

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DO SORO URÊMICO DE CÃES COM
INSUFICIÊNCIA RENAL SOBRE O METABOLISMO
OXIDATIVO E APOPTOSE DOS
POLIMORFONUCLEARES**

**Tatiana de Sousa Barbosa
Médica Veterinária**

**ARAÇATUBA - SP
2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DO SORO URÊMICO DE CÃES COM
INSUFICIÊNCIA RENAL SOBRE O METABOLISMO
OXIDATIVO E APOPTOSE DOS
POLIMORFONUCLEARES**

**Tatiana de Sousa Barbosa
Orientador: Prof. Ass. Dr. Paulo César Ciarlini**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia –
UNESP, Campus de Araçatuba,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal (Fisiopatologia
Médica e Cirúrgica).

**ARAÇATUBA - SP
2009**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TATIANA DE SOUSA BARBOSA – nascida em 07 de maio de 1981, na cidade de São Paulo, iniciou e concluiu o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Campina Grande/Patos – PB (2000 - 2005). Durante o período acadêmico desenvolveu atividades tais como monitoria e estágios extracurriculares e curriculares. Em 2006 iniciou a Residência em Diagnóstico Veterinário pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *Câmpus* de Araçatuba na qual desenvolveu projetos junto ao orientador que resultaram em trabalhos científicos, e ainda colaborou com projetos de outros discentes da mesma instituição. Em 2008 ingressou no curso de mestrado da Pós Graduação em Ciência Animal da UNESP- Araçatuba continuou a colaborar em projetos de pesquisa do orientador, auxiliou em projetos de iniciação científica e realizou estágio de docência, participando de aulas práticas e teóricas da disciplina de Laboratório Clínico Veterinário. Ainda durante o ano integralizou os créditos e desenvolveu seu projeto de pesquisa. Em 11 de março de 2009 foi aprovada no exame geral de qualificação intitulado “Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães” no qual faz parte desta dissertação.

Aos meus pais, Eunice e Cláudio, com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa oportunidade e por toda força ao longo da minha vida.

Ao Professor Paulo César Ciarlini pela orientação, pelas valiosas idéias e acima de tudo, pelo empenho, entusiasmo e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais, Eunice e Cláudio, exemplos em minha vida, por toda a educação que me transmitiram. Sou eternamente agradecida pelo apoio incondicional, sem o qual não alcançaria meus êxitos.

Ao meu irmão Cláudius por todo apoio, carinho e incentivos.

Aos meus familiares que me incentivaram nesta longa caminhada.

A toda equipe do Laboratório Clínico Veterinário pelo auxílio durante todos estes anos de trabalho.

A Adriana Almeida, Bruna Biffe e Carolina Mori por toda e qualquer ajuda prestada durante a realização deste, mas sem dúvida alguma a mais importante foi a presença, a amizade e o carinho de vocês durante os dias estressantes regado a boas risadas e a um pão caseiro (ou melhor, laboratorial)

A Luciana Carrenho e Karina Fattori, amigas de todas as horas.

Aos pós-graduandos Anivaldo Corte, Emiliana Batista, Fabrine Bigatão, Juliana Peloi, Marina Ferrarezi, Marissol Cardoso e Sheila Ribeiro pelas ajudas e grato convívio durante todo este tempo que certamente sentiremos saudades. Em especial ao Rafael Cipriano por todo seu carinho, dedicação, paciência e ajuda prestada.

Às pós-graduandas Talita Souza, Maria Carolina Vivan e Juliana Peloi por gentilmente permitirem a utilização de seus cães como parte deste experimento.

Ao Canil da Polícia Militar de Araçatuba pela permissão de seus cães para participarem deste estudo.

À Profa. Sílvia Helena Venturolli Perri pela ajuda na realização das análises estatísticas.

À minha banca de Qualificação, Profa. Dra. Mary Marcondes e Profa. Dra. Valéria Lima, pelas valiosas sugestões para melhoria deste trabalho.

À Profa. Dra. Juliana Regina Peiró pela correção do abstract da qualificação e ao Prof. Dr. Fabiano Antônio Cadioli pela ajuda na versão final.

Às antigas “iniciações científicas do grupo” e atuais mestrandas da USP, Cristiana Trinconi e Sílvia Cellone pelas considerações no artigo da qualificação. E à atual, Maria Carolina Nogueira, pela ajuda.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela oportunidade de realizar este curso de mestrado.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – pela bolsa de mestrado cedida.

Aos funcionários da biblioteca do Curso de Medicina Veterinária da UNESP – Araçatuba, em especial às bibliotecárias Izabel Pereira Matos e Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti pelo auxílio na elaboração das referências bibliográficas.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	9
Considerações Gerais	10
Objetivos	20
Referências	21
CAPÍTULO 2	28
EFEITO INIBIDOR DO SORO URÊMICO SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS DE CÃES	
Resumo.....	29
Introdução	30
Material e Métodos	32
Resultados e Discussão	34
Conclusão	38
Referências.....	39
CAPÍTULO 3 –	43
APOPTOSE E METABOLISMO OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS DE CÃES TRATADOS COM SORO URÊMICO	
Resumo.....	44
Introdução	45
Material e Métodos	45
Resultados, Discussão e Conclusão.....	48
Referências.....	51
ANEXOS	56
Anexo A	57
Anexo B	61

EFEITO DO SORO URÊMICO DE CÃES COM INSUFICIÊNCIA RENAL SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E APOPTOSE DOS POLIMORFONUCLEARES

RESUMO - Embora a insuficiência renal ocorra com bastante frequência na espécie canina, não se sabe se essa condição, a semelhança do que ocorre em humano, compromete o funcionamento dos poliformonucleares (PMN). O superóxido produzido pelo metabolismo oxidativo dos PMN exerce importante papel na resposta imune inata, destruindo os patógenos fagocitados, entretanto, quando em excesso age de modo deletério promovendo a aceleração da apoptose. Testou-se a hipótese de que, a semelhança do que ocorrer em humanos, as toxinas presentes no soro de cães urêmicos alteram o metabolismo oxidativo e acelera a morte celular programada dos neutrófilos de cães normais. Para tal o sangue total e polimorfonucleares isolados de dez cães saudáveis foram incubados com soro urêmico. A produção de superóxido foi quantificada pelo teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) e o índice apoptótico calculado pelo método morfométrico. A produção de superóxido gerada dos neutrófilos de sangue total tratados com soro urêmico apresentou significativa redução ($p < 0,05$). Quando isolados e incubados com soro urêmico, apenas na metade das amostras os PMN apresentaram concomitantemente diminuição da produção de superóxido e aumento do índice apoptótico. Foi possível concluir que os componentes presentes no soro urêmico alteram *ex vivo* o metabolismo oxidativo e a apoptose dos PMN, fortalecendo a hipótese de que cães com de insuficiência renal têm sua imunidade inata comprometida.

Palavras - chave: Neutrófilos, toxinas urêmicas, superóxido, morte celular programada, imunossupressão.

EFFECT OF THE UREMIC SERUM FROM DOGS PRESENTING KIDNEY FAILURE ON OXIDATIVE METABOLISM AND APOPTOSIS OF THE POLYMORPHONUCLEAR ONES

SUMMARY - Although kidney failure occurs frequently on canine species, it is unknown if this condition, being similar to what occurs in human beings, jeopardized the functioning of the polymorphonuclear (PMN). The superoxide produced by the oxidative metabolism of the PMN plays an important role in the immune inherent answer, having destroyed the pathogenic phagocytized. However, when in excess it acts in a deleterious way promoting the acceleration of apoptosis. It was tested by the hypothesis that, similar to what occurs in humans, the toxins present in the serum of uremic dogs alter the oxidative metabolism and accelerates the programmed cellular death of the neutrophils of normal dogs. For that, the total blood and polymorphonuclears isolated from ten healthy dogs were incubated with uremic serum. The production of superoxide was quantified by nitroblue tetrazolium reduction test (NBT) and the apoptotic index was calculated by the morphometric method. The production of superoxide generated from the neutrophil of total blood treated with uremic serum presented significant reduction ($P < 0.05$). When isolated and incubated with uremic serum, only on half of the sample the PMN presented concomitantly a reduction of production of superoxide and increase of apoptotic index. It was possible to deduct that the components present in the uremic serum alter *ex vivo* the oxidative metabolism and the apoptosis of the PMN, consolidating the hypothesis that dogs having kidney failure have their inherent immunity jeopardized.

Keywords: Neutrophil, uremic toxins, superoxide, programmed cellular death, immunosuppression.

Capítulo 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Definição do problema

Pesquisa realizada junto ao laboratório clínico veterinário da UNESP de Araçatuba constatou que cães com quadro inflamatório apresentavam aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, porém o aumento da produção de superóxido não foi observado naqueles com quadro de insuficiência renal. Buscando melhor entender a diferença entre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães urêmicos e não urêmicos, verificou-se que os compêndios clássicos de clínica veterinária (GRAUER; LANE, 1995; POLZIN et al., 2004; WARE, 2006) invariavelmente afirmam que cães são muito susceptíveis a insuficiência renal e a condição promove uma imunossupressão. Entretanto, tais afirmações têm como base citações de estudos em humanos que evidenciam imunossupressão e alta mortalidade por infecções bacterianas devido à disfunção dos polimorfonucleares (PMN) causada pela uremia, incluindo aceleração da apoptose e inibição do metabolismo oxidativo por toxinas urêmicas.

1.2. Investigação do problema na literatura – a revisão

Em busca de evidências de que a uremia, a semelhança do que ocorre em humanos, também promove inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães, foi realizada uma revisão de literatura utilizando-se os bancos de dados eletrônicos (Biological Abstracts 1998 até 2002; Books in print 2008/09 até 2008/11; CHEMBANK 2008/06 até 2008/12; Drug Information Fulltext 2009/02; FRANCIS 1984 até 2008/11; IPA 1970 até 2008/12; SilverPlatter MEDLINE(R) 1950 até 2009/01; MEDLINE(R) In-Process & Other Citations 2006/12 – 2009/02; Zoological Records v.115-120 1978-1984 até v.142 2006), disponíveis no Portal da Pesquisa (www.portaldapesquisa.com.br), o Academic Search Complete (Academic

Search Premier; CINAHL; Library, Information Science & Technology Abstract;) disponíveis no EBSCO (<http://search.ebscohost.com>). A pergunta para a realização da revisão foi estruturada com três elementos conceituados na Medicina Baseada em Evidências, conforme preconizado por Castro (2001) - Situação: Leucócitos, polimorfonucleares e neutrófilos; Intervenção: uremia, urêmico e insuficiência renal; Desfecho: metabolismo oxidativo, explosão respiratória, ROS e superóxido. Foi utilizado apenas a espécie canina como limite para recuperação de artigos. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca nas bases de dados supracitados: (neutrophil or PMN or leukocyte or polymorphonuclear [any term]) AND (uremic or uremia or renal failure) AND (superoxide or oxidative metabolism or burst respiratory or ERO [any term]) AND (dog or puppies or canine [any term]). Nenhum artigo foi recuperado de modo que a pesquisa foi ampliada, repetindo a mesma estratégia, porém sem utilizar a limitação de espécie. Dos artigos identificados, foram selecionados apenas os que quantificaram o superóxido e redigidos na língua espanhola, inglesa e portuguesa.

Obedecendo aos mesmos critérios, como pesquisa complementar, utilizou-se a literatura disponível no PubMed (www.pubmed.gov), o banco de dados do grupo neutrófilo do curso de medicina veterinária da UNESP de Araçatuba (<http://br.groups.yahoo.com/group/neutrofilo/database>) e recurso de pesquisa avançada do Google acadêmico (www.scholar.google.com.br). O levantamento bibliográfico foi realizado em junho de 2007 e revisado mensalmente até o fim de abril de 2009.

1.2.1 A importância do metabolismo oxidativo para a defesa inespecífica do organismo. Relação existente entre estresse oxidativo e apoptose.

Os neutrófilos são células que integram a primeira linha de defesa do organismo, degradando e exterminando patógenos invasores (JAIN et al., 1993). Sob condições normais, a entrada de microrganismo em um hospedeiro leva a resposta que se fundamenta na ação das selectinas e integrinas que

promovem a adesão dos neutrófilos ao endotélio e em seguida se locomovem aos locais com maior concentração de substâncias quimiotáxicas (C5a, LTB₄, IL-8, fator de ativação de plaquetas). Processo este conhecido como quimiotaxia, em que os neutrófilos alcançam o local afetado para realizar a fagocitose. Porém, precedentemente as partículas são opsonizadas pelos complementos (C3;C4) e imunoglobulinas (IgG) para haver melhor aderência aos receptores dos neutrófilos e que desse modo sejam internalizadas (ZINKL e KABBUR, 1997). O microrganismo invasor é rodeado pelos pseudópodes dos neutrófilos, formando um fagossomo. Logo em seguida os grânulos presentes no citoplasma dos neutrófilos fundem suas membranas com aquelas do fagossomo de modo que possam liberar seu conteúdo no interior do fagossomo e destruir o agente invasor por meio de enzimas lisossômicas e agentes oxidantes (JANEWAY et al., 2007).

Durante este processo há um aumento no consumo de oxigênio em aproximadamente 200 vezes (BABIOR, 2004) e de acordo com Ferreira e Matsubara (1997), em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio o oxigênio (O₂) sofre redução formando água (H₂O) e, durante cujo processo, são produzidas as espécies reativas do oxigênio (ERO), como os radicais superóxido (O₂⁻), hidroperoxila (HO₂), hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e compostos halogenados (HClO e HBrO). Por serem consideradas espécies altamente reativas, as ERO são liberadas primariamente no interior dos fagossomos, onde combinam-se rapidamente com as proteínas microbianas e lipídeos resultando na oxidação dos mesmos. Estes são liberados no citosol, onde alteram o estado redox da célula e oxidam os componentes celulares, alterando sua função (FIALKOW et al., 2007). A NADPH oxidase é uma enzima que cataliza a produção do superóxido e, por meio do seu complexo, ativa os neutrófilos que estão em contato com microorganismos fornecendo-lhes agentes bactericidas, viricidas e fungicidas (BABIOR, 2004). Estima-se que aproximadamente 1 – 4% do oxigênio que reage na explosão respiratória leva a formação do radical superóxido (KANNAN; JAIN, 2000).

Existem diversos métodos para se avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, como a determinação do consumo de oxigênio, a redução do ferricitocromo C, a quimioiluminescência, a determinação da 2,7 – diclorofloresceína ou da dihidrorodamina por citometria de fluxo, a determinação da mieloperoxidase e iodinação, contudo, o teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) é um dos mais utilizados. A mensuração quantitativa do metabolismo oxidativo foi dificultada em alguns testes, como a quimioiluminescência e a redução do citocromo C por serem complicados e trabalhosos (RICHARDSON et al., 1998). Nas últimas décadas a citometria de fluxo foi desenvolvida para identificar os produtos do metabolismo oxidativo, sendo uma metodologia mais simples e capaz de mensurar a atividade de centenas de neutrófilos em um período muito curto de tempo (BASS et al., 1983). O NBT é um corante supravital amarelo claro que sofre redução na presença do ânion superóxido tornando-se azul escuro, dessa maneira constituindo-se um método rápido, simples e que não requer isolamento celular. É de baixo custo, prestando-se muito bem a avaliação do metabolismo oxidativo dos fagócitos (GORDON et al., 1973) e além disso, sendo um teste quantitativo inclui uma mensuração criteriosa dos estágios iniciais do metabolismo oxidativo (RICHARDSON et al., 1998).

Inicialmente o teste do NBT foi empregado por Baehner e Nathan (1968) para o diagnóstico da doença granulomatosa crônica em crianças. A redução do referido corante pode ser avaliada ao visibilizar por microscopia óptica as células redutoras que apresentam precipitado intracitoplasmático azul escuro, e assim determinar o percentual de positivas.

Normalmente as ERO atuam de forma importante em numerosas funções biológicas, em compensação a produção destas por ativação desempenha uma parte crítica na defesa do hospedeiro contra invasão dos patógenos (LEE et al., 2003). O aumento da sua produção e/ou diminuição do sistema antioxidante leva a um estresse oxidativo na qual o excesso causará danos e disfunção em muitos componentes vitais da célula (VAZIRI et al., 2003), contudo o prejuízo somente vai ocorrer quando as ERO esgotarem as

defesas bioquímicas celulares (HORTON; FAIRHURST, 1987). A reação inicial produz um segundo radical, a qual reage com uma segunda macromolécula e assim por diante, em uma contínua reação em cadeia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Existe uma relação dinâmica entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante que é determinada pelo sistema celular (KANNAN; JAIN, 2000). As ERO podem reagir com todas as macromoléculas biológicas, ou seja, os lipídeos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos, porém sob condições normais, as mitocôndrias possuem eficientes mecanismos bioquímicos de defesa que neutralizam seu efeito (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Tais mecanismos incluem os sistemas enzimáticos glutaciona redutase, glutaciona peroxidase, superóxido dismutase, NADP desidrogenase (NADPH) e vitamina E e C (MCGOWAN et al., 1996). Apesar da mitocôndria se apresentar como a principal produtora de ERO, existem outras fontes celulares para sua formação e todos os componentes celulares são susceptíveis à sua ação, porém a membrana é um dos mais atingidos, sofrendo tanto alterações na sua estrutura quanto na permeabilidade. Em consequência, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de produtos citotóxicos que culmina com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Apoptose ou morte celular programada é um processo de morte celular que ocorre naturalmente sendo essencial para o desenvolvimento normal e para a homeostase de todos os organismos multicelulares (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993). Este processo é também importante para remoção de células danificadas, infectadas ou neoplásicas. Porém, tanto a baixa afinidade apoptótica quanto seu grau podem levar a consequências biológicas adversas (NAGATA, 1996). Durante este processo, uma célula sofre processo ativo de morte celular culminando na fragmentação do DNA e na formação de corpos apoptóticos. A membrana plasmática destas células em apoptose e os corpos apoptóticos mantêm a sua integridade, impedindo o extravazamento do material celular. Apoptose pode ser desencadeada por

inúmeros fatores incluindo mediadores, ausência de fatores de crescimento, drogas antitumorais e sob certas condições, danos do DNA (DUKE et al., 1996), cada um destes indutores tem seu próprio mecanismo que promove a ativação do processo apoptótico, porém são as caspases os componentes centrais desta indução (HAMPTON; ORRENIUS, 1998). As caspases são enzimas dependentes de cisteína e sensíveis ao estado redox da célula, sendo sintetizadas como precursores que tem pouca atividade catalítica e um dos seus papéis é inativar proteínas que são vitais para sobrevivência da célula, de maneira que vai interromper o contato célula – célula, desorganizar o citoesqueleto, destruir e impedir a replicação do DNA, romper a estrutura nuclear e induzir mudanças bioquímicas na superfície celular para reconhecimento dos fagócitos e finalmente desintegra a célula a corpúsculos vesiculares (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

A maioria dos mediadores da apoptose estão localizados nas regiões ou territórios celulares que se seguem (1) superfície celular, (2) citosol, (3) citoesqueleto, (4) mitocôndria e (5) núcleo (KANNAN; JAIN, 2000). O processo é altamente regulado, e envolve a ação de vários indutores, mas o mecanismo genético da apoptose dos polimorfonucleares ainda é vagamente entendido (MAJEWSKA et al., 2003). O excesso de estresse oxidativo mata células, quer seja por necrose ou por apoptose. Em muitos modelos de apoptose, alterações no estado redox da célula ocorrem antes da ativação da caspase (ZAMZAMI et al., 1996).

1.2.2 O estresse oxidativo em cães com insuficiência renal.

A insuficiência renal é uma condição em que as suas funções dos rins são alteradas, tornando-se incapazes de manter a capacidade reguladora, excretora e endócrina. Ocorre mais especificamente quando 75% dos néfrons deixam de funcionar, acarretando principalmente o acúmulo de toxinas urêmicas. Também, a insuficiência renal pode ser inicialmente classificada em duas formas, aguda e crônica (DIBARTOLA, 2004). A insuficiência renal aguda

ocorre quando há uma perturbação súbita no funcionamento dos rins, com duração de horas ou dias, normalmente causada por lesões tóxicas ou isquêmicas (COWGILL;ELLIOTT, 2004) e cuja concentração de uréia no organismo se eleva para valores três a quatro vezes superiores ao valor basal (3-8 mol/L) e podendo ser inclusive maior aqueles encontrados na insuficiência renal crônica (KERR, 2003). Na insuficiência renal crônica (IRC), o quadro se desenvolve durante um período mais longo, que vai de semanas, meses ou até mesmo anos, e é quando há perda progressiva do número de néfrons, devido à cicatrização das lesões iniciais ocorridas. Nestes casos não há mais reversibilidade do quadro e o paciente terá que viver com esta condição para o resto de sua vida (POLZIN et al., 2004).

O estresse oxidativo é reconhecido como uma decorrência consistente em diversos processos patológicos de cães, e o dano causado é bem abrangente (MCMICHEL, 2007). Animais com doença renal crônica têm recorrentes condições que aumentam a produção das ERO, e a IRC está diretamente associada a uma deficiência relativa de antioxidantes (BROWN, 2008). As células renais, particularmente as epiteliais tubulares, estão entre aquelas metabolicamente mais ativas no organismo. Isso porque os rins mantêm altos níveis de fosforilação oxidativa mitocondrial e abrange o grande fluxo sanguíneo, de modo que a formação de ERO é esperada (BROWN, 2008).

Ao longo do tempo diversos estudos em humanos e roedores (SARDENBERG et al., 2006; ZARBOCK et al., 2006) confirmaram a importância de se investigar o estresse oxidativo nos polimorfonucleares em pacientes portadores de IRC. Porém, em cães, a avaliação do estresse oxidativo tem focado outras condições patológicas, tais como a cardiomiopatia dilatada idiopática (FREEMAN et al., 1999), catarata em Cocker spaniel inglês (BARROS et al., 1999) e Leishmaniose visceral (BILDIK et al., 2004). Também quanto à avaliação do metabolismo oxidativo dos polimorfonucleares de cães, foram encontrados estudos referentes à rinite e à pneumonia em Doberman Pinscher (BREITSACHWERDT et al., 1987), em condições sépticas (WEBB et al., 2007) e, ainda, relatos feitos por Eickhoff et

al. (2004) de que há uma grande variação dos resultados obtidos em cães saudáveis.

Especificamente quanto no caso de IR, o único relato de estresse oxidativo fez referência à avaliação das hemácias de cães portadores IRC (LUSTOZA, 2004), não havendo nada descrito com relação à série granulocitária. Tal fato justifica o subjetivismo com relação ao que realmente acontece com a produção de superóxido em cães com insuficiência renal, capaz de desencadear o quadro de imunossupressão. Provavelmente devido a uma disfunção celular acarretará em uma alteração da produção de superóxido, e assim desencadeado a imunossupressão.

1.2.3 Comprovação, em humanos, que a IR compromete a função dos leucócitos polimorfonucleares.

A insuficiência renal crônica em pacientes humanos é um problema de saúde pública mundial, cujo contingente de 58% dos pacientes vive em apenas cinco países (Estados Unidos, Japão, Alemanha, Brasil e Itália). Nos Estados Unidos, a insuficiência renal crônica encontra-se em 9º lugar como causa morte, tem uma crescente incidência e prevalência, porém diagnóstico, prognóstico e tratamento têm ainda alto custo (ARORA; VERRELI, 2008). Os pacientes renais terminais são considerados grupo de alto risco para desenvolver sepse letal e estima-se que mais de 75% das mortes ocorridas dentre eles decorrem da septicemia (SARNAK; JABER, 2000).

A patogênese que leva a esta susceptibilidade ainda não está definitivamente esclarecida, porém sabe-se que há falhas nos mecanismos de defesa celular principalmente dos neutrófilos, além dos linfócitos e monócitos (COHEN et al., 1997). Estas deficiências têm sido amplamente atribuídas à presença de toxinas urêmicas, má nutrição, excesso de ferro, aumento do cálcio citosólico e deficiência de zinco no organismo de tais pacientes (HÖRL, 1999; IBS e RINK, 2003). As toxinas urêmicas são fatores plasmáticos circulantes acumulados no soro dos portadores de insuficiência renal (COHEN

et al., 1997). Dentre elas, a mais conhecida é a uréia por ser a mais estudada na abordagem clínico-patológica nefropática. Entretanto seu papel tóxico ainda é controverso, pois alguns autores acreditam que a uréia *per se* não seja tóxica (VANHOLDER et al., 2008). Enquanto outros acreditam que o efeito tóxico da uréia seja devido ao seu acúmulo concomitante a outros solutos como os produtos protéicos de oxidação (WITKO-SARSAT et al., 1998), a guanidina (HIRAYAMA et al., 2000), o polifosfato de adenosina (JANKOWSKI et al., 2001), os produtos finais de glicação avançada (GLORIEUX et al., 2004), a β_2 – microglobulina (VANHOLDER et al., 2003), a leptina (OTTONELLO et al., 2004), as proteínas de ligação (BAMMENS et al., 2006), a interleucina – 18 (CHIANG et al., 2006), as variantes de angiotensina (JANKOWSKI et al., 2007), os indóis (DOU et al., 2007), o p-cresilsulfato (SCHEPERS et al., 2007). Há ainda estudiosos que acreditam que ocorra um efeito acumulativo de cada substância e que o efeito final seja potencializado por cada uma das toxinas, de forma que afete a funcionalidade e viabilidade dos PMN (SARDENBERG et al., 2006).

Na literatura da IRC, em humanos, há muita contradição com relação à produção de ERO na uremia pelos PMN. Há aqueles que verificaram a ocorrência de menor produção (CENDOROGLO et al., 1999; HIRABAYASHI et al., 1988; SARDENBERG et al., 2006), outros que verificaram aumento na produção (MCLEISH et al., 1996; RYSZ et al., 2004; WARD; MC LEISH, 1995), como também os que não constataram nenhuma alteração com relação a produção de ERO por células de pacientes urêmicos quando comparados com os indivíduos saudáveis (ANDING et al., 2003; CHRETIEN; GARAGUSI, 1973; GASTALDELLO et al., 2000; PAUL et al., 1991). Contudo sabe-se que parte das divergências é devido ao método utilizado (SARDENBERG et al., 2006).

Whyte et al. (1993) demonstraram uma relação direta entre a apoptose e a perda das funções do citoesqueleto, fagocitose, degranulação e metabolismo oxidativo nos PMN. De acordo com Cendoroglo et al. (1999), a mortalidade causada por infecção bacteriana secundária em os pacientes portadores de

insuficiência renal é alta devido a disfunção dos PMN ocorrida por uma diminuição da produção de superóxido e pela aceleração da apoptose.

Cendoroglo et al. (1999), em estudo *ex vivo*, verificaram que a produção de superóxido dos PMN normais incubados com soro urêmico foi significativamente menor que daqueles incubados com soro normal. Cendoroglo et al. (1999) e Lewis et al. (1988) igualmente verificaram inibição da produção de superóxido em neutrófilos de pacientes urêmicos estimulados com fMLP (N-formyl methionyl leucyl phenylalanine), porém não com PMA (phorbol myristate acetate).

Com relação à apoptose, Cendoroglo et al. (1999) observaram que houve diferença significativa entre a apoptose dos PMN de pacientes normais e urêmicos tanto quando incubados com os seus soros como com soro fetal bovino. Os autores verificaram uma correlação inversa entre a produção de superóxido e a apoptose destas células. Foi possível verificar um aumento de 33% da taxa de apoptose dos PMN normais quando incubado com soro urêmico, porém as taxas de apoptose dos PMN urêmicos quando incubados com soro normal não diferiram, sugerindo dessa forma que os PMN urêmicos são mais propensos a apoptose, mesmo quando submetidos a uma condição normal. Sardenberg et al.(2006), de modo similar, observaram que os pacientes com IRC, não tratados, tinham uma maior taxa de apoptose quando comparados com controles e pacientes submetidos à hemodiálise, sugerindo que a toxicidade urêmica atua na apoptose dos PMN e que a diálise pode minimizar a taxa de apoptose. Koller et al. (2004), diferentemente, verificaram discreta diminuição da apoptose ao incubar PMN normais com soro urêmico e PMN de pacientes urêmicos com soro normal.

Jaber et al. (2001) constataram que a expressão Fas foi significativamente maior em pacientes com insuficiência renal crônica comparados com indivíduos controle. E, também, que o soro urêmico aumentou a expressão do Fas associado ao PMN e a proteína FasL, e que havia forte correlação Fas - estimulante de apoptose com a depuração de creatinina. Majewska et al. (2003) verificaram, *in vivo*, aceleração da apoptose

dos PMN em pacientes urêmicos, com relação aos indivíduos controle e que esse resultado era dependente do aumento do fator de expressão Fas/Apop-1 gerados durante a uremia.

Os objetivos deste estudo visaram:

1. Testar a hipótese de que a produção de superóxido gerada pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães diminui quando incubados com soro urêmico.
2. Testar a hipótese de que há relação entre a taxa de apoptose e a produção de superóxido dos PMN de cães tratados com soro urêmico.

REFERÊNCIAS

- ANDING, K.; GROSS, P.; ROST, J.M. et al. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.18, n.10, p. 2067-2073, 2003.
- ARORA, P.; VERRELI, M. Chronic renal failure. 2008. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/238798-overview>>. Acesso em 08 abril 2009
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 16, n.1, p. 42-47, 2004.
- BAEHNER, R.L.; NATHAN, D.G. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 278, n. 18, p. 971-976, 1968.
- BAMMENS, B.; EVENEPOEL, P.; KEULEERS, H. et al. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney. Int.*, v. 69, n. 6, p. 1081-1087, 2006.
- BARROS, P.S.M.; ANGELOTTI, A.C.; NOBRE, F. et al. Antioxidant profile of cataractous English Cocker Spaniels. *Vet. Ophthalmol.*, v. 2, n. 2, p.83-86, 1999.
- BASS, D.A.; PARCE, J.W.; DECHATELET, L.R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.*, v.130, n. 4, p. 1910 - 1917, 1983.
- BILDIK, A.; KARGIN, F.; SEYREK, K. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidant status in dogs with visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v.77, n. 1, p. 63-66, 2004.
- BREITSCHWERDT, E.B.; BROWN, T.T.; DE BUYSSCHER, E.V. et al. Rhinitis, pneumonia, and defective neutrophil function in the Doberman Pinscher. *Am. J. Vet. Res.*, v. 48, n.7, p.1054-1062, 1987.
- BROWN, S.A. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Vet. Clin. North AM. Small Anim. Pract.*, v. 38, n. 1, p.157-166, 2008.

- CASTRO, A. A. Revisão sistemática e meta-análise. 2001. Disponível em : <<http://www.metodologia.org/meta1.PDF> >. Acesso em: 1 mar. 2008
- CENDOROGLIO, M.; BERTRAND, L.J.; BALAKRISHNAN, V.S. et al. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 10, n.1, p. 93-100, 1999.
- CHIANG, C.K.; HUANG, J.W.; HSU, S.P. et al. Plasma interleukin-18 levels in hemodialysis patients: increase by dialysis process and association with interleukin-6 and tumor necrotic factor-alpha. *Blood. Purif.*, v.24, n.2, p.174-179, 2006.
- CHRETIEN, J.H.; GARAGUSI, V.F. Phagocytosis and nitroblue tetrazolium reduction in uremia. *Experientia*, v. 29, n. 5, p.612-613, 1973.
- COHEN, G.; HAAG-WEBER, M.; HÖRL, W. H. Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int. Suppl.*, v. 52, n. 62, p. S79 – S82, 1997.
- COWGILL, L.D.; ELLIOTT, D.A. Insuficiência renal aguda. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, Cap. 168, p. 1702 – 1720.
- DIBARTOLA. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, Cap. 167, p. 1686 – 1701.
- DOU, L.; JOURDE-CHICHE, N.; FAURE, V. et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.*, v.5, n.6, p.1302-1308, 2007.
- DUKE, R.C.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, D.E. Cell suicide in health and disease, *Sci. Am.*, v. 275, n. 6, p. 80–87, 1996.
- EICKHOFF, S.; MIRONOWA, L.; CARLSON, R. et al. Measurement of phagocytosis and oxidative burst of canine neutrophils: high variation in healthy dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.101, n. 1/2, p.109–121, 2004.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

- FIALKOW L.; WANG Y.; DOWNEY G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 42, n. 2, p. 153-164, 2007.
- FREEMAN, L.M.; BROWN, D.J.; RUSH, J.E. Assessment of degree of stress oxidative and antioxidant concentrations in dogs with dilated cardiomyopathy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.215, n. 5, p.644-646, 1999.
- GASTALDELLO, K.; HUSSON, C.; WENS, R. et al. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.15, n.10, p.1638-46, 2000.
- GLORIEUX, G.; HELLING, R.; HENLE, T. et al. In vitro evidence for immune activating effect of specific AGE structures retained in uremia. *Kidney Int.*, v. 66, n.5, p.1873–1880, 2004.
- GORDON, A.M.; ROWAN, R.M.; BROWN, T. et al. Routine application of the nitroblue-tetrazolium test in the clinical laboratory. *J. Clin. Pathol.*, v.26, n.1, p. 52-56, 1973.
- GRAUER, G.F.; LANE, I.F. Acute renal failure: ischemic and chemical nephrosis. In: OSBORNE, C.A; FINCO, D.R. *Canine and feline nephrology and urology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. p. 441 – 459.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford:Claredon, 1989. 543 p.
- HAMPTON, M.B.; ORRENIUS, S. Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. *Toxicol. Lett.*, v.102/103, p. 355–358, 1998.
- HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T.; NISHIKAWA, A. et al. Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal failure. *Nephron.*, v. 49, n. 4, p. 305-312, 1988.
- HIRAYAMA, A.; NORONHA-DUTRA, A.A.; GORDGE, M.P. et al. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidine compounds. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.11, n.4, p.684-689, 2000.
- HÖRL, W.H. Neutrophil function and infections in uremia. *Am. J. Kidney Dis.*, v. 33,n. 2, p.xlv – xvliii, 1999.

- HORTON, A.A.; FAIRHURST, S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, v.18,p. 27–79,1987.
- IBS, K.; RINK L. Zinc-altered immune function. *J. Nutr.*, v.133, suppl., p. 14525–14565, 2003.
- JABER, B. L.; CENDOROGLIO, M.; BALAKRISHNAN, V.S. et al. Apoptosis of leukocytes: Basic concepts and complications in uremia. *J. Leukoc. Biol.*, v. 69, p.1006-1012, 2001.
- JAIN,N.C. Examination of the blood and bone marrow. In: JAIN,N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p 222 - 246.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap.2. p. 37-48.
- JANKOWSKI, J.; HAGEMANN, J.; YOON, M.S. et al. Increased vascular growth in hemodialysis patients induced by platelet-derived diadenosine polyphosphates. *Kidney Int.*, v. 59, n. 3, p.1134–1141, 2001.
- JANKOWSKI, V.; VANHOLDER, R.; VAN DER GIET, M. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, v. 27,n. 2, p. 297–302, 2007.
- KANNAN, K.; JAIN, S. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, v. 7, n. 3, p. 153–163, 2000.
- KERR, M.G. *Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 436 p.
- KOLLER, H.; HOCHEGGER, K.; ZLABINGER,G.J. et al. Apoptosis of human polymorphonuclear neutrophils accelerated by dialysis membranes via the activation of the complement system. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 19, n. 12, p.3104-3111, 2004.
- LEE, W. L.; HARRISON, R.E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.*, v. 5, n. 14, p. 1299–1306, 2003.
- LEWIS, S.L.; VAN EPPS, D.E.; CHENOWETH, D.E. Alterations in chemotactic factor-induced responses of neutrophils and monocytes from chronic dialysis patients. *Clin. Nephrol.*, v. 30, n.2, p.63-72, 1988.

- LUSTOZA, M.D. *Avaliação do estresse oxidativo em cães com insuficiência renal crônica e anemia*. 2004. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2004.
- MAJEWSKA, E, BAJ, Z, SULOWSKA, Z, RYSZ, J, LUCIAK, M. Effects of uraemia and haemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.18, v. 12, p.2582-2588, 2003.
- MCGOWAN, A.J.; FERNANDES, R.S.; SAMALI, A. et al. Anti-oxidants and apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 24, n. 1, p. 229–233,1996.
- MCLEISH, K.R.; KLEIN, J.B.; LENDERER, E.L. et al. Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Inter.*, v. 50, n. 2, p. 407-416, 1996.
- MCMICHAEL, M.A. Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *J.Am. Vet. Med.Assoc.*, v. 231, n.5, p. 714- 720, 2007.
- NAGATA, S. Fas-mediated apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 406, p. 119–124. 1996.
- OTTONELLO, L.; PAOLA, G.; BERTOLOTTO, M. et al. Leptin as uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.15, p.2366-2372, 2004.
- PAUL, J.L.; ARVEILLER, M.R.; MAN, N.K. et al. Influence of uremia on polymorphonuclear leukocytes oxidative metabolism in end-stage renal disease and dialyzed patients. *Nephron*, v. 57, n.4, p. 428-432, 1991.
- POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; JACOB, F. et al. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, Cap.169, p.1721-1751.
- RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple flow cytometry assay dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J. Immunol. Methods*, v.219, n.1/2, p.187-193, 1998.

- RYSZ, J.; KASIELSKI, M.; APANASIEWICZ, J. et al. Increased hydrogen peroxide in the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.19, n.1, p.158-163, 2004.
- SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, L.A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.*,v.14, n. 2, p. 133–151,1993.
- SARDENBERG, C.; SUASSUNA, P.; ANDREOLI, M.C.C. et al. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.21, n.1, p. 160–165, 2006.
- SARNAK, M.J.; JABER, B.L. Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Inter.*,vol 58, p. 1758 -1764, 2000.
- SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G. et al. P-cresylsulphate, the main *in vivo* metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.22, n.2, p.592-596, 2007.
- THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science.*, v. 281, n. 5381, p. 1312–1316, 1998.
- VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; GLORIEUX, G. et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.*, v. 63,n. 5, p.1934–1943, 2003.
- VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr. Nephrol.*, v.23, n. 8, p.1211–1221, 2008.
- VAZIRI, N.D; DICUS, M.; HO, N.D. et al. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.*,v. 63, n.1, p.179-185, 2003.
- WARD, R.A.; McLEISH, K.R. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 5, n.9, p.1697-1702, 1995.
- WARE, W.A. Distúrbios do trato urinário: insuficiência renal. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina interna de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 583 – 597.

- WEBB, C.; MCCORD K.; DOW, S. Neutrophil function in septic dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, v.21, n. 5, p.982-989, 2007.
- WHYTE, M.K.B.; MEAGHER, L.C.; MACDERMOT, J.; et al. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.*, v. 150, n.11, p. 5124-5134, 1993.
- WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; NGUYEN, K.T. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol.*, v.161, n.5, p. 2524–2532, 1998.
- ZARBOCK, A.; SCHMOLKE, M.; SPIEKER, T. et al. Acute uremia but not renal inflammation attenuates aseptic acute lung injury: a critical role for uremic neutrophils. *J. Am. Soc. Nephrol.* v.17, n.11, p. 3124–3131, 2006.
- ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P. et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.*, v.183, n.4, p. 1533–1544, 1996.
- ZINKL, J.G; KABBUR, M.B. Neutrophils. In: KANEKO, J.; HARVEY, J.N.; BRUSSM, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic Press, 1997. p 285 - 302.

Capítulo 2

1 **Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos**
2 **de cães**¹

3 **Inhibitory effect of uremic serum on neutrophils oxidative metabolism from dogs.**

4 **Barbosa, T.S¹.; Mori, C.K².; Ciarlini, P.C^{3*}.**

5 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UNESP – Araçatuba. Bolsista CAPES.

6 ² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

7 ³ Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba, FOA, UNESP, Rua
8 Clóvis Pestana, 793, 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil, e-mail: ciarlini@fmva.unesp.br. *Autor para correspondência.
9

10 **RESUMO**

11 Foi testada a hipótese de que, a semelhança do que ocorre em humanos, os
12 componentes do soro urêmico inibem o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães.
13 Para isto, o sangue total de 10 cães foi incubado com soro homólogo urêmico e não
14 urêmico e posteriormente comparados quanto à produção neutrofílica de superóxido
15 estimada pelo método citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT). A
16 produção de superóxido gerada pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos tratados
17 com soro urêmico apresentou significativa redução ($p < 0,05$) em relação aos tratados
18 com plasma autólogo e homólogo com níveis normais de uréia. Concluiu-se que os
19 componentes presentes no soro urêmico inibem *ex vivo* o metabolismo oxidativo dos
20 neutrófilos de cães portadores de insuficiência renal têm sua imunidade inata
21 comprometida.

22 **Palavras-chave:** Tetrazólio nitroazul, insuficiência renal, superóxido.
23

24 **ABSTRACT**

25 The aim of this study was to test the hypothesis that the uremic compounds decrease the
26 neutrophil oxidative metabolism in dogs, as occurs in humans. Whole blood from ten
27 dogs was incubated with uremic and non-uremic homologous serum and the superoxide
28 production by activated neutrophils was quantified by the nitroblue tetrazolium
29 reduction test (NBT). The superoxide production generated by neutrophils in the
30 presence of uremic serum was significantly decreased ($p < 0,05$) in comparison with
31 autologous and homologous serum with normal serum urea levels. It was concluded that
32 the presence of components of uremic serum inhibits the *ex vivo* neutrophil oxidative

¹ Normalização segundo a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Anexo A)

33 metabolism in dogs, suggesting that, similarly to humans, dogs with renal failure may
34 have compromised innate immunity response.

35

36 **Keywords:** Nitroblue tetrazolium, renal failure, superoxide.

37

38 INTRODUÇÃO

39 A insuficiência renal é caracterizada por lesões intrarrenais e ocorre quando 75%
40 ou mais dos néfrons tornam-se afuncionais, resultando na retenção de restos de produtos
41 nitrogenados não protéicos no organismo, podendo ocorrer de forma aguda (IRA) ou
42 crônica (IRC) (DiBartola, 2004). Nos casos de IRA a concentração plasmática normal
43 de uréia entre 3 – 8 mmol/L, eleva-se abruptamente para valores acima de 35 mmol/L,
44 geralmente superiores aos observados na IRC (Kerr, 2003). A IRC é a afecção renal
45 mais comum em cães, sendo progressiva, irreversível e de mau prognóstico. Porém,
46 quando adequadamente tratada, o cão portador de IRC pode sobreviver com boa
47 qualidade de vida por muitos meses (Polzin et al., 2004). Em cães com IRC cujos
48 valores de uréia plasmática são inferiores a 20 mmol/L, as chances de resposta a uma
49 terapia alimentar são grandes; entretanto, valores superiores a 60 mmol/L indicam
50 prognóstico ruim (Kerr, 2003). Apesar da concentração sérica da uréia ser bem aceita
51 como um bom marcador para a severidade da falência renal, seu papel na patogênese da
52 síndrome urêmica ainda é controverso (Lim et al., 1995).

53 Conhen et al. (1997) relataram que as toxinas urêmicas circulantes de pacientes
54 nefropatas graves são provenientes da redução da excreção, assim como resultante do
55 aumento da sua síntese durante a uremia. Segundo Vanholder et al. (2008) a uréia *per*
56 *se* parece não ser tóxica, contudo, seu efeito tóxico se faz pelo acúmulo simultâneo com
57 outras substâncias de ação biológica. As guanidinas (Hirayama et al., 2000), a leptina
58 (Ottonello et al., 2004), o p-cresol (Schepers et al., 2007), a uréia e a β 2-microglobulina
59 representam alguns dos 100 solutos urêmicos identificados em pacientes com
60 nefropatias graves e que potencialmente alteram a função neutrofílica (Vanholder et al.,
61 2008). Especula-se que cada toxina urêmica tenha efeitos distintos na função e
62 viabilidade dos neutrófilos (Sardenberg et al., 2006)

63 A produção de fatores quimiotáticos para os neutrófilos aparentemente é normal
64 em pacientes urêmicos. Porém, a integridade da locomoção dos referidos neutrófilos ao
65 sítio de infecção, capacidade de fagocitose e ação bactericida, parecem estar diminuídas
66 (Chretien e Garagusi, 1972). Uma vez fagocitado, o microorganismo é destruído por
67 meio de enzimas lisossomais e agentes oxidantes (Janeway et al., 2007). De acordo com
68 Ferreira e Matsubara (1997), no metabolismo celular aeróbio normal o oxigênio sofre
69 redução, formando água, processo no qual são formadas as espécies reativas do
70 oxigênio (ERO), tais como os radicais superóxido, hidroperoxila, hidroxila, peróxido de
71 hidrogênio e compostos halogenados que atuam como bactericidas, viricidas e
72 fungicidas (Babior, 2004).

73 O metabolismo oxidativo e a produção de superóxido dos neutrófilos de
74 pacientes humanos com insuficiência renal têm sido avaliados por meio de diferentes
75 métodos, tais como a quimioiluminescência, citometria de fluxo e tetrazólio nitroazul
76 (NBT), produzindo resultados discordantes (Gastaldello et al., 2000). O NBT é um
77 corante supravital amarelo claro que se transforma em formazan (azul escuro) após a
78 sua redução pelo superóxido produzido pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos. A
79 principal causa de valor elevado de redução do NBT é a infecção bacteriana, e esta
80 redução pode ocorrer antes mesmo de qualquer alteração clínica e ou laboratorial
81 (Richardson et al., 1998).

82 Hirabayashi et al., (1988) afirmam que pacientes humanos com insuficiência
83 renal apresentaram menor produção de radicais de oxigênio. Cendoroglo et al. (1999)
84 observaram esta menor produção de superóxido em neutrófilos de pacientes humanos
85 quando incubados com plasma homólogo urêmico. Ward e McLeish (1995), McLeish
86 et al. (1996) e Rysz et al. (2004) verificaram maior produção de radicais de oxigênio
87 nos neutrófilos de insuficientes renais, enquanto Paul et al. (1991), Gastaldello et al.
88 (2000) e Anding et al. (2003) não observaram em pacientes urêmicos alteração no
89 metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

90 Embora a insuficiência renal seja uma nefropatia comum em cães, não há
91 relatos na literatura veterinária quanto ao efeito da uremia sobre o metabolismo
92 oxidativo de neutrófilos nesta espécie. A fim de preencher esta lacuna de conhecimento,
93 neste trabalho objetivou-se testar a hipótese de que a produção de superóxido gerado

94 pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães sadios diminui quando incubado
95 com soro urêmico.

96

97 MATERIAL E MÉTODO

98 Vinte e um cães adultos, de diferentes raças, machos ou fêmeas foram submetidos
99 a exame físico geral, conforme preconizado por Feitosa (2008), e a exames
100 laboratoriais como hemograma completo e determinação da concentração sérica de
101 uréia e creatinina. Assim, com base nos resultados dos supracitados exames, os animais
102 foram agrupados em:

103 **Grupo Controle (GC):** Constituído de 11 cães sem evidências de alterações
104 clínicas e laboratoriais. Destes, utilizaram-se dez para a realização dos ensaios e um
105 teve seu plasma utilizado como “homólogo sadio”.

106 **Grupo Urêmico (GU):** Constituído de dez cães com quadro clínico-laboratorial
107 de uremia, conforme critérios de Kerr (2003) e DiBartola (2004), sem insuficiência
108 cardíaca, ruptura vesical e obstrução pós-renal.

109 De ambos os grupos foram excluídos cães com qualquer histórico de tratamento
110 recente com antibióticos e anti-inflamatórios, que pudessem interferir no metabolismo
111 oxidativo dos neutrófilos.

112 Para as colheitas de sangue dos animais de ambos os grupos utilizaram-se agulhas
113 hipodérmicas descartáveis 25 x 8 mm, próprias para tubos estéreis siliconizados e
114 heparinizados à vácuo¹. De cada animal do GC colheram-se seis mililitros de sangue
115 total, sendo dois destinados à avaliação do metabolismo oxidativo, dois para realização
116 do hemograma e outros dois para obtenção de plasma para análises bioquímicas. Dos
117 cães do GU, foram colhidos quatro mililitros de sangue total em tubos sem
118 anticoagulante para obtenção de soro para os ensaios *ex vivo* e análises bioquímicas, e
119 dois mililitros foram acondicionados em tubos plásticos contendo K²-EDTA² para o
120 hemograma. O soro obtido foi acondicionado a – 20°C e as amostras sanguíneas
121 mantidas refrigeradas até o momento do processamento laboratorial.

¹ Vacutainer plus plastic Heparin, Cod. 367993, Becton-Dickson, New Jersey, USA.

² Vacutainer plus plastic K2 EDTA, Cod. 367841, Becton-Dickson, New Jersey, USA.

122 Os plasmas dos animais do GC foram submetidas à prova sorológica de pesquisa de
 123 anticorpos IgG anti-*Leishmania sp.* por meio da técnica de ELISA, como descrita por
 124 Lima et al. (2003).

125 O sangue total dos dez cães do grupo controle foi submetido concomitantemente ao
 126 acréscimo de plasma autólogo, homólogo sadio e soro urêmico, conforme protocolo
 127 apresentado (Fig. 1).

128

PROTOCOLO	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Sangue total heparinizado do GC	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Centrifugação 700g durante 15 minutos		X	X	X
Retirada de 100 µL do plasma sobrenadante		X	X	X
Acréscimo de 100 µL de soro homólogo do GU				X
Acréscimo de 100 µL de plasma homólogo do GC			X	
Reposição de 100 µL do plasma autólogo do GC		X		
Homogeneização por ressuspensão		X	X	X
Determinação da concentração de uréia			X	X
Incubação em banho-maria 37°C por 2 horas		X	X	X
Determinação do superóxido (NBT)	X	X	X	X

129

130 Figura 1- Protocolo experimental dos diferentes ensaios realizados para avaliar o
 131 metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães do grupo controle (GC) imediatamente
 132 após a colheita (ensaio 1); sangue total incubado com plasma autólogo (ensaio 2);
 133 sangue total incubado com plasma homólogo sadio (ensaio 3) e sangue total
 134 incubado com soro homólogo do grupo urêmico (GU) (ensaio 4).

135

136 Os valores do hemograma foram obtidos utilizando-se contador eletrônico de
 137 células sanguíneas³ e a contagem diferencial das células foi feita pelo método de
 138 microscopia de esfregaços corados com Panótico⁴. A determinação do volume globular
 139 foi realizada pelo método de micro-hematócrito, segundo as recomendações e critérios
 140 de Thrall et al. (2007). A concentração de uréia plasmática foi obtida, em duplicata, pelo

³ Contador eletrônico hematológico veterinário, Mod. CC-530, CELM, São Paulo-SP.

⁴ Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

141 método enzimático cinético (37^oC), utilizando-se conjunto de reativo comercial⁵ com
142 leitura realizada em espectrofotômetro⁶ previamente calibrado, conforme recomendação
143 do fabricante.

144 A produção de superóxido foi quantificada pelo método citoquímico de redução
145 espontânea do NBT, conforme Ciarlini et al. (2004), utilizando reagente tamponado⁷.
146 De cada ensaio realizou-se dois esfregaços corados com reagente hematológico
147 comercial⁴. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da
148 contagem de 100 neutrófilos, sendo apenas consideradas as células que apresentavam
149 qualquer grânulo intracitoplasmático de cor azul enegrecida típica de formazan.

150 Após os estudos das distribuições das variáveis quanto à normalidade (teste
151 Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Teste Bartlett), conforme
152 preconizado por Zar (1984), utilizou-se o teste de Friedman para comparar os grupos,
153 seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram
154 efetuadas empregando-se o programa computacional SAS⁸ e os valores foram
155 considerados quando $p < 0,05$.

156

157 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

158 Os valores do hemograma e concentrações séricas de uréia dos dez cães do
159 grupo controle apresentaram-se dentro dos intervalos de referências de normalidade
160 descritas por Kerr (2003), confirmando a boa condição de saúde sugerida pelo exame
161 clínico geral. A concentração média final de uréia das 10 amostras submetidas aos
162 ensaios com plasma autólogo (ensaio 2) e plasma homólogo sadio (ensaio 3) variou
163 dentro da faixa de normalidade para a espécie, enquanto as amostras tratadas com soro
164 urêmico (ensaio 4) apresentaram uma concentração elevada, comum à cães portadores
165 de IRC (Tab. 1).

166

167

⁵ Ureia enzimática, Katal, Katal Biotecnológica Indústria e comércio LTDA, Belo Horizonte- MG, Brasil.

⁶ Espectrofotômetro E-205, CELL-M, Brasil

⁷ Nitrobluetetrazolium, Cat. N6876, Sigma, St. Louis, USA

⁸ SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA

168 Tabela 1- Valores de tendência central e dispersão (média \pm desvio padrão) da
 169 concentração final de uréia e porcentagens (%) da taxa neutrofílica de redução
 170 espontânea do NBT de dez cães hígidos submetido a diferentes ensaios: Utilização
 171 de sangue total imediatamente após a colheita (ensaio 1); sangue total incubado com
 172 plasma autólogo (ensaio 2); sangue total incubado com plasma homólogo sadio
 173 (ensaio 3) e sangue total incubado com soro homólogo urêmico (ensaio 4).

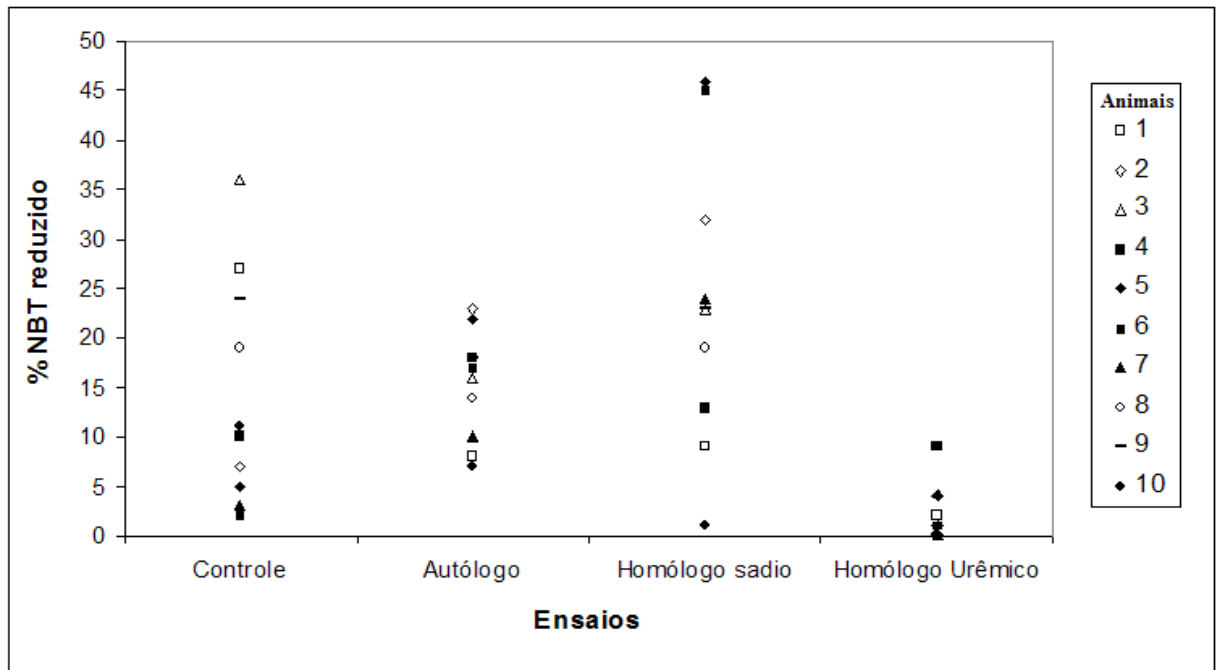
Amostra	Uréia (mmol/L)	% redução NBT
Ensaio 1	7,57 \pm 1,10 ^{a*}	14,4 \pm 11,5 ^{a*}
Ensaio 2	7,57 \pm 1,10 ^a	15,3 \pm 5,5 ^{ab}
Ensaio 3	6,38 \pm 0,79 ^a	23,5 \pm 14,4 ^{ab}
Ensaio 4	26,81 \pm 6,25 ^a	1,7 \pm 2,8 ^c

174 * Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

175 O metabolismo oxidativo de neutrófilos dos dez cães, quando analisado
 176 individualmente apresentou heterogenicidade nos diferentes ensaios (Fig.2),
 177 provavelmente devido ao método e presença de subpopulações de neutrófilos.
 178 Estudos realizados em seres humanos (Vouter et al.,1996) e cães (Webb et al., 2007),
 179 igualmente verificaram variações no metabolismo oxidativo de neutrófilos devido à
 180 presença de subpopulações de neutrófilos, as quais respondem de diferentes maneiras
 181 à diferentes condições.

182 A incubação com plasma homólogo sadio (ensaio 3) promoveu uma maior
 183 ativação do metabolismo oxidativo de neutrófilos do que a utilização de plasma
 184 autólogo (ensaio 2). Porém, as taxas de redução do NBT nesses dois ensaios não
 185 diferiram significativamente entre si e nem em relação ao ensaio 1. A maior ativação
 186 com plasma homólogo (ensaio 3) não ocorreu em todas as amostras, sendo que 40%
 187 apresentaram valores de redução do NBT semelhantes ou menores do que o ensaio 2,
 188 que utilizou plasma autólogo (Fig. 2). Considerando o modelo experimental adotado
 189 ter sido pareado, portando com a mesma subpopulação de neutrófilos, é provável que
 190 a maior produção de superóxido observada no ensaio 3 em relação ao ensaio 2 tenha

191 ocorrido devido à alguma diferença na composição do plasma autólogo em relação
 192 ao homólogo.



193 Figura 2- Variação da taxa de redução espontânea neutrofílica do NBT em dez cães
 194 hígidos submetidos a diferentes ensaios: Utilização de sangue total imediatamente
 195 após a colheita (ensaio 1); utilização sangue total incubado com plasma autólogo
 196 (ensaio 2); sangue total incubado com plasma homólogo sadio (ensaio 3) e sangue
 197 total incubado com soro homólogo urêmico (ensaio 4).

198

199 A porcentagem média de neutrófilos redutores de NBT logo após a colheita (ensaio
 200 1) foi semelhante aos valores de referência descritos por Ciarlini et al. (2004), porém
 201 inferior aos de Trevelin et al. (2008) e superior aos de Poli et al. (1973) e Emanuelli
 202 (2007). Tais discrepâncias são comuns em estudos que avaliam o metabolismo
 203 oxidativo dos neutrófilos (Cendoroglo et al., 1999; Gastaldello et al., 2000; Wann et al.,
 204 2007). Reconhecidamente, os resultados obtidos pelo método de redução do NBT são
 205 principalmente influenciados pela temperatura e tempo de incubação (Sela et al., 2005),
 206 tipo e concentração do anticoagulante (Freitas et al., 2008) e estimulante (Cendoroglo et
 207 al., 1999).

208 Quatro cães foram soro-positivos para *Leishmania sp.* (1, 2, 3 e 8), sendo que dois
209 deles apresentaram neutrófilos com taxa de redução de NBT elevadas (1, 3) enquanto
210 nos outros dois a taxa foi considerada normal (Fig.2). Tais achados diferem das
211 observações de Vuotto et al. (2000), que verificaram uma menor produção de
212 superóxido observada em cães infectados com *L. infantum*. Os cães sorologicamente
213 positivos foram mantidos no estudo uma vez que todos possuíam neutrófilos com
214 metabolismo oxidativo funcional e não tinham qualquer alteração clínica ou laboratorial
215 compatível com leishmaniose.

216 Independente das fontes de variações, a taxa neutrofílica de redução do NBT do
217 ensaio 1, obtida logo após a colheita, demonstrou que no momento inicial do
218 experimento todas as amostras utilizadas nos diferentes ensaios apresentavam
219 neutrófilos com metabolismo oxidativo funcional, passíveis de serem testados quanto ao
220 efeito inibidor da uremia.

221 Comprovando que a manipulação das células nos diferentes ensaios não
222 comprometeu a capacidade dos neutrófilos produzirem o superóxido, a taxa de redução
223 do NBT do ensaio 2 não diferiu significativamente das obtidas no ensaio 1 (Tab. 1).

224 Não ocorreu ativação ou inibição significativa do metabolismo oxidativo devido a
225 qualquer componente presente no plasma homólogo, uma vez que a taxa de redução
226 neutrofílica do NBT após o acréscimo de plasma homólogo de cães saudáveis (ensaio 3)
227 não diferiu significativamente dos ensaios (1 e 2).

228 De modo homogêneo, 100% das amostras incubadas com soro urêmico (ensaio 4)
229 apresentaram inibição do metabolismo oxidativo (Fig. 2), sendo a taxa de redução
230 neutrofílica do NBT significativamente inferior (Tab.1) à dos demais ensaios,
231 reproduzindo *ex vivo* em cão o efeito inibidor dos componentes urêmicos sobre o
232 metabolismo oxidativo. Embora seja aceito que cães com IRC tenham sua imunidade
233 comprometida (Polzin et al., 2004), não existem relatos na literatura que forneçam
234 evidências, como as obtidas no presente estudo, quanto ao efeito inibitório da uremia
235 sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Diante de tais achados obtidos *ex vivo*,
236 torna-se imperativo comprovar se o efeito imunossupressor da uremia ocorre também *in*
237 *vivo*, contribuindo, dessa maneira, para melhor esclarecer os mecanismos que
238 promovem a imunossupressão de cães com IRC.

239 Concordando com os resultados obtidos no presente estudo, pesquisas realizadas
240 em seres humanos também demonstraram o efeito inibidor da uremia sobre o
241 metabolismo oxidativo dos neutrófilos (Lewis et al. 1988; Cendoroglo et al.,1999).
242 Entretanto, Sela et al. (2005) verificaram a ativação do metabolismo na uremia,
243 enquanto Chretien e Garagusi (1972) observaram uma taxa de redução neutrofílica do
244 NBT de pacientes urêmicos (7,5%) semelhante à de pacientes saudáveis (7,2%). Segundo
245 Sardenberg et al.(2006), os resultados conflitantes sobre o efeito da uremia sob a
246 produção de superóxido não se restringe aos diferentes estimulantes utilizados para
247 ativar o metabolismo dos neutrófilos, mas a vários fatores como meio de cultivo,
248 concentração de plasma autólogo, técnicas de isolamento e métodos analíticos.

249 Cendoroglo et al. (1999) realizaram um estudo *ex vivo* similar e verificaram
250 igualmente uma menor produção de superóxido em neutrófilos humanos isolados e
251 incubados com plasma homólogo urêmico. Sendo amplamente aceito que o aumento do
252 metabolismo oxidativo acelera a apoptose celular (Whyte et al., 1988). Cendoroglo et al.
253 (1999) hipotetizaram que *in vivo*, num primeiro momento, a uremia promove um
254 aumento do metabolismo oxidativo neutrofílico que induz a apoptose celular e essa por
255 sua vez compromete o funcionamento dos neutrófilos.

256 Portanto, o protocolo utilizado no presente estudo reproduziu *ex vivo* o efeito da
257 uremia sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, sugerindo que *in vivo* o
258 mesmo possa ocorrer em cães com insuficiência renal e, dessa maneira, comprometer a
259 imunidade inata, favorecendo a instalação e morte por infecções bacterianas. Diante de
260 tais indícios *ex vivo*, torna-se necessário realizar outras investigações para averiguar se a
261 uremia *in vivo* também promove a inibição do metabolismo oxidativo ou outras
262 disfunções dos neutrófilos em cães. Outrossim, a complementação do presente estudo
263 poderá confirmar a potencial utilização do cão como modelo para estudos comparativos
264 sobre as disfunções neutrofílicas associadas à uremia.

265

266 CONCLUSÃO

267 Concluiu-se que *ex vivo* o soro de cães urêmicos compromete a produção de
268 superóxido dos neutrófilos de cães hígidos, similarmente a inibição do metabolismo
269 oxidativo que ocorre em pacientes humanos portadores de insuficiência renal crônica.

270 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 271 ANDING, K.; GROSS, P.; ROST, J.M. et al. The influence of uraemia and
272 haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol Dial*
273 *Transplant*, v.18, p. 2067-2073, 2003.
- 274 BABIOR B.M. NADPH oxidase. *Curr. Opin. immunol.*, v. 16, p. 42-47, 2004.
- 275 CENDOROLO, M.; BERTRAND, L.J.; BALAKRISHNAN, V.S. et al. Neutrophil
276 apoptosis and dysfunction in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 10. p. 93-100, 1999.
- 277 CHRETIEN, J.H.; GARAGUSI, V.F. Phagocytosis and nitroblue tetrazolium reduction
278 in uremia. *Experientia*, v. 29, p.612-613, 1972.
- 279 CIARLINI, P. C.; PATRÍCIO, R. F.; COUTO, R. et al. Efeito da vacina polivalente
280 sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. *Arq. Inst. Biol.*,
281 v. 71, p.323-327, 2004.
- 282 COHEN, G.; HAAG-WEBER, M.; HÖRL, W. H. Immune dysfunction in uremia.
283 *Kidney International*, v. 52, p. S79 – S82, 1997.
- 284 DiBARTOLA, S.P. Abordagem clínica e laboratorial da doença renal. In: ETTINGER,
285 S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro:
286 Guanabara Koogan, 2004. v.2, Cap.167, p.1686-1720.
- 287 EMANUELLI, M. P. *Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e*
288 *peroxidação lipídica em cadelas com piometra por Escherichia coli*. 2007. 38f.
289 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa
290 Maria, Santa Maria.
- 291 FEITOSA, F. L. F. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. 2ªed. São Paulo:Roca,
292 2008. 735p.
- 293 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças
294 relacionadas, de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43, p.107-110,
295 1997.
- 296 FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J.L.F.C. et al. Isolation and activation of human
297 neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection.
298 *Clin. Biochem.*, v.41, p.570 –575, 2008.

- 299 GASTALDELLO, K.; HUSSON, C.; WENS, R. et al. Role of complement and platelet-
300 activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species
301 production during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.15, p.1638-46, 2000.
- 302 HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T.; NISHIKAWA, A. et al. Oxidative metabolism
303 and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal
304 failure. *Nephron.*, v. 49, p. 305-312, 1988
- 305 HIRAYAMA, A.; NORONHA-DUTRA, A.A.; GORDGE, M.P. et al. Inhibition of
306 neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidine compounds. *J.*
307 *Am. Soc. Nephrol.*, v.11, p.684-689, 2000.
- 308 JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. WALPORT, M. et al. *Imunobiologia: o sistema*
309 *imune na saúde e na doença*. 6^oed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap.2. p. 37-48
- 310 KERR, M.G. *Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e*
311 *hematologia veterinária*. 2^oed. São Paulo: Roca, 2003.
- 312 LEWIS, S.L.; VAN EPPS, D.E.; CHENOWETH, D.E. Alterations in chemotactic
313 factor-induced responses of neutrophils and monocytes from chronic dialysis patients.
314 *Clin. Nephrol.*, v. 30, p.63-72, 1988.
- 315 LIM, J.; GASSON, C.; KAJI, D.M. Urea inhibits NaK₂CI cotransport in human
316 erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, v.96, p. 2126-2132, 1995.
- 317 LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E. IKEDA,F.A. et al. Anti-leishmania antibodies in
318 cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasos. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36,
319 p.485-489, 2003.
- 320 McLEISH, K.R.; KLEIN, J.B.; LENDERER, E.L. et al. Azotemia, TNF alpha, and LPS
321 prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Inter.*, v.
322 50, p. 407-416, 1996.
- 323 OTTONELLO, L.; PAOLA, G.; BERTOLOTTO, M. et al. Leptin as uremic toxin
324 interferes with neutrophil chemotaxis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.15, p.2366-2372, 2004.
- 325 PAUL, J.L.; ARVEILLER, M.R.; MAN, N.K. et al. Influence of uremia on
326 polymorphonuclear leukocytes oxidative metabolism in end-stage renal disease and
327 dialyzed patients. *Nephron.*, v. 57, p. 428-432, 1991.
- 328 POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T) test nel
329 cane. *Folia Vet. Lat.*, v.3, p.215, 1973.

- 330 POLZIN, D.J., OSBORNE, C.A., JACOB, F. et al. Insuficiência renal crônica. In:
331 ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 4° ed. Rio
332 de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, Cap.169, p.1721-1751.
- 333 RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple flow
334 cytometry assay dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory
335 burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J.*
336 *immunol. Methods.*, v.219, p.187-193, 1998.
- 337 RYSZ, J.; KASIELSKI, M.; APANASIEWICZ, J. et al. Increased hydrogen peroxide in
338 the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. *Nephrol. Dial.*
339 *Transplant.*, v.19, p.158-163, 2004.
- 340 SARDENBERG, C.; SUASSUNA, P.; ANDREOLI, M.C.C. et al. Effects of uraemia
341 and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol. Dial.*
342 *Transplant.*, v.21, p. 160–165, 2006.
- 343 SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G. et al. P-cresylsulphate, the main *in vivo*
344 of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol. Dial. Transplant.*,
345 v.22, p.592-596, 2007.
- 346 SELA, S.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; COHEN-MAZOR, M. et al. Primed peripheral
347 polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and
348 systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 16, p.
349 2431–2438, 2005.
- 350 THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W. et al. *Hematologia e bioquímica*
351 *clínica veterinária*. Roca: São Paulo, 2006.582p.
- 352 TREVELIN, S.C.; TRINCONI, C.M.; BARBOSA, T.S. et al. Efeito do plasma rico em
353 uréia sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães domésticos. In: Congresso de
354 Iniciação Científica da UNESP, 2008, São José dos Campos. **Anais...** (Resumo
355 Expandido).
- 356 VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic
357 toxicity? *Pediatr. Nephrol.*, v.23, p.1211–1221, 2008.
- 358 VOUTER, J.; JANSSON, S.E.; REPO, H. Standardization of a flow cytometric assay
359 for phagocyte respiratory burst activity. *Scand. J. Immunol.*, v.43, p.329-334, 1996.

- 360 VUOTTO, M.L.; DE LUNA, R.; IELPO, M.T.L. et al. Chemiluminescence activity in
361 whole blood phagocytes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*.
362 *Luminescence*, v.15, p.251-255, 2000.
- 363 WANN, J.G.; HSU, Y.; YANG, C. et al. Neutrophils in acidotic haemodialysed patients
364 have lower intracellular pH and inflamed state. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.22,
365 p.2613–2622, 2007.
- 366 WARD, R.A.; McLEISH, K.A. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is
367 enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 5,
368 p.1697-1702, 1995.
- 369 WEBB, C.; MC CORD K.; DOW, S. Neutrophil function in septic dogs. *J. Vet. Inter.*
370 *Med.*,v.21, p.982-989, 2007.
- 371 WHYTE, M.K.B.; MEAGHER, L.C.; MACDERMOT, J. et al. Impairment of function
372 in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.*, v. 150, p. 5124-5134,
373 1993
- 374 ZAR, J.H. *Bioestatistical analysis*. 2° ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718p.
375
376

Capítulo 3

Efeito do soro de cães portadores de insuficiência renal sobre a apoptose e o metabolismo oxidativo dos polimorfonucleares³

Effect of serum from dogs with renal failure on apoptosis and oxidative metabolism of polymorphonuclears

Barbosa T. S.⁴; Soeiro C. S.²; Silva A. C. R. A.⁵; Mori C. K.⁶; Ciarlini P. C.^{7*}

ABSTRACT.- Barbosa T.S., Soeiro C.S., Silva A.C.R.A., Mori C.K. & Ciarlini P.C [Effect *in vitro* of serum from dogs with renal failure on apoptosis and oxidative metabolism of neutrophils] Efeito *in vitro* do soro de cães portadores de insuficiência renal sobre a apoptose e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

In recent years the uremic toxins have been investigated about its importance as an immunosuppressant in nephropathy's human patients. The aim of this study was to test the hypothesis that there are relation between apoptosis and superoxide production. PMN from ten dogs was incubated with uremic and non-uremic homologous serum and autologus, and quantified the superoxide production and apoptosis. It was concluded that the presence of components of uremic serum parcial inhibits the oxidative metabolism in dogs and no correlated with apoptosis

Index terms: Dogs, PMN, programmed cell death, superoxide.

RESUMO

Nos últimos anos, as toxinas urêmicas têm sido amplamente investigada como elemento imunossupressor nos pacientes humanos nefropatas. Este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que existe relação entre a taxa de apoptose e a produção de superóxido dos PMN de cães tratados com soro urêmico. Foram isolados os PMN de 10 cães saudáveis e incubados com soro autólogo, homólogo saudável e homólogo urêmico, em seguida foram avaliados quanto ao superóxido gerado e a taxa apoptótica. Foi verificado um efeito parcial de inibição do metabolismo oxidativo na uremia sem correlação com a aceleração da apoptose dos PMN de cães.

Termos de indexação: Caninos, morte celular programada, PMN, supéroxido.

³ Normalização segundo a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (Anexo B)

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UNESP – Araçatuba. Bolsista CAPES.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UNESP – Araçatuba.

⁶ Curso de Medicina Veterinária, UNESP – Araçatuba.

⁷ Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba, FOA, UNESP, Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil, e-mail: ciarlini@fmva.unesp.br. *Autor para correspondência.

INTRODUÇÃO

A primeira linha de defesa do organismo contra infecções, constituída dentre outros elementos por polimorfonucleares (PMN), fica comprometida em pacientes humanos com uremia acarretando muitas mortes por infecções (Sarnak & Jaber 2000). O metabolismo oxidativo dos PMN gera superóxido e derivados que atuam benéficamente como bactericidas, mas também promove danos oxidativos que comprometem a função leucocitária e induz a apoptose (Kannan & Jain 2000).

Os mecanismos relacionados às disfunções dos PMN em pacientes humanos urêmicos não estão totalmente esclarecidos (Sardenberg et al. 2006), havendo evidências que esteja associada com a aceleração da apoptose (Cendoroglo et al. 1999). Estudos sobre o metabolismo oxidativo dos PMN de pacientes urêmicos são contraditórios, tendo sido observado normalidade (Paul et al. 1991; Gastaldello et al. 2000; Anding et al. 2003), aumento (Ward & Mcleish 1995; Mcleish et al. 1996; Sela et al. 2005) e diminuição (Lewis et al. 1988; Cendoroglo et al. 1999) da produção do superóxido e derivados.

Há evidências de que o excesso de radicais de oxigênio produzidos pelo metabolismo oxidativo acelera a apoptose (Jaber et al. 2001), assim evidencia-se que células em apoptose possuem seu funcionamento comprometido, inclusive com diminuição da sua capacidade de produção de superóxido (Whyte et al. 1993).

A insuficiência renal crônica (IRC), dentre outras causas urêmicas, é uma nefropatia comum na espécie canina. Os danos do estresse oxidativo sobre os eritrócitos foram verificados em cães com IRC (Lustoza 2005), porém não há nesta espécie estudos sobre o efeito da uremia no funcionamento dos PMN. Recentemente, constataram que o plasma de cães saudáveis enriquecido com uréia comercial promove a aceleração da apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis e que este efeito é dependente do tempo (Trinconi et al. 2008).

O presente trabalho tem como objetivo testar a hipótese de que há relação entre a taxa de apoptose e produção de superóxido dos PMN tratados com soro urêmico de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais

Para constituição dos grupos experimentais, cães adultos, de várias raças machos ou fêmeas, foram submetidos a exame físico geral segundo Feitosa (2008), e a laboratoriais (hemograma completo e quantificação sérica de ácido úrico, albumina, colesterol, creatinina, frutamina, glicose e uréia). Foi utilizado como critério de exclusão de cães o histórico de tratamento recente com antibióticos e anti-inflamatórios que poderiam interferir no metabolismo oxidativo dos PMN. De acordo com os resultados obtidos para as características clínico-laboratoriais, acima referidos os animais foram agrupados em:

Grupo Controle (GC): Onze cães sem evidências de alterações clínicas e laboratoriais, dos quais dez destinados à realização dos ensaios e um utilizado como fonte de homólogo sadio.

Grupo Urêmico (GU): Dez cães insuficientes renais urêmicos, conforme critérios laboratoriais de Kerr (2003) e clínicos de DiBartola (2004), todos sem insuficiência cardíaca, ruptura vesical e obstrução pós-renal.

Colheita e acondicionamento das amostras

De ambos os grupos, utilizando-se agulhas hipodérmicas descartáveis 25 x 8 mm, colheu-se sangue total em tubos heparinizados à vácuo⁸ para a avaliação do metabolismo oxidativo e determinação do índice apoptótico. Para a realização do hemograma, parte do sangue total foi acondicionado em tubos com K²-EDTA⁹ e outra parte para obtenção de soro foi acondicionado tubos sem anticoagulante¹⁰. O soro obtido foi acondicionado a -20°C e as amostras sanguíneas mantidas refrigeradas até o momento do processamento laboratorial.

Isolamento, purificação e viabilidade dos PMN

Os PMN foram isolados imediatamente após a colheita, conforme metodologia descrita por Hirayama et al. (2000), com pequenas modificações a fim de evitar a lise eritróide e prevenir ativação artificial dos PMN. Resumidamente, quatro mililitros de sangue total heparinizado (100 UI/mL) foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno estéreis contendo parte iguais de Histopaque-1119¹¹ e 1077¹², totalizando seis mililitros de duplo gradiente de separação. Após centrifugação a 340 x g por 30 minutos, a camada de PMN foi aspirada com ponteiras siliconizada, lavada duas vezes com tampão de lise (cloreto de amônia 0,8%) e uma vez com HBSS¹³. Após o descarte do sobrenadante, as células foram diluídas em meio RPMI¹⁴ para obter concentração de PMN final de 2 x 10⁶ mL, com pureza e viabilidade mínima de 95%. Conforme recomendações de Metcalf et al. (1986), o grau de viabilidade dos PMN foi determinado pelo método de exclusão do azul tripan, a concentração em câmara de Neubauer e o grau de pureza estimada a partir da contagem diferencial de 100 células das amostras citocentrifugadas e coradas.

Delineamento experimental

Em partes iguais, uma suspensão de PMN (2x10⁶ mL) em meio RPMI de cada um dos 10 cães do GC foi incubado por 20 minutos a 37°C com soro autólogo (ensaio 1), com soro homólogo de cão sadio (ensaio 2) e com soros de cães urêmicos (ensaio 3). A concentração final de uréia dos ensaios 1, 2 e 3

⁸ Vacutainer plus plastic Heparin, Cod. 367993, Becton-Dickson, New Jersey, USA.

⁹ Vacutainer plus plastic K2 EDTA, Cod. 367842, Becton-Dickson, New Jersey, USA.

¹⁰ Vacutainer plus plastic No Additive, Cod. 8009659, Becton-Dickson, New Jersey, USA

¹¹ Histopaque®-1119, Cod. 1119-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

¹² Histopaque®-1077, Cod. 1077-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

¹³ Hanks balanced salt solution (HBSS) modified, Cod. H 9394, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

¹⁴ Medium RPMI 1640, Cat. R0883, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

variaram de 3,17 a 8,35 mmmol/L, 4,5 a 7,18 mmmol/L e de 37,3 a 86,6 mmmol/L, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados simultaneamente e imediatamente após o isolamento. Após a incubação, todas as amostras foram submetidas ao teste de redução do NBT, sendo a taxa de PMN redutores e o índice apoptótico calculada para cada reação.

Os ensaios 1, 2 e 3 foram repetidos para estimar a taxa de apoptose após quatro horas de incubação, com e sem estímulo apoptótico ($0,3 \mu\text{mol CAM}^{15} / 1 \times 10^6 \text{ PMN}$).

Análises laboratoriais

Os valores do hemograma foram obtidos utilizando-se contador eletrônico de células sanguíneas¹⁶ previamente calibrados conforme recomendações do fabricante. A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida pela análise microscópica de esfregaços corados com Panótico¹⁷. A determinação do volume globular foi realizada pelo método de micro-hematócrito (Thrall et al. 2007). Todas as análises bioquímicas foram realizadas em um analisador bioquímico automatizado¹⁸, previamente ajustado com calibrador comercial¹⁹ e controles nível I²⁰ e II²¹. Utilizando-se reagentes comerciais e temperatura de 37°C, a concentração plasmática de uréia foi determinada pelo método enzimático UV (urease/ glutamato desidrogenase)²²; a creatinina pelo método cinético (picrato alcalino)²³; a albumina pelo método de verde de bromocresol²⁴, o ácido úrico pelo método colorimétrico enzimático (uricase/peroxidase)²⁵; o colesterol pelo método enzimático oxidase/peroxidase²⁶, a glicose pelo método enzimático (glicose oxidase/Peroxidase)²⁷ e a frutossamina pelo método colorimétrico de redução do NBT²⁸.

Avaliação do metabolismo oxidativo dos PMN

A produção de superóxido dos PMN isolados foi determinada indiretamente pelo método citoquímico de redução espontânea NBT²⁹. Resumidamente, 50 μL de solução aquosa a 2% de NBT foram acrescidos a 100 μL da suspensão de PMN de cada ensaio e com auxílio de um mixer termomicroprocessado³⁰ foram incubados a 37°C sob agitação (600 rpm/60

¹⁵ Camptothecin, Cat. C9911, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

¹⁶ Contador eletrônico hematológico veterinário, Mod. CC-530, CELM, São Paulo-SP.

¹⁷ Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

¹⁸ Analisador automático BTS, mod. 370 plus, BioSystems, Barcelona, Spain..

¹⁹ Calibrator serum, Cód.18011, BioSystems, Barcelona, Spain.

²⁰ Assayed control serum level I, Cód. 18005, BioSystems, Barcelona, Spain.

²¹ Assayed control serum level II, Cód. 18007, BioSystems, Barcelona, Spain.

²² Urea/BUN-UV, Cod. 11516, BioSystems, Barcelona, Spain.

²³ Creatinine, Cod.11502, BioSystems, Barcelona, Spain.

²⁴ Albumine, Cod.11574, BioSystems, Barcelona, Spain.

²⁵ Uric acid, Cod.11802, BioSystems, Barcelona, Spain.

²⁶ Cholesterol, Cód.11505, BioSystems, Barcelona, Spain.

²⁷ Glucosa, Cod.11503, BioSystems, Barcelona, Spain.

²⁸ Fructosamina, Cod. 11046, BioSystems, Barcelona, Spain.

²⁹ Nitroblue tetrazolium, Cat. N6876, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

³⁰ Thermomixer comfort 5355, Eppendorf AG, Hamburg, Germany

segundos a cada cinco minutos). Após o final da incubação todas as amostras foram citocentrifugadas por cinco minutos a 400 x g e posteriormente coradas com reagente hematológico comercial. A porcentagem de células produtoras de superóxido foi estimada a partir da contagem de 100 neutrófilos, sendo consideradas positivas apenas as redutoras de NBT, ou seja, aquelas com grânulo intracitoplasmático de cor azul enegrecida típica de formazan, independente do tamanho.

Avaliação do índice apoptótico dos PMN

Conforme os protocolos de citocentrifugação e coloração supracitados, imediatamente após a incubação, o índice apoptótico de PMN foi calculado a partir da análise morfométrica de 100 células, utilizando-se microscopia óptica (aumento de 1.000X), conforme recomendações e critérios de Campos et al. (2004) e Batista et al. (2005). Resumidamente, foram consideradas apoptóticas células que apresentaram pelo menos três das seguintes características morfológicas peculiares do processo: condensação do citoplasma (intensa coloração citoplasmática), condensação nuclear (compactação da cromatina nuclear em massas densas e uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear), fragmentação nuclear (convolução e fragmentação da membrana nuclear sem cariorrexe ou ruptura), fragmentação celular (formação de corpos apoptóticos). Os corpos apoptóticos em grande número e próximos uns dos outros foram quantificados como o resultado de uma única célula em apoptose. A fim de não incluir corpos apoptóticos de linfócitos na avaliação em questão, levou-se em consideração as informações descritas por Nagami e colaboradores (2002), em que corpos apoptóticos de linfócitos apresentam citoplasma basofílico (coloração azulada), menor tamanho, fragmentos nucleares mais irregulares do que os PMN.

Análise Estatística

Após análise das distribuições das variáveis quanto à normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Teste Bartlett), conforme preconizado por Zar (1984), utilizou-se o teste de Friedman para comparar os grupos, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. De acordo com o padrão de normalidade, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson ou de Spearman entre os grupos. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa computacional SAS³¹.

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os valores do perfil bioquímico, das contagens globais de hemácias e leucócitos dos 10 cães do GC (Quadro 1) ficaram dentro dos limites de normalidade referidas por Kerr (2003), confirmando a boa condição de saúde sugerida pelo exame clínico geral.

Todas as amostras incubadas com soro autólogo (ensaio 1) reduziram o NBT (Quadro 2), comprovando que os PMN obtidos de suspensões isoladas e

³¹ SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA.

utilizadas nos três ensaios exibiram metabolismo oxidativo funcional. A taxa de redução neutrofílica do NBT foi inferior aos de Trevelin et al. (2008) e superior aos de Poli et al. (1973), Ciarlini et al. (2004) e Emanuelli (2007). Em estudos sobre o metabolismo oxidativo do PMN é comum a divergência entre autores sobre a taxa de produção de superóxido (Ward & Mc Leish 1995; Cendoroglo et al. 1999). Acredita-se que tais divergências devem-se às diferenças quanto aos métodos analíticos empregados, assim como dos procedimentos de isolamento celular (Sardenberg et al., 2006), tempo e temperatura de incubação das amostras (Sela et al. 2005), além do tipo e concentração do anticoagulante utilizado (Freitas et al. 2008).

A adição do soro homólogo sadio às células isoladas não comprometeu a capacidade dos PMN produzirem superóxido, indicando que possíveis diferenças antigênicas existentes não afetou o metabolismo oxidativo (Quadro 2).

Houve discreta diminuição da taxa de redução neutrofílica do NBT após o acréscimo do soro homólogo urêmico (ensaio 3) em relação aos demais ensaios. Embora o valor mediano da taxa de redução do NBT das amostras incubadas com soro urêmico tenha sido 37,5 e 56,5% inferior aos do ensaio 1 e 2, respectivamente, tais diferenças não foram significativas (Quadro 2). Utilizando protocolo similar em cão, porém com sangue total, Barbosa e colaboradores (2009), diferentemente, evidenciaram uma marcante inibição do metabolismo oxidativo dos PMN incubados com soro urêmico. Segundo Sela et al. (2005), por não haver manipulação das amostras, ensaio com sangue total representa melhor as condições *in vivo*, pois as células não são afetadas pela separação, nem por longas incubações. É provável que o efeito inibidor da uremia sobre a produção de superóxido, neste caso, tenha sido parcial devido ao fato dos PMN isolados terem sido incubados com soro urêmico por apenas 20 minutos, enquanto que no estudo de Barbosa et al. (2009) o sangue total foi incubado por duas horas. Colaborando com essa hipótese, Sela et al. (2005) verificaram que a produção de superóxido é dependente da temperatura e tempo de incubação das amostras. Considerando que a ação inibidora da uremia sobre o metabolismo oxidativo seja também dependente do tempo, o protocolo adotado não permitiu evidenciar tal efeito. Resultados do ensaio piloto revelaram que os PMN isolados e incubados com NBT sofriam muita lise a partir de uma hora. É possível também que o processo de isolamento adotado tenha ativado o metabolismo oxidativo dos PMN de modo a aumentar a produção de superóxido antes da incubação com soro urêmico, mascarando o efeito inibidor das toxinas, conforme observado em estudo similar realizado em humanos (Cendoroglo et al. 1999). A inibição da produção de superóxido em PMN humanos isolados apenas ocorreu após 24 horas de incubação com soro urêmico (Cendoroglo et al. 1999).

Os índices apoptóticos calculados durante as reações de redução do NBT, dos três ensaios, variaram em torno de 10%, não diferindo entre si, (Quadro 2). Tais resultados divergem de estudos que verificaram significativa aceleração da apoptose dos PMN em pacientes urêmicos (Majewska et al. 2003, Sela et al. 2005, Sardenberg et al. 2006) e em células sadias incubadas

com soro urêmico (Cendoroglo et al. 1999). Trinconi et al. (2008), utilizando protocolo semelhante ao do presente estudo, porém com sangue total, constatou-se que o plasma enriquecido com uréia comercial promove aceleração da apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis e que este efeito é dependente do tempo. É possível que o pequeno tempo de incubação adotado no ensaio de redução do NBT não tenha permitido evidenciar o efeito apoptótico do soro urêmico descrito em outros estudos. Ao se avaliar a apoptose dos PMN isolados, sem a presença do NBT (Quadro 3), foi confirmado que o índice apoptótico sofre efeito do tempo de incubação, no entanto, não foi possível observar, após 4 horas de incubação, qualquer aceleração da apoptose no grupo tratado com soro urêmico. Há de se considerar que Cendoroglo et al. (1999) avaliaram a apoptose incubando 24 horas o isolado de PMN com soro urêmico, portanto, um tempo bem superior aos dos ensaios do presente estudo. É possível também que as toxinas presentes nos soros urêmicos utilizados no ensaio 3 tenham sofrido diluição ao serem acrescidas à suspensão de PMN na proporção de 1:1, contribuindo para o mascaramento do efeito de aceleração da apoptose e inibição da produção de superóxido já descritos em humanos portadores de IRC (Cendoroglo et al. 1999).

Na presença do CAM os índices apoptóticos foram significativamente superiores nos três ensaios (Quadro 3), comprovando o efeito indutor de apoptose dessa droga sobre o PMN de cães descrito por NAGAMI et al (2002). Esse efeito indutor de apoptose do CAM já havia sido descrito em estudos realizados com linfócitos humanos (Dolzhanskiy & Basch 1995), porém não em PMN. Segundo Ondrousková et al. (2008), o mecanismo que o CAM induz apoptose celular é lisossomo dependente e ocorre devido a geração de radicais livres que inibem a topoisomerase 1 do DNA, causando o dano nuclear.

Não foi verificada correlação significativa entre o índice apoptótico e a capacidade dos PMN reduzirem o NBT (Quadro 2). Este resultado diverge de estudo feito em humanos (Sela et al. 2005), porém coincide com as observações de Cendoroglo et al. (1999) que não constataram correlação entre a apoptose e a produção de superóxido de PMN humano ativado com PMA. No presente estudo a metade das amostras incubadas com soro urêmico apresentaram decréscimo na produção de superóxido e a totalidade destes teve aumento do índice apoptótico, resultados que sustentam a afirmação de Whyte et al. (1993) de que células em apoptose tem seu funcionamento comprometido, inclusive diminuindo sua capacidade de produção de superóxido. Diferentemente, dentre as amostras incubadas com soro urêmico que apresentaram aumento do metabolismo oxidativo, apenas metade apresentaram aceleração da apoptose. Estes resultados colaboram também com a hipótese de Cendoroglo et al. (1999) de que na fase inicial da uremia ocorra um aumento do metabolismo oxidativo dos PMN, de modo que as substâncias oxidantes produzidas se acumulam e causam, apenas numa fase mais tardia, dano celular que induz a aceleração da apoptose e conseqüente diminuição da produção de superóxido. Majewska et al. (2003) sugeriram que

a aceleração da apoptose dos neutrófilos é devida ao aumento da proteína de expressão Fas promovida pela uremia.

Portanto, foi possível obter evidências de que as toxinas urêmicas de cães também promovam uma ativação inicial do metabolismo oxidativo dos PMN que posteriormente induz a aceleração da apoptose e conseqüente diminuição da produção de superóxido. Conclui-se que a não correlação entre a produção de superóxido e o índice apoptótico in vitro sofre influencia da diferença temporal quanto ao efeito das toxinas urêmicas sobre o metabolismo oxidativo e a apoptose dos PMN de cães.

REFERENCIAS

Anding K., Gross P., Rost J.M., Allgaier D. & Jacobs E. 2003. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18:2067-2073

Barbosa T. S., Mori C.K. & Ciarlini P.C. 2009. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. 13p. Exame Geral de Qualificação. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista/ Araçatuba – SP.

Batista J. J., Martin, A. S., Moro L. & Vasconcelos, A. C. 2005. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticóide. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57(4):457-464.

Campos P.P., Vasconcelos A.C. & Melo M.M. 2004. Apoptose no placentomo de cabras intoxicadas experimentalmente com cipó-preto – *Tetraptery multiglandulosa*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56(1):19-24.

Cendoroglo M., Jaber B.L., Balakrishnan V.S., Perianayagam M., King A.J. & Pereira B.J.G. 1999. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 93-100.

Ciarlini P.C., Patrício R.F., Couto R. & Bonello F.L. 2004. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. *Arq. Inst. Biol.* 73(3):323-327.

DiBartola S.P. 2004. Abordagem clínica e laboratorial da doença renal, p.1686-1720. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. Tratado de medicina interna veterinária. 4. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Dolzhanskiy A. & Basch R. S. 1995. Flow cytometric determination of apoptosis in heterogeneous populations. *J. Immunol. Methods.* 180; 131-140.

Emanuelli M.P. 2007. Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 38p.

Feitosa F.L.F. 2008. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 2.ed. Roca, São Paulo. 735p.

Freitas M., Porto G., Lima, J.L.F.C. & Fernandes E. 2008. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.* 41:570-575.

Gastaldello K., Husson C., Wens R., Vanherweghem J. & Tielemans, C. 2000. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:1638 - 1646.

Hirayama A., Noronha-Dutra A.A., Gordge M.P., Neild G.H. & Hothersall J.S. 2000. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidine compounds. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11:684-689.

Jaber B.L., Cendoroglo M., Balakrishnan V.S., Perianayagam M.C., King, A.J. & Pereira, B.J.G. 2001. Apoptosis of leukocytes: Basic concepts and implications in uremia. *Kidney Inter.* 59:197-205.

Kannan K. & Jain S.K. 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 7:153-163.

Kerr M.G. 2003. Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia veterinária. 2.ed. Roca, São Paulo.

Lewis S.L., Van Epps D.E. & Chenoweth D.E. 1988. Alterations in chemotactic factor-induced responses of neutrophils and monocytes from chronic dialysis patients. *Clin. Nephrol.* 30:63-72.

Lustoza M. D. 2005. Avaliação do estresse oxidativo em cães com insuficiência renal crônica e anemia. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 92f .

Majewska E., Baj Z., Sulowska Z., Rysz J. & Luciak M. 2003. Effects of uraemia nad haemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18:2582-2588.

McLeish K.R., Klein J.B., Lenderer E.L. Head K.Z. & Ward R.A. 1996. Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Inter.* 50:407-416.

Metcalf J.A., Gallin J.I., Nauseef W.M & Root R.K. 1986. Preparation of cells and materials for functional assays. p.87-143. In:___(Ed.) *Laboratory manual of Neutrophil Function.* Raven Press, New York.

Nagami K., Kawashima Y., Kuno H., Kemi M. & Matsumoto H. 2002. *In Vitro* cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils. *J. Toxicol. Sci.* 27(3):191-203.

Ondrousková E., Soucek K., Horváth V. & Smarda J. 2008. Alternative pathways of programmed cell death are activated in cells with defective caspase: dependent apoptosis. *Leuk. Res.* 31: 599 -609.

Paul J.L., Arveiller M.R., Man N.K., Luong N., Moatti N. & Raichwarg D. 1991. Influence of uremia on polymorphonuclear leukocytes oxidative metabolism in end-stage renal disease and dialyzed patients. *Nephron*. 57:428-432.

Poli G., Nicoletti G. & Faravelli G. 1973. Nitroblue tetrazolium (N.B.T) test nel cane. *Folia Vet. Lat.* 3:215.

Sardenberg C., Suassuna P., Andreoli M.C.C., Watanabe R., Dalboni M.A., Manfredi S.R., Santos O.P., Kallas E.G., Draibe S.A. & Cendoroglo M. 2006. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21:160-165.

Sarnak M.J. & Jaber B.L. 2000. Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Inter.* 58:1758-1764.

Sela S., Shurtz-Swirski R., Cohen-Mazor M., Mazor R., Chezar J., Shapiro G., Hassan K., Shkolnik G., Geron R. & Kristal B. 2005. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:2431–2438.

Thrall M.A., Baker D.C., Campbell T.W., DeNicola D., Fettman M.J., Lassen E.D., Rebar A. & Weiser G. 2007 *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Roca, São Paulo. 582p.

Trevelin S.C., Trinconi C.M., Barbosa T.S. & Ciarlini P.C. 2008. Efeito do plasma rico em uréia sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães domésticos. In: *ongresso de Iniciação Científica da UNESP, São José dos Campos.(Resumo Expandido)*.

Trinconi C.M., Trevelin S.C., Sousa, T. & Ciarlini P.C. 2008. Efeito do plasma rico em uréia sobre a apoptose de neutrófilos de cães. *Vet. Zootec.* 15 (2 supl.1):96.

Ward R.A. & McLeish K.A. 1995. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1697-1702.

Whyte M.K.B., Meagher L.C., MacDermot J. & Haslett C. 1993. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.* 150:5124-5134.

ZAR J.H. 1984. *Bioestatistical analysis*. 2.ed. Englewood Cliffs, Prentice Hall. 718p.

Quadro 1- Valores medianos (média \pm desvio padrão) da contagem total de hemácias e leucócitos e as determinações bioquímicas realizadas dos dez cães hígidos submetido aos ensaios.

	Média \pm Desvio Padrão
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,20 \pm 0,75
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,28 \pm 3,36
Ácido Úrico (mmol/L)	0,70 \pm 0,24
Albumina (g/L)	24,55 \pm 3,08
Colesterol (mmol/L)	5,3 \pm 2,24
Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)	79,56 \pm 15,02
Frutosamina (mmol/L)	1,29 \pm 0,39
Glicose (mmol/L)	4,44 \pm 1,19
Uréia (mmol/L)	5,73 \pm 1,41
Proteína Plasmática Total (g/L)	69,6 \pm 12,2

Quadro 2- Valores medianos (média \pm desvio padrão) das porcentagens (%) da taxa neutrofílica de redução espontânea do NBT e do índice apoptótico de dez cães hígidos submetido a diferentes ensaios e coeficiente de correlação entre a porcentagem de NBT e apoptose: Utilização dos neutrófilos isolados e incubados com plasma autólogo (ensaio 1); neutrófilos isolados e incubados com plasma homólogo sadio (ensaio 2) e neutrófilos isolados e incubados com soro homólogo urêmico (ensaio 3).

Amostra	% redução NBT	% apoptose sem CAM	Coefficiente de correlação NBT x Apoptose
Ensaio 1	16 ^a (17,3 \pm 10,03)	10 ^b (11,1 \pm 5,56)	r = 0,2441 (p=0,4968)
Ensaio 2	23 ^a (20,8 \pm 11,07)	10 ^b (11,0 \pm 7,16)	r = -0,2395 (p=0,5052)
Ensaio 3	10 ^a (20,95 \pm 16,2)	12 ^b (20,8 \pm 21,92)	r = - 0,0518 (p=0,8916)

Quadro 3- Valores medianos (média \pm desvio padrão) das porcentagens (%) do índice apoptótico não estimulado e com CAM, com 4 horas de incubação, de dez cães hígdos submetido a diferentes ensaios: Utilização dos neutrófilos isolados e incubados com plasma autólogo (ensaio 1); neutrófilos isolados e incubados com plasma homólogo sadio (ensaio 2) e neutrófilos isolados e incubados com soro homólogo urêmico (ensaio 3).

Amostra	% apoptose sem CAM	% apoptose com CAM
Ensaio 1	36A ^{a*} (37,2 \pm 18,1)	49B ^a (48,6 \pm 18,7)
Ensaio 2	44,5A ^a (39 \pm 19,7)	57,5B ^a (57,4 \pm 22,1)
Ensaio 3	31,5A ^a (32 \pm 12,1)	42B ^a (48,8 \pm 19,6)

* Letras maiúsculas não coincidentes na mesma linha indica diferença significativa ($p < 0,05$).
Letras minúsculas não coincidentes na mesma coluna indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Anexos

Anexo A

ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

O periódico **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** é editado pela Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia/FEPMVZ-Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins relacionadas com a produção animal. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). A lista de especialistas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano. Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista. Os trabalhos para publicação deverão ser encaminhados ao FEP MVZ Editora Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia Caixa Postal 567, 30123-970 - Belo Horizonte, MG Telefone: 0055 21 31 3409 2041 Telefax: 0055 21 31 3409 2042 e-mail: revista@vet.ufmg.br

NORMAS GERAIS

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS: Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em CD-ROM juntamente com uma via impressa em uma só face, espaço entre linhas 1,5, fonte Times New Roman tamanho 12 e 3cm de margens, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua), não excedendo a 15.

TRABALHOS APÓS MODIFICAÇÕES: A versão após as modificações sugeridas deverá ser apresentada em CD-ROM identificado pelo número de registro do trabalho, em editor de texto compatível com o "Word for Windows", sem formatação do texto, juntamente com uma cópia impressa com páginas e linhas numeradas (numeração contínua). Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa. Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT58NBR – 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto. Quando os nomes dos autores forem parte integrante do texto menciona-se a data da publicação citada entre parênteses, logo após o nome do autor, conforme exemplos:

a) autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971) ; (Anuário...,1987-88) ou Anuário... (1987-88) b) dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno(1974) c) mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson

et al. (1979) d) mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente. *Citação de citação* (Adaptação da ABNT-NBR 10520 feita pela FEPMVZ-Editora). Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Entretanto, nem sempre é possível. Nesse caso, pode-se reproduzir informação já citada por outros autores. Pode-se adotar o seguinte procedimento: • **no texto**, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor do

documento consultado; • **na listagem de referência** deve-se incluir a referência completa da fonte citada e outra referência da fonte consultada (citar as 2 referências em separado) não usar o apud como manda a NBR 10520. (Adaptação FEPMVZ89Editora).

Comunicação pessoal (ABNT-NBR 10520). Não fazem parte da lista de referências, sendo colocadas apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão “comunicação pessoal”, a data da comunicação, nome, estado e país da Instituição ao qual o autor é vinculado.

Documento eletrônico (ABNT – NBR 6023). Faz parte da lista de referências bibliográficas onde se deve colocar o endereço eletrônico e a data de acesso.

TIPOS DE TRABALHOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Elementos do corpo do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Elementos do corpo do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes).

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo oito páginas impressas, sem distinção dos elementos do corpo do texto especificados para “Artigo Científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

CARACTERÍSTICAS DOS ELEMENTOS DE UM TRABALHO

TÍTULO. Em português e em inglês e vice-versa. Evitar termos não significativos como estudo, exame, análise etc. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

AUTORES. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

RESUMO e ABSTRACT devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

PALAVRAS-CHAVE e KEYWORDS. No máximo cinco.

INTRODUÇÃO. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS. Técnicas e procedimentos de rotina devem ser apenas referenciados. Não se aceitam subtítulos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Os resultados poderão ser apresentados como um elemento do texto ou juntamente com a discussão, em texto corrido ou mediante ilustrações. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. Comparações, quando pertinentes, devem ser feitas de forma que o leitor chegue às suas próprias conclusões.

Ilustrações são tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) de onde foi extraída. A referência bibliográfica completa relativa à fonte da ilustração deve figurar na lista bibliográfica final. As despesas de impressão de ilustrações coloridas correrão por conta dos autores.

Tabela. O termo refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Serão construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. O termo refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. Os desenhos, gráficos etc. devem ser feitos com tinta preta, bem nítidos. As fotografias, no tamanho de 10 x 15cm, devem ser bem nítidas e de bom contraste, ambos indicando no verso a orientação para impressão, nome do autor e a qual figura se refere. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. Chama-se a atenção para as proporções entre letras, números e dimensões totais da figura: caso haja necessidade de redução, esses elementos também serão reduzidos e podem ficar ilegíveis. Assim, é bom que o tamanho dos desenhos apresentados pelos autores se aproxime do tamanho final impresso. Além de impressas, quando pertinente, devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

CONCLUSÕES. As conclusões podem estar inseridas na discussão. Neste caso este item não é necessário. As conclusões não devem ser repetição dos resultados. Lembrar que nem sempre são necessárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Relacionam-se, em ordem alfabética, as referências bibliográficas, incluindo todas as fontes utilizadas. São adotadas as normas ABNT-NBR-6023 – agosto de 2002, simplificadas conforme exemplos:

PERIÓDICOS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987- 88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5 - 10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

PUBLICAÇÃO AVULSA

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.
 LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97.(Resumo). MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400- 415. NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p. SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000. JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <[http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related Articles/](http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/)>. Acessado em: 5 dec. 1994.

TAXAS DE PUBLICAÇÃO

TAXA DE SUBMISSÃO: O autor, ao submeter o artigo, deverá apresentar um comprovante de depósito no valor de R\$30,00 na conta da FEP-MVZ Editora (Ag. 3610-2; Conta 921482-8; Banco do Brasil) referente à taxa de submissão juntamente com os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

TAXA DE PUBLICAÇÃO: A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

Anexo B

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão, podem ser enviados pelo correio, em uma via impressa, com arquivos em disquete ou CD (de preferência na versão mais recente do Word), ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Embrapa-CNPAB/PSA, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, ou por via eletrônica, através do e-mail pvb@pvb.com.br. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista. NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista. Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação. Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes três últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) O(s) autor(es) deve(m) adotar um “nome de guerra” (não necessariamente o nome de batismo completo), para sua identificação científica:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto, usa Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V., Franklin Riet-Correa Amaral, usa Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F., Claudio Severo Lombardo de Barros, usa Claudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.;

c) o Abstract deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ambos devem ser seguidos de “Index Terms” ou “Termos de Indexação”, respectivamente;

d) o Resumo deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português do trabalho, deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a Introdução deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em Material e Métodos devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, devem constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em Resultados deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

h) na Discussão, os resultados devem ser discutidos diante da literatura.

Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as Conclusões devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a lista de Referências, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores (em caixa alta e baixa), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences) e/ou “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel, com margens de, no mínimo, 2,5cm. A formatação do original a ser submetido para publicação deve seguir o exemplo de apresentação no último fascículo da revista (www.pvb.com.br). O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final. As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Devem ser introduzidos no texto do trabalho, através da ferramenta “Inserir” do Word, pois imagens copiadas e coladas, perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. Abstract e Resumo serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas. c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo do(s) autor(es) e E-mail do autor para correspondência; d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso; e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos,

a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Cit. Fulano 19..)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971); f) a lista das Referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos. 3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais, em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo quando escaneadas pelo autor. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”) coloridos. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações); na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores. Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. 4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e serão apresentadas no final do trabalho. 5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de a em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda