quando comparados ao grupo de indivíduos que não desenvolveu a doença. Além disso, o aparecimento de IRA foi maior no grupo que previamente apresentava DRC. Os níveis desse biomarcador foram também mensurados em amostras de plasma coletado em 2, 4, 12, 24 e 36 horas após o procedimento cirúrgico; e os níveis de NGAL estavam significativamente elevados em todos

os pontos de tempo no grupo que desenvolveu IRA. Foi também evidenciado que o aumento de NGAL foi mais expressivo em pacientes que desenvolveram IRA moderada e grave, o que indica que os níveis plasmáticos desse biomarcador podem estar associada à gravidade da doença. A mensuração dos níveis plasmáticos de NGAL em portadores de DRC na fase pré-operatória pode identificar um grupo de alto risco para doença renal em estágio final e morte. Ademais, este pode ser indicador precoce de IRA quando comparado com os níveis plasmáticos de creatinina ou taxa de filtração glomerular²⁷.

Moon et al²⁸ avaliaram o valor preditivo dos níveis urinários de NGAL para a recuperação após IRA, em comparação com outros marcadores como creatinina sérica e cistatina C urinária. Participaram do estudo 66 pacientes, dos quais 33 pertenciam ao grupo em que houve recuperação, que foi definida pela diminuição de 50 % dos níveis séricos de creatinina em relação ao nível de pico de cada paciente; e os demais 33 pertenciam ao grupo em que não houve recuperação da IRA. As causas mais comuns de IRA foram sepse ou infecção (50,0 %), isquemia (27,3 %) e nefrotoxinas (19,7 %). Foi observado que o NGAL urinário era o preditor de mau prognóstico para recuperação de IRA e que baixos níveis deste marcador estavam associados à maior probabilidade de recuperação. Porém, os níveis de creatinina sérica e cistatina C urinária apenas mostraram-se significativamente diferentes após o 4º dia, sugerindo-se que estas são marcadores menos precoces do que NGAL. Os autores concluíram que os níveis de NGAL urinário estão associados com a possibilidade de haver ou não recuperação após IRA, tornando-se possível efetuar a escolha do tratamento com o melhor potencial terapêutico para cada paciente²⁸.

A fim de avaliar o potencial prognóstico de NGAL, Rostami et al²⁹ analisaram 64 pacientes submetidos ao transplante renal, dos quais 31 desenvolveram IRA após o transplante. Houve aumento dos níveis de NGAL urinário nas primeiras horas após o transplante renal nos pacientes que desenvolveram IRA, o que demonstra que esse biomarcador é um bom preditor de IRA após a cirurgia de substituição

renal²⁹. Os principais achados dos estudos referentes à IRA, bem como a avaliação dos níveis de NGAL nas condições patológicas subsequentes estão descritos na **Tabela 2**.

Nefropatia mediada por IgA

A nefropatia mediada por IgA (NIgA) é a forma mais comum de glomerulonefrite³⁰, causada pelo acúmulo de IgA nos rins, que por sua vez leva à lesão glomerular. Ding et al³¹ quantificaram os níveis urinários de NGAL em pacientes portadores de NIgA, que apresentavam elevada proteinúria, e demonstraram o aumento significativo nos níveis de NGAL em pacientes portadores desta doença. Após 6 meses de tratamento com varfarina sódica, benazepril e tripterygium, em 21 pacientes que responderam bem ao tratamento houve diminuição na proteinúria e nos níveis de NGAL, o que evidencia que esse biomarcador além de ser usado para identificar a lesão renal decorrente de NIgA, também pode ser utilizado para monitorar o tratamento do paciente. Os níveis de NGAL também estão associados com o grau de lesão histológica renal³¹.

Recentemente, Peters et al³² quantificaram o NGAL urinário em 65 pacientes portadores de NIgA e 65 voluntários saudáveis como grupo controle. Os níveis de NGAL estavam aumentados no grupo de pacientes quando comparado com o grupo controle. Os níveis desse biomarcador foram também associados com o desenvolvimento de doença renal em estágio final³².

Nefrite lúpica

A nefrite lúpica (NL) é decorrente de lúpus eritematosos sistêmicos (LES), que é uma doença autoimune inflamatória que atinge diversos órgãos. Nos rins, a lesão ocorre pelo depósito de imunoglobulinas e complementos, que se não for tratado evoluirá para falência renal. Rubinstein et al⁷ sugeriram que este biomarcador poderia ser uma boa ferramenta para efetuar a detecção de NL, uma vez que seus níveis apresentavam-se significativamente aumentados em pacientes portadores de LES⁷. Os níveis de NGAL aumentam em resposta à inflamação causada pela NL e diminuem ao longo do tratamento³³.

Yang et al³⁴ demonstraram a ocorrência

Tabela 2. Alguns estudos que associam NGAL com doenças renais

Autor	População	Achados chave
Mishra et al ⁹	71 crianças submetidas à cirurgia corretiva cardíaca com circulação extracorpórea	O NGAL apresentou elevado potencial diagnóstico precoce de IRA. Utilizando-se o <i>cut-off</i> de 50µg/L foram obtidas sensibilidade de 100 % e especificidade de 98 %
Bennett et al ²³	196 crianças submetidas à cirurgia corretiva cardíaca com circulação extracorpórea	Os níveis urinários de NGAL foram associados à duração e à gravidade do IRA. Por meio de análise da curva ROC, foram obtidas sensibilidade de 95 % e especificidade de 82 % considerando-se o <i>cut-off</i> de 100 ng/mL
Kim et al ²⁵	231 pacientes em estado crítico com suspeita de sepsé	O desenvolvimento de IRA foi associado aos níveis elevados de NGAL plasmático. O <i>cut-off</i> para tomada de decisão terapêutica para o NGAL foi de 150 ng/mL.
Dói et al ²⁷	146 pacientes adultos submetidos à cirurgia cardíaca	A dosagem de níveis plasmáticos de NGAL em portadores de DRC na fase pré-operatória identificou um grupo de alto risco para doença renal em estágio final e mortalidade. NGAL mostrou ser indicador precoce de ocorrência de IRA quando comparado com os níveis plasmáticos de creatinina ou taxa de filtração glomerular. Considerando-se o valor de <i>cut-off</i> de 220 ng/mL, a sensibilidade foi de 89 % e a especificidade de 75 % para identificar IRA
Moon et al ²⁸	66 pacientes com IRA	O NGAL urinário foi o marcador de mau prognóstico para recuperação de IRA; e baixos níveis deste marcador foram associados à maior probabilidade de recuperação em pacientes diagnosticados com IRA. O <i>cut-off</i> de NGAL urinário para recuperação de IRA foi de 348,2 ng/mL com sensibilidade de 84 % e especificidade de 68,7 %
Rostami et al ²⁹	64 pacientes submetidos à substituição renal	Níveis elevados de NGAL urinário identificaram precocemente o desenvolvimento de IRA após a cirurgia de transplante renal. Considerando-se o <i>cut-off</i> de 204 ng/mL, foram obtidas sensibilidade de 72 % e especificidade de 67 %
Ding et al ³¹	70 pacientes com NIgA	O NGAL apresentou-se elevado em pacientes com NIgA quando comparados com indivíduos saudáveis. Após seis meses de tratamento da nefropatia foi observada a diminuição na proteinúria e nos níveis de NGAL. Considerando-se o <i>cut-off</i> de 20,5 µg/L, foram obtidas a sensibilidade de 90,2 % e especificidade de 67,9 % para identificar pacientes com NIgA
Peters et al ³²	65 pacientes com NIgA	O NGAL apresentou-se elevado em pacientes com NIgA quando comparados com indivíduos saudáveis. Os níveis deste biomarcador foram associados ao desenvolvimento de doença renal em estágio final
Yang et al ³⁴	42 pacientes com NL	Os níveis urinários de NGAL foram elevados em pacientes portadores de NL e em indivíduos portadores de LES que apresentavam proteinúria quando comparados com indivíduos saudáveis. Considerando-se o <i>cut-off</i> de 31 mg/dia, foram obtidas sensibilidade de 70,8 % e especificidade de 84,5 %
Brunner et al ³⁵	76 pacientes com NL	Apesar da capacidade de prever a ocorrência de lesão renal proveniente de NL e ser um método pouco invasivo, o NGAL não conseguiu discriminar as diferentes classes histológicas de NL
Fanning et al ³⁸	50 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca	O NGAL urinário mostrou ser um bom preditor para IRA associada à cirurgia cardíaca. A avaliação dos níveis séricos e urinários absolutos de NGAL demonstrou bom valor preditivo para IRA associada à cirurgia cardíaca
Nielsen et al ⁴⁵	148 pacientes com diabetes mellitus tipo 1	Os níveis de NGAL foram elevados em pacientes diabéticos quando comparados com indivíduos saudáveis. O aumento de NGAL foi também detectado em pacientes diabéticos normoalbuminúricos, o que indica lesão tubular em estágio inicial
Carvalho et al ⁴⁷	117 pacientes com diabetes mellitus tipo 2	Os níveis de NGAL urinário apresentam associação positiva com a albuminúria. O aumento de NGAL foi também detectado em pacientes diabéticos normoalbuminúricos, o que indica ND em estágio inicial

NGAL = lipocalina associada à gelatinase neutrofilica; IRA = injúria renal aguda; ROC = *receiver operator characteristic*; DRC = doença renal crônica; NIgA = nefropatia mediada por IgA; NL = nefrite lúpica; LES = lúpus eritematoso sistêmico; ND = nefrite diabética

de aumento dos níveis urinários de NGAL em pacientes portadores de NL e em pacientes portadores de LES que apresentavam proteinúria. Os níveis desse marcador não estavam alterados em pessoas portadoras de outras doenças autoimunes avaliadas nesse estudo, como síndrome de Sjögren, síndrome antifosfolípide, vasculite, anemia hemolítica autoimune, artrite reumatoide com sobreposição de esclerose sistêmica, polimiosite, doença de Still com início na idade adulta, pênfigo e urticária aguda, e em indivíduos portadores de LES mas sem comprometimento renal³⁴.

Brunner et al³⁵ associaram os níveis urinários de NGAL com os achados histológicos em 76 pacientes portadores de NL, identificados por meio de biópsia renal. Das 76 amostras de urina, 38 foram obtidas no dia anterior ou no dia da realização da biópsia, e as outras 38 foram coletadas, em média no intervalo de 3,5 dias, após a realização da biópsia. Os 38 pacientes que realizaram a biópsia antes da coleta de amostra de urina, estavam submetidos ao intenso tratamento para NL. Considerando-se apenas os 38 pacientes que realizaram a biópsia após a coleta da urina, houve uma correlação entre os níveis mais baixos de NGAL concomitante com a presença de crescimentos celulares. Este é importante achado histopatológico indicativo da proliferação da NL, o que indica a ocorrência de possível falha na proteção do rim frente às mudanças estruturais causadas pela NL³⁵. Apesar da capacidade de prever o surgimento de lesão renal proveniente de NL e de ser um método pouco invasivo, o NGAL não consegue discriminar as diferentes classes histológicas de NL, e não há possibilidade de substituir a biópsia renal, que é atualmente o padrão ouro no diagnóstico de NL³⁶.

Isquemia renal

Acredita-se que o rim seja altamente suscetível à lesão causada por isquemia como resultado de vasoconstrição, lesão endotelial ou pela ativação de respostas inflamatórias imunes. Esta suscetibilidade ocorre, em parte, pela associação entre o suprimento sanguíneo na medula renal externa, em que as células tubulares são mais vulneráveis à isquemia e pela resposta

funcional do néfron, que podem levar à toxicidade celular³⁷.

Fanning et al³⁸ buscaram identificar o ponto no tempo, dentro do período perioperatório, em que os níveis séricos e urinários de NGAL teriam o maior poder preditivo para o desenvolvimento de IRA. Estes pesquisadores investigaram também se a mudança dos níveis de NGAL a partir de um valor basal seria melhor marcador prognóstico de IRA do que o valor absoluto desse biomarcador. O NGAL urinário mostrou ser o melhor preditor para IRA associada à cirurgia cardíaca, principalmente quando mensurado no período de 4 e 24 horas após o início da circulação extracorpórea. A avaliação dos níveis absolutos de NGAL tanto urinário quanto sérico mostrou ser o melhor preditor de IRA associada à cirurgia cardíaca em relação à avaliação do nível basal desse biomarcador³⁸.

Os níveis séricos de creatinina levam de um a três dias para evidenciar a IRA após a cirurgia cardíaca, ao passo que NGAL leva até três horas para demonstrar níveis urinários e séricos significativamente elevados³⁹. Um recente estudo mostrou que mesmo quando os níveis de creatinina não estão clinicamente elevados, a dosagem do NGAL tem a capacidade de detectar IRA subclínica, que pode evoluir para situações mais graves⁸.

Em crianças de até três anos de idade e portadoras de doença cardíaca congênita, o NGAL mostrou ser um excelente biomarcador de IRA quando determinado no período de 4 a 6 horas após a cirurgia cardíaca^{9,23}. No entanto, nos adultos os níveis de NGAL têm menor valor preditivo para IRA⁴⁰. Mishra et al⁹ obtiveram sensibilidade de 100 % e especificidade de 98 % na predição de IRA em duas horas após a cirurgia cardíaca pediátrica, ao avaliar os níveis de NGAL sérico e urinário⁹. Bennett et al²³ fizeram associação dos níveis urinários de NGAL em duas horas após a cirurgia cardíaca com a duração e gravidade do IRA, a necessidade de medidas de suporte, como hemodiálise, diálise peritoneal e transplante renal, tempo de estada no hospital e risco de morte²³. Além disso, os níveis elevados de NGAL urinário estão associados à prolongada ventilação mecânica e permanência mais longa

em unidade de tratamento intensivo⁴¹.

Nefropatia diabética

Nefropatia diabética é uma complicação grave que se desenvolve em 30-40 % dos pacientes diabéticos, e o monitoramento da albuminúria e intervenções que visam à proteção do rim são essenciais⁴². A albuminúria ocorre pela excreção de albumina na urina e é primariamente o resultado de lesão glomerular, mas também pela falta de reabsorção tubular da albumina⁴³. Mesmo que a excreção de albumina ocorra nas regiões glomerular e tubular, as lesões que ocorrem nesses dois locais nem sempre estão associadas⁴⁴, e um marcador mais específico para lesão tubular se faz necessário.

Nielsen et al⁴⁵ demonstraram que mesmo em pacientes portadores de diabetes tipo 1, que apresentavam valores de albuminúria dentro dos valores de referência, os níveis de NGAL urinário foram elevados quando comparados com os indivíduos saudáveis não diabéticos. Além disso, foi detectada a correlação entre os níveis mais elevados de albuminúria com os níveis mais altos de NGAL⁴⁵. Resultados similares foram achados em estudo feito com pacientes portadores de diabetes tipo 2, em que os valores mais elevados de albuminúria estavam também associados com os níveis aumentados de NGAL⁴⁶.

Em estudo mais recente, Carvalho et al⁴⁷ investigaram se os níveis urinários de NGAL estariam elevados em pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 e com níveis normais ou pouco elevados de albuminúria. Estes pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o valor obtido da razão entre os níveis urinários de albumina e de creatinina (uACR). Em um dos grupos foram incluídos os pacientes com níveis normais de albuminúria (uACR < 10 mg/g de creatinina). Os pacientes com níveis pouco elevados de albuminúria (uACR 10-30 mg/g de creatinina) constituíram o segundo grupo e o terceiro grupo foi compreendido por pacientes com níveis moderadamente ou excessivamente elevados de albuminúria (uACR > 30 mg/g de creatinina). Os níveis de NGAL urinário aumentaram progressivamente entre os grupos, e estes dados mostraram a existência de correlação

positiva entre albuminúria e NGAL urinário⁴⁷.

ASPECTOS LABORATORIAIS DO NGAL

A dosagem dos níveis de NGAL pode ser realizada em amostras de plasma e soro, livres de hemólise e, também, em urina que é a amostra geralmente utilizada. A análise dos níveis deste biomarcador é realizada por meio de técnicas de imunoensaio como ensaio de imun absorção ligada à enzima (ELISA) e mais recentemente por meio de imun quimioluminescência⁴⁸. Grenier et al⁴⁸ avaliaram diferentes aspectos pré-analíticos sobre os níveis de NGAL, como os interferentes analíticos e a estabilidade a curto e longo prazo das amostras. Neste estudo foi investigada a estabilidade de 95 amostras de urina, que foram mantidas refrigeradas a 4 °C para avaliar a estabilidade em curto prazo, e a -20 °C e -75 °C para avaliar a estabilidade de longo prazo. Houve uma queda menor do que 2 % nos níveis de NGAL nas amostras de urina estocadas a 4 °C durante o período de até 22 dias, e queda de 7,8 % e 12,0 % em média nas amostras estocadas a -75 °C e -20 °C, respectivamente, em um período de até 13 meses. Por conseguinte, é recomendado que as amostras a serem empregadas na mensuração dos níveis de NGAL não de imediato, sejam estocadas à temperatura de -75 °C para garantir a preservação dessa proteína⁴⁸.

Em estudos mais recentes, Vrie et al⁴⁹ investigaram a estabilidade do NGAL em amostras de urina armazenadas em diferentes temperaturas (4 °C e -80 °C) e com a presença ou ausência de inibidor de protease. Os níveis de NGAL se mantiveram estáveis durante o período de 48h para as amostras armazenadas a 4 °C e por um período de seis meses para as amostras armazenadas a -80 °C, independentemente da adição de inibidor de protease⁴⁹.

A adição de alguns interferentes pré-analíticos, como acetona (100 mg/dL), ácido ascórbico (1 g/dL), albumina (1 g/dL), bilirrubina (2 mg/dL), creatinina (1 g/dL), etanol (200 mg/dL), glicose (2 g/dL), hemoglobina (1 g/dL), NaCl (6 g/dL), ácido oxálico (100 mg/dL), riboflavina (7,5 mg/dL) e ureia (12 g/dL) nas amostras de urina de voluntários saudáveis não induziram alterações

significativas nos valores de NGAL⁴⁸.

CONCLUSÃO

A IRA e outras condições em que há o envolvimento de lesão renal, como DRC, nefropatia mediada por IgA, nefrite lúpica, isquemia renal e nefropatia diabética, que são doenças que atingem pacientes em estado crítico, faz com que ocorra o aumento considerável da necessidade de terapia de substituição renal e risco de morte. O diagnóstico e o prognóstico destas patologias estão baseados na avaliação de biomarcadores de função e de lesão renal. Os marcadores atualmente utilizados na detecção da perda de função renal, como a creatinina sérica e a taxa de filtração glomerular, muitas vezes apresentam aplicação limitada na prática clínica. Neste contexto, é necessária que ocorra uma perda considerável na função renal para induzir alteração detectável desses parâmetros. Além disso, a albuminúria que é o marcador padrão ouro na avaliação de lesão renal, pode também apresentar-se inalterada em situações nas quais já há lesão renal instalada.

Tendo em vista estas limitações, o NGAL tem sido amplamente estudado considerando-se o seu papel na ocorrência de lesão renal, com destaque para IRA, bem como pela viabilidade de se tornar um biomarcador sensível e preciso que pode ser utilizado na prática clínica para identificar a ocorrência desta doença em seu estágio inicial. Conforme representada na Tabela 2, a avaliação dos níveis séricos e urinários de NGAL mostra o bom potencial diagnóstico de IRA, e possui a capacidade de predizer os desfechos clínicos e de ser utilizado no monitoramento da doença. Em virtude de precocidade de ser detectada em doenças renais, sua correlação com a progressão da doença e o fato da possibilidade de ser mensurado em amostras de urina, cuja coleta é feita por meio de procedimento não invasivo, fazem do NGAL um importante marcador de lesão renal. De fato, a avaliação de marcadores de dano tubular em doenças renais, incluindo-se o NGAL, tem ganhado destaque pelo fato destes apresentarem boa sensibilidade e especificidade em detectar a lesão. Particularmente, o NGAL apresenta-se como um marcador promissor de dano renal em uma série

de doenças renais, como IRA, DRC e nefropatias. No entanto, a albuminúria ainda é o padrão ouro no diagnóstico de lesão renal, e a avaliação da função renal é realizada por meio de avaliação da creatinina sérica e sua depuração renal. Portanto, a avaliação do NGAL, nas amostras de urina e de plasma, parece ser potencial ferramenta a ser implementada na prática clínica para complementar os parâmetros tradicionais de diagnóstico, prognóstico e de monitoramento das doenças renais. Além disso, novos estudos devem ser realizados para estabelecer o verdadeiro papel do NGAL, seja como parâmetro diagnóstico ou como um marcador de monitoramento. Neste sentido, ainda não há condições de afirmar de que o NGAL possa substituir os marcadores que atualmente são utilizados no diagnóstico das doenças renais, mas sim de sugerir que a mensuração dos seus níveis pode refletir em um diagnóstico precoce e exato em pacientes de grupos de risco para doenças renais, quando acompanhado da análise de marcadores bem estabelecidos na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Fernández CA, Yan L, Louis G, Yang J, Kutok JL, Moses MA. The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005;11(15):5390-5. [DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2391].
2. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood*. 1994;83(3):799-807.
3. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 1996;38(3):414-20.
4. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*. 2005;579(3):773-7. [DOI: 10.1016/j.febslet.2004.12.031].

5. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):595-605. [DOI: 10.1053/j.ajkd.2008.01.020].
6. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*. 2002;10(5):1045-56. [DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00710-4].
7. Rubinstein T, Pitashny M, Putterman C. The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. *Autoimmun Rev*. 2008;7(3):229-34. [DOI: 10.1016/j.autrev.2007.11.013].
8. Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G, et al. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: A multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(17):1752-61. [DOI: 10.1016/j.jacc.2010.11.051].
9. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365(9466):1231-8. [DOI: 10.1016/S0140-6736(05)74811-x].
10. Fjaertoft G, Foucard T, Xu S, Venge P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a diagnostic tool in children with acute infections: A study of the kinetics. *Acta Paediatr*. 2005;94(6):661-6. [DOI:10.1080/08035250510031610].
11. Singer E, Markó L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Müller DN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207(4):663-72. [DOI: 10.1111/apha.12054].
12. Glasscock RJ. Prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes: millimeters or milligrams. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12):3276-8. [DOI: 10.1681/ASN.2006101131].
13. Devarajan, P. Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)*. 2010;15(4):419-28. [DOI: 10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x].
14. Matheson A, Willcox MD, Flanagan J, Walsh BJ. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26(3):150-71. [DOI: 10.1002/dmrr.1068].
15. Flower DR. The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochem J*. 1996;318(1):1-14. [DOI: 10.1042/bj3180001].
16. Goetz DH, Willie ST, Armen RS, Bratt T, Borregaard N, Strong RK. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry*. 2000;39(8):1935-41. [DOI:10.1021/bi992215v].
17. Tomonaga Y, Szucs T, Ambühl P, Nock S, Risch M, Risch L. Insights on urinary NGAL obtained in a primary care setting. *Clin Chim Acta*. 2012;413(7-8):733-9. [DOI: 10.1016/j.cca.2012.01.001].
18. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophoreiron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005;115(3):610-21. [DOI: 10.1172/JCI200523056].
19. Mahdavi-Mazdeh M, Abdollahi A, Nozary HB, Sobhani Z. Comparison of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) with serum creatinine in prediction of kidney suitability for transplantation. *Nephrourol Mon*. 2013;5(1):679-82. [DOI: 10.5812/numonthly.5002].
20. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432(7019):917-21. [DOI:10.1038/nature03104].
21. Lassnigg A, Schmid ER, Hiesmayr M, Falk C, Druml W, Bauer P, et al. Impact of minimal increases in serum creatinine on outcome in patients after cardiothoracic surgery: do we have to revise current definitions of acute renal failure? *Crit Care Med*. 2008;36(4):1129-37. [DOI: 10.1097/CCM.0b013e318169181a].
22. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534-43. [DOI:10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6].

23. Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3):665-673. [DOI: 10.2215/CJN.04010907].
24. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(6):1012-24. [DOI: 10.1053/j.ajkd.2009.07.020].
25. Kim H, Hur M, Cruz DN, Moon HW, Yun YM. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in critically ill patients with suspected sepsis. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1414-8. [DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.05.069].
26. Payen D, Lukaszewicz AC, Legrand M, Gayat E, Faivre V, Megarbane B, et al. A multicentre study of acute kidney injury in severe sepsis and septic shock: association with inflammatory phenotype and HLA genotype. *PLoS One*. 2012;7(6):e35838. [DOI: 10.1371/journal.pone.0035838].
27. Doi K, Urata M, Katagiri D, Inamori M, Murata S, Hisagi M, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury superimposed on chronic kidney disease after cardiac surgery: a multicenter prospective study. *Crit Care*. 2013;17(6):R270. [DOI: 10.1186/cc13104].
28. Moon SJ, Park HB, Yoon SY, Lee SC. Urinary biomarkers for early detection of recovery in patients with acute kidney injury. *J Korean Med Sci*. 2013;28(8):1181-6. [DOI: 10.3346/jkms.2013.28.8.1181. Epub 2013 Jul 31].
29. Rostami Z, Nikpoor M, Einollahi B. Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) for early diagnosis of acute kidney injury in renal transplant recipients. *Nephrourol Mon*. 2013;5(2):745-52. [DOI: 10.5812/numonthly.9385].
30. Ibels LS, Gyory AZ, Catterson RJ, Pollock CA, Mahony JE, Waugh DA, et al. Primary IgA nephropathy: natural history and factors of importance in the progression of renal impairment. *Kidney Int Suppl*. 1997;61:S67-S70.
31. Ding H, He Y, Li K, Yang J, Li X, Lu R, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol*. 2007;123(2):227-34. [DOI: 10.1016/j.clim.2007.01.010].
32. Peters HP, Waanders F, Meijer E, van den Brand J, Steenbergen EJ, van Goor H, et al. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(11):1-8. [DOI: 10.1093/ndt/gfr135].
33. Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M, Passo MH, Olson J, Singer NG, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2772-81. [DOI: 10.1002/art.24751].
34. Yang CC, Hsieh SC, Li KJ, Wu CH, Lu MC, Tsai CY, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a potential biomarker for renal damage in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:759313. [DOI: 10.1155/2012/759313].
35. Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Suzuki M, Petri M, Kiani AN, et al. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2687-97. [DOI: 10.1002/art.34426].
36. Yilmaz A, Sevetoglu E, Gedikbasi A, Karyagar S, Kiyak A, Mulazimoglu M, et al. Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(12):2387-92. [DOI: 10.1007/s00467-009-1279-6].
37. Bagshaw SM, Bellomo R, Devarajan P, Johnson C, Karvellas CJ, Kutsiogiannis DJ, et al. Review article: acute kidney injury in critical illness. *Can J Anaesth*. 2010;57(11):985-98. [DOI: 10.1007/s12630-010-9375-4].
38. Fanning N, Galvin S, Parke R, Gilroy J, Bellomo R, McGuinness S. A prospective study of the timing and accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in predicting acute kidney injury in high-risk cardiac surgery patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2016;30(1):76-81. [DOI: 10.1053/j.jvca.2015.07.034]. [Epub 2015 Jul 30].

39. Wyckoff T, Augoustides JG. Advances in acute kidney injury associated with cardiac surgery: the unfolding revolution in early detection. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012;26(2):340-5. [DOI: 10.1053/j.jvca.2012.01.001].
40. Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006;105(3):485-91.
41. Parikh CR, Devarajan P, Zappitelli M, Sint K, Thiessen-Philbrook H, Li S, et al. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after pediatric cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1737-47. [DOI: 10.1681/ASN.2010111163].
42. Parving HH, Mauer M, Ritz E. In: Brenner & Rector's *The Kidney*. 8^a ed. Boston (WB):Saunders; 2008.
43. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int*. 2006;69(3):440-9. [DOI: 10.1038/sj.ki.5000141].
44. Brocco E, Fioretto P, Mauer M, Saller A, Carraro A, Frigato F, et al. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int*. 1997;63:S40-4.
45. Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS, Tarnow L, Lajer M, Hansen PR, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril. *Diabet Med*. 2010;27(10):1144-50. [DOI: 10.1111/j.1464-5491.2010.03083.x].
46. Bolognani D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Fazio MR, Nicocia G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32(2):91-8. [DOI: 10.1159/000209379].
47. Carvalho JAM, Tatsch E, Hausen BS, Bollick YS, Moretto MB, Duarte T, et al. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem*. 2016;49(3):232-6. [DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.10.016]. [Epub 2015 Oct 27].
48. Grenier FC, Ali S, Syed H, Workman R, Martens F, Liao M, et al. Evaluation of the ARCHITECT urine NGAL assay: assay performance, specimen handling requirements and biological variability. *Clin Biochem*. 2010;43(6):615-20. [DOI:10.1016/j.clinbiochem.2009.12.008].
49. van de Vrie M, Deegens JK, van der Vlag J, Hilbrands LB. Effect of long-term storage of urine samples on measurement of kidney injury molecule 1 (KIM-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). *Am J Kidney Dis*. 2014;63(4):573-6. [DOI:10.1053/j.ajkd.2013.10.010].