

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESVERATROL NA APOPTOSE E PRODUÇÃO DE  
SUPERÓXIDO EM NEUTRÓFILOS DE CÃES**

**Marinês de Castro**

Médica Veterinária

**2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESVERATROL NA APOPTOSE E PRODUÇÃO DE  
SUPERÓXIDO EM NEUTRÓFILOS DE CÃES**

Marinês de Castro

**Orientadora: Profa. Dr. Maria Rita Pacheco**

**Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Ciarlini**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

**2012**

C355r Castro, Marines de  
Resveratrol na apoptose e produção de superóxido em neutrófilos de cães. / Marines de Castro. -- Jaboticabal, 2012  
vi, 57 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientador: Maria Rita Pacheco  
Banca examinadora: Janaina Fernandes Gonçalves Neto, Marcia Ferreira da Rosa Sobreira, Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, Marcio Mateus Beloti  
Bibliografia

1. Antioxidantes. 2. Cão. 3. Citometria de fluxo. 4. Espécie Reativa de Oxigênio. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.015.11:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** RESVERATROL NA APOPTOSE E PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EM NEUTRÓFILOS DE CÃES

**AUTORA:** MARINES DE CASTRO

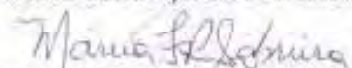
**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA RITA PACHECO


**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. PAULO CESAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. MARIA RITA PACHECO  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. JANAINA FERNANDA GONÇALVES NETO  
Faculdade de Educação São Luís / Jaboticabal/SP

  
Profa. Dra. MARCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA  
Departamento de Patologia Clínica / Unicaslelo / Descalvado/SP

  
Profa. Dra. LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHÃO  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. MARCIO MATEUS BELOTI  
Universidade de São Paulo - USP / Departamento de Ciências Morfológicas / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 05 de dezembro de 2012.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARINES DE CASTRO** - Nascida em Faxinal dos Guedes, SC, aos 24 de maio de 1979. Filha de Zonir Cezário de Castro e Geni dos Santos de Castro. Concluiu os cursos primário e ginásio no colégio Estadual Professor Salustiano Antônio Cabreira em Faxinal dos Guedes e o ensino médio no colégio Estadual Presidente Artur da Costa e Silva em Xanxerê/SC. Gradou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Paranaense, Campus de Umuarama/PR em dezembro de 2001. Especializou-se em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pela Faculdade SPEI em Florianópolis/SC em março de 2003. Obteve o título de mestre em Patologia Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal em março de 2008. Atualmente é Professora titular da disciplina de Patologia Geral e Especial Veterinária e Histologia Veterinária da Faculdade de Itapiranga/SC - FAI-Faculdades.

**Dedico este trabalho aos animais, os seres mais especiais criados por Deus.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e pela força direcionadora nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais Zonir e Geni de Castro pela torcida, pelas orações e pelo amor.

Ao meu irmão Victor pelas palavras de apoio, incentivo e carinho durante momentos difíceis.

À Professora Dra. Maria Rita Pacheco por entender a situação de aluno e profissional, pela educação e humanidade com que trata as pessoas, e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Dr. Paulo Cesar Ciarlini pela dedicação, pelo prazer em transmitir seus conhecimentos, pela compreensão de professor e profissional.

À Professora Dra. Valéria de Lima pelo seu tempo e sua atenção.

Ao Breno de Almeida meu sincero agradecimento por toda a ajuda, opiniões e risadas. Também agradeço a todos do Laboratório Clínico e do Setor de Imunologia da UNESP- Câmpus de Araçatuba que me auxiliaram durante todo o período.

A todos os amigos, colegas, Professores, coordenadores e diretores da FAI/UCEFF – Faculdades pela troca de horários, pelas substituições, pelos conselhos e palavras motivadoras.

Aos amigos: Leandro, Sandra, Ana Sara, Paulo, Adrien, Ludmila. Agradeço por me ouvirem e me aconselharem.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal do Nível superior, CAPES, pela bolsa concedida durante 1 ano, também à FAPESP pela aprovação deste projeto.

À UNESP- Câmpus de Jaboticabal e Araçatuba, a todos seus colaboradores e docentes.

A todos os proprietários que aceitaram incluir seus animais neste experimento.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO I- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO II- RESVERATROL NA APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS EM</b>	
<b>CÃES.....</b>	<b>7</b>
RESUMO.....	7
SUMMARY.....	8
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
III.1 Seleção dos animais.....	13
III.2 Análises laboratoriais.....	14
III.3 Colheita e acondicionamento das amostras.....	14
III.4 Isolamento, purificação e viabilidade dos PMN.....	15
III.5 Delineamento experimental.....	16
III.6 Determinação do índice apoptótico.....	16
III.7 Análise estatística.....	17
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>V. CONCLUSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO III –NÍVEIS DE SUPERÓXIDO EM NEUTRÓFILOS DE</b>	
<b>CÃES.....</b>	<b>29</b>
RESUMO.....	29
SUMMARY.....	30



<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>32</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
III.1 Análises laboratoriais.....	41
III.2 Colheita e acondicionamento das amostras.....	42
III.3 Isolamento, purificação e viabilidade dos PMN.....	42
III.4 Delineamento experimental .....	43
III.5 Determinação da produção de superóxido.....	43
III.6 Análise estatística.....	44
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>V. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\mu\text{mol}$ = Micromol

ALT= Alanina amino transferase

AST= Aspartato amino transferase

ATP= Trifosfato de adenosina

BPI= *bactericidal permeability-increasing protein*

CAM= Camptotecina

COX-2= Cicloxigenase 2

DAG= Diacilglicerol

DCFH-DA= 2'7'diacetato de diclorofluoresceína

EDTA= Acido etilenodiaminatetraacetico

ET-1= Endotelina 1

Fmlp= Formil-metionil- leucil- fenilalanina

$\text{H}_2\text{O}_2$ = Peróxido de hidrogênio

HBSS= *Hanks balanced salt solution*

HE= Hidroetidina

HOCL= Ácido hipocloroso

ID= Intestino delgado

IL= Interleucina

$\text{IP}_3$ =Trifosfato de inositol

LPS= Lipopolissacarídeo

MPO= Mieloperoxidase

NADPH= Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBT= Tetrazólio nitroazul

NF- $\kappa$ B= Fator de transcrição nuclear kappa  $\beta$

OCL<sup>-</sup> = Ânion hipoclorito

O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Radical superóxido

OH<sup>•</sup>= Radical hidroxila

pH= Potencial hidrogeniônico

PKC= Proteína quinase C

PMA= Forbol-12-miristato 13 acetato

PMN= Polimorfonuclear

pO<sub>2</sub>= Pressão de oxigênio

NO = Óxido nítrico

ROS= Espécies reativas de oxigênio

RPMI= Meio de cultura para linfócitos

RV= Resveratrol

SOD= Superóxido dismutase

TNF $\alpha$ = Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TOP 1= Topoisomerase 1

TPA= *12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato*

## RESVERATROL NA APOPTOSE E PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO EM NEUTRÓFILOS DE CÃES

**RESUMO** - A destruição dos micro-organismos ocorre principalmente por mecanismos dependentes de oxigênio e pela liberação de enzimas líticas dos grânulos intracelulares dos neutrófilos. Neutrófilos ativados *in vitro* e *in vivo* geram espécies reativas de oxigênio e sofrem apoptose rapidamente. O resveratrol possui efeitos protetores na aterosclerose, possui potencial anticancerígeno e antiinflamatório podendo também atuar como protetor e regenerador dos antioxidantes primários do organismo. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito protetor de diferentes concentrações de resveratrol na apoptose e produção de superóxido de neutrófilos. Uma suspensão de neutrófilos final de  $1 \times 10^6$  mL de 10 cães adultos hígidos foram aliqüotadas e pré- incubadas com diferentes concentrações finais de resveratrol (0, 30, 60 e 90  $\mu$ mol) durante 4 horas. A taxa de apoptose foi determinada por citometria de fluxo capilar, utilizando-se do sistema Anexina V-PE e a de superóxido por sonda HE. Nos grupos tratados com resveratrol (30, 60 e 90  $\mu$ mol) e estimulados com CAM (camptotecina) não houve diminuição nos índices apoptóticos. Na presença de PMA (forbol-12-miristato 13 acetato) a fluorescência média do brometo foi superior em todos os tratamentos. Nos grupos tratados com RV e estimulados com PMA não houve diminuição na quantidade de superóxido. Conclusões: Nas doses utilizadas o resveratrol não inibiu a apoptose de neutrófilos. A incubação dos neutrófilos com RV não afetou a viabilidade celular. As taxas de produção de superóxido não diferiram entre os tratamentos utilizados  $p > 0,05$ , constatado através de citometria de fluxo

**Palavras-chave:** Antioxidantes, Cão, Citometria de Fluxo, Espécies Reativas de Oxigenio, Explosão respiratória

## RESVERATROL IN APOPTOSIS AND SUPEROXIDE PRODUCTION IN DOG NEUTROPHILS

**ABSTRACT** - The destruction of microorganisms occurs mainly by oxygen-dependent mechanisms involving the generation of reactive oxygen metabolites and also the liberation of lytic enzymes from intracellular granules. Activated neutrophils generate ROS and suffer apoptosis quickly, verified *in-vitro* and *in- vivo*. Resveratrol has protective effects against atherosclerosis, it has anticarcinogenic and anti-inflammatory potential and it may also protect and regenerate body's primary antioxidants. The objective of the present study was to examine the possible protective effect of different concentrations of resveratrol on apoptosis and superoxide production of stimulated neutrophils.

A final neutrophil suspension of  $1 \times 10^6$  of 10 adult healthy dogs was aliquoted and pre-incubated with different final concentrations of resveratrol (0, 30, 60 e 90  $\mu\text{mol}$ ) for 4 hours. Superoxide production rate and apoptosis was determined by capillary flow cytometry used annexin V-PE system and HE probe. In PMA(forbol-12-miristato 13 acetato) presence, bromide average fluorescence was superior in every treatment. In the groups treated with resveratrol and stimulated with PMA there was no reductions in amount of superoxide. In groups treated with resveratrol and stimulated with CAM (camptotecina) there was no decrease in apoptotic index. It was also observed that the concentrations of RV used did not affected cellular viability.

**KEYWORDS:** Antioxidants, Cytometry techniques, Dog, Oxidative burst, Reactive Oxygen Species

## **CAPÍTULO I - Considerações gerais**

### **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

Os neutrófilos participam da resposta inflamatória por meio da quimiotaxia ao tecido inflamado e fagocitose de micro-organismos e outros materiais estranhos, sendo particularmente importantes em quadros infecciosos. Após a fagocitose, os grânulos lisossômicos se fundem aos fagossomos para destruição dos micro-organismos e, em seguida, degradação do material por digestão enzimática. Tal destruição ocorre através da explosão respiratória, envolvendo a geração de potentes antioxidantes e liberação de enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos dos grânulos intracelulares (KERR, 2003; THRALL, 2007). Quando os neutrófilos se ligam à citocinas, como o TNF- $\alpha$ , ou são expostos a outros estímulos inflamatórios, o complexo NADPH-oxidase é formado levando à geração do ânion superóxido, importante espécie reativa de oxigênio – ROS (THRALL, 2007).

Uma grande quantidade de agentes é capaz de estimular o complexo enzimático NADPH oxidase em macrófagos e neutrófilos em sistemas *ex vivo*. Entre as substâncias solúveis incluem-se os peptídeos quimiotáticos, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e os ésteres de forbol como o forbol-12-miristato 13 acetato - PMA (ANDREWS; BABIOR, 1984; BRIGADAO; COLEPICOLO, 1996).

Segundo HOELZL et al., (2005) uma ampla variedade de técnicas *in vitro* tem sido desenvolvidas para a detecção do efeito antioxidante. A produção intracelular de ROS pode ser detectada com a utilização de sondas fluorescentes e posteriormente mensurada por citometria de fluxo, uma técnica rápida e simples. Devido à limitação que outras sondas oferecem, a hidroetidina (HE) tornou-se a de escolha pela sua especificidade (ZIELONKA; KALYANARAMAN, 2010).

O Resveratrol (RV) é um polifenólico que possui confirmadas propriedades antioxidantes, antiplaquetárias, protetoras endoteliais (FRÉMON, 1999), efeitos protetores na doença aterosclerótica (CASTRO et al., 2009) bem como potencial anticancerígeno e anti-inflamatório conhecidos em humanos (UDENIGWE et al., 2008).

Dávalos et al., (2009) observaram que um concentrado de polifenólicos e polifenólicos puros diminuíram a atividade da NADPH-oxidase em neutrófilos humanos *in vitro* de forma dose dependente. Em doses micromolares o RV não apresentou nenhuma toxicidade para linfócitos e a apoptose desencadeada pelo oxidante 2- deoxi D-ribose (dR) nessas células, foi bloqueada em concentrações de 50  $\mu$ M de RV (LOSA, 2003). Também o RV não alterou a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 observado através das concentrações de ATP obtida por luminometria (CIZ et al., 2008).

A ingestão regular de RV, contido no suco de uva, em pacientes hemodialisados reduziu a atividade da NADPH-oxidase melhor do que o efeito observado pela vitamina E (CASTILHA et al., 2008).

Cadenas et al., (1999) e Hattori et al., (2002) afirmaram que embora *in vivo* o RV funcione como um potente antioxidante, *in vitro* atua como um pobre varredor de ROS, necessitando ser utilizado em concentrações maiores. A propriedade antioxidante *in vivo* do RV provavelmente é resultante da sua capacidade para aumentar a síntese de NO, que funciona como um antioxidante, eliminando os radicais de superóxido. Colaborando com esta hipótese, nas lesões de isquemia por reperfusão em cérebro, coração ou rins, o resveratrol induziu a síntese de NO, assim reduzindo o estresse oxidativo. Já Huisman et al., (2004) verificaram que nem a produção de superóxido nem a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais foram afetadas com a utilização de quatro tipos de polifenólicos (catequina, epicatequina, ácido gálico e quercetina) em doses de 5  $\mu$ m/L; e etanol 0,05%. Segundo os autores, esses polifenólicos somente exercem um efeito varredor de ROS significativo em altas doses. Em concentrações, nanomolares, conforme encontradas *in vivo*, o papel exercido pelos mecanismos endógenos removedores de superóxido são comparativamente mais importantes.

ROS produzidos durante a “explosão respiratória”, quando liberadas no citosol dos neutrófilos, alteram o estado redox e oxidam componentes celulares, alterando sua função (FIALKOW et al., 2007). Os neutrófilos ativados geram ROS e sofrem apoptose rapidamente *in vitro* segundo Barbosa et al., (2009) e Trinconi et al., (2011). A apoptose é um processo programado de morte celular, ativo, com controle intrínseco, influenciado por fatores externos (BONINI et al., 2000). Controla o

turnover celular, promovendo assim um mecanismo fisiológico de eliminação de células isoladas sem causar dano tecidual (SAVILL et al., 1993).

Observações de Narayanan et al., (1997) indicaram que o início da apoptose neutrofílica é em parte mediada pelo estresse oxidativo, resultado da diminuição de sistemas de defesa antioxidantes celulares como a superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase. A SOD sofre modificações e é inativada quando exposta à radicais OH•.

Em relação à espécie canina não há relatos de estudos sobre o efeito antioxidante do RV sobre o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos. Considerando as evidências de que a apoptose celular é dependente tanto da concentração de RV como de ROS, no presente estudo foi avaliada *in vitro* a capacidade de diferentes concentrações de RV inibir a produção de superóxido e a apoptose dos neutrófilos isolados do sangue periférico de cães saudáveis, expostos ao indutor de apoptose CAM e do estimulador da geração de superóxido PMA. Os objetivos desse estudo visaram testar a hipótese de que *in vitro* o RV é capaz inibir, de forma dose dependente, a produção de superóxido e a apoptose dos neutrófilos isolados do sangue periférico de cães saudáveis.

Os resultados obtidos indicam que o RV não altera *in vitro* a viabilidade dos neutrófilos de cães e que diferentemente de estudos realizados com outros tipos celulares e espécies, o efeito antioxidante e anti-apoptótico desse polifenol não foi evidenciado.

## 2. REFERÊNCIAS:

ANDREWS, P. C.; BABIOR, B. N. Phosphorilation of cytosolic proteins by resting and activated human neutrophils. **Blood**, V. 64, n. 4, p. 883-890, 1984.

BARBOSA, T. S. **Efeito do soro urêmico de cães com insuficiência renal sobre o metabolismo oxidativo e apoptose de polimorfonucleares**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.



BARTOLOMÉ, B.; LASUNCIÓN, M.A. Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. **British Journal of Nutrition**, v.102, p. 1125–1135, 2009.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 70-77, 2000.

BRIGADAO, M. R. P. L.; COLEPICOLO, P. Oscillations in superoxide anion released by polymorphonuclear leucocytes and its inhibition by human saliva. **Biological Rhythm Research**. V. 27, n. 3, p. 269-280, 1996.

CADENAS, S.; BARJA, G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen  $\text{KBrO}_3$ . **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 11-12, p. 1531-1537, 1999.

CASTILHA, P.; DÁVALOS, A.; TERUEL, J. L.; CERRATO, F.; FERNÁNDEZ-LUCAS, M.; MERINO, J. L.; SÁNCHEZ-MARTIN, C. C.; ORTUÑO, J.; LASUNCIÓN, M. A. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 87, n. 4, p. 1053-1061, 2008.

CASTRO, M.; VEIGA, A. P. M.; PACHECO, M. R. Plasma lipid profile of experimentally induced hyperlipidemic New Zealand white rabbits is not affected by resveratrol. **The Journal of Applied Research**, Apopka, v. 9, n. 1, p. 18-22, 2009.

CIZ, M.; PAVELKOVÁ, M.; GALLOVÁ, M.; KRÁLOVÁ, J.; KUBALA, L.; LOJEK, A. The Influence of Wine Polyphenols on Reactive Oxygen and Nitrogen Species Production by Murine Macrophages RAW 264.7 **Physiological Research**, v.57, p. 393-402, 2008

DÁVALOS, A.; la PENÑA, G.; SÁNCHEZ-MARTÍN, C.C.; TERESA GUERRA, M

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 153-164, 2007.

FREMÓN, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 6, p. 2511-2521, 1999.

HATTORI, R.; OTNAI, H.; MAULIK, N.; DAS, D. K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 282, n. 6, p. 1988-1995, 2002.

HOELZL, C.; BICHLER, J.; FERK.; SIMIC, T.; NERSESYAN, A.; ELBLING, L.; EHRLICH, V.; CHAKRABORTY, A.; KNASMÜLLER, S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. **Journal of physiology and pharmacology**. V. 56, n. 2, p. 49-64, 2005.

HUISMAN, A.; van de WIEL, A.; RABELINK, T. J.; van FAASSEN, E.E. Wine polyphenols and ethanol do not significantly scavenge superoxide not affect endothelial nitric oxide production. **Journal of Nutritional Biochemistry**. V. 15, p.426–432, 2004.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária, Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2 ed. Roca: São Paulo, 2003, 436 p.

LOSA, G.A. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, p. 818-823, 2003

NARAYANAN, P. K.; RAGHEB, K.; LAWLER, G.; ROBINSON, J.P. Defects in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis. **Journal of leukocyte biology**. V. 61, p.481-488, 1997.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

TRINCONI, S. C.; BARBOSA, T. S.; CIARLINI, P. C. Efeito do plasma rico em glicose sobre a apoptose dos neutrófilos de cães. **Veterinaria e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 432-440, 2011.

UDENIGWE, C. C.; RAMPRASATH, V.R.; ALUKO, R.E.; JONES, P. J.H. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 8, p. 445-454, 2008.

ZIELONKA , J. KALYANARAMAN, B. Hydroethidine and MitoSox-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 983-1001, 2010

## CAPÍTULO II - Efeito do resveratrol na apoptose de neutrófilos em cães

M. CASTRO\*, P. C.; CIARLINI<sup>1</sup>; M. R. PACHECO<sup>2</sup>; B. F. ALMEIDA<sup>3</sup>

**RESUMO:** Os neutrófilos desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra a invasão de micro-organismos. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas por neutrófilos durante a “explosão respiratória”, alterando o estado redox e oxidando componentes desta célula. Neutrófilos ativados geram ROS e sofrem apoptose rapidamente *in vitro*. Aumento na apoptose neutrofílica é observado em pacientes com insuficiência renal crônica, insuficiência hepática, diabetes, doenças auto-imunes em traumas entre outras enfermidades. O resveratrol possui efeitos protetores na aterosclerose, possui potencial anticancerígeno e anti-inflamatório podendo também atuar como protetor e regenerador dos antioxidantes primários do organismo. O objetivo do presente estudo foi verificar o possível efeito protetor de diferentes concentrações de resveratrol na apoptose de neutrófilos estimulados com camptotecina. Para isso utilizou-se uma suspensão de neutrófilos final de  $1 \times 10^6$  mL de 10 cães adultos hígidos que foram aliqüotadas e pré-incubadas com diferentes concentrações finais de resveratrol (0, 30, 60 e 90  $\mu\text{mol}$ ) durante 4 horas. A taxa de apoptose foi determinada por citometria de fluxo capilar, utilizando-se do sistema Anexina V-PE. Os resultados evidenciaram que na presença de CAM (camptotecina) os índices apoptóticos foram superiores em todos os tratamentos comprovando o efeito indutor de apoptose por esta droga sobre neutrófilos de cães. Nos grupos tratados com resveratrol (30, 60 e 90  $\mu\text{mol}$ ) e estimulados com CAM não houve diminuição nos índices apoptóticos. Também não foi observada diferença estatística entre a porcentagem de células viáveis, de células em apoptose final e a apoptose total. O resveratrol nas doses utilizadas não inibiu a apoptose de neutrófilos, constatado através de citometria de fluxo.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, Camptotecina, Cão, Polifenólico, Polimorfonucleares.

---

\* UNESP - FCAV Câmpus de Jaboticabal. Autor para correspondência: Rua Carlos Kummer 100, Bairro Universitário, 89896-000, Itapiranga- SC. E-mail: castrocati@yahoo.com.br

<sup>1</sup> UNESP - Câmpus de Araçatuba.

<sup>2</sup> UNESP - FCAV Câmpus de Jaboticabal

<sup>3</sup> UNESP - Câmpus de Araçatuba.

**SUMMARY:** Neutrophils play an important role in host defense against the invasion of microorganisms. Reactive Oxygen Species (ROS) are produced by neutrophils during “respiratory burst”, changing the redox state and causing oxidation of the cell components. Activated neutrophils generate ROS and suffer apoptosis quickly, verified *in-vitro*. Neutrophilic apoptosis imbalance can be observed in patients with chronic renal failure and some other illnesses. Resveratrol has protective effects against atherosclerosis, it has anticarcinogenic and anti inflammatory potential. This substance may also protect and regenerate body’s primary antioxidants. The objective of the present study was to examine the possible protective effect of different concentrations of resveratrol on apoptosis of neutrophils stimulated with camptothecin. Materials and methods:  $1 \times 10^6$  final suspensions of neutrophils of 10 healthy adult dogs were aliquoted and preincubated with different final concentrations of resveratrol (0, 30, 60 and 90  $\mu\text{mol}$ ) for 4 hours. The apoptosis rate was determined by capillary flow cytometry using Annexin V-PE. Results: In presence of CAM (camptotecina) the apoptotic index were superior in all of the treatments confirming the apoptosis inducing effect of this drug on neutrophils of dogs. In groups treated with resveratrol (30, 60 and 90  $\mu\text{M}$ ) and stimulated with CAM there was no decrease in apoptotic index. We haven’t observed statistical difference between the percentage of viable cells, cells in late apoptosis and complete apoptosis either. Resveratrol, in the doses that were used, did not inhibit the apoptosis of neutrophils, it was detected by flow cytometry.

**Keywords:** Antioxidants. Camptothecin. Dog. Polymorphonuclear. Polyphenolic.

## I. INTRODUÇÃO

Os neutrófilos desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra a invasão de micro-organismos. A explosão respiratória gera espécies reativas de oxigênio (ROS) através de um complexo enzimático ligado à membrana, o NADPH-oxidase, é um evento metabólico essencial para destruição e engolfamento de agentes estranhos (SMITH, 1994). ROS produzidos durante a explosão respiratória, quando liberadas no citosol dos neutrófilos, alteram o estado redox e oxidam componentes celulares, alterando sua função (FIALKOW et al., 2007). O superóxido é um oxidante com fraco poder bactericida, porém, é capaz de inibir a apoptose em baixas concentrações. O peróxido de hidrogênio derivado do superóxido possui maior poder bactericida e é um forte indutor de apoptose. Neutrófilos ativados geram ROS e sofrem apoptose rapidamente *in vitro* (BARBOSA et al., 2009; TRINCONI et al., 2011).

A morte celular programada denominada de apoptose é importante para a rápida resolução das inflamações e evita danos teciduais indesejáveis causados pela ativação prolongada dos neutrófilos. ROS gerados pela ativação neutrofílica, assim como o fator de necrose tumoral e a radiação ultravioleta, induzem a apoptose em vários tipos celulares (LENNON et al., 1991; BUTTKE; SANDSTROM, 1994; THOMPSON, 1995).

O RV possui efeito de hormese, ou seja: resposta dependendo da dose/concentração em vários testes biológicos. Segundo Calabrese et al. (2010) em células do sistema imune baixas doses de RV (0-10  $\mu\text{mol}$ ) aumentam a resposta imune de muitas linhagens celulares, desta forma mediando um amplo efeito protetor associado ao seu consumo. Já em altas doses suprime a resposta contribuindo para exacerbar muitas doenças. Descrito ainda pelos mesmos autores na Leishmaniose em humanos, baixas doses de RV aumenta a viabilidade do parasito *L. major*. Já altas doses, suprime a atividade do parasito, podendo ser útil na prevenção da doença. Dessa forma, torna-se necessário maior esclarecimento das implicações terapêuticas dos efeitos dose/resposta para um tratamento de sucesso. Stocco et al. (2012) verificaram que RV em altas doses induziu a morte de células humanas ECV304 de carcinoma de bexiga, entretanto baixas doses induziu proteção. A modulação da proteína Bcl-2 pelo RV parece ter mediado este efeito.

O objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que a apoptose de neutrófilos de cães saudáveis induzida *in vitro* pela camptotecina pode ser inibida pelo RV em diferentes concentrações.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

O resveratrol (3, 4, 5 trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina de ocorrência natural na uva, sintetizado na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora vitícola*), dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol e cis-resveratrol (SAUTTER et al., 2005). O RV possui confirmados efeitos protetores na doença aterosclerótica (CASTRO et al., 2009), potencial anticancerígeno e anti-inflamatórios (UDENIGWE et al., 2008). Os fenóis podem agir como antioxidantes ativos, doando hidrogênio aos radicais livres, e como preventivo, impedindo a peroxidação de lipídios e inibindo enzimas oxidativas (fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipoxigenase). Além disso, os fenóis podem atuar como protetores e regeneradores dos antioxidantes primários do organismo como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o  $\beta$  - caroteno (vitamina A) (FUHRMAN; AVIRAM, 2001).

A apoptose caracteriza-se por um série ordenada de eventos intracelulares desempenhados por uma variedade de estímulos extracelulares e intracelulares. Como estímulos intracelulares incluem-se a radiação ultravioleta, toxinas, ROS, ausência de fatores de crescimento, citocinas e hormônios; e, dentre os estímulos intracelulares inclui-se: glicocorticóides, calor, radiação, hipóxia e infecções virais. A fase de execução dá-se através da ação das caspases, principalmente a caspase 8 e 9 que degradam proteínas do citoesqueleto, fragmentam o DNA e cromatina e finalmente formam corpúsculos apoptóticos expressando ligantes para células fagocíticas. Essas caspases também podem ligar-se à mitocôndria resultando na liberação de fatores amplificadores da morte localizadas no espaço intermembranas mitocondrial. Assim, um meio intracelular facilitador para a ativação das caspases, torna-se importante para a apoptose celular (COTRAN et al., 2000).

Clement et al. (1998) e Ahmad et al. (2003) relataram que o RV exerce seu efeito antioxidante por inibir a apoptose estimulada por peróxido de hidrogênio. Quando células leucêmicas humanas foram expostas à baixas doses de RV (4-8 $\mu$ M) houve inibição da apoptose por aumento discreto na produção de O<sub>2</sub> intracelular, criando um meio pró-oxidante não permissivo a ativação de caspases (3 e 9)

Kasahara et al. (1997) utilizando neutrófilos normais e neutrófilos de pacientes com doença granulomatosa crônica, determinaram que a apoptose de neutrófilos *in vitro* é mediada por produtos oxidativos endógenos, pois ao reduzirem os níveis intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a apoptose foi reduzida em neutrófilos normais. Sugeriram assim, que a apoptose é mediada por esses metabólitos oxidativos mediados pelo receptor CD95 via Fas. Apesar dessa conclusão, para Clement e Stamenkovic (1996) e Yoshihito et al. (1997) o papel funcional dos ROS na apoptose via Fas é controverso e não totalmente compreendido. Os locais intracelulares e quantidade de ROS produzidos podem influenciar os resultados experimentais, porque NADPH oxidase produz grande quantidade de ROS em ambas, membrana plasmática e membrana do fagossomo dos fagócitos, enquanto que em outras células a produção ocorre através da respiração celular na mitocôndria.

Plow et al. (2000) observaram que o RV liga-se a integrina  $\alpha_v \beta_3$  levando a ativação da proteína quinase 1 e 2 reguladora de sinal extracelular (MAPK-ERK1/2) e apoptose mediada pelo p53 numa ampla variedade de tumores. A MAPK-ERK1/2 são componentes normais do processo de transdução de sinais celulares. A integrina  $\alpha_v \beta_3$  é uma proteína estrutural da membrana essencial para a interação de células cancerosas e células dos vasos sanguíneos com proteínas específicas de matriz extracelular. Resveratrol ativa o MAPK em baixas concentrações (1 pM-10 $\mu$ M) já em doses de (50-100  $\mu$ M) pode inibir essa quinase em células cancerosas.

Zhang et al. (2004) confirmou a hipótese de que a cicloxigenase-2 (COX-2) desempenha um importante papel como agente pró-apoptótico e que o RV induz um acúmulo nuclear de COX-2 através de um mecanismo dependente da fosforilação de Ser-15 do gene p53 em células cancerosas. O acúmulo nuclear de COX-2 induzida pelo RV está associado com a ativação de ERK1/2 no núcleo de células



cancerosas, importante para a ativação do gene p53 e consequente apoptose (LIN et al., 2008).

Para Cavallaro et al. (2003) a maior diminuição de HOCL sugere que o efeito do RV é maior sobre a enzima mieloperoxidase (MPO) uma vez que os níveis de superóxido foram pouco afetados.

Em neutrófilos de equinos, a atividade da MPO foi inibida pelas doses de  $10^{-5}$  M e  $10^{-4}$  M de RV, enquanto a dose de  $10^{-6}$  M não promoveu inibição. A atividade enzimática ocorreu pela interação do RV com a MPO, alterando sua configuração ou bloqueando seu local de ativação. Através de teste de ELISA especularam que a atividade do RV foi extracelular, já que não houve impedimento da degranulação de neutrófilos no plasma (KOHLEN et al., 2007). Uma diminuição no infiltrado inflamatório com a utilização do RV foi observada num modelo de colite induzida (MARTÍN et al., 2006). Os autores associaram o resultado ao efeito do RV na diminuição da atividade da enzima MPO. Para Cavallaro et al. (2003) e Leonard et al. (2003) o potencial removedor de ROS pelo RV foi também intracelular pela remoção do superóxido e de radicais hidroxila.

Cao e Li (2004) afirmaram que o pré-tratamento com 100  $\mu$ M de RV durante 2 horas não protegeu células cardíacas H9C2 de ratos da toxicidade causada pela produção de ânion superóxido pelo sistema xantina-oxidase, já um tempo maior de incubação (> 48 horas) aumentou a atividade dos sistemas antioxidantes celulares, superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Em linfócitos e monócitos humanos o RV promoveu o aumento de várias enzimas antioxidantes, incluindo glutatona, glutatona peroxidase, glutatona-S-transferase e glutatona-redutase (YEN, 2003).

Para estudo da apoptose neutrofílica *in vitro* verifica-se na literatura algumas substâncias indutoras: CAM (REYES -VALDÉS et al., 2009) TNF $\alpha$  (KETTRITZ et al., 1996) e peróxido de hidrogênio (AHMAD et al., 2003).

A CAM é um alcaloide quinolínicu inibidor da topoisomerase I por estabilizar o complexo topoisomerase-DNA. A TOP I corta o DNA por ataque a pontos de unidade tirosínica, na ligação fosfodiéster do DNA, assim, o mantém íntegro e reparando-o quando danificado (WHITACRE et al., 1997). Qualquer alteração no balanço entre estas enzimas é suficiente para induzir a apoptose (BASSI; PALITTI,

2000). A citotoxicidade da CAM é atribuída à interrupção da replicação pela estabilização do complexo DNA TOP I por covalência, resultando no rompimento da dupla fita e conseqüentemente impedindo a síntese de RNA (HERBEN et al., 1998; NELSON; COX, 2011). Legarza e Yang (2006) afirmaram que em células de câncer de cólon humano, a CAM induz a apoptose celular por aumentar a produção de fatores pró-apoptóticos como o p53, Bax, Bcl-xl e p-21.

A utilização da CAM como indutor da apoptose também foi anteriormente descrita em estudos realizados com células de linfoma histiocítico humano (HL-60) (SHELLHAAS; ZUCKERMAN, 1995) duas linhagens de células leucêmicas humanas (HIRAOKA et al. 1998), em células tumorais pulmonares em humanos (JAMES et al., 2012) e em neutrófilos (REYES -VALDÉS et al., 2009).

Conforme Shellhaas e Zuckerman (1995) e Hiraoka et al. (1998) a CAM promoveu apoptose dose-dependente mais evidente após 48 horas. As técnicas utilizadas para avaliar a apoptose eficazmente segundo os autores foram a citometria de fluxo multiparamétrica, microscopia confocal a laser, fragmentação de DNA por gel de agarose e ELISA.

O RV é um polifenólico de ocorrência natural na uva com importantes efeitos biológicos (LIN et al., 2011). Produtos naturais com potencial curativo e ou preventivo são alvo de interesse na medicina humana e veterinária atualmente. Através de estudos prévios foi possível comprovar o efeito anti-inflamatório do RV na aterosclerose (CASTRO et al., 2009). Aqui pretende-se testar de forma inédita o efeito do RV na apoptose de neutrófilos de cães num sistema *in vitro*.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **III. 1 Seleção dos animais**

Para este estudo, 10 cães adultos com peso variando de 7 a 20 Kg, de várias raças, machos ou fêmeas, foram submetidos a exame físico geral segundo Feitosa (2008) e a laboratoriais como hemograma, quantificação sérica de ácido úrico, albumina, colesterol, triglicérido, creatinina, glicose, ureia, proteína total, aspartato amino transferase (AST) e alanino amino transferase (ALT) para a comprovação de

sua higidez. 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.

### III. 2 Análises laboratoriais

Os valores do hemograma foram obtidos utilizando-se contador eletrônico<sup>4</sup> de células sanguíneas previamente calibrado conforme recomendações do fabricante. A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida pela análise microscópica de esfregaços corados com Panótico Rápido<sup>5</sup>. A determinação do volume globular foi realizado pelo método do micro-hematócrito (THRALL et al., 2007). Todas as análises bioquímicas foram realizadas em um analisador bioquímico automatizado<sup>6</sup>, previamente ajustado com calibrador comercial e controles nível I e II<sup>7</sup>. Utilizando-se reagentes comerciais e temperatura de 37°C, a concentração plasmática de ureia foi determinada pelo método enzimático UV<sup>8</sup> (urease/glutamato desidrogenase); a creatinina pelo método cinético<sup>9</sup> (picrato alcalino); albumina pelo método de verde de bromocresol<sup>10</sup>; colesterol pelo método enzimático<sup>11</sup> (oxidase/peroxidase); glicose pelo método enzimático<sup>12</sup> (glicose oxidase/peroxidase); os triglicérides pelo método enzimático-colorimétrico<sup>13</sup> e AST<sup>14</sup> e ALT<sup>15</sup> pelo método cinético (UV).

### III.3 Colheita e acondicionamento das amostras

Utilizando-se seringas e agulhas hipodérmicas descartáveis 25 x 0,8 mm, colheu-se 10 mL de sangue total da veia jugular, desses, 8 mL foram acondicionados em tubos heparinizados para a avaliação do índice apoptótico. Para a realização do hemograma, parte do sangue total foi acondicionado em tubos com

<sup>4</sup> Contador eletrônico hematológico veterinário, Mod. CC-530, CELM, São Paulo-SP

<sup>5</sup> Panótico rápido LB – Laborclin, Pinhais-PR

<sup>6</sup> Analisador automático BTS, mod. 370 plus, BioSystems, Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Calibrador serum, Cód.18011, BioSystems, Barcelona,Spain.

<sup>8</sup> Urea/BUN-UV, Cod. 11516, BioSystems, Barcelona,Spain

<sup>9</sup> Creatinine, Cod.11502, BioSystem, Barcelona,Spain

<sup>10</sup> Albumine, Cod.11574, BioSystems, Barcelona,Spain

<sup>11</sup> Cholesterol, Cód.11505, BioSystems, Barcelona,Spain

<sup>12</sup> Glucosa, Cod.11503, BioSystems, Barcelona,Spain

<sup>13</sup> Triglicérides PP, Cod. 459, GoldAnalisa, Minas Gerais, Brasil

<sup>14</sup> AST, Cod. 442665, Beckman Coulter do Brasil Com e Imp de Prod de Lab Ltda, São Paulo, Brasil

<sup>15</sup> ALT, Cod. 442620, Beckman Coulter do Brasil Com e Imp de Prod de Lab Ltda, São Paulo, Brasil

K2- EDTA e outra parte para obtenção de soro, foi acondicionada em tubos sem anticoagulante. Parte do soro obtido foi utilizado para os testes bioquímicos, as amostras sanguíneas foram processadas imediatamente após a colheita.

### III.4 Isolamento, purificação e viabilidade dos Polimorfonucleares

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. Quatro mililitros de sangue total heparinizado (100 UI/mL) foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno estéreis contendo partes iguais de Histopaque 1119<sup>16</sup> e 1077<sup>17</sup>, totalizando 6 mL de duplo gradiente de separação. Após centrifugação a 2000 rotação por minuto (rpm) por 30 minutos, a camada de PMN foi aspirada com ponteiros siliconizados, lavada duas vezes com tampão de lise (cloreto de amônia 0,8%) e uma vez com HBSS<sup>18</sup>. Após o descarte do sobrenadante, as células foram diluídas em meio RPMI para obter a concentração de PMN final de  $1 \times 10^6$  mL, com pureza e viabilidade mínima de 95%. Esta concentração foi obtida através do seguinte cálculo:

$N \times 2 \times 10$ , sendo:

$N$  = nº de células contadas em um quadrante de leucócitos

$2$  = fator devido à diluição inicial com o azul de tripan

$10$  = fator da área contada (1 quadrante de leucócitos na câmara de Neubauer)

Este resultado deve ser dividido por 1000, assim obtêm-se a concentração de neutrófilos ( $\times 10^6$ /ml).

Posteriormente realiza-se uma regra de três simples para descobrir o volume necessário de neutrófilos para obter-se a concentração desejada.

[PMN] -----1000  $\mu$ L (volume desejado – 1 ml)

$1,0 \times 10^6$  -----x  $\mu$ L

Conforme recomendações de Metcalf et al., (1986), o grau de viabilidade dos PMN

<sup>16</sup> Histopaque®-1119, Cod. 1119-1, Sigma, St. Louis, USA.

<sup>17</sup> Histopaque®-1077, Cod. 1077-1, Sigma, St. Louis, USA.

<sup>18</sup> Hanks balanced salt solution (HBSS) modified, Cod. H 9394, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

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<sup>19</sup> e coradas.

### III.5 Delineamento experimental

Uma suspensão de neutrófilos final de  $1 \times 10^6$  mL foi alíquotada e pré-incubada com diferentes concentrações finais de RV (0, 30, 60 e 90  $\mu$ mol) durante quatro horas a 37° sendo mantidas em banho maria e agitadas por um minuto (600 rpm) a cada 15 minutos em um agitador térmico computadorizado. O controle (RV 0) foi submetido às mesmas condições das outras amostras.

Todos os ensaios foram realizados simultaneamente e imediatamente após o isolamento.

### III.6 Determinação do índice apoptótico

A taxa de apoptose foi determinada por citometria de fluxo capilar, utilizando-se do sistema Anexina V-PE. Previamente 100  $\mu$ L de uma suspensão de neutrófilos final de  $1 \times 10^6$  foram alíquotadas e pré- incubadas com diferentes concentrações finais de RV (0, 30, 60 e 90  $\mu$ mol) durante uma hora. A avaliação da apoptose de cada concentração de RV foi realizada em duas provas. Como controle positivo, as alíquotas de 100  $\mu$ L de uma suspensão de neutrófilos ( $1 \times 10^6$  mL) foram acrescidas 100  $\mu$ L do indutor camptotecina (19,800  $\mu$ mol/L), enquanto na amostra a ser avaliada foi acrescida o mesmo volume de RPMI. Posteriormente as amostras foram incubadas durante três horas a 37° C, sendo agitadas por um minuto (600 rpm) a cada 15 minutos em um agitador térmico computadorizado. Em seguida foi transferido 100  $\mu$ L da solução para um eppendorf estéril e acrescentado 100 $\mu$ L de Anexina-PE incubando durante 20 minutos em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Utilizando-se citômetro de fluxo capilar Guava EasyCyte Mini<sup>20</sup>, foi realizada aquisição de 10.000 eventos. Os dados adquiridos foram analisados em programa

<sup>19</sup> Centrifuga Citológica Microprocessada REVAN, Mod. 2000D, Cientec, SP

<sup>20</sup> Citômetro - Guava EasyCyte Mini<sup>®</sup>, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.

computacional específico,<sup>21</sup> sendo que após a compensação do citômetro, foi possível quantificar quatro populações celulares: células não apoptóticas; apoptose total, inicial, apoptose final ou necrose. Todas as análises foram feitas em duplicata.

### III.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se Anova seguida pelo teste LSD (teste de variância mínima significativa) e os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade da célula em manter uma concentração não tóxica de ROS através do seu sistema antioxidante é crucial para a sobrevivência da mesma. Um grande acúmulo de ROS intracelular pode criar um ambiente oxidativo o qual promove a morte da célula por necrose ou apoptose. Por outro lado, um ligeiro aumento de ROS é um estímulo para proliferação celular (COTRAN et al., 2000; AHMAND et al, 2003).

As diferentes atividades do RV são atribuídas à suas propriedades antioxidantes, com ação intra ou extracelular no metabolismo neutrofílico, o que contribui para controlar o equilíbrio redox inibindo a formação de ROS (KASAHARA et al., 1997; YEN, 2003; CAVALLARO et al., 2003)

Dependendo do tipo de concentração utilizada, o RV tem mostrado promoção ou inibição da proliferação celular e apoptose (CLEMENT et al., 1998; AHMAND et al., 2003). O acúmulo nuclear de COX-2 induzido pelo RV está associado a ativação do gene p53 em células cancerosas segundo Zhang et al. (2004)

O índice apoptótico dos neutrófilos sem CAM e resveratrol e o com CAM e RV em diferentes concentrações incubados durante um período de 4 horas são

---

<sup>21</sup> Software - Guava Express, CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software. Personal Cell Analysis, v.4.1, 2006. Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.

mostrados na Tabela 1. Na presença do CAM, os índices apoptóticos foram superiores em todos os tratamentos, comprovando o efeito indutor de apoptose por esta droga sobre neutrófilos de cães, conforme descrito recentemente por Barbosa (2009).

TABELA 1. Valores médios, análise de variância e erro padrão do índice apoptótico obtido pelo sistema Anexina V-PE, utilizando citometria de fluxo capilar, de neutrófilos de dez cães saudáveis incubados com resveratrol com e sem o uso de (CAM) como indutor de apoptose. Araçatuba (SP), 2012.

Concentração Resveratrol ( $\mu\text{M}$ )	Índice apoptótico %	
	Com CAM	Sem CAM
0	27.48 <sup>b</sup>	0.43 <sup>a</sup>
30	29.73 <sup>b</sup>	0.99 <sup>a</sup>
60	28.05 <sup>b</sup>	0.62 <sup>a</sup>
90	27.42 <sup>b</sup>	0.38 <sup>a</sup>
Valor de p	0.93	0.74
Média	28.17	0.60
EP	2.43	0.17

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste t.

A habilidade da citometria de fluxo em determinar a apoptose num grande número de células e de forma simultânea, avaliando também subpopulações dentro de um grande número de células, é um dos grandes benefícios desta técnica em comparação com outras, como morfologia e eletroforese em gel (Van EEDEN et al., 1999). Neste experimento o estímulo utilizado para a apoptose foi a CAM (19,800  $\mu\text{mol/L}$ ), com tempo de incubação de 4 horas, utilizando um único momento de leitura através de citometria de fluxo. Observou-se apoptose e ausência de efeito protetor pelo RV nas diferentes concentrações utilizadas respectivamente (27,48; 29,73; 28,05 e 27,42 %). Segundo Legarza (2006) a CAM induz apoptose em células de câncer de cólon humano por aumentar a produção de fatores pró-apoptóticos, dentre eles o p53. Se o RV consegue ativar o gene p53 conforme Zhang et al.

(2004) afirmaram, o RV neste experimento atuaria como agente pró-apoptótico, o que não foi visto quando analisou-se os resultados.

A mensuração da apoptose dos neutrófilos por citometria de fluxo, utilizando-se o sistema anexina V-PE, permite uma melhor avaliação dos efeitos obtidos pelas diferentes concentrações de RV, quantificando e diferenciando simultaneamente a porcentagem de células viáveis, de células em apoptose inicial, final e apoptose total, Tabela 2.

TABELA 2. Valores médios, análise de variância e erro padrão da porcentagem de neutrófilos viáveis, em apoptose inicial (AI), final (AF) e total (AT), obtidos pelo sistema Anexina V-PE, utilizando citometria de fluxo capilar, de neutrófilos de dez cães sadios incubados com resveratrol com e sem o uso de (CAM) como indutor de apoptose. Araçatuba (SP), 2012.

Resveratrol ( $\mu\text{M}$ )	% neutrófilos							
	Com CAM				Sem CAM			
	AI	AF	AT	Viáveis	AI	AF	AT	Viáveis
0	38.79 <sup>b</sup>	19.54 <sup>b</sup>	27.48 <sup>a</sup>	8.28 <sup>b</sup>	79.77 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>	0.43 <sup>b</sup>	98.0 <sup>a</sup>
30	38.12 <sup>b</sup>	14.92 <sup>b</sup>	29.73 <sup>a</sup>	8.19 <sup>b</sup>	80.69 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0.99 <sup>b</sup>	98.6 <sup>a</sup>
60	42.77 <sup>b</sup>	14.70 <sup>b</sup>	28.05 <sup>a</sup>	8.27 <sup>b</sup>	80.31 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>	0.62 <sup>b</sup>	98.4 <sup>a</sup>
90	40.03 <sup>b</sup>	17.62 <sup>b</sup>	27.42 <sup>a</sup>	8.27 <sup>b</sup>	81.14 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>	98.8 <sup>a</sup>
Valor de p	0.92	0.74	0.93	0.95	0.93	0.96	0.74	0.70
Média	40.75	16.70	28.17	68.94	80.47	0.40	0.60	97.05
Erro padrão	5.78	1.99	2.43	2.15	5.30	0.09	0.17	0.58

AI- Apoptose Inicial; AF: Apoptose Final; AT: Apoptose Total (valores médios). Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste t.

Através dos resultados da presente pesquisa apesar do RV não atuar como agente anti-apoptótico também não afetou a viabilidade celular, a qual permaneceu normal para todas as concentrações utilizadas. Encontram-se na literatura relatos sobre a atividade do RV na apoptose, principalmente em linhagens de células cancerígenas. Stocco et al. (2012) verificaram que em células humanas ECV304 tratadas com altas doses de RV ( $>20 \mu\text{M}$ ) houve aumento na relação Bad/Bcl-2 (proteína proapoptótica/antiapoptótica) Também em células endoteliais e em células de câncer de colo uterino altas doses de RV (10-100  $\mu\text{g/mL}$ ) induzem apoptose e



diminuem a atividade mitótica, enquanto doses de (0,1-1,0 µg/mL) aumentam a proliferação celular (SZENDE et al., 2000).

Células ECV304 de carcinoma de bexiga mantidas em condições de estresse oxidativo induzidas pelo peróxido de hidrogênio e pré-tratadas com RV em baixas doses (2,5 µM) mostraram melhor permeabilidade celular e menor perda de DNA (STOCCO et al., 2012). Assim, pensou-se que as diferentes concentrações utilizadas neste experimento, pudessem mostrar algum resultado, diminuindo a apoptose em baixas concentrações ou aumentando na dose máxima de 90 µM.

Apesar de não se observar diferença estatística entre os grupos, quando se avalia a porcentagem de células em apoptose final nos grupos utilizando o indutor CAM, verifica-se uma discreta diminuição no grupo RV 30 e 60 quando comparado ao RV 0. Já nos grupos sem o indutor CAM observou-se maior porcentagem de células em apoptose final para o grupo RV 60 quando comparado ao RV 0, (tabela 3).

Pelo exposto na literatura sobre apoptose de neutrófilos em humanos observam-se resultados conflitantes. Em algumas situações em que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos é inibido, pode ocorrer uma diminuição da apoptose celular, entretanto, a menor produção de ROS favorece in vivo a instalação de infecções bacterianas que pode acelerar a morte celular (YOSHIHITO et al., 1997).

O pré-tratamento com 100 µM de RV durante duas horas não protegeu células cardíacas H9C2 de ratos da toxicidade causada pela produção de ânion superóxido pelo sistema xantina-oxidase, já um tempo maior de incubação (> 48 horas) aumentou a atividade dos sistemas antioxidantes celulares, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (CAO; LI, 2004). No presente trabalho apesar do RV permanecer incubado durante 4 horas, tempo passível de penetração na célula, não houve efeito anti-apoptótico nem mesmo diminuição da concentração de superóxido (dados não publicados). No entanto, comparando as concentrações 0 e 90 µM, observa-se que o RV não afetou a viabilidade celular após 1 hora de incubação, anteriormente ao estímulo da camptotecina, neste momento a viabilidade de neutrófilos foi de 99% (dados não publicados). Mesmo após três horas de incubação, não houve alteração na viabilidade quando comparado os valores do

grupo estimulado e o não estimulado com CAM nas concentrações de 0 e 90  $\mu\text{M}$  de RV, Tabela 3.

TABELA 3 - Valores médios e erro padrão da viabilidade celular de neutrófilos incubados com e sem CAM, sob diferentes concentrações de RV, avaliados através de citometria de fluxo capilar. Araçatuba (SP), 2012.

Concentração resveratrol( $\mu\text{M}$ )	% de neutrófilos	
	Viáveis Sem CAM	Viáveis Com CAM
0	98.0 <sup>b</sup>	8.28 <sup>a</sup>
30	98.6 <sup>b</sup>	8.19 <sup>a</sup>
60	98.4 <sup>b</sup>	8.27 <sup>a</sup>
90	98.8 <sup>b</sup>	8.27 <sup>a</sup>
Valor de p	0.70	0.95
Média	97.05	68.94
EP	0.58	2.15

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste t.

## V. CONCLUSÕES

Considerando as evidências de que a apoptose celular é dependente tanto da concentração de RV como de ROS, no presente estudo foi avaliada *in vitro* a capacidade de diferentes concentrações de RV inibir a apoptose dos neutrófilos do sangue periférico de cães saudáveis. Os resultados obtidos indicam que o RV não alterou a viabilidade dos neutrófilos e que diferentemente de estudos realizados com outros tipos celulares e espécies, o efeito anti-apoptótico deste polifenol não foi evidenciado. Considerando-se que este é o primeiro relato sobre a ação do RV em neutrófilos de cães, é necessário investigar os seus mecanismos moleculares na apoptose celular.

## VI. REFERÊNCIAS:

AHMAD, K. A.; CLEMENT, M. V.; PERVAIZ, S. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Hoboken, v. 1010, n. 1, p. 365-373, 2003.

BARBOSA, T. S. **Efeito do soro urêmico de cães com insuficiência renal sobre o metabolismo oxidativo e apoptose de polimorfonucleares**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

BASSI, L.; PALITTI, F. Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1065-1069, 2000.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 70-77, 2000.

BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunology Today**, London, v. 15, n. 1, p. 7-10, 1994. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90018-3](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(94)90018-3)>

CADENAS, S.; BARJA, G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO<sub>3</sub>. **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 11-12, p. 1531-1537, 1999.

CASTILHA, P.; DÁVALOS, A.; TERUEL, J. L.; CERRATO, F.; FERNÁNDEZ-LUCAS, M.; MERINO, J. L.; SÁNCHEZ-MARTIN, C. C.; ORTUÑO, J.; LASUNCIÓN, M. A. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis

patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 87, n. 4, p. 1053-1061, 2008.

CASTRO, M.; VEIGA, A. P. M.; PACHECO, M. R. Plasma lipid profile of experimentally induced hyperlipidemic New Zealand white rabbits is not affected by resveratrol. **The Journal of Applied Research**, Apopka, v. 9, n. 1, p. 18-22, 2009.

CAO, Z.; LI, Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. **European Journal Pharmacology**, Amsterdam, v. 489, n. 1-2, p. 39-48, 2004.

CAVALARRO, A.; AINIS, T.; BOTTARI, C.; FIMIANI, V. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. **Physiological Research**, Prague, v. 52, p. 555-562, 2003.

CLEMENT, M. V.; STAMENKOVIC, I. Superoxide anion is natural inhibitor of Fas-mediated cell death. **The Embo Journal**, London, v. 15, n. 2 p. 216-225, 1996.

CLEMENT, M. V.; PONTON, A.; PERVAIZ, S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion and cytosolic acidification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, v. 290, p. 1145-1150, 1998.

DJAKIEW, D. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. **Prostate**, Hoboken, v. 42, n. 2, p. 150-160, 2000.

DONG, Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 523-524, p.145-150, 2003.

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

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 153-164, 2007.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 12, n. 1, p. 41-48, 2001.

HATTORI, R.; OTNAI, H.; MAULIK, N.; DAS, D. K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 282, n. 6, p. 1988-1995, 2002.

HERBEN, V. M. M.; HUININK, W. W. B.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Clinical pharmacokinetics of camptothecin topoisomerase I inhibitors.1. **Pharmacy World & Science**: PWS, Dordrecht, v. 20, n. 4, p. 161-72, 1998.

HIRAOKA, W.; VAZQUEZ, N.; NIEVES-NEIRA, W.; CHANOCK, S. J.; POMMIER, Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induces in human leukemia cells. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 1961-1968, 1998.

JAMES, M. A.; WEIDONG, W.; WANG, Y.; BYERS, L. A.; HEYMACH, J. V.; COOMBES, K. R.; GIRARD, L.; MINNA, J.; YOU, M. Functional characterization of clptm1l as a lung cancer risk candidate gene in the 5p15.33 Locus. **Plos One**, v. 7, n. 6, e36116, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/\\_10.1371/journal.pone.0036116](http://dx.doi.org/_10.1371/journal.pone.0036116)>.

KASAHARA, Y.; IWAI, K.; YACHIE, A.; OHTA, K.; KONNO, A.; SEKI, H.; MIYAWAKI, T.; TANIGUCHI, N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. **Blood**, Washington, v. 89, n. 5, p. 1748-1753, 1997.

KETTRITZ, R.; FALK, R. J.; JENNETTE, J. C.; GAIDO, M. L. Neutrophil superoxide release is required for spontaneous and FMLP-mediated but not for TNF $\alpha$ -mediated

apoptosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 8, n. 7, p. 1091-1100, 1996.

KOHENEN, S.; FRANCK, T.; ANTWERPEN, P. V.; BOUDJELTIA, K. Z.; MICKALAD, A. M.; DEBY, C.; MOGUILVSKY, N.; DEBY-DUPONT, G.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Resveratrol inhibits the activity of equine neutrophil myeloperoxidase by a direct interaction with the enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 20, p. 8080-8087, 2007.

LEGARZA, K.; YANG, L. X. New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs. **Anticancer Research**, Atiki, v. 26, n. 5A, p. 3301-3306, 2006.

LENNON, S. V.; MARTIN, S. J.; COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 203-214, 1991.

LEONARD, S. S.; XIA, C.; JIANG, B. H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, H. K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and affects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 309, n. 4, p. 1017-1026, 2003.

LIN, H. Y.; SUN, M. Z.; TANG, H. Y.; SIMONE, T. M.; WU, Y. H.; GRANDIS, J. R.; CAO, H. J.; DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Resveratrol causes COX-2 and p53-dependent apoptosis and head and neck squamous cell cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 6, p. 2131-2142, 2008.

LIN, H. Y.; TANG, H. Y.; DAVIS, F. B.; DAVIS, P. J. Resveratrol and apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Hoboken, v. 1215, p. 79-88, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05846.x>>.

MARTÍN, A. R.; VILLEGAS, I.; LA CASA, C.; LA LASTRA, C. A. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis

during early colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 67, n. 7, p. 1399-1410, 2004.

MARTÍN, A. R.; VILLEGAS, I.; HIDALGO-SÁNCHEZ, M.; LA LASTRA, C. A. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **British Journal of Pharmacology**, Chichester, v. 147, n. 8, p. 873-885, 2006.

METCAIF, J. A.; GALLIN, J. I.; NAUSEEF, W. M.; ROOT, R. K. Functions related to microbicidal activity. In: \_\_\_\_\_. **Laboratory manual of neutrophil function**. New York: Raven Press, 1986. chap. 5, p. 87-143.

MILOSO, M.; BERTELLI, A. A.; NICOLINI, G.; TREDICE, G. Resveratrol induced activation of the mitogen-activated protein kinase, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, Shanonn, v. 264, n. 1-3, p. 141-144, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00194-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00194-9)>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1271 p.

PLOW, E. F.; HAAS, T. A.; ZHANG, L.; LOFTUS, J.; SMITH, J. W. Ligand binding to integrins. **Journal of Chemical Biology**, Heidelberg, v. 275, n. 29, p. 21785-21788, 2000.

REYES-VALDÉS, L.; ARQUETA, J.; MORÁN, J.; SALAIZA, N.; HERNÁNDEZ, J.; BERZUNZA, M.; AQUIRRE-GARCÍA, M.; BECKER, I.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Leishmaniamexicana: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 121, n. 3, p. 199-207, 2009.

SAUTTER, C. K.; DENARDIM, S.; ALVES, A. O.; MALMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SAVILL, J.; FADOK.; HENSON, P.; HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunology Today**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 131-136, 1993.

SENDO, F.; TSUCHIDA, H.; TAKEDA, Y.; GON, S.; TAKEI, H.; KATO, T.; HACHIYA, O.; WATANABE, H. Regulation of neutrophil apoptosis: Its biological significance in inflammation and the immune response. **Human Cell**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 215-222, 1996.

SHELLHAAS, J. L.; ZUCKERMAN, S. H. *In vitro* detection of apoptotic stimuli by use of the HL-60 myeloid leukemic cell line. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 2, n. 5, p. 598-603, 1995.

SMITH, J. A. Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 672-676, 1994.

SZENDE, B.; TYIHAK, E.; KIRALY-VEGHELY, Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. **Experimental & Molecular Medicine**, London, v. 32, n. 2, p. 88-92, 2000.

STOCCO, B.; TOLEDO, K.; SALVADOR, M.; PAULO, M.; KOYAMA, N.; TOLOI, M. R. T. Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress. **Maturitas**, Shannon, v. 72, n. 1, p. 72-78, 2012.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease. **Science**, Washington, v. 267, n. 5203, p. 1456-1462, 1995.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

TRINCONI, S. C.; BARBOSA, T. S.; CIARLINI, P. C. Efeito do plasma rico em glicose sobre a apoptose dos neutrófilos de cães. **Veterinaria e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 432-440, 2011.



UDENIGWE, C. C.; RAMPRASATH, V. R.; ALUKO, R. E.; JONES, P. J. H. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 66, n. 8, p. 445-454, 2008.

WHITACRE, C. M.; ZBOROWSKA, E.; GORDON, N. H.; MACKAY, W.; BERGER, N. A. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 57, n. 5, p.1425, 1997.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; LIN, C. W. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radical Research**, London, v. 37, n. 5, p. 509-514, 2003.

YOSHIHITO, K.; KASUYUKI, I.; YACHIE, A.; OHTA, K.; KONNO, A.; SEKI H.; MIYAWAKI, T.; TANIGUCHI, N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95(Fas/APO-1) mediated apoptosis of neutrophils. **Blood**, Washington, v. 89, n. 5, p. 1748-1753, 1997.

ZHANG, S. I.; CAO, J. H.; DAVIS, F. B.; TANG, H-Y.; DAVIS, P. J.; LIN, H-Y. Oestrogen inhibits resveratrol-induced posttranslational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells. **The British Journal of Cancer**, New York, v. 91, n. 1, p. 178-185, 2004. Supplement. Disponível em: < 10.1038/sj.bjc.6601902>.

### **CAPÍTULO III - Resveratrol e níveis de superóxido em neutrófilos de cães**

**M. CASTRO\*, P. C.; CIARLINI<sup>1</sup>; B. F. ALMEIDA<sup>2</sup>; M. R. PACHECO<sup>3</sup>**

**RESUMO:** Os neutrófilos constituem cerca de 60 a 75% dos leucócitos dos carnívoros. São importantes células efetoras em inúmeras condições inflamatórias. A destruição dos micro-organismos ocorre principalmente por mecanismos dependentes de oxigênio e pela liberação de enzimas líticas dos grânulos intracelulares. As perturbações metabólicas que ocorrem nos leucócitos durante a quimiotaxia, ativação e fagocitose resultam na liberação de produtos não apenas dentro do fagolisossoma, mas também no espaço extracelular. Esses produtos são mediadores potentes da lesão endotelial e tecidual e amplificam os efeitos do estímulo inflamatório inicial. O objetivo deste trabalho foi verificar se o antioxidante resveratrol, um antioxidante, em diferentes concentrações, afeta os níveis de superóxido em neutrófilos isolados de cães estimulados com PMA. Uma suspensão de neutrófilos de  $1 \times 10^6$  mL de 10 cães adultos hígidos foram pré- incubadas com diferentes concentrações finais de RV (0, 30, 60 e 90  $\mu\text{mol}$ ) durante 4 horas. A taxa de produção de superóxido foi determinada por citometria de fluxo capilar. Na presença de PMA a fluorescência média do brometo foi superior em todos os tratamentos. Nos grupos tratados com RV e estimulados com PMA não houve diminuição na quantidade de superóxido. Também foi observado que as concentrações de RV utilizadas não afetaram a viabilidade celular. As taxas de produção de superóxido não diferiram entre os tratamentos utilizados  $p > 0,05$ .

**Palavras – Chave:** Citometria de fluxo, Espécie Reativa de Oxigênio, Explosão respiratória, Fagocitose.

---

\* UNESP - FCAV Câmpus de Jaboticabal. Autor para correspondência: Rua Carlos Kummer 100, Bairro Universitário, 89896-000, Itapiranga- SC. E-mail: castrocati@yahoo.com.br

<sup>1</sup> UNESP - Câmpus de Araçatuba.

<sup>2</sup> UNESP - Câmpus de Araçatuba.

<sup>3</sup> UNESP - FCAV Câmpus de Jaboticabal

**SUMMARY:** Neutrophils constitute about 60 to 75% of carnivore's leukocytes. They are important effector cells in numerous inflammatory conditions. The destruction of microorganisms occurs mainly by oxygen-dependent mechanisms involving the generation of reactive oxygen metabolites and also the liberation of lytic enzymes from intracellular granules. Metabolic disturbances and membrane disturbances that occur in leukocytes during chemotaxis, activation and phagocytosis result in liberation of products not only inside the phagolysosome, but also in extracellular space. These products are potent mediators of endothelial and tissue injury and they broaden the effects of initial inflammatory stimulus. The objective of this study was to check if resveratrol in different concentrations affects the level of superoxide in neutrophils isolated from healthy dogs stimulated with PMA.

A final neutrophil suspension of  $1 \times 10^6$  mL of 10 adult healthy dogs was aliquoted and pre-incubated with different final concentrations of resveratrol (0, 30, 60 e 90  $\mu$ mol) for 4 hours. Superoxide production rate was determined by capillary flow cytometry. In PMA presence, bromide average fluorescence was superior in every treatment. In the groups treated with resveratrol and stimulated with PMA there was no reductions in amount of superoxide. Incubation of neutrophils with RV for 1 hours has not changed oxidative metabolism of neutrophils, they were checked according to the values of concentration 0 and 90  $\mu$ M. The rates of superoxide production have not differed among the treatments used  $p < 0,05$ . It was also observed that the concentrations of RV used did not affected cellular viability.

**Keywords:** Cytometry techniques, Oxidative Burst, Phagocytosis, Reactive oxygen species

## I. INTRODUÇÃO

Os neutrófilos são os principais leucócitos encontrados no sangue, constituem cerca de 60 a 75% dos leucócitos dos carnívoros (KERR, 2003). São importantes células efetoras em inúmeras condições inflamatórias. A destruição dos microorganismos ocorre principalmente por mecanismos dependentes de oxigênio, chamado de explosão respiratória ou *oxidative burst*, envolvendo a geração de metabólitos reativos de oxigênio e outro, envolvendo a liberação de enzimas líticas dos grânulos intracelulares, ocorrendo poucos minutos após o estímulo dos neutrófilos (COTRAN et al., 2000). Dessa forma, os neutrófilos representam a primeira linha de células de defesa na proteção do organismo contra infecções e, representam papel importante na resposta do sistema imune (TIZARD, 2008).

Entretanto, excessiva produção de ROS pode mediar lesão endotelial e tecidual amplificando os efeitos do estímulo inflamatório inicial. Assim, uma regulação inefetiva ou ausente na produção de ROS, têm papel fundamental na patogênese de inflamações crônicas como a artrite, asma, glomerulonefrite, lesão de reperfusão, aterosclerose, entre outras (COTRAN et al., 2000; ENGELICH et al., 2001).

A explosão respiratória de neutrófilos é caracterizada inicialmente pela produção de superóxido, o primeiro ROS produzido após o contato do fator estimulante com o neutrófilo, pelo sistema enzimático NADPH oxidase. ROS liberados durante a ativação neutrofílica modulam o estado redox intra e extracelular o qual por sua vez desempenha papel chave na regulação e amplificação da resposta inflamatória. Há evidências de que disfunções neutrofílicas adquiridas são importantes causas de infecção em pacientes diabéticos, com insuficiência renal, hepática e doenças auto-imunes entre outras (ENGELICH et al., 2001). Comprovadamente compostos presentes no plasma de cães urêmicos inibem a produção de superóxido de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (SOEIRO, 2010; SILVA, 2011).

O estado redox intracelular pode ser modulado por antioxidantes exógenos que atuam como doadores de elétrons ou por inibição das enzimas envolvidas na

produção de ROS, incluindo inibidoras do complexo NADPH oxidase (CIZ et al., 2012).

O efeito do RV sobre o metabolismo oxidativo de PMN em seres humanos ainda é muito contraditório, em cães ainda não foi estudado, contudo, sabe-se que parte dessas divergências em neutrófilos humanos é devido ao método de isolamento dos neutrófilos e quantificação das ROS (SARDEMBERG et al., 2006).

Quanto à produção de ROS em neutrófilos isolados de cães, não se encontra relato sobre o efeito do RV. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar se o RV, em diferentes concentrações, afeta os níveis de superóxido em neutrófilos isolados de cães saudáveis estimulados com forbol-12-miristato 13 acetato (PMA).

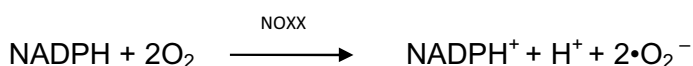
## **II. REVISÃO DE LITERATURA**

Os neutrófilos são produzidos exclusivamente na medula óssea ativa de animais domésticos adultos saudáveis. Pode-se observar produção extramedular, principalmente no baço de animais jovens, e, nos casos de doença inflamatória crônica, em animais adultos no baço, fígado e nos linfonodos. Cada mieloblasto pode originar de 16 a 32 neutrófilos segmentados, o padrão de produção medular corresponde a uma mistura de quantidade relativamente pequena de células primitivas, uma quantidade maior de células intermediárias e várias células mais maduras (THRALL, 2007). O controle da produção é mediada por um complexo conjunto de citocinas e de fatores de crescimento. A liberação de neutrófilos da medula óssea para o sangue pode ser acelerado pela IL-1, pelo fator de necrose tumoral (TNF) e pelo fator indutor de leucocitose. O tempo para o mieloblasto completar seu estágio de maturação, originando o neutrófilo segmentado no sangue em condições normais é de sete dias. Essas células migram aleatoriamente aos tecidos, assim, seu tempo de circulação é variável e não está relacionada à idade celular (6 a 10 horas), portanto, a população de neutrófilos do sangue se renova duas a três vezes ao dia. Os fatores quimiotáticos liberados no sítio da lesão, associados aos eventos vasculares, favorecem o consumo de neutrófilos (KERR, 2003; THRALL, 2007).

À microscopia eletrônica, muitos tipos diferentes de grânulos ricos em enzimas podem ser observados no citoplasma dos neutrófilos, alguns destes grânulos contêm enzimas como mieloperoxidase, lisozima, elastase,  $\beta$ -glucuronidase e catepsina B. Outros grânulos não contêm mieloperoxidase, mas possuem lisozima e colagenase e a proteína ligante de ferro, lactoferrina (KERR, 2003; TIZARD, 2008).

A formação de ROS por neutrófilos é catalisada por uma proteína ligada à membrana, a NADPH oxidase, a qual é inativa em células em repouso e torna-se ativada durante o processo de fagocitose ou seguindo a interação destas células com estimulantes solúveis. O caminho para ativação desses neutrófilos é chamado de explosão respiratória, porque inicialmente foi descrita como um repentino aumento do consumo de oxigênio ocorrendo poucos segundos após a interação da célula com o agente estimulante (BELLAVITE, 1988). Neutrófilos em repouso não são diretamente ativados ao sofrerem um primeiro estímulo, mas, permanecem mais sensíveis à ativação da NADPH oxidase, podendo ativar-se totalmente quando expostos a um segundo estímulo (AQUINO et al., 1998).

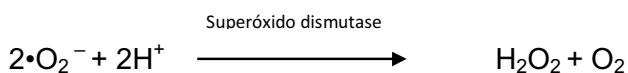
Quando os neutrófilos se ligam à citocinas, como o TNF- $\alpha$ , ou são expostos a outros estímulos inflamatórios o complexo NADPH-oxidase é formado. Uma vez formado, ocorre a conversão NADPH, a forma reduzida da NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) a NADP<sup>+</sup> liberando elétrons (COTRAN et al., 2000). Uma molécula de oxigênio aceita um elétron doado, o que leva à geração do ânion superóxido (o ponto em  $\bullet\text{O}_2^-$  indica a presença de um elétron não-pareado):



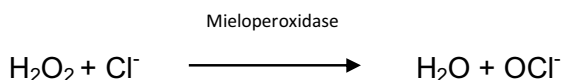
O complexo NADPH oxidase é composto basicamente por 3 subunidades citosólicas p67phox, p40phox e p47phox e duas unidades intramembranares gp 91phox e p22 phox juntamente com o citocromo b558. A ativação deste complexo dá-se através de um sistema de segundo mensageiros de fosfolipídeos de membrana. Assim que o neutrófilo é estimulado a enzima fosfolipase C catalisa a degradação de fosfolipídeos de membrana em dois segundos mensageiros:

diacilglicerol e trifosfato de fosfatidilinositol. O diacilglicerol ativa a proteína quinase C e esta então fosforila uma série de outras proteínas que então translocam as 3 subunidades citoplasmáticas para a membrana onde formam um complexo ativo com o citocromo (NELSON et al., 2004; CUNNINGHAM, 2004).

A  $\text{NADPH}^+$  acelera o desvio da hexose monofosfato, uma via metabólica que converte a glicose à pentose e  $\text{CO}_2$  e libera energia, que é usada pela célula. As duas moléculas de  $\cdot\text{O}_2^-$  interagem espontaneamente (dismutação), gerando uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sob a influência da enzima superóxido dismutase (COTRAN et al., 2000; TIZARD, 2008).



O peróxido de hidrogênio é convertido a compostos bactericidas, através da ação da mieloperoxidase, a mais importante enzima presente nos grânulos dos neutrófilos. Esta enzima catalisa a reação entre o peróxido de hidrogênio e os íons haleto ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  ou  $\text{SCN}^-$ ) produzindo hipo-haleto (TIZARD,2008):



O  $\text{OCl}^-$  é o principal produto do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, não se acumulando nos sistemas biológicos mas desaparecendo em múltiplas reações. Enquanto houver um suprimento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a mieloperoxidase usará o  $\text{Cl}^-$  plasmático para formar  $\text{OCl}^-$ .  $\text{OCl}^-$  destruirá as bactérias oxidando suas proteínas e seus lipídeos e aumentando as atividades bactericidas das atividades lisossômicas (COTRAN et al., 2000; TIZARD,2008).

Os neutrófilos contém grandes quantidades de glutatona, que reduz os oxidantes. Os metais redox-ativos, como o ferro, podem se ligar a lactoferrina, minimizando a formação de  $\text{OH}\cdot$ , e os antioxidantes, como o ácido ascórbico e a vitamina E interrompem essas reações (TIZARD, 2008).

A fagocitose também ocorre através de enzimas líticas, metabolismo não oxidativo. Nessa situação o conteúdo dos fagossomos é continuamente acidificado para a ação das proteases granulares. Quando o agente liga-se à membrana do neutrófilo, os lisossomos migram através do citoplasma, fundem-se aos fagossomos em maturação, fagolisossomo, e, liberam suas enzimas (MOREL et al., 1991; TIZARD, 2008). O aumento da força iônica dentro dos fagossomos libera enzimas como a elastase e catepsina G de suas matrizes proteoglicanas sulfatadas, lisozima, proteases, hidrolases ácidas e mieloperoxidase. Os neutrófilos também possuem peptídeos antimicrobianos compostos principalmente pelas defensinas, catelicidinas e as serprocidinas. Duas outras importantes proteínas antibacterianas são a BPI “bactericidal permeability-increasing protein” e a calprotectina (HALLIWELL, 1993).

Sob a influência de produtos bacterianos, como os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), os neutrófilos podem secretar muitas citocinas diferentes, como a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 RA, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e o fator transformador de crescimento –  $\beta$  (MOREL et al., 1991; HALLIWELL, 1993; TIZARD, 2008).

As perturbações metabólicas e da membrana que ocorrem nos leucócitos durante a quimiotaxia, ativação e fagocitose resultam na liberação de produtos não apenas dentro do fagolisossoma, mas também no espaço extracelular. As mais importantes dessas substâncias liberadas pelos neutrófilos são (1) enzimas lisossômicas, presentes nos grânulos; (2) metabólitos ativos derivados do oxigênio (ROS); e (3) produtos do metabolismo do ácido araquidônico, incluindo as prostaglandinas e leucotrienos. Esses produtos são mediadores potentes da lesão endotelial e tecidual e amplificam os efeitos do estímulo inflamatório inicial. Portanto, se persistente e desimpedido, o infiltrado de leucócitos torna-se o próprio agressor, e a lesão tecidual dependente de leucócitos dá origem a muitas enfermidades humanas como: artrite, asma, glomerulonefrite, lesão de reperfusão, aterosclerose, entre outras (COTRAN et al., 2000)

Uma grande quantidade de agentes é capaz de estimular o complexo enzimático NADPH oxidase em macrófagos e neutrófilos em sistemas *ex vivo*, tanto substâncias solúveis quanto particuladas. Entre os primeiros incluem-se os peptídeos quimiotáticos, como o formil-metionil- leucil- fenilalanina (fMLP) e os ésteres de forbol como o forbol-12-miristato 13 acetato (PMA). Dentre os



particulados incluem bactérias, leveduras e complexos antígeno/anticorpo opsonizados por componentes do sistema complemento (ANDREWS; BABIOR, 1984; BRIGADAO; COLEPICOLO, 1996). Como componente solúvel o PMA promove a explosão respiratória em células fagocitárias através da ativação direta da proteína quinase C (PKC), relacionada com os mecanismos de degranulação e produção de ROS. O PMA ativa a PKC diretamente devido a sua característica apolar que o permite atravessar a membrana celular facilmente, permitindo a ativação de forma prolongada, pois não é metabolizado pela célula (PONGRACZ et al., 1994). Essa ativação permite que a PKC fosforile resíduos de serina e treonina em uma vasta gama de substratos proteicos. A fosforilação de outras proteínas citosólicas foi também relacionada como essencial para a explosão respiratória desencadeada pelo PMA (HEYWORTH; DADWEY, 1990; TOKER, 1998). A PKC é composta de 2 subunidades: a) subunidade regulatória que apresenta os domínios C1, responsável pela ligação com o diacilglicerol (DAG) e com o (PMA), e a C2, responsável pela ligação com o cálcio, e b) a subunidade catalítica altamente conservada dentre as diferentes isoformas, que apresenta os domínios C3 e C4 responsáveis pela ligação do ATP e do substrato, respectivamente (MICHIE; NAKAGAWA, 2005).

Dávalos et al. (2009) avaliaram se os polifenólicos presentes no suco de uva afetavam subunidades da NADPH oxidase. Assim utilizaram neutrófilos, células mononucleares, células HL-60 e uma linhagem de células endoteliais EA.hy926 *in vitro* de forma dose dependente. Nesse ensaio a produção de superóxido foi mensurada com a utilização de 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e lucigenina. Suco de uva e vinho tinto reduziram p47phox, p22phox e gp91phox, polifenólicos puros, particularmente quercetina reduziu a expressão da subunidade p47phox. A eficácia desses polifenólicos foi comprovada após esses serem retirados do meio celular sugerindo seus efeitos como varredores de radicais livres ou por regulação intracelular ou ambos.

A detecção de ROS geradas durante a ativação dos neutrófilos também pode ser realizada através da quimioluminescência. É uma técnica frequentemente utilizada e apresenta sensibilidade e baixo custo, entretanto, é questionada porque a redução da lucigenina pode gerar  $O_2^{\cdot -}$  (HASEGAWA et al., 1997; KOPPRASCH et al., 2003).

Segundo Hoelzl et al. (2005) uma ampla variedade de técnicas *in vitro* tem sido desenvolvidas para a detecção de espécies reativas de oxigênio. A produção intracelular de ROS pode ser detectada com a utilização de sondas fluorescentes e posteriormente mensurada por citometria de fluxo. Os diferentes métodos fornecem resultados que variam grandemente, principalmente pela formação de artefatos durante a preparação da amostra, pois o isolamento pode aumentar a produção de superóxido por neutrófilos.

Eickhoff et al. (2004) tentaram elucidar a razão para a alta variação na atividade fagocítica e produção de ROS de neutrófilos de cães adultos saudáveis. Determinaram que o histopaque não influencia a produção de ROS, embora influencie diminuindo a capacidade fagocítica das células. A estocagem de PMN a temperatura ambiente durante 24 horas não influenciou nenhuma das duas variáveis estudadas. Já Ruauux e Williams (2000) não recomendam a estocagem de neutrófilos para avaliação da produção de ROS.

Van Eeden et al. (1999) afirmam que manter as amostras de sangue em temperatura ambiente após a colheita é importante para reduzir as mudanças artefatuais na avaliação da ativação celular neutrofílica. Os mesmos autores afirmam que a habilidade da técnica de citometria de fluxo em determinar a apoptose num grande número de células e de forma simultânea, avaliando subpopulações dentro de um grande número de células, é um dos grandes benefícios dessa técnica em comparação com outras, como morfologia e eletroforese em gel.

Para KAMPEN et al. (2004) a citometria de fluxo representa conveniente alternativa para os métodos clássicos para determinar a explosão respiratória em neutrófilos de sangue total de bovinos. A técnica assegurou repetidos resultados iguais quando executada da mesma forma e no mesmo dia não necessitando isolamento celular, ou grandes quantidades de sangue. Com o advento de inúmeros novos fluorocromos e análises multiparamétricas, é possível avaliar diversas funções de neutrófilos na mesma população de células. A citometria promove uma rápida avaliação das anormalidades neutrofílicas e reflete de forma mais fidedigna seu comportamento *in vivo*. Em neutrófilos normais ou com anormalidades funcionais o uso da citometria de fluxo tem ajudado no entendimento na patogênese das

doenças, através do uso de anticorpos monoclonais fluorescentes específicos contra antígenos intracelulares ou de superfície e fluorocromos (van EEDEN et al., 1999).

Estudos realizados por Carden e Granger (2000) e Saito et al. (2005) comprovaram os efeitos benéficos do RV em lesões renais de isquemia e reperfusão. Sener et al. (2006) constataram que a redução das lesões renais em ratos tratados com RV foi devido a: (1) capacidade em manter o status oxidante-antioxidante; (2) inibição da infiltração neutrofílica no tecido renal; (3) regulação de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e lactato desidrogenase) e (4) capacidade de proteção de membranas, conforme observado pelos níveis de malondialdeído, glutathiona e óxido nítrico teciduais.

Tou e Urbizo (2001) estudaram *in vitro* o efeito do RV na inibição da fosfolipase D e seus substratos, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol e diacilglicerol em neutrófilos estimulados por fMLP e PMA. O efeito foi obtido em doses de 42,4  $\mu$ M. Também Leiro et al. (2004) observaram a inibição direta da NADPH oxidase pelo isômero *cis*-resveratrol em macrófagos, mesmo em baixas concentrações 1  $\mu$ M. Os autores comentam que a conformação espacial, *cis* ou *trans*-resveratrol não modifica sua interação com os sítios de ação na célula. López-Sepúlveda et al. (2011) avaliaram a ação do RV na endotelina-1(ET-1) na aorta de ratos e produção de  $O_2^{\cdot}$  vascular direta. A ET-1 aumenta o estresse oxidativo (com subsequente aumento da produção de  $O_2^{\cdot}$ ) pela inativação do ON. O RV inibe esse papel tóxico da ET-1 pela inibição da NADPH-oxidase.

Cavallaro et al. (2003) avaliou em humanos o efeito do RV em sangue total, particularmente quanto à geração de superóxido, e em neutrófilos isolados quanto à quimiotaxia, produção de ácido hipocloroso (HOCL), óxido nítrico e geração de superóxido. Nesse experimento os autores utilizaram uma ampla diferença nas concentrações de RV (4,38 nM a 43,8  $\mu$ M). A produção de superóxido no sangue total e nos neutrófilos foi inibida em mínimas concentrações (4,38 nM) de RV em neutrófilos estimulados com fMLP e Zimosan. Já em níveis basais de produção de superóxido, o RV demonstrou efeito inibitório somente em altas concentrações. A produção de HOCL, a de ON e a quimiotaxia de neutrófilos foram inibidas de forma dependente da dose, significativa em altas concentrações.

A habilidade do RV em inibir a produção de ROS em monócitos foi investigada por Poolman et al. (2005) utilizando isoluminol, luminol, lucigenina e 2',7'-diclorofluoresceína. Nas doses de (0,1 a 50  $\mu$ M) RV inibiu a formação de ROS em células estimuladas por fMLP, PMA e ácido araquidônico após 1 hora de incubação, ou quando adicionados diretamente na reação. O efeito inibitório do RV em células estimuladas com fMLP foi relacionada com o efeito inibitório na fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) um mediador central de várias importantes funções leucocitárias como quimiotaxia, fagocitose e ativação de NADPH oxidase e também da proteína cinase B (Akt) outro sinalizador intermediário para ativação dessa enzima.

Oliveira et al. (2002) avaliando o efeito do flavanóide quercetina sobre o metabolismo oxidativo de polimorfonucleares de coelhos após interação com imunocomplexos da classe G, observaram através de quimioluminescência que houve inibição da produção de ROS, mas que esse fato não estava relacionado à inibição da fagocitose e sim aos efeitos da quercetina como sequestrante de ROS ou ainda pela inibição das enzimas relacionadas à produção dos mesmos.

Em neutrófilos humanos estimulados com 12-O-*tetradecanoilforbol* 13-acetato (TPA) um promotor tumoral que aumenta a produção de ROS foi verificado por Ignatowicz et al. (2003) que o RV em doses de 5,76  $\mu$ M, demonstrou menor geração de ROS por essas células através da técnica de quimioluminescência quando comparado a outros compostos fenólicos.

Redução do ferrocitocromo c, ressonância de spin eletrônico e HE foram técnicas adequadas para detecção de baixas concentrações de ânion superóxido de células endoteliais segundo Barbacanne et al. (2000) já a quimioluminescência utilizando lucigenina não foi eficaz. Esta última técnica é questionada porque a redução da lucigenina pode gerar  $O_2^{\cdot-}$ .

Ciz et al. (2008) verificaram a habilidade de quatro antioxidantes, catenina, epicatequina, quercetina e RV na diminuição do estresse oxidativo usando macrófagos RAW 264.7. Todos os compostos testados inibiram a quimioluminescência produzida pela estimulação das células com PMA. O efeito do RV se destacou entre todos os testados, pois, em concentrações 50  $\mu$ M marcadamente inibiu a quimioluminescência. Os autores verificaram que estes compostos não afetaram a viabilidade das células. Para eles, o potencial

antioxidante é dependente da organização e do número de grupos hidroxil e da extensão da estrutura de conjugação. A dupla ligação C-2,3, presente na quercetina e no RV pode ser importante para a inibição de ROS e ON.

O RV é absorvido e metabolizado pelo intestino delgado e fígado. Isso se torna importante, pois, um intenso metabolismo desse componente pode restringir a sua biodisponibilidade quando administrado via oral (WENZEL; SOMOZA, 2005). A absorção se dá rapidamente por transporte passivo. O RV é absorvido do sangue pelos hepatócitos através de um processo passivo e utilizando carreador, resveratrol-albumina-proteína (LANCON et al., 2004) Segundo Jannin et al. (2004) a comprovação que o RV liga-se à albumina foi obtida em seus experimentos quando quantidades iniciais de RV (5  $\mu$ M) ligaram-se totalmente com a proteína após 24 h de incubação com albumina sérica bovina. No plasma é detectado após 15 minutos de sua administração oral e atinge o pico aos 30 minutos. Suas formas conjugadas glucoronídeo e sulfato são detectadas no plasma após 3 h o que sugere sua parcial metabolização no intestino delgado e distribuição aos tecidos na sua forma conjugada (YU et al., 2002; VITRAC et al., 2003). Bertelli et al. (1998) reportou em seus estudos que no fígado e no rim de roedores altas concentrações de RV foram observadas após uma hora da administração oral e valores basais retornaram em 4 horas. A concentração diminui com o tempo, sendo renal a excreção do RV. Em humanos a forma livre do RV (aglicone) é obtida no plasma em valores mínimos de 1,7 a 1,9% (GOLDERBEG et al., 2003)

Em humanos ocorre recirculação entérica dos metabólitos por reabsorção intestinal após hidrólise. Mesmo após utilização do RV por via intravenosa observou-se extenso metabolismo. A maioria do RV absorvido em humanos foi convertido em glucuronídeo (16.8%) o qual foi o principal metabólito luminal (de SANTI et al., 2000; WENZEL; SOMOZA, 2005).

Na literatura são escassos os trabalhos avaliando o metabolismo oxidativo de neutrófilos em cães, nos últimos dois anos não foram verificadas publicações envolvendo produção de superóxido mensurada através de citometria de fluxo utilizando sonda HE (SUCH et al., 1983; EICKHOFF et al., 2004). A utilização do RV como antioxidante é amplamente descrito conforme observado na literatura supracitada.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### III.1 Seleção dos animais

Para este estudo, 10 cães adultos com peso variando de 7 a 20 Kg, de várias raças, machos ou fêmeas, foram submetidos a exame físico geral segundo Feitosa (2008), e a laboratoriais como hemograma, quantificação sérica de ácido úrico, albumina, colesterol, triglicérideo, creatinina, glicose, ureia, proteína total, aspartato amino transferase (AST) e alanino amino transferase (ALT) para a comprovação da higidez dos animais. 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.

#### III.2 Análises laboratoriais

Os valores do hemograma foram obtidos utilizando-se contador eletrônico<sup>4</sup> de células sanguíneas previamente calibrado conforme recomendações do fabricante. A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida pela análise microscópica de esfregaços corados com Panótico Rápido<sup>5</sup>. A determinação do volume globular foi realizado pelo método do micro-hematócrito (THRALL et al., 2007). Todas as análises bioquímicas foram realizadas em um analisador bioquímico automatizado<sup>6</sup>, previamente ajustado com calibrador comercial e controles nível I e II<sup>7</sup>. Utilizando-se reagentes comerciais e temperatura de 37°C, a concentração sérica de ureia foi determinada pelo método enzimático UV<sup>8</sup>(urease/glutamato desidrogenase); a creatinina pelo método cinético<sup>9</sup> (picrato alcalino); albumina pelo método de verde de bromocresol<sup>10</sup>; colesterol pelo método enzimático<sup>11</sup> (oxidase/peroxidase); glicose pelo método enzimático<sup>12</sup> (glicose

---

<sup>4</sup> Contador eletrônico hematológico veterinário, Mod. CC-530, CELM, São Paulo-SP

<sup>5</sup> Panótico rápido LB – Laborclin, Pinhais-PR

<sup>6</sup> Analisador automático BTS, mod. 370 plus, BioSystems, Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Calibrador serum, Cód.18011, BioSystems, Barcelona,Spain

<sup>8</sup> Urea/BUN-UV, Cod. 11516, BioSystems, Barcelona,Spain.

<sup>9</sup> Creatinine, Cod.11502, BioSystems, Barcelona,Spain.

<sup>10</sup> Albumine, Cod.11574, BioSystems, Barcelona,Spain

<sup>11</sup> Cholesterol, Cód.11505, BioSystems, Barcelona,Spain

<sup>12</sup> Glucosa, Cod.11503, BioSystems, Barcelona,Spain

oxidase/peroxidase); os triglicerídeos pelo método enzimático-colorimétrico<sup>13</sup> e AST<sup>14</sup> e ALT<sup>15</sup> pelo método cinético (UV).

### III.3 Colheita e acondicionamento das amostras

Utilizando-se seringas e agulhas hipodérmicas descartáveis 25 x 0,8 mm, colheu-se 10 mL de sangue total da veia jugular, desses, 8 mL foram acondicionados em tubos heparinizados para a avaliação do metabolismo oxidativo. Para a realização do hemograma, parte do sangue total foi acondicionado em tubos com K2- EDTA e outra parte para obtenção de soro, foi acondicionada em tubos sem anticoagulante. Parte do soro obtido foi utilizado para os testes bioquímicos, as amostras sanguíneas foram processadas imediatamente após a colheita.

### III.4 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. Quatro mililitros de sangue total heparinizado (100 UI/ml) foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno estéreis contendo partes iguais de Histopaque<sup>16</sup> 1119 e 1077, totalizando 6 mililitros de duplo gradiente de separação. Após centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos, a camada de PMN foi aspirada com ponteiros siliconizadas, lavada duas vezes com tampão de lise (cloreto de amônia 0,8%) e uma vez com HBSS<sup>17</sup>. Após o descarte do sobrenadante, as células foram diluídas em meio RPMI para obter a concentração de PMN final de  $1 \times 10^6$ , com pureza e viabilidade mínima de 95%. Esta concentração foi obtida através do seguinte cálculo:

$N \times 2 \times 10$ , sendo:

$N = n^{\circ}$  de células contadas em 1 quadrante de leucócitos

$2 =$  fator devido à diluição inicial com o azul de tripan

<sup>13</sup> Triglicérides PP, Cod. 459, GoldAnalisa, Minas Gerais, Brasil

<sup>14</sup> AST, Cod. 442665, Beckman Coulter do Brasil Com e Imp de Prod de Lab Ltda, São Paulo, Brasil

<sup>15</sup> ALT, Cod. 442620, Beckman Coulter do Brasil Com e Imp de Prod de Lab Ltda, São Paulo, Brasil

<sup>16</sup> Histopaque®-1119, Cod. 1119-1, Sigma, St. Louis, USA.

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

<sup>17</sup> Hanks balanced salt solution (HBSS) modified, Cod. H 9394, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

10= fator da área contada (1 quadrante de leucócitos)

Este resultado deve ser dividido por 1000, assim obtêm-se a concentração de neutrófilos ( $\times 10^6/\text{mL}$ ).

Posteriormente realiza-se uma regra de três simples para descobrir o volume necessário de neutrófilos para obter-se a concentração desejada.

[PMN] -----1000  $\mu\text{L}$  (volume desejado – 1 mL)

$1,0 \times 10^6$  -----x  $\mu\text{L}$

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<sup>18</sup> e coradas<sup>19</sup>.

### III.5 Delineamento experimental

Uma suspensão de neutrófilos final de  $1 \times 10^6$  mL foram aliqüotadas e pré-incubadas com diferentes concentrações finais de RV (0, 30, 60 e 90  $\mu\text{mol}$ ) durante uma hora (produção de superóxido), sendo mantidas em banho maria e agitadas por um minuto (600rpm) a cada 15 minutos em um agitador térmico computadorizado. O controle (RV 0) foi submetido às mesmas condições das outras amostras.

Todos os ensaios foram realizados simultaneamente e imediatamente após o isolamento.

### III.6 Determinação da produção de superóxido

Para determinação da produção de superóxido 180  $\mu\text{L}$  das amostras contendo uma suspensão de neutrófilos final de  $1 \times 10^6$  mL com e sem RV foram incubadas durante uma hora. Posteriormente foi acrescida a esta solução 20  $\mu\text{L}$  de HE (0,1mmol/L). Como controle positivo, às aliqüotas de 180  $\mu\text{L}$  foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  PMA<sup>20</sup> (3,2 $\mu\text{mol/L}$ ). Após nova incubação a 37° C por 15 minutos a amostra foi

<sup>18</sup>Centrifuga Citológica Microprocessada REVAN, Mod. 2000D, Cientec,SP

<sup>19</sup>Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

<sup>20</sup> Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Cat. P8139, Sigma, St. Louis, USA.



mantida em banho de gelo e protegida da ação da luz até o momento da leitura. A concentração de superóxido foi quantificada em citômetro de fluxo capilar<sup>21</sup> ajustado para o comprimento de onda máximo para emissão (593nm) e excitação (473nm) do brometo de etídio. Foram adquiridos 10.000 eventos e analisados em programa computacional específico<sup>22</sup>. Os granulócitos foram distinguidos dos monócitos e linfócitos remanescentes devido ao seu maior tamanho e granulosidade. Todas as análises foram feitas em duplicata.

### III.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se programa computacional Anova seguida pelo teste LSD (teste de variância mínima significativa) e os valores foram considerados quando  $p < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do perfil bioquímico, das contagens globais de hemácias e leucócitos dos 10 cães permaneceram dentro dos limites da normalidade referidos por Kerr (2003), confirmando a boa condição de saúde sugerida pelo exame clínico geral dos animais estudados.

Todas as amostras incubadas com PMA demonstraram uma ativação neutrofílica e aumento na produção de superóxido conforme observado na Tabela 1. Porém, as taxas de produção de superóxido não diferiram entre os tratamentos utilizados  $p > 0,05$ . De acordo com Ward e Mcleih (1995) o PMA estimula a explosão respiratória por atuar na proteína quinase C.

---

<sup>21</sup> Guava EasyCyte Mini ©, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.

<sup>22</sup> Software - Guava Express, CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software. Personal Cell Analysis, v.4.1, 2006. Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.

Tabela 1 – Valores médios, análise de variância e erro padrão da concentração arbitrária de superóxido (Fluorescência vermelha média do brometo de etídio) obtida em citômetro de fluxo utilizando sonda Hidroetidina (HE), do metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães saudáveis incubados com resveratrol nas concentrações de 0, 30, 60 e 90  $\mu$ M. Araçatuba (SP), 2012.

Concentração de resveratrol ( $\mu$ M)	Fluorescência do brometo	
	Com PMA	Sem PMA
0	480.28 <sup>a</sup>	184.52 <sup>b</sup>
30	515.00 <sup>a</sup>	169.02 <sup>b</sup>
60	538.57 <sup>a</sup>	166.33 <sup>b</sup>
90	476.30 <sup>a</sup>	169.90 <sup>b</sup>
Valor de p	0.98	0.72
Média	502.53	175.52
Erro Padrão	80.72	18.37

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste t.

Para evitar qualquer possível artefato nas análises, os neutrófilos foram isolados sempre no mesmo horário e logo após a colheita do sangue. Segundo Franck et al. (2006) os grupos hidroxil do RV são hidrofílicos e diminuem a penetração do mesmo nas membranas. Por esse motivo, deve-se incubá-lo por tempo prolongado, pelo menos maior do que 10 minutos.

Neste experimento utilizando RV na concentração de 90  $\mu$ m, alta de acordo com Cavallaro et al. (2003); Poolman et al. (2005) e FRANCK et al. (2006). Não houve efeito inibidor nos níveis de superóxido, embora, quando comparado os níveis de fluorescência do brometo no grupo com e sem PMA na concentração 90  $\mu$ m com o controle RV 0, observa-se discreto efeito inibidor, mesmo não tendo apresentado significância estatística.

Dentre as técnicas empregadas para detecção de ROS em neutrófilos, algumas mensuram a liberação de ROS extracelular (redução do citocromo c, quimioluminescência amplificada por luminol ou lucigenina) outras, mensuram a liberação de ROS intracelular (NBT e citometria de fluxo analisada por diferentes sondas) (HASEGAWA et al., 1997; KOPPRASCH et al., 2003; HOELZL et al., 2005;

DÁVALOS et al., 2009). Dessa forma, esperava-se que com a técnica de detecção utilizada, citometria de fluxo, a qual apresenta inúmeras vantagens sobre outras, aqui no texto relatadas, obteríamos resultados satisfatórios com a utilização do RV. A sonda HE apresenta especificidade muito boa, porém, pode reagir com o peróxido de hidrogênio além do superóxido (ELBIM; LIZARD, 2009). Também na avaliação de superóxido produzido por células endoteliais a sonda HE é adequada, segundo BARBACANNE et al. (2000).

As doses de RV escolhidas para esse experimento estão de acordo com aquelas observadas em literatura descritas por Tou e Urbizo (2001), Cavallaro et al. (2003) e Poolman et al. (2005) para estudos *in vitro* com células isoladas. No trabalho buscava-se um efeito dose dependente diminuindo a produção de superóxido, semelhantes aos dos autores supracitados, mesmo porque, neste tipo de experimento, a técnica utilizada é mais específica para a detecção de ROS, segundo Kampen et al. (2004).

Neste estudo foi utilizado o trans-resveratrol (não conjugado), *in vivo* se sabe que o RV sofre metabolização intestinal e hepática, o que não ocorre em sistemas *in vitro*. Assim, pode-se imaginar que o seu efeito não foi observado por este motivo, embora Tou e Urbizo (2001) e Cavallaro et al. (2003) utilizaram a mesma forma de RV e comprovaram efeitos. A habilidade do RV em diminuir o estresse oxidativo promovido pelo PMA em macrófagos foi também observado por Ciz et al. (2008), além deste efeito, o composto não alterou a viabilidade celular.

Segundo Freitas et al. (2009) a escolha do meio de incubação bem como a metodologia utilizada para detectar a explosão respiratória de neutrófilos tem uma grande influência nos resultados posteriores. Diversos testes descritos na literatura em sistemas *in vitro* requerem rigoroso controle de diversos parâmetros físicos e químicos como osmolaridade, pH, pO<sub>2</sub> e temperatura; estes cuidados garantem boa viabilidade celular. Os valores médios de fluorescência do brometo deste estudo utilizando metodologia semelhante foram maiores do que aqueles encontrados por Soeiro (2011) e muito menores do que aqueles observados por Eickhoff et al. (2004) utilizando uma concentração menor de PMA, demonstrando a grande variabilidade de resultados de animal para animal e de pesquisador para pesquisador. Aventa-se a hipótese de que o RV pode ter atuado em outro sistema enzimático que não o

NADPH oxidase da membrana celular pois, Van Eeden (1999) recomenda cuidados com a manipulação para reduzir mudanças artefatuais na avaliação da ativação neutrofílica.

O teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) para avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos em equinos foi utilizado por SILVA et al. (2010). Para tal grupo, esse teste constitui-se numa metodologia bastante útil e fácil de ser executada. Porém, em condições de estresse, além do próprio superóxido, o NBT pode ser diretamente reduzido por antioxidantes ou indiretamente por radicais produzidos por antioxidantes (MACDONALD-WICKS et al., 2006), esse foi o motivo pelo qual tal técnica não foi empregada no presente experimento.

O RV pode inibir ou estimular a produção intracelular de ROS, dependendo do tipo celular. O  $H_2O_2$  desencadeia a apoptose por diminuir as quantidades de  $O^{2-}$  e pH citosólico, assim criando um meio intracelular permissivo para a apoptose. Um discreto aumento no  $O^{2-}$  pode inibir a apoptose através de um efeito direto ou indireto na ativação das caspases (AHMAD et al., 2003). Neste trabalho, o aumento nos níveis de superóxido não apresentou correlação com o aumento dos índices apoptótico (dados não publicados).

O efeito inibitório do RV na produção de ROS se deve a sua ação na fosfolipase D (TOU; URBIZO, 2001) sob ação direta no complexo enzimático NADPH oxidase (LEIVO et al., 2004) inibindo a PKC e  $IP_3$  (POOLAN et al., 2005) e extracelularmente por atuar na enzima MPO (FRANCK et al., 2006). Ainda OLIVEIRA et al. (2002) confirmaram a ação sequestrante de ROS ou inibição dos sistemas enzimáticos responsáveis pela sua produção.

São escassos estudos publicados que utilizam a sonda HE para quantificação de superóxido em neutrófilos de cães, necessitando ainda cuidado na interpretação dos resultados obtidos com esta metodologia (SUCH et al., 1999, EICKHOFF et al., 2004). Mesmo assim, pela limitação que outras sondas oferecem, esta tornou-se a de escolha pela sua especificidade (ZIELONKA; KALYANARAMAN, 2010).

## V. CONCLUSÕES

Concluiu-se através deste estudo que neutrófilos isolados de cães saudáveis estimulados com PMA e incubados com RV em diferentes concentrações, durante 4 horas, não alterou a produção de superóxido quando comparado com as células num meio sem RV. Também observou-se que as concentrações de RV utilizadas não afetaram a viabilidade celular.

## VI. REFERÊNCIAS

AQUINO, E. N. Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e estimulados com fator de agregação plaquetária (PAF). 2008, 131 f. Dissertação (mestrado – Patologia molecular) Universidade de Brasília, 2008.

ANDREWS, P. C.; BABIOR, B. N. Phosphorylation of cytosolic proteins by resting and activated human neutrophils. **Blood**, V. 64, n. 4, p. 883-890, 1984.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, V. 9, p. 523–524, 2003.

BARBACANNE, M.A.; SOUCHARD, J.P.; DARBLADE, B.; ILIOU, J.P.; NEPVEU, F.C.; PIPY, B.; BAYARD, F.; ARNAL, J.F. Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. **Free Radical Biology & Medicine**, V. 29, p. 388–396, 2000

BARBOSA, T.S. Efeito do soro urêmico de cães com insuficiência renal sobre o metabolismo oxidativo e apoptose dos polimorfonucleares. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, 2009.

BELLAVITE, P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, V. 4, p. 225-261, 1988

BERTELLI, A.; BERTELLI, A. A. E.; GIOZZINI, A.; GIOVANNIS, L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. **Drugs under experimental and clinical research**. V. 24, p.1233-1238, 1998.

BONINI, A.L.; MOURA, L. AR.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n.2, p. 70-77, 2000.

BRIGADAO, M. R. P. L.; COLEPICOLO, P. Oscillations in superoxide anion released by polymorphonuclear leucocytes and its inhibition by human saliva. **Biological Rhythm Research**. V. 27, n. 3, p. 269-280, 1996.

CALABRESE, E.J.; MATTSON, M. P.; CALABRESE, V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. **Human and Experimental Toxicology**. v.29, p. 980-1015, 2010.

CARDEN, D.L.; GRANGER, D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. v.190, p.255-66. 2000

CASTRO, M.; VEIGA, A. P.M.; PACHECO, M.R. Plasma lipid profile of experimentally induced hyperlipidemic New Zealand White rabbits is not affected by resveratrol. **The journal of applied research**, v.9, n. 1, p. 18-22, 2009.

CAVALARRO, A.; AINIS, T.; BOTTARI, C.; FIMIANI, V. Effect of Resveratrol on Some Activities of Isolated and in Whole Blood Human Neutrophils. *Physiological Research*, vol. 52, p.555-562, 2003.

CIZ, M.; PAVELKOVÁ, M.; GALLOVÁ, M.; KRÁLOVÁ, J.; KUBALA, L.; LOJEK, A. The Influence of Wine Polyphenols on Reactive Oxygen and Nitrogen Species

Production by Murine Macrophages RAW 264.7 **Physiological Research**, v.57, p. 393-402, 2008

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-78.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004

DÁVALOS, A.; la PENÑA, G.; SÁNCHEZ-MARTÍN, C.C.; TERESA GUERRA, M BARTOLOMÉ, B.; LASUNCIÓN, M.A. Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. **British Journal of Nutrition**, v.102, p. 1125–1135, 2009.

De SANTI, C.; PIETRABISSA, A.; SPISNI, R.; MOSCA, F.; PACIFICI, G.M. Sulfation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. **Xenobiotica**, 2000, 30, 857-866.

EICKHOFF, S.; MIRONOWA, L.; CARLSON, R.; LEIBOLD, W.; TIPOLD, A. Measurement of phagocytosis and oxidative burst of canine neutrophils: high variation in healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.109-121, 2004.

ELBIM, C.; LIZARD, G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. **Cytometry Part A**. V. 75, p. 475-481, 2009.

ENGELICH, G.; WRIGHT, D.G.; HARSHORN, K.L. Acquired disorders of phagocyte function complicating medical and surgical illnesses. **Clinical Infectious Diseases**. V. 33, p. 2040-2048, 2001.

FIALKOW L.; WANG Y.; DOWNEY G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 2, p.153-164, 2007.

FRANCK, T.; KOHNEN, S.; DEBY-DUPONT, G.; GRULKE, S.; DEBY, C.; SERTEYN, D. A specific method for measurement of equine active myeloperoxidase in biological samples and in *in vitro* tests. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, V. 18, p. 326–334, 2006.

FREITAS, M.; PORTO, G., LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst *in vitro*. **Talanta**, V. 78, p. 1476–1483, 2009.

GOLDBERG, D.M.; YAN, J.; SOLEAS, G.J.; Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clinical Biochemistry**. V.36, p.79-87, 2003.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**. V. 23, Suppl.1, p. 118-126. 1993.

HEYWORTH, P.G.; BADWEY, J. A. Protein phosphorylation associated with synergistic stimulation of neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, V. 264, n.25, p. 14935-14939, 1989.

HOELZL, C.; BICHLER, J.; FERK.; SIMIC, T.; NERSESYAN, A.; ELBLING, L.; EHRLICH, V.; CHAKRABORTY, A.; KNASMÜLLER, S. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. **Journal of physiology and pharmacology**. V. 56, n. 2, p. 49-64, 2005.

HUISMAN, A.; van de WIEL, A.; RABELINK, T. J.; van FAASSEN, E.E. Wine polyphenols and ethanol do not significantly scavenge superoxide not affect



endothelial nitric oxide production. **Journal of Nutritional Biochemistry**. V. 15, p.426–432, 2004.

IGNATOWICZ, E.; BARTOSZ, B.; SURYANARAYANA, V.; VULIMIRI, V.; SZAEFER, H.; BAER-DUBOWSKA, W. The effect of plant phenolics on the formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts and TPA-stimulated polymorphonuclear neutrophils chemiluminescence *in vitro*. **Toxicology**, V. 189, p. 199-209, 2003.

JANNIN, B.; MENZEL, M.; BERLOT, J.P. DELMAS, D. et al. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. **Biochemical Pharmacology**. V.68, p.1113-1118, 2004.

KAMPEN, A.H.; TOLLERSRUD, T.; LARSEN, S.; ROTH, J.A.; FRANK, D.E.; LUND, A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytesVeterinary. **Immunology and Immunopathology**. V. 97, p. 105–114, 2004.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária, Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2 ed. Roca: São Paulo, 2003, 436 p.

LANCON, A.; DELMAS, D.; OSMAN, H.; THENOT, J. P. Et al. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. **Biochemical and biophysical research communications**. 2004, 316, 1132-1137.

LEIRO, J.; ÁLVAREZ, E.; ARRANZ, J.A.; LAGUNA, R.; URIARTE, E.; ORALLO, F. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. **Journal of leukocyte biology**. V. 75, p.1156-1165, 2004.

LÓPEZ-SEPÚLVEDA, R.; GÓMEZ-GUZMÁN, M.; ZARZUELO, M.J.; ROMERO, M.; SÁNCHEZ, M.; QUINTELA, A.M.; GALINDO, P.; O'VALLE, F.; TAMARGO, J.;

PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; DUARTE, J.; JIMÉNEZ, R. Red wine polyphenols prevent endothelial dysfunction induced by endothelin-I in rat aorta: role of NADPH oxidase. **Clinical Science**. V. 120, p. 321-333, 2011.

LOSA, G.A. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, p. 818-823, 2003

MACDONALD-WICKS, L.K., WOOD, L.G., GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. **Journal of the science of food and agriculture**. v. 86, p. 2046–2056, 2006.

MICHIE, A. M. & NAKAGAWA, R. The link between PKC alpha regulation and cellular transformation. **Immunology Letters**, V.2, n. 96, p. 155-62, 2005.

MOREL, F.; DOUSSIERE, J.; VIGNAIS, P. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. **European Journal of Biochemistry**. V. 201, p. 523-546, 1991

NARAYANAN, P. K.; RAGHEB, K.; LAWLER, G.; ROBINSON, J.P. Defects in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis. **Journal of leukocyte biology**. V. 61, p.481-488, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger. **Princípios da bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2004, 1202 p.

OLIVEIRA, C.A., AZZOLINI, A.E.C.S., SILVA, S.C., KANASHIRO, A., KABEYA, L.M., AZEVEDO, A.P.G.B., GONÇALVES, C.F.F., CORDEIRO, D.S., LEITÃO, D.P.S., GASPAR, L.R., SOUZA, P.L.V., LUCISANO-VALIM, Y.M., MANTOVANI, B., Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. **Eclética Química** V.27, p. 273–284, 2002.

PONGRACZ, J., JOHNSON, G.D., CROCKER, J., BIRNETT, D. and LORD, J.M. "The role of protein kinase C in myeloid cell apoptosis." **Biochemical Society Transactions**, V.22, p. 593-597, 1994.

POOLMAN, T.M.; FARMER, P.B.; MANSON, M.M. Inhibition of the respiratory burst by resveratrol in human monocytes: Correlation with inhibition of PI3K signaling. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 39, p. 118-132, 2005.

RINALDI, M.; MORONI, P.; PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D.D. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V. 115, p. 107–125, 2007.

ROTHER, G.; VALET, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. **Journal of Leucocyte Biology**. V. 47, p. 440-448. 1989

RUAUX, C.G.; WILLIAMS, D.A. 2000. The effect of ex vivo refrigerated storage and cell preservation solution (Cyto-Chex II) on CD 11b expression and oxidative burst activity of dog neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V.74, p.59–69, 2000.

SAITO, M.; SATOH, S. KOJIMA, N.; TADA, M.; SATO, M.; SUZUKI, T.; SENOO, H.; HABUCHI, T. Effects of a phenolic compound, resveratrol, on the renal function and costimulatory adhesion molecule CD86 expression in rat kidneys with ischemia/reperfusion injury. **Archives of Histology and Cytology**. v.68, p. 41-49, 2005.

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., CENDORO GLO M. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Nephrology, Dialysis Transplantation**. V.21, p.160-165, 2006.

SAVILL, J.; FADOK.; HENSON, P.; HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunology Today**, v. 14, p. 131-136, 1993.

SENER, G.; TUGTEPE, H.; YÜKSEL, M.; CETINEL, S.; GEDIK, N.; YEGEN, B.C. Resveratrol Improves Ischemia/Reperfusion-Induced Oxidative Renal Injury in Rats. **Archives of medical research**. v.37, 822-29, 2006.

SILVA, A. C. R. A.; VALADARES, T. C. ALMEIDA, B. F. M.; CIARLINI, P. C. Efeito do EDTA sobre o teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) para avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos de equinos. **ARS Veterinária**, v. 26, p. 124-127, 2010.

SILVA, A.C.R.A. Estresse oxidativo, produção de superóxido e a apoptose de neutrófilos de cães com insuficiência renal crônica. 201. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

SOEIRO, C.S. Mensuração do superóxido e apoptose neutrofílica em cães azotêmicos e urêmicos. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2011, 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária Câmpus de Araçatuba.

SUCH, L., O'CONNOR, J.E., SAÉZ, G.T., GIL, F., BELTRAN, J.F., MOYA, A., ALBEROLA, A. Flow Cytometric Analysis of Peroxidative Activity in Granulocytes From Coronary and Peripheral Blood in Acute Myocardial Ischemia and Reperfusion in Dogs: Protective Effect of Methionine. **Cytometry** v. 37, p. 140–146, 1999.

SZUSTER-CIESIELSKA; A.; SŁOTWIŃSKA, M.; STACHURA ,A.; MARMUROWSKA-MICHAŁOWSKA , H.; DUBAS-ŚLEMP, H.; BOJARSKA-JUNAK, A.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.32, p. 686–694, 2008.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Roca: São Paulo. 582 p. 2007

TIZARD, I.; R. **Imunologia Veterinária**. 8 ed. Elsevier:Rio de Janeiro, 587 p. 2008.

TOKER, A. "Signaling through protein kinase C." **Frontiers in Bioscience**, V. 3, p. 1134-114,1998

TOU, J.; URBIZO, C. Resveratrol inhibits the formation of phosphatidic acid and diglyceride in chemotatic peptide-or phorbol ester-stimulated human neutrophils. *Cellular Signalling*, vol.13, p. 191-197, 2001.

TRINCONI, C.M.; TREVELIN, S.C.; SOUSA, T.; CIARLINI, P.C. Efeito do plasma rico em uréia sobre a apoptose de neutrófilos de cães. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.2, p.96, 2008.

UDENIGWE, C. C.; RAMPRASATH, V.R.; ALUKO, R.E.; JONES, P. J.H. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 8, p. 445-454, 2008.

VAN EEDEN, S.F.; KLUT, M. E.; WALKER, B.A.M.; HOGG, J.C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. **Journal of Immunological Methods**. V. 232, p.23-43, 1999.

VITRAC, X.; DESMOULIERE.; A.; BROUILLAUD, B.; KRISA, S. et al. Distribution of C trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissue after oral administration. **Life Science**. V.72, p.2219-2233, 2003.

YU, C.; SHIN, Y.G.CHOW, A.; LI, Y. et al. Human, rat and mouse metabolism of resveratrol. **International journal of life science and pharma research**. V.19, p. 1907-1914, 2002

WARD, R.A.; McLEISH, K.R. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. **Journal of the American Society of Nephrology**. V. 5, p. 1697-1702, 1995

WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Molecular Nutrition & Food Research**. V. 49, p. 472 – 481, 2005.

WILHELM, J. VYTASEK, R.; OSTADALOVA, I.; VAJNER, L.K.; Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. **Molecular and Cellular Biochemistry**. V. 328, p.167–176, 2009

ZIELONKA , J. KALYANARAMAN, B. Hydroethidine and MitoSox-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 983-1001, 2010.