

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

MENSURAÇÃO DO SUPERÓXIDO E APOPTOSE  
NEUTROFÍLICA EM CÃES AZOTÊMICOS E URÊMICOS

Carolina Soares Soeiro  
Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP  
2011

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

MENSURAÇÃO DO SUPERÓXIDO E APOPTOSE  
NEUTROFÍLICA EM CÃES AZOTÊMICOS E URÊMICOS

Carolina Soares Soeiro  
Orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini

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

ARAÇATUBA - SP  
2011

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**CAROLINA SOARES SOEIRO** – nascida em 09 de junho de 1981, na cidade de Campinas, iniciou e concluiu o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Paulista/Campinas-SP (2002 - 2006). Durante o período acadêmico desenvolveu atividades tais como monitoria e estágios extracurriculares e curriculares. Em 2007 iniciou a Residência em Diagnóstico Veterinário pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *Câmpus* de Araçatuba na qual desenvolveu projetos junto ao orientador que resultaram em trabalhos científicos, e ainda colaborou com projetos de outros discentes da mesma instituição. Em 2009 ingressou no curso de mestrado da Pós Graduação em Ciência Animal da UNESP- Araçatuba continuou a colaborar em projetos de pesquisa do orientador, auxiliou em projetos de iniciação científica e realizou estágio de docência, participando de aulas práticas e teóricas da disciplina de Laboratório Clínico Veterinário. Ainda durante o ano integrou os créditos e desenvolveu seu projeto de pesquisa. Em 09 de junho de 2010 foi aprovada no exame geral de qualificação intitulado “Evidências de disfunção neutrofílica na azotemia não renal em cães” o qual faz parte desta dissertação.

*À minha mãe Vera Lúcia, que na ausência  
de um pai, foi pai e mãe, além de amiga,  
companheira, maior incentivadora e  
exemplo.*

## AGRADECIMENTOS

Á **Deus**, por me dar saúde e coragem para realização dos meus propósitos.

Á **minha Família**, principalmente minha mãe **Vera**, minhas irmãs **Poara, Victória e Regiane** e minha madrinha **Solange**, que são a base, a âncora e o principal refúgio em todos os momentos.

Ao meu marido **Piero Henrique** por ser sempre amigo, companheiro, incentivador, sempre me apoiando e demonstrando todo amor possível.

Aos meus **amigos e amigas** que abriram mão da minha presença nos principais momentos da vida em prol dos estudos e que mesmo assim permaneceram ao meu lado, sendo fundamentais em minha vida.

Ao meu orientador **Professor Paulo César Ciarlini** por me proporcionar esta oportunidade, por todos os ensinamentos, pela dedicação ao longo do projeto, pela disponibilidade de sempre ajudar e sobretudo pela amizade.

Aos meus animais **Pachimina** e **Monstro** pela lealdade e amor sempre incondicional, e por serem, sem dúvidas, os maiores colaboradores deste experimento.

Ás minhas amigas **Marianne Guida** e **Juliana Tessari** por estarem sempre presentes, mesmo quando longe e por me mostrar que sempre vale á pena.

Aos **colegas** do Laboratório Clínico Veterinário da Universidade Estadual Paulista- Araçatuba, que contribuíram com meu estudo das mais variadas formas.

Ao canil da **Polícia Militar** de Araçatuba por permitir coleta de material de seus cães para realização deste estudo.

Á minha banca de qualificação, Profa. Adj. **Valéria Marçal Félix de Lima** e Profa. Dra. **Márcia Marinho**, pelas valiosas sugestões para melhoria deste trabalho. Além disso, agradeço especialmente à Profa. Valéria por sempre dispor de tempo, paciência e atenção a cada amostra lida no citômetro de fluxo.

Ao **Programa de Pós Graduação** em Ciência Animal desta universidade, pela oportunidade de realizar este curso de mestrado.

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

Á Técnica do Laboratório Clínico **Laine Margareth**, e companheira de mestrado, **Adriana Almeida** por toda ajuda, companheirismo e incentivo.

Á todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desta dissertação.

Á todos vocês, o meu mais sincero obrigada!

## SUMÁRIO

## Página

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Origem do problema.....	13
1.2 Investigação primaria do problema – a revisão de literatura.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Neutrófilo e sua importância para defesa imune inespecífica do organismo .....	15
2.2 Metabolismo Oxidativo dos neutrófilos .....	16
2.3 Apoptose dos neutrófilos e relação com o Metabolismo Oxidativo.....	20
2.4 Metabolismo Oxidativo e Apoptose na Insuficiência Renal .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Seleção dos animais e agrupamento experimental .....	28
3.2 Colheita e acondicionamento das amostras .....	28
3.3 Análises laboratoriais .....	28
3.4 Isolamento dos Neutrófilos.....	29
3.5 Delineamento experimental.....	30
3.6 Determinação da produção de superóxido .....	30
3.8 Análise estatística .....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS .....	42

## LISTA DE TABELAS

## Página

Tabela 1- Valores medianos e desvios padrão do hemograma e perfil bioquímico de cães do grupo sadio.	35
Tabela 2 – Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães sadios incubados com plasma canino autólogo normal, urêmico e azotêmico, com e sem ativação com 13-acetato de fobol éster 12-miristato (PMA). Valores médios e desvios-padrão da porcentagem de neutrófilos redutores de tetrazólio nitroazul (NBT) e concentração arbitrária de superóxido (Fluorescência vermelha média do brometo de etídio) obtida em citômetro de fluxo utilizando a sonda Hidroetidina (HE).	36
Tabela 3 – Valores médios e desvios-padrão do índice apoptótico de neutrófilos de cães normais incubados com plasma canino autólogo (PA), urêmico (PU) e azotêmico (PZ), obtido pelo método morfológico, com e sem o uso de Camptotecina (CAM) como indutor de apoptose.	39
Tabela 4 – Valores médios e desvios-padrão da porcentagem de neutrófilos viáveis e apoptóticos inicial (AI), final (AF) e total (AT), obtido pelo sistema Anexina V-PE, utilizando citometria de fluxo capilar, de neutrófilos de dez cães normais incubados com plasma canino autólogo, urêmico e azotêmico, com e sem o uso de Camptotecina (CAM) como indutor de apoptose.	40



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: por cento

$\Sigma$ : somatório

**1O<sub>2</sub>**: forma singleto de oxigênio

**7-AAD**: 7-Amino-actinomicina D

**90LS**: right – angle light scatter

**C**: Celsius

**Ca**: cálcio

**CAM**: indutor apoptótico camptotecina

**Cl<sup>-</sup>**: Íon de cloreto

**DNA**: ácido dinucleotídeo

**EB**: brometo etídio

**EDTA Na**: ácido etilenodiamino tetracético sódico

**EGF**: fator estimulador de epitélio

**ERO**: espécies reativas de oxigênio

**FALS**: forward – angle light scatter

**Fas**: Membro da grande família de receptores de TNF

**FasL**: proteína transmembrana tipo II

**fL**: fentolitros

**fMLP**: formil metionil leucil fenilalanina

**G**: força gravitacional

**GMFSC**: fator estimulador de crescimento de colônia granulócito e macrófago

**H<sup>+</sup>**: íon hidrogênio

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peróxido de hidrogênio

**HBSS**: solução balanceada de sais

**HE**: hidroetidina

**HLA-DR**: antígeno de histocompatibilidade de classe II humano

**HOCl**: Ácido hipocloroso

**IA**: índice apoptótico

**IRA**: insuficiência renal aguda

**IRC**: insuficiência renal crônica

**L**: Litro

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**LPS:** lipopolissacarídeo

**LTB4:** leucotrieno B4

**Mg:** magnésio

**mL:** mililitro

**mmol:** milimol

**MPO:** mieloperoxidase

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** bicarbonato de sódio

**NADP:** nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NADPH:** forma reduzida do dinucleotídeo nicotinamida-adenina

**NBT:** tetrazólio nitroazul

**NH<sub>4</sub>Cl:** cloreto de amônia

**nM:** nanomolar

**nm:** nanômetros

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Superóxido

**OH<sup>-</sup>:** Radical hidroxila

**ONOO<sup>-</sup>:** nitrato de peróxido

**PAF:** fator de agregação plaquetária

**Phox:** produto gênico fosforilado que compõe uma oxidase de fagócitos

**PKC:** proteína quinase C

**PMA:** formol miristato acetato

**PMN:** leucócitos polimorfonucleares

**RPMI:** meio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute

**SOD:** superóxido dismutase

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

**UI:** unidades Internacionais

**UV:** ultravioleta

**$\mu$ M:** micromolar

**$\mu$ mol:** micromol

## MENSURAÇÃO DO SUPERÓXIDO E APOPTOSE NEUTROFÍLICA EM CÃES AZOTÊMICOS E URÊMICOS

**RESUMO** - O metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos de pacientes humanos nefropatas e sua relação com as toxinas urêmicas tem sido, nos últimos anos, amplamente investigados devido sua importância como elemento imunossupressor. Recentemente surgiram evidências de que a uremia causa disfunção neutrofílica em cães nefropatas, porém não se sabe se o acúmulo de compostos nitrogenados, que também ocorrem nas azotemias não renais, igualmente afeta a função dos neutrófilos. O objetivo do presente estudo foi testar *ex vivo* a hipótese de que plasmas urêmicos e azotêmicos igualmente afetam o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães. Para tal, neutrófilos de cães saudáveis foram isolados e incubados com plasma autólogo, plasma de cão azotêmico e urêmico. A produção de superóxido, com e sem o estímulo com PMA, foi estimada pelo método de redução do nitroazul tetrazólio (NBT) e por citometria de fluxo capilar utilizando-se a sonda hidroetidina (HE). A taxa de neutrófilos viáveis, em apoptose inicial e final, foi quantificada por citometria utilizando-se Anexina V-PE e o índice apoptótico mensurado pelo método morfométrico. A produção de superóxido gerada pelos neutrófilos isolados, em ambos os tratamentos (plasma urêmico e azotêmico) apresentou significativa redução ( $p < 0,05$ ). Já a apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis foi acelerada, quando incubados com plasmas urêmico e azotêmico. Pode-se concluir que os componentes presentes nos plasmas urêmicos e azotêmicos alteram *ex vivo* o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos, fortalecendo a hipótese de que *in vivo* ambas condições podem comprometer a imunidade inata de cães.

**Palavras - chave:** uremia, metabolismo oxidativo, explosão respiratória, morte celular, disfunção leucocitária, insuficiência renal.

## MEASUREMENT OF SUPEROXIDE AND NEUTROPHILS APOPTOSIS IN AZOTEMIC AND UREMIC DOGS

**ABSTRACT-** The oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils from human patients with nephropathy and its relation with uremic toxins has been widely investigated in the last years because of its importance as an immunosuppressive element. Recently evidences suggests that uremia causes neutrophil dysfunction in dogs with renal disease, but it is unclear whether the accumulation of nitrogen compounds, which also occur in non-renal azotemia, can as well affect the role of neutrophils. The objective of this study was to test *ex vivo* the hypothesis that uremic and azotemic plasma also affects the oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils in dogs. To this end, neutrophils from healthy dogs were isolated and incubated with autologous plasma, plasma of azotemic and uremic dog. The production of superoxide, with and without PMA stimulation was estimated by the method of nitroblue tetrazolium reduction (NBT) and by capillary flow cytometry using the hydroethidine probe (HE). The rate of viable, in early and late apoptosis neutrophils was quantified by flow cytometry using Annexin V-PE and the apoptotic index was measured by morphometric method. The production of superoxide generated by isolated neutrophils in both treatments (azotemic and uremic plasma) showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ). Neutrophil apoptosis of healthy dogs was accelerated when incubated with uremic and azotemic plasma. In conclusion, the components present in uremic and azotemic plasma change *ex vivo* the oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils, **emphasizing** the hypothesis that *in vivo* both conditions can compromise the innate immunity of dogs.

**Key - words:** uremia, oxidative metabolism, respiratory burst, cell death, leukocyte dysfunction, renal failure.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Origem do problema**

Conforme estudos realizados no laboratório clínico veterinário da UNESP de Araçatuba, ficou constatado que cães e bovinos com quadro inflamatório apresentam um aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, exceto aqueles com quadro de insuficiência renal (SOEIRO et al. 2009). Buscando melhor entender a diferença de resposta neutrofílica de animais com e sem uremia, constatou-se que os compêndios clássicos de clínica veterinária (GRAUER e LANE, 1995; POLZIN et al. 2004 e WARE, 2006) afirmam que cães são bastante susceptíveis à insuficiência renal e que esta condição promove uma imunossupressão. Porém, tais compêndios veterinários fazem referência a estudos realizados em humanos, comprovando a associação entre a alta mortalidade por infecções bacterianas em pacientes urêmicos e a imunossupressão oriunda da disfunção dos polimorfonucleares (PMN).

### **1.2 Investigação primaria do problema – a revisão de literatura**

Para buscar evidências de que a uremia e compostos azotêmicos, a semelhança do que ocorre em humanos, também alteram o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos em cães, realizou-se uma revisão de literatura sistemática. Para tal foram utilizados bancos de dados eletrônicos: Biological Abstracts (1998 a 2010); Academic Search Complete (Academic Search Premier; CINAHL; Library, Information Science & Technology Abstract;) disponíveis no EBSCO (<http://search.ebscohost.com>); CAB Abstracts (1990-03/2010); Pubmed (1966-03/2010) e Web of Science (1998-03/2010).

Investigou-se a hipótese de que a uremia e azotemia de origem nefrogênica alteram a produção de superóxido e a apoptose dos neutrófilos de cães.

A elaboração da pergunta para a realização da revisão possuiu três elementos conceituados na Medicina Baseada em Evidências, conforme preconizado por Castro (2001) - Situação: Leucócitos, polimorfonucleares e

neutrófilos; Intervenção: uremia, azotemia, insuficiência renal e doença renal; Desfecho: metabolismo oxidativo, superóxido, apoptose e morte celular.

A estratégia para busca nas bases de dados supracitadas foi:

((("leukocytes"[MeSH Terms] OR "leukocytes"[All Fields] OR "leukocyte"[All Fields]) OR ("leukocytes"[MeSH Terms] OR "leukocytes"[All Fields] OR ("white"[All Fields] AND "blood"[All Fields] AND "cell"[All Fields]) OR "white blood cell"[All Fields]) OR ("neutrophils"[MeSH Terms] OR "neutrophils"[All Fields] OR ("polymorphonuclear"[All Fields] AND "leukocytes"[All Fields]) OR "polymorphonuclear leukocytes"[All Fields]) OR ("neutrophils"[MeSH Terms] OR "neutrophils"[All Fields])) AND (("uraemia"[All Fields] OR "uremia"[MeSH Terms] OR "uremia"[All Fields]) AND ("azotemia"[MeSH Terms] OR "azotemia"[All Fields]) AND ("kidney failure"[MeSH Terms] OR ("kidney"[All Fields] AND "failure"[All Fields]) OR "kidney failure"[All Fields])) OR cratinine[All Fields] OR ("urea"[MeSH Terms] OR "urea"[All Fields])) AND ("respiratory burst"[MeSH Terms] OR ("respiratory"[All Fields] AND "burst"[All Fields]) OR "respiratory burst"[All Fields]) OR ("respiratory burst"[MeSH Terms] OR ("respiratory"[All Fields] AND "burst"[All Fields]) OR "respiratory burst"[All Fields]) OR ("oxidative"[All Fields] AND "burst"[All Fields]) OR "oxidative burst"[All Fields]) OR ("superoxides"[MeSH Terms] OR "superoxides"[All Fields]) OR ("apoptosis"[MeSH Terms] OR "apoptosis"[All Fields]) OR ("apoptosis"[MeSH Terms] OR "apoptosis"[All Fields] OR ("programmed"[All Fields] AND "cell"[All Fields] AND "death"[All Fields]) OR "programmed cell death"[All Fields]) OR ("cell death"[MeSH Terms] OR ("cell"[All Fields] AND "death"[All Fields])).

Como a pesquisa supra relatada não gerou resultados, visto a limitação de espécie (apenas canina), a mesma foi repetida sem o limite de espécie. Dos artigos identificados, foram selecionados apenas os redigidos na língua portuguesa, inglesa e espanhola.

Como pesquisa complementar, obedecendo aos mesmos critérios, utilizou-se literatura disponível no banco de dados do grupo neutrófilo do Curso de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba (<http://br.groups.yahoo.com/group/neutrofilo/database>) e recurso de pesquisa avançada do Google acadêmico ([www.scholar.google.com.br](http://www.scholar.google.com.br)). O levantamento bibliográfico foi realizado em agosto de 2008 e revisado mensalmente até o final de julho de 2010.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Neutrófilo e sua importância para defesa imune inespecífica do organismo

Os neutrófilos, ou leucócitos polimorfonucleares (PMNs), são os principais tipos de leucócitos encontrados no sangue periférico, compreendendo de 40 a 70% do total de glóbulos brancos sanguíneos, em condições normais. Possuem uma meia vida curta na circulação de apenas seis a dez horas. Da circulação essas células podem migrar para os tecidos, sendo recrutadas a um sítio de inflamação, seguindo um gradiente de quimiocinas específicas, onde permanecem ativas por dois até seis dias. A abundância de neutrófilos no sangue, a eficácia de seu recrutamento e suas ações antimicrobianas e fagocitárias no sítio inflamatório, fazem dessas células uma primeira linha de defesa do sistema imune inato (THRALL et al, 2006).

Os polimorfonucleares são as primeiras células a migrar do sangue para o sítio de infecção e se apresentam com um vasto armamento de defesa contra os agentes infectantes. O processo de migração para o local da inflamação é finamente regulado por citocinas e outros mediadores quimiotáticos, dentre eles C5a, LTB<sub>4</sub>, IL-8 e fator de ativação de plaquetas (COHEN, et al. 2001).

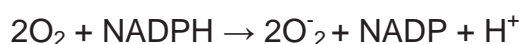
Ao atingir o sítio inflamatório, inicia-se no neutrófilo o processo de fagocitose de microorganismos invasores. Assim como os macrófagos, os neutrófilos também podem internalizar partículas opsonizadas ou não opsonizadas. Os principais receptores de opsoninas (RFc) ligam-se a imunoglobulinas, na porção Fc, além do subgrupo de  $\beta$ 2-integrinas que se liga a partículas ativadas pelo complemento (COHEN, et al. 2001)

A ligação de partículas opsonizadas a um receptor Fc eleva a concentração de tais receptores ao redor da área de contato, e as células estendem seus pseudópodos ao redor da partícula, formando um canal. Então ocorre a fusão deste canal, originando uma vesícula (fagossomo). A ligação do patógeno opsonizado pode ainda desencadear dois outros processos: a geração de compostos reativos de oxigênio, através da enzima NADPHoxidase e a liberação do conteúdo granular para o fagossomo, com o intuito de destruir o agente invasor (JANEWAY, et al. 2007).

## 2.2 Metabolismo Oxidativo dos neutrófilos

Em neutrófilos, monócitos e macrófagos, outro dispositivo antimicrobiano, além da fagocitose, contribui para uma defesa prolongada e efetiva. Esse mecanismo oxidativo emprega espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (RNs), que são gerados a partir do ânion superóxido produzido pelo complexo NADPHoxidase. As partículas fagocitadas são internalizadas nos fagossomos, onde os EROs e RNs exercem função de antimicrobicidas (TUNG, et al. 2009).

O complexo NADPHoxidase catalisa a produção do ânion superóxido  $O_2^-$  pela redução do oxigênio, tendo o NADPH como doador de elétrons (BEUTLER, 2004).



Este complexo possui ainda componentes citosólicos e ligados à membrana, que são requeridos para sua ativação. A fração membranar, chamada de flavocitocromo b558 é constituída pelas proteínas p22phox, e gp91phox. Já a fração citosólica é constituída por p47phox, p67phox, p40phox e Rac2, que precisam translocar-se para a membrana durante a ativação do complexo (figura 1) (AMBRUSO et al. 2004).

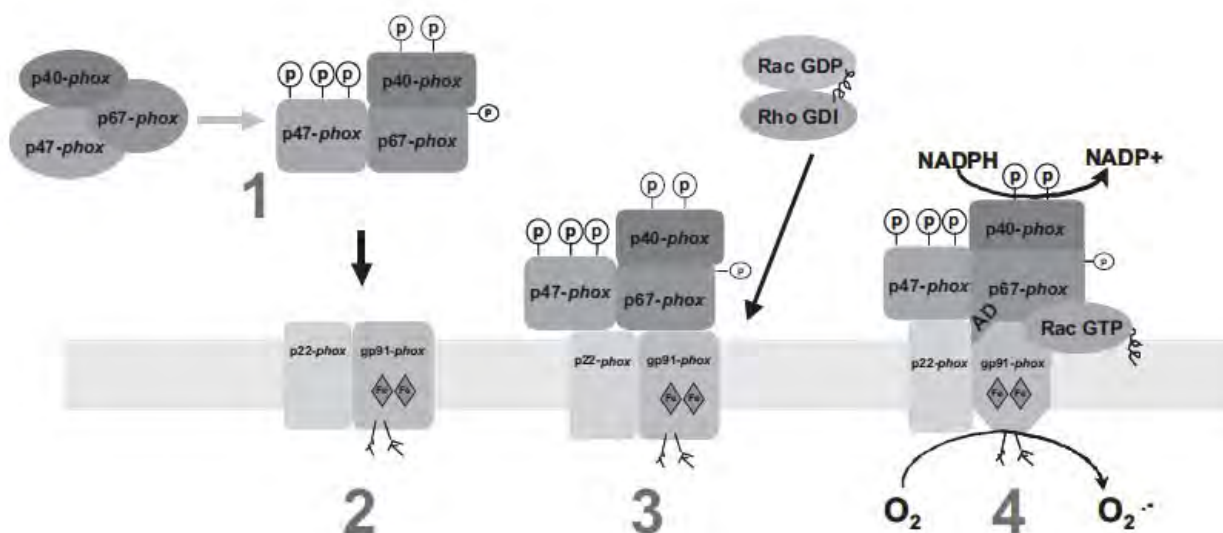


Figura 1. Ativação da NADPHoxidase: os componentes p47phox, p67phox e p40phox são fosforilados após ativação celular (1), e migram para a membrana onde se associam aos componentes gp91phox e p22phox (2). Ao mesmo tempo, Rac se dissocia de seu inibidor rho-GDI e migra para a membrana (3). O citocromo b558 é ativado pelo domínio de ativação (AD) e Rac2 promove a interação entre p67phox e o citocromo (4). NADPHoxidase ativada usa o NADPH para reduzir o oxigênio e produzir ânions superóxido (El-Benna et al. 2005).



O ânion superóxido por si só não é um agente oxidante, porém é um importante substrato para a geração de agentes oxidantes mais poderosos por meio de reação envolvendo a enzima superóxido dismutase (SOD):  $2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^- = \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . Dentre as EROs que são geradas a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  encontram-se o ácido hipocloroso cuja formação depende da ação da mieloperoxidase (MPO):  $\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ = \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ . Segundo Vlessis et al. (1995) estes compostos são microbicidas muito potentes e formam outros metabólitos que também destroem micróbios, tais como oxigênio na forma singlete ( $1\text{O}_2$ ) e a radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ). A hidroxila pode ser produzida via reação de Fenton independentemente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^-$ , assim como espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito, podem ser produzidas por reação espontânea tendo  $\text{O}_2^-$  como substrato:  $\text{NO} + \text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$  (BEUTLER, 2004).

Kitchen, et al. (1996), evidenciaram que neutrófilos estimulados podem retornar ao estado de repouso, porém, uma vez atingido o estado ativado não há retorno ao estado inicial.

Os neutrófilos possuem três distintos fenótipos, classificados como repouso ou quiescente; estimulado e ativado. Os quiescentes são observados na ausência de estímulos, permanecendo na circulação sanguínea, não aderentes ao endotélio e sem alterações na expressão de receptores de membrana. O neutrófilo estimulado é aquele encontrado na primeira fase da resposta inflamatória e caracteriza-se por expressar moléculas de adesão e apresentar modificações morfológicas que permitem a sua adesão e diapedese, porém difere do neutrófilo ativado por produzir poucas EROs e não fagocitar (Aquino, 2008). Neutrófilos estimulados mostram-se mais sensíveis à degranulação e à ativação da NADPHoxidase após ação de um segundo estímulo. Agentes estimuladores que não despertariam estas funções nos neutrófilos quiescentes, conseguem desencadeá-las em neutrófilos estimulados. Os neutrófilos completamente ativados além de apresentarem capacidade de aderir firmemente ao endotélio, também são capazes de realizar diapedese, chegando ao sítio de infecção e iniciando fagocitose e explosão respiratória (Sheppard, et al. 2005)..

Agentes com formil peptídeo met-leu-phe (fMLP), lipopolissacarídeo (LPS), fator de agregação plaquetária (PAF), fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), fator estimulador de crescimento de colônia granulócito e macrófago

(GMFSC), possuem capacidade de estimular os neutrófilos em baixas concentrações. Dependendo da concentração, alguns ativadores como o fMLP, LPS e do 13-acetato de fobol éster 12-miristato (PMA) também podem ser estimuladores (SANTOS, 2007).

TNF- $\alpha$  é um fraco ativador do metabolismo oxidativo, porém quando utilizado associado ao zimozan e EGF (fator estimulador de eptélio) aumenta a explosão respiratória. O LPS isoladamente igualmente promove um estado de ativação inicial, porém quando associado a um segundo estímulo de fMLP causa um aumento significativo da explosão respiratória dos neutrófilos. O PMA é um ativador solúvel análogo ao diacilglicerol que permeia a membrana plasmática neutrofílica e ativa diretamente as isoformas de proteínas quinase C (PKC) intracelulares que por sua vez ativam o sistema NADPHoxidase, promovendo a explosão respiratória em concentrações de 10nM a 1 $\mu$ M (SANTOS, 2007).

Estudo comparativo in vitro entre PAF, fMLP, PAF+fMLP, PMA, para verificação do perfil de ativação neutrofílica pela explosão respiratória frente a diferentes estímulos, revelou que o PAF isoladamente é um fraco ativador do metabolismo oxidativo pois apenas estimula os neutrófilos sem ativá-los. O fMLP em baixas concentrações exerceu função semelhante ao PAF, porém quando associado a este promoveu completa ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Neste mesmo estudo o PMA em baixa concentração promoveu uma completa ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos sem passar por fase intermediária de estimulação (BOTHÁ et al. 1995).

Diversos métodos são utilizados para se avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, como a determinação do consumo de oxigênio, o teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT), a redução do ferricitocromo C, a quimioiluminescência, a determinação da mieloperoxidase, sendo, estes dois últimos, considerados trabalhosos e complicados (RICHARDSON et al., 1998). Nas últimas décadas a citometria de fluxo foi desenvolvida para identificar os produtos do metabolismo oxidativo, sendo uma metodologia mais simples e capaz de mensurar a atividade de centenas de neutrófilos em um período muito curto de tempo (BASS et al., 1983).

O NBT é um corante supravital amarelo claro que sofre redução na presença do ânion superóxido, sendo as células redutoras facilmente

identificadas e quantificadas por apresentar reação intracitoplasmática azul escuro denominada formazan. O teste de redução do NBT é de baixo custo, prestando-se muito bem a avaliação do metabolismo oxidativo dos fagócitos (GORDON et al., 1973). A principal causa do aumento de neutrófilos redutores de NBT é a infecção bacteriana, sendo possível detectar este tipo de infecção antes mesmo de qualquer alteração clínica e ou laboratorial (RICHARDSON et al., 1998).

Especificamente para o NBT, fatores como a temperatura, tempo de incubação (SELA et al., 2005), tipo e a concentração de anticoagulante (FREITAS et al., 2008, SILVA et al., 2008) e de estimulante (CENDOROGLIO et al., 1999) podem influenciar o resultado. Shalekoff et al. (1998) demonstraram que a expressão de dois receptores de superfície (HLA-DR e CD11b) importantes na ativação dos PMN, são influenciados pela manipulação além da temperatura de incubação e do anticoagulante utilizado.

Os produtos oxigenados gerados pela “explosão respiratória” são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e possuem um papel fundamental na destruição do tecido inflamatório, uma vez que essas formas reativas de oxigênio provocam reações secundárias de descarboxilação oxidativa, desaminação oxidativa, peroxidação e halogenação, capazes de destruir bactérias e outras células (BROWN, 2008). Porém a produção deficiente ou exacerbada de ERO implica no comprometimento da função celular (GROEMPING & RITTINGER, 2005). Segundo Martins (2005) o maior estado de ativação de neutrófilos na sepse humana promove um aumento do metabolismo oxidativo. Todavia, nas fases iniciais da sepse a produção elevada de espécies reativas de oxigênio está relacionada a uma resposta efetiva para resolução do processo infeccioso e em fases mais avançadas parece estar relacionada a um maior dano tecidual.

As ERO podem reagir com todas as macromoléculas biológicas, ou seja, os lipídeos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos, porém sob condições normais, as mitocôndrias possuem eficientes mecanismos bioquímicos de defesa que neutralizam seu efeito (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Tais mecanismos incluem os sistemas enzimáticos glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase, NADP desidrogenase (NADPH) e vitamina E e C (MCGOWAN et al., 1996). Mesmo a

mitocôndria sendo a principal produtora de ERO, existem outras fontes celulares para sua formação e todos os componentes celulares são susceptíveis à sua ação, porém a membrana é um dos mais atingidos, sofrendo tanto alterações na sua estrutura quanto na permeabilidade. Em consequência, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de produtos citotóxicos que culmina com a morte celular (DeCOURSEY e LIGETI, 2005).

### **2.3 Apoptose dos neutrófilos e relação com o metabolismo oxidativo**

Apoptose é um processo programado de morte celular, ativo, com controle intrínseco, influenciado por fatores externos (BONINI et al., 2000). Pode ser iniciada por estímulos fisiológicos ou patológicos. Dentre os processos patológicos podem ser citadas a resolução de processos inflamatórios, neoplasias, injúrias teciduais não suficientemente intensas para causar necrose, e as atrofia patológicas de diversos tecidos por várias causas (p.ex.: isquemia, privação hormonal em tecido dependente, privação de fatores de crescimento, calor, radiação, HIV) (BONINI et al., 2000; KANNAN e JAIN, 2000; RACHID et al., 2000; JABER et al., 2001).

Vários mecanismos estão envolvidos na apoptose, dentre eles a síntese protéica, expressão de antígenos de superfície, perda da adesão celular, manutenção da atividade metabólica e produção de energia com preservação da integridade da membrana plasmática e de organelas citoplasmáticas (BONINI et al., 2000; ANAZETTI e MELO, 2007). Portanto, a célula apoptótica reorganiza o citoesqueleto e, em vez de edemaciar e romper, encolhe e produz corpos apoptóticos que são rapidamente ingeridos por fagócitos (macrófagos) que os reconhecem por intermédio dos antígenos de superfície produzidos durante o processo (BONINI et al., 2000; MELLEY et al., 2005; HART et al., 2008). Caso não ocorra a fagocitose pelos macrófagos, os corpos apoptóticos eventualmente iniciam um processo de necrose secundária (MELLEY et al., 2005). Esta necrose é um processo de morte “acidental” que ocorre devido à exposição da célula a estímulos nocivos muito intensos como, por exemplo, anóxia, toxinas, calor e radiação (BONINI et al., 2000). É caracterizada pelo inchaço e falência mitocondrial, manutenção da cromatina,

perda da integridade da membrana com inchaço celular e eventualmente ruptura. Isto resulta na liberação de compostos celulares, incluindo proteases e lisossomos, dentro do espaço extracelular causando posteriormente ativação de células inflamatórias e perpetuação da inflamação (ANAZETTI e MELO, 2007).

As ERO produzidas durante a “explosão respiratória”, quando liberadas no citosol dos neutrófilos, alteram o estado redox da célula e oxidam componentes celulares, alterando sua função (FIALKOW et al., 2007). Sob condições patológicas, tais radicais são liberados no meio extracelular, onde são responsáveis pelo dano tecidual durante uma resposta inflamatória não controlada (FLOCCARI et al., 2005).

Neutrófilo que sofre apoptose tem suas funções de quimiotaxia, fagocitose e produção de superóxido prejudicada (WHYTE et al., 1993). Segundo Khan et al. (2009), a apoptose é um fenômeno complexo que possui três fases: indução, execução e degradação. Afirmam ainda que existem vários mecanismos para apoptose de células de mamíferos. Estes incluem o meio intrínseco, extrínseco e fatores indutores da apoptose.

O mecanismo intracelular responsável pela apoptose parece ser similar em todas as células animais, sendo dependente de uma família de proteases chamadas de caspases que clivam as DNases, ativando-as e promovendo irreversível quebra da lâmina nuclear e fragmentação do DNA (ALBERTO et al., 2002).

A maioria dos mediadores da apoptose estão localizados na superfície celular, citosol, citoesqueleto, mitocôndria e núcleo celular (KANNAN; JAIN, 2000). O processo é altamente regulado, e envolve a ação de vários indutores, mas o mecanismo genético da apoptose dos PMN ainda é vagamente entendido (MAJEWSKA et al., 2003). Sabe-se que a mitocôndria tem um papel central na iniciação da apoptose, liberando proteínas relacionadas à apoptose que normalmente estão presentes no espaço de intermembranas, no citoplasma (FU, et al. 2006). O excesso de estresse oxidativo mata células, quer seja por necrose ou por apoptose. Em muitos modelos de apoptose, alterações no estado redox da célula ocorrem antes da ativação da caspase (ZAMZAMI et al., 1996).

Algumas enzimas são críticas para o funcionamento normal de qualquer célula, dentre as mais importantes, destaca-se as enzimas topoisomerases I e II. São elas quem mantêm a integridade do DNA, reparando-o quando danificado. Qualquer alteração no balanço entre estas enzimas é suficiente para induzir a apoptose (SILVA, et al. 2008). As substâncias que atuam nas topoisomerases são divididas em duas classes. A primeira classe é composta por substâncias estabilizadoras do complexo topoisomerase DNA e a segunda por substâncias inibidoras catalíticas da topoisomerase. Os inibidores das topoisomerases I e II pelo primeiro mecanismo são mais numerosos, como exemplo o alcalóide quinolítico camptotecina (CAM), isolado de uma árvore nativa chinesa *Camptotheca acuminata* (SEN, et al. 2004).

A CAM é um tradicional inibidor da topoisomerase, capaz de inibir a síntese de DNA, causando morte celular durante o ciclo celular (LIN, et al. 2008). A utilização da CAM tem sido bastante empregada em células cancerígenas, com intuito de fazer com que células malignas percam a habilidade de se reparar, induzindo a apoptose (SEN, et al. 2004).

## **2.4 Metabolismo Oxidativo e Apoptose na Insuficiência Renal**

Azotemia é definida como o aumento da concentração de resíduos nitrogenados não protéicos no sangue, particularmente a uréia, creatinina e ácido úrico (GUYTON e HALL, 2002). As causas não necessariamente são por lesões do parênquima renal (KERR, 2003), podendo ser pré-renal como consequência da má perfusão renal (p.ex.: desidratação grave e insuficiência cardíaca) e a azotemia pós-renal resultante da interferência na excreção da urina do organismo (p.ex.: obstrução urinária e uroabdome). A azotemia renal primária ocorre quando 75% ou mais dos néfrons tornam-se afuncionais, podendo ser classificada como insuficiência renal aguda (IRA) ou crônica (IRC). Por definição, o termo uremia refere-se à somatória de sinais clínicos e laboratoriais associadas a uma perda crítica de néfrons e inclui as manifestações extra renais (gastrenterite urêmica, hiperparatireotismo) da insuficiência renal (DI BARTOLA, 2004). Embora a concentração sérica da uréia correlacione-se bem com os sinais clínicos da uremia, a taxa de filtração



glomerular é avaliada melhor pela determinação sérica de creatinina (BRAUN et al., 2003).

Em pacientes humanos a insuficiência renal crônica é um problema de saúde pública mundial, possuindo crescente incidência (ARORA e VERRELLI, 2008). Os pacientes renais terminais são considerados grupo de alto risco para desenvolver sepse letal e a infecção bacteriana é responsável por mais de 15% das mortes de nefropatas terminais e hemodialisados (CENDOROGLO et al., 1999), mantendo-se como a segunda maior causa de morte em pacientes humanos em estágio final de doença renal (PAHL, et al. 2009). Acredita-se que a alta mortalidade por infecções bacterianas em pacientes humanos com lesões renais terminais seja devido à ação inibidora da uremia sobre a função dos neutrófilos (COHEN et al. 1997). O mecanismo responsável pela redução da função neutrofílica em paciente humanos urêmicos ainda não é bem compreendida, porém é atribuída a sobrecarga de ferro, deficiência de zinco, ao aumento de cálcio ionizado intracelular devido ao hiperparatireoidismo, a anemia, a desnutrição e a própria diálise (COHEN et al., 1997; CENDOROGLO et al., 1999; ANDING et al.; 2003; CHOCHOL, 2006).

As toxinas urêmicas são compostos plasmáticos circulantes acumulados no soro dos portadores de insuficiência renal (COHEN et al., 1997). Dentre elas, a mais conhecida é a uréia por ser a mais estudada na abordagem clínico-patológica nefropática. Segundo Vanholder et al. (2008) a uréia *per se* parece ter ausência de toxicidade contudo, seu efeito tóxico se faz pelo acúmulo simultâneo com outras substâncias de ação biológica. As guanidinas (HIRAYAMA et al., 2000), a leptina (OTTONELLO et al., 2004), o p-cresol (SCHEPERS et al., 2007), a uréia e a  $\beta$ 2-microglobulina (HAAG-WEBER et al., 1994) representam alguns dos mais de 100 solutos urêmicos identificados em pacientes com nefropatias graves e que potencialmente alteram a função neutrofílica (VANHOLDER et al., 2008). Especula-se que cada toxina urêmica tenha efeitos distintos na função e viabilidade dos neutrófilos (SARDENBERG et al., 2006). O p-cresol afeta a atividade da mieloperoxidase e diminui a explosão respiratória dos neutrófilos de maneira dose dependente na IRC (Hörl, 2001). Os componentes guanidínicos agem sobre os neutrófilos inibindo em 50% a produção de superóxido, diminuindo

em 60% a concentração de ATP e inibindo em 45% a produção de lactato (HIRAYAMA et al. 2000).

Com utilização do NBT, Chretien e Garagusi (1972) verificaram que pacientes urêmicos possuíam maior porcentagem de neutrófilos redutores no teste estimulado com látex quando comparados a indivíduos normais, apesar de não terem observado diferença significativa no teste não estimulado ou com maiores concentrações de estimulantes. Posteriormente, Mcleish et al. (1996), Rysz et al. (2004) e Sela et al. (2005) também observaram maior produção de radicais de oxigênio em neutrófilos de pacientes urêmicos quando comparados aos de indivíduos normais. Diferentemente, Harabayashi et al. (1988) e Haag-Weber et al. (1993) identificaram menor produção de peróxido de hidrogênio e outros radicais de oxigênio pelos neutrófilos de pacientes urêmicos quando comparados aos de indivíduos normais. Cendoroglo et al. (1999) verificaram inibição da produção de superóxido em neutrófilos de pacientes urêmicos estimulados com fMLP, porém não com PMA. Já Gastaldello et al. (2000) e Anding et al. (2003) não observaram diferença entre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de pacientes urêmicos não dialisados e controles, atribuindo o uso de membranas bioincompatíveis como responsáveis pela elevação na produção de radicais de oxigênio nos pacientes tratados.

Em estudo *ex vivo*, Vanhloder et al. (1994) e Cendoroglo et al. (1999) verificaram que neutrófilos de indivíduos normais possuem redução do metabolismo oxidativo quando expostos ao plasma de pacientes urêmicos. Diferentemente, Mcleish et al. (1996) observaram que o metabolismo oxidativo de neutrófilos de indivíduos normais aumenta quando incubados com plasma de pacientes com insuficiência renal. Recentemente, o grupo de pesquisa de neutrófilo da UNESP de Araçatuba verificou que os PMN de sangue total de cães sadios incubados com soro enriquecido com uréia não tiveram sua produção de superóxido afetada (TREVELIN et al. 2008). Em outro estudo do grupo, Barbosa (2009) constatou uma diminuição da produção de superóxido em PMN de sangue total de cão sadio quando incubado com soro de cão urêmico.

Sardenberg et al.(2006), afirmam que os resultados conflitantes sobre o efeito da uremia sob o metabollismo oxidativo não se restringe aos diferentes estimulantes utilizados, mas a vários fatores como meio de cultivo,



concentração de plasma autólogo, técnicas de isolamento e métodos analíticos.

De acordo com Cendoroglo et al. (1999), a mortalidade causada por infecção bacteriana secundária em pacientes portadores de insuficiência renal é alta devido a disfunção dos PMN ocorrida por uma diminuição da produção de superóxido e pela aceleração da apoptose. Cohen et al, (2001) afirmam que toxinas urêmicas modulam funções essenciais de neutrófilos, bem como sua apoptose. Consideram ainda que fatores pró e anti apoptóticos são necessários para a manutenção de uma resposta imunológica eficaz. Neste estudo, os autores avaliaram os efeitos de proteínas séricas modificadas de glicose e cadeias leves de imunoglobulinas livres (IgLCs) na função e apoptose de neutrófilos. Ambos os grupos de proteínas são encontrados em níveis elevados em soro de pacientes urêmicos. Observaram que, sob efeito de proteína modificada de glicose, houve tanto um aumento dos movimentos quimiotáticos, quanto um aumento da apoptose dos neutrófilos. Por outro lado, observaram que a presença de IgLCs, diminuem a quimiotaxia e aumentam o percentual de neutrófilos viáveis, através da inibição da apoptose. Com isso, os autores concluíram que tanto proteínas modificadas de glicose, quanto IgLCs podem ser consideradas toxinas urêmicas, contribuindo para disfunção imune nos pacientes urêmicos.

Segundo Jaber et al. (2001) os neutrófilos de pacientes com IRC, diferentemente dos neutrófilos normais, apresentam maior susceptibilidade à apoptose *in vitro*. Isto ocorre em paralelo ao aumento da expressão na superfície celular de Fas e FasL. Isto indica que a retenção de solutos urêmicos pode resultar em desarranjo celular, promovendo a morte celular programada. Majewska et al. (2003) verificaram, *in vivo*, que o aumento do fator de expressão Fas/Apop-1 gerados durante a uremia foi responsável pela aceleração da apoptose dos PMN em pacientes urêmicos, com relação aos indivíduos controle sadios.

Cendoroglo et al (1999) demonstraram *in vitro*, em pacientes humanos, que a apoptose é acelerada em PMN urêmicos e também que plasmas urêmicos induzem a apoptose em PMN normais, o que sugere a existência de algum(s) determinado(s) fator(s) solúvel(s) que pode também induzir a apoptose, resultando em um mecanismo disfuncional que é similar àquele

observado em PMN urêmicos. Foi possível verificar um aumento de 33% da taxa de apoptose dos PMN normais quando incubado com soro urêmico, porém as taxas de apoptose dos PMN urêmicos quando incubados com soro normal não diferiram, sugerindo dessa forma que os PMN urêmicos são mais propensos a apoptose, mesmo quando submetidos a uma condição normal. Os autores afirmam ainda que, em fase inicial da uremia, ocorre aumento na produção de radicais de oxigênio pelos neutrófilos, induzindo a apoptose, e resultando, em uma fase tardia, na redução no metabolismo oxidativo.

Sardenberg et al.(2006), de modo similar, observaram que pacientes humanos com insuficiência renal crônica, não tratados, tinham uma maior taxa de apoptose quando comparados com controles e pacientes submetidos à hemodiálise, sugerindo que a toxicidade urêmica atua na apoptose dos PMN e que a diálise pode minimizar a taxa de apoptose. Koller et al. (2004), diferentemente, verificaram discreta diminuição da apoptose ao incubar PMN normais com soro urêmico e PMN de pacientes urêmicos com soro normal.

Novos estudos indicam que a linfopenia B em indivíduos com falência renal crônica pode ser parcialmente atribuída ao aumento da susceptibilidade para a morte celular por apoptose que está associada com o declínio da expressão de bcl-2 (Fernández-Fresnedo et al., 2000), onde o mesmo raciocínio pode ser usado em relação aos PMNs.

Ao investigar as concentrações de  $Ca^{2+}$  intracelular sobre efeito de inibidor da enzima  $Ca^{2+}$  ATPase, resultando em aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular; considerando que este aumento modula diversas funções dos PMNs, dentre elas a apoptose, Cohen et al, (2008), diferentemente de outros autores, observaram que a apoptose não é atenuada em PMN de pacientes urêmicos; ao menos não sob influência da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular.

Trinconi et al. (2008), em estudo realizado pelo grupo de pesquisa de neutrófilos da UNESP de Araçatuba, constataram aceleração da apoptose em PMN de sangue total de cães saudáveis incubados com soros homólogos enriquecidos com uréia. Já Barbosa (2009), em outro estudo do grupo, observou que, apenas a metade dos neutrófilos isolados e incubados com soro de cães urêmicos apresentaram diminuição do metabolismo oxidativo e aceleração da apoptose, fortalecendo a hipótese de que cães com de insuficiência renal têm sua imunidade inata comprometida.

## **OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi testar *ex vivo* a hipótese de que plasmas urêmicos e azotêmicos igualmente afetam o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção dos animais e agrupamento experimental**

Cães adultos de ambos os sexos e diferentes raças foram submetidos a um prévio exame físico geral e a exames laboratoriais complementares (Hemograma completo, proteína plasmática total, fibrinogênio plasmático, urinálise tipo I, albumina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, glicose e frutossamina plasmática). Conforme os critérios clínicos-laboratoriais de Kerr (2003) e Di Bartola (2004) os cães foram selecionados e agrupados: Grupo urêmico, constituído por 10 cães nefropatas adultos com taxa de uréia sérica superior a 35 mmol/L; grupo azotêmico, constituído por 10 cães não nefropatas com taxa de uréia entre 8-35 mmol/L; e grupo autólogo ou controle, constituído por 10 cães considerados clinicamente sadios, com valores de uréia plasmática inferior a 8 mmol/L. Animais recentemente vacinados ou submetidos a algum tipo de tratamento que afeta a função renal ou leucocitária foram excluídos do estudo.

#### **3.2 Colheita e acondicionamento das amostras**

Após jejum de 12 horas, colheu-se 10 mL de sangue total de cães, utilizando seringas e agulhas estéreis. Cada amostra foi acondicionada em tubos de vidro siliconizados (7 mL) contendo 10 U heparina sódica<sup>1</sup>/ml sangue para avaliação do metabolismo oxidativo e determinação do índice apoptótico. Para a realização do hemograma, parte do sangue total foi acondicionada em tubos com anticoagulante do tipo EDTA potássico. As amostras foram mantidas refrigeradas por no máximo duas horas até o momento de seu processamento.

#### **3.3 Análises laboratoriais**

A contagem total de leucócito e eritrócito, e a concentração de hemoglobina foram obtidas com auxílio de contador eletrônico de células sanguíneas<sup>2</sup> e o volume globular pelo método microcapilar de Strumia (centrifugação 12700 G/5 minutos). A contagem diferencial de leucócitos foi

---

<sup>1</sup> Heparina sódica HEPTAR<sup>®</sup>, EUROFARMA, Brasil.

<sup>2</sup> Contador eletrônico hematológico veterinário, Mod. CC-530, CELM, São Paulo-SP.

feita em esfregaços sangüíneos tingidos com corante hematológico panótico rápido comercial<sup>3</sup>, segundo as recomendações e critérios de Jain (1986). Todas as análises bioquímicas foram realizadas em um analisador bioquímico automatizado<sup>4</sup>. Utilizando conjunto de reativo comercial, a concentração plasmática de uréia foi determinada pelo método enzimático UV (urease/ Glutamato desidrogenase)<sup>5</sup>; de creatinina pelo método cinético (Picrato alcalino)<sup>6</sup>; de albumina pelo método de verde de bromocresol<sup>7</sup>, ácido úrico pelo método<sup>8</sup>; do colesterol pelo método enzimático oxidase/peroxidase<sup>9</sup>, glicose pelo método enzimático (glicose oxidase/Peroxidase)<sup>10</sup>, frutossamina pelo método colorimétrico de redução do NBT<sup>11</sup>. Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

### 3.4 Isolamento dos Neutrófilos

De cada animal saudável, quatro mililitros de sangue total heparinizado (100 UI/mL) obtidos em frascos estéreis<sup>12</sup> foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno estéreis contendo duplo gradiente de separação composto de volumes iguais (3 mL) de Histopaque-1119<sup>13</sup> e 1077<sup>14</sup>. Após centrifugação a 340 G por 30 minutos a camada de polimorfonucleares foi aspirada e lavada duas vezes com solução aquosa de cloreto de amônio (4,01g NH<sub>4</sub>Cl; 0,8 g EDTA-Na; ,42g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) para total lise dos eritrócitos residuais. Em seguida a amostra foi centrifugada (100 G) durante cinco minutos com HBSS<sup>15</sup> sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e ao sedimento celular foi acrescido um mililitro de HBSS. Após determinada a concentração em hemocítmetro e a viabilidade celular estimado pelo método de exclusão do azul tripan conforme descrito por Metcalf et al. (1986), a amostra foi diluída em meio RPMI<sup>1</sup> para obter

---

<sup>3</sup> Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

<sup>4</sup> Analisador automático BTS, mod. 370 plus, BioSystems, Barcelona, Spain..

<sup>5</sup> Urea/BUN-UV, Cod. 11516, BioSystems, Barcelona, Spain.

<sup>6</sup> Creatinine, Cod.11502, BioSystems, Barcelona, Spain.

<sup>7</sup> Albumine, Cod.11574, BioSystems, Barcelona, Spain.

<sup>8</sup> Uric acid, Cod.11802, BioSystems, Barcelona, Spain.

<sup>9</sup> Cholesterol, Cód.11505, BioSystems, Barcelona, Spain.

<sup>10</sup> Glucosa, Cod.11503, BioSystems, Barcelona, Spain.

<sup>11</sup> Frutosamine NBT, Cod. 11046, BioSystems, Barcelona, Spain.

<sup>12</sup> Labor import, Cod. 50091, Wei Hai, China.

<sup>13</sup> Histopaque®-1119, Cod. 1119-1, Sigma, St. Louis, USA.

<sup>14</sup> Histopaque®-1077, Cod. 1077-1, Sigma. St. Louis, USA.

<sup>15</sup> Hanks balanced salt solution (HBSS) modified, Cod. H 9394, Sigma, St. Louis, USA.

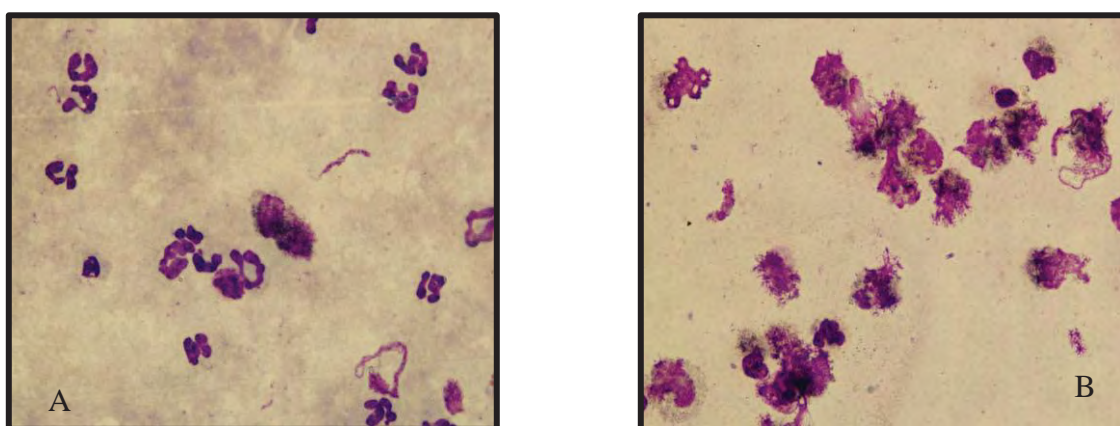
concentração celular final de  $2 \times 10^6$  mL. A pureza da amostra foi certificada pela contagem diferencial dos tipos celulares.

### 3.5 Delineamento experimental

A suspensão de neutrófilos ( $2 \times 10^6$  mL) em meio RPMI dos cães do grupo controle foi incubada por duas horas a  $37^\circ\text{C}$ , em volumes iguais, com o plasma autólogo, plasma de cães azotêmicos e plasma de cães urêmicos. Todos os ensaios foram realizados simultaneamente e imediatamente após o isolamento.

### 3.6 Determinação da produção de superóxido

A produção de superóxido em neutrófilos foi avaliada pelo método de redução do NBT. Para tal adicionou-se  $100\mu\text{L}$  de suspensão de neutrófilos ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) em dois microtubos de  $1,5\text{ mL}$  estéreis contendo  $50\mu\text{L}$  de solução salina 0,2% de NBT, um dos tubos com acréscimo de PMA<sup>16</sup> ( $535\ \mu\text{mol/L}$ ). Após incubação ( $37^\circ\text{C}$ ) por dez minutos em agitador térmico microprocessado<sup>17</sup>, as amostras foram centrifugadas em centrífuga citológica<sup>18</sup> por cinco minutos a 400 G e tingidas com corante panótico rápido<sup>19</sup>. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem mínima de 100 neutrófilos.



**Figura 2.** (A) Neutrófilos isolados apresentando redução de NBT, sem estímulo. (B) Neutrófilos isolados estimulados com PMA, apresentando redução de NBT.

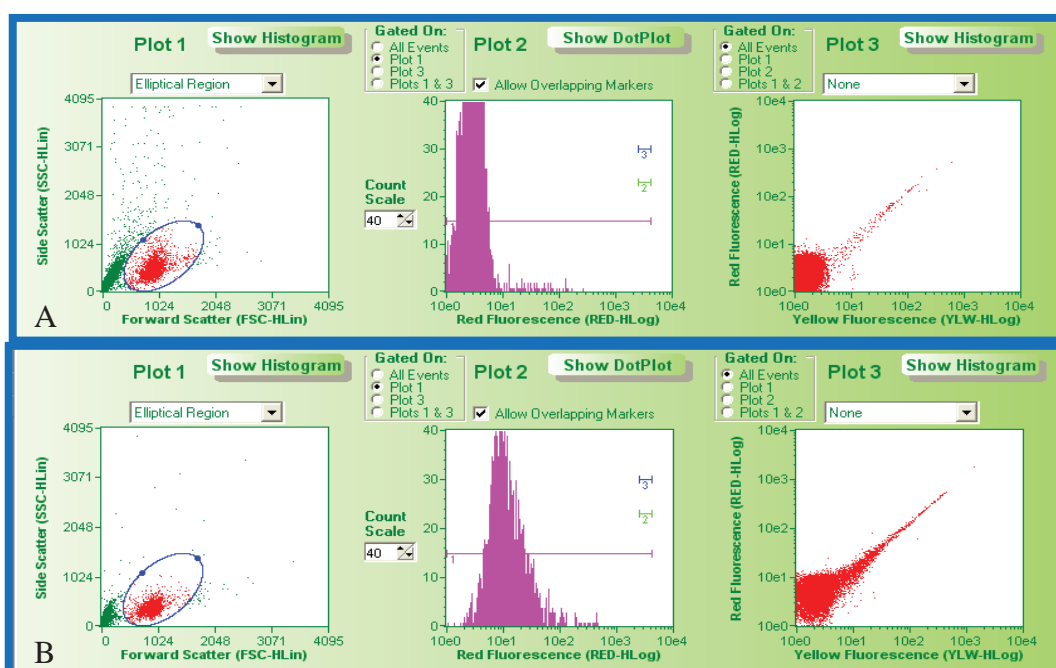
<sup>16</sup> Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Cat. P8139, Sigma, St. Louis, USA.

<sup>17</sup> Thermomixer, Eppendorf, Mod. Comfort, Hamburg, Germany.

<sup>18</sup> Centrífuga Citológica Microprocessada REVAN, Mod. 2000D, Cientec, Piracicaba-SP.

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

Para a determinação de superóxido dos neutrófilos utilizou-se também a sonda hidroetidina (HE)<sup>20</sup>. Resumidamente, 180  $\mu\text{L}$  de suspensão de neutrófilos ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) em RPMI foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por uma hora. Posteriormente foi acrescida uma solução tamponada de HE (0,1mmol/L) com e sem PMA (1,47  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ). Após nova incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 15 minutos a amostra foi 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 (593 nm) e excitação (473 nm) 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.



**Figura 3.** Imagem gráfica da aquisição de eventos celulares por citometria de fluxo. (A) Neutrófilos isolados e marcados com sonda HE, para produção de superóxido, sem estímulo. (B) Neutrófilos isolados e estimulados com PMA, para produção de superóxido, marcados com sonda HE.

<sup>20</sup> Hydroethidine™ (Dihydroethidium bromide), Cat. 17084, Polysciences, Inc., Valley Road, Warrington, USA.

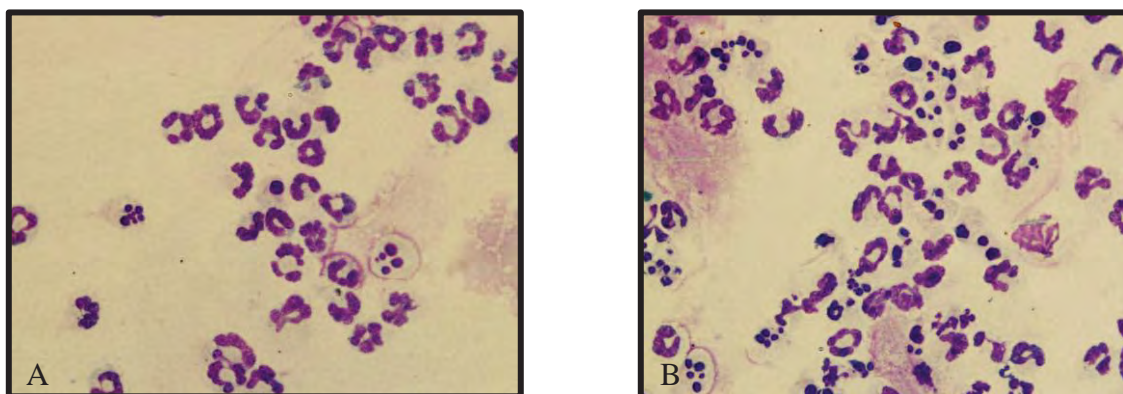
<sup>21</sup> Guava EasyCyte Mini®, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.

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



### 3.7 Determinação do índice apoptótico

Para a análise morfométrica da apoptose de cada cão foi realizada duas provas. Como controle positivo, às alíquotas de 100 µL de uma suspensão de neutrófilos ( $2 \times 10^6$ /mL) foram acrescidas 100 µL do indutor Camptotecina<sup>23</sup> (0,30 µM), enquanto que na amostra a ser avaliada foi acrescida o mesmo volume de RPMI. Posteriormente as amostras foram incubadas por quatro horas a 37° C, sendo agitadas por um minuto (600 rpm) a cada 15 minutos em agitador térmico computadorizado<sup>24</sup>. Posteriormente, utilizando centrifuga citológica<sup>25</sup>, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 400 G e coradas com corante panótico rápido<sup>26</sup>. O índice apoptótico foi estimado como a porcentagem de células apoptóticas por campo microscópico, conforme a seguinte equação:  $IA = (\Sigma \text{de células em apoptose}) \times 100 / (\Sigma \text{de células totais})$ . Para a quantificação das células apoptóticas foram contadas somente as células que apresentaram pelo menos três das seguintes características morfológicas peculiares do processo: condensação do citoplasma, condensação nuclear, fragmentação nuclear, fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos.



**Figura 4.** (A) Alguns neutrófilos isolados, sem estímulo, apresentando diferentes estágios e apoptose e corpos apoptóticos. (B) Presença de grande quantidade de neutrófilos em apoptose e corpos apoptóticos em neutrófilos isolados e estimulados com CAM.

A taxa de apoptose foi também determinada por citometria de fluxo capilar<sup>27</sup>, utilizando-se sistema Anexina V-PE<sup>27</sup>. Para tal, a avaliação da apoptose de cada cão foi realizada em duas provas. Como controle positivo, às

<sup>23</sup> Camptothecin, Cod. C9911. Sigma, St. Louis, USA.

<sup>24</sup> Thermomixer, Eppendorf, Mod. Comfort, Hamburg, Germany.

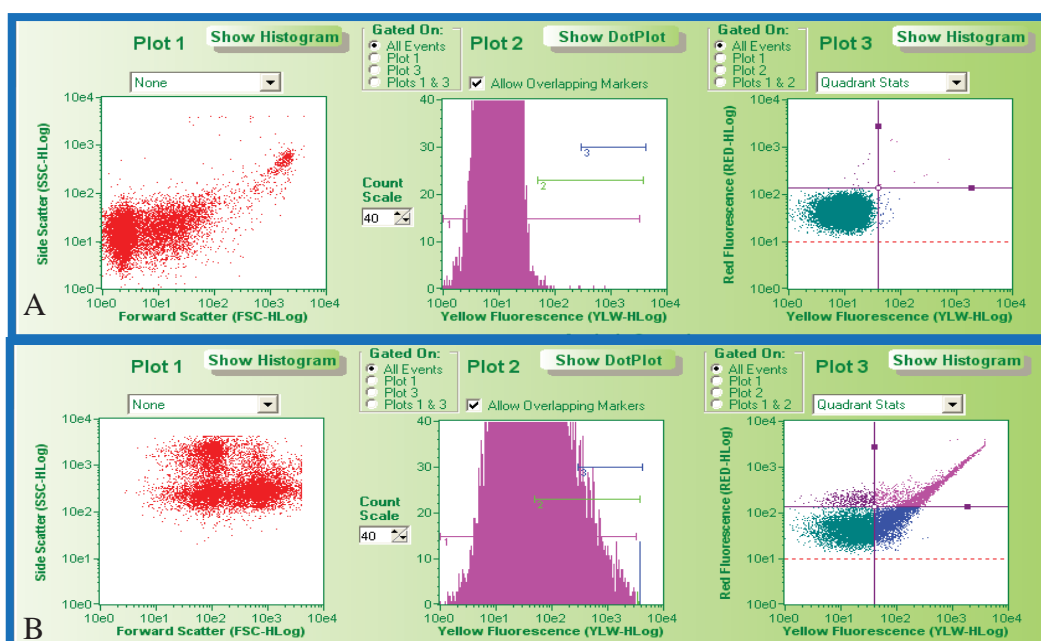
<sup>25</sup> Centrifuga Citológica Microprocessada REVAN, Mod. 2000D, Cientec, Piracicaba-SP.

<sup>26</sup> Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

<sup>27</sup> Guava Nexin Kit, Cat. 4500-0010, Guava Technologies, USA.



alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de neutrófilos ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram acrescidas 100  $\mu\text{L}$  do indutor Camptotecina<sup>28</sup> (6,0  $\mu\text{M}$ ), enquanto na amostra a ser avaliada foi acrescida o mesmo volume de RPMI. Posteriormente as amostras foram incubadas por uma hora a 37° C, sendo agitadas por um minuto (600 rpm) a cada 15 minutos em agitador térmico computadorizado<sup>29</sup>. Em seguida a suspensão de células foi alíquotada em 100  $\mu\text{L}$  e acrescida de 100  $\mu\text{L}$  de Anexina-PE e posteriormente incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Utilizando-se citômetro de fluxo capilar<sup>30</sup>, foi realizada aquisição de 10.000 eventos. Os dados adquiridos foram analisados em programa computacional específico<sup>31</sup>, sendo que após a compensação do citômetro, foi possível quantificar três populações celulares: células não apoptóticas; apoptose inicial e apoptose final ou necrose.



**Figura 5.** Imagem gráfica da aquisição de eventos celulares por citometria de fluxo. (A) Neutrófilos isolados e marcados com sonda Nexina, sem estímulo, em apoptose. (B) Neutrófilos isolados e estimulados com PMA, em apoptose, marcados com sonda Nexina.

<sup>28</sup> Camptothecin, Cod. C9911. Sigma, St. Louis, USA.

<sup>29</sup> Thermomixer, Eppendorf, Mod. Comfort, Hamburg, Germany.

<sup>30</sup> Guava EasyCyte Mini®, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.

<sup>31</sup> Guava Express, CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software. Personal Cell Analysis, v.4.1, 2006. Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.

### **3.8 Análise estatística**

Realizou-se a análise das distribuições das variáveis quanto à normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Teste Bartlett), conforme preconizado por Zar (1984). De acordo com a positividade e negatividade quanto à normalidade e homocedasticidade, utilizou-se o teste de ANOVA e Friedman para comparar os grupos e os pós-testes de Tukey e Dunn para comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa computacional SAS<sup>32</sup>.

---

<sup>32</sup> SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do perfil hematológico e bioquímico dos cães sadios selecionados permaneceram dentro da faixa de normalidade para a espécie (Tabela 1), conforme estabelecido por Kerr (2003), comprovando assim a higidez destes cães. As células isoladas do sangue dos cães sadios apresentaram elevada taxa de viabilidade ( $96,41 \pm 1,62$ ) e grau de pureza de neutrófilos ( $89,16 \pm 3,09$ ), portanto adequadas para ensaios *ex vivo* (CENDOROGLIO, et al. 1999).

**Tabela 1-** Valores medianos e desvios padrão do hemograma e perfil bioquímico de cães do grupo sadio.

Hemograma		Bioquímica plasmática	
Hemácias ( $\times 10^{12}/L$ )	$7,15 \pm 0,55$	Ácido Úrico (mmol/L)	$78,64 \pm 31,16$
Volume globular (fração volume)	$0,49 \pm 0,02$	Albumina (g/L)	$30,07 \pm 2,94$
Hemoglobina (mmol/L)	$15,98 \pm 0,81$	Colesterol (mmol/L)	$5,41 \pm 1,81$
VCM (fL)	$69,03 \pm 4,93$	Creatinina ( $\mu\text{mol}/L$ )	$96,48 \pm 9,57$
CHCM (mmol/L)	$33,54 \pm 0,99$	Frutosamina (mmol/L)	$1,92 \pm 0,40$
Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	$12,76 \pm 3,07$	Glicose (mmol/L)	$4,09 \pm 0,60$
Segmentados ( $\times 10^9/L$ )	$7,15 \pm 2,00$	Uréia (mmol/L)	$8,37 \pm 1,75$
Linfócitos ( $\times 10^9/L$ )	$3,60 \pm 1,63$		
Monócitos ( $\times 10^9/L$ )	$0,73 \pm 0,39$		
Eosinófilo ( $\times 10^9/L$ )	$0,07 \pm 0,06$		

Todas as amostras incubadas com plasma autólogo reduziram o NBT (Tabela 2), comprovando que os neutrófilos isolados do grupo sadio e utilizados nos demais ensaios possuíam metabolismo oxidativo funcional, sendo, portanto adequadas para a avaliação de possíveis interferências de compostos azotêmicos e urêmicos.

**Tabela 2** – Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães sadios incubados com plasma canino autólogo normal, urêmico e azotêmico, com e sem ativação com 13-acetato de fobol éster 12-miristato (PMA). Valores médios e desvios-padrão da porcentagem de neutrófilos redutores de tetrazólio nitroazul (NBT) e concentração arbitrária de superóxido (Fluorescência vermelha média do brometo de etídio) obtida em citômetro de fluxo utilizando a sonda Hidroetidina (HE).

Plasma	Redução NBT (%)		Fluorescência média de brometo	
	Sem PMA	Com PMA	Sem PMA	Com PMA
<b>Autólogo</b>	18,8 ± 15,60 a*	47,3 ± 18,93 a	30,9 ± 20,74 b	112,4 ± 98,13
<b>Urêmico</b>	4,0 ± 4,51 b	32,1 ± 14,17 b	78,1 ± 100,18 a	100,8 ± 90,59
<b>Azotêmico</b>	5,7 ± 4,38 b	37,8 ± 18,07 ab	104,2 ± 193,19 ab	297,9 ± 541,19
<b>p- value</b>	0,001	0,0476	0,0016	0,5836

\* Letras não coincidentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas significativas.

Segundo Aquino et al. (1998), neutrófilos em repouso ou quiescentes ao sofrerem um primeiro estímulo não são diretamente ativados, porém permanecem mais sensíveis à ativação da NADPH oxidase, podendo alcançar total ativação quando submetidos a um segundo estímulo. Em estudo realizado por Shalekoff et al. (1998) foi demonstrado que a expressão de dois receptores de superfície (HLA-DR e CD11b) importantes para a ativação dos neutrófilos, são influenciados pela manipulação, temperatura de incubação e anticoagulante utilizado. É provável que o processo de isolamento adotado possa ter estimulado o metabolismo oxidativo dos neutrófilos aumentando a produção de superóxido antes da incubação com plasma urêmico, o que explica as maiores taxas de redução de NBT obtidas quando comparadas aos de Poli et al. (1973), Ciarlini et al. (2004) e Emanuelli (2007) que utilizaram sangue total.

Os neutrófilos incubados com plasma urêmico e azotêmico apresentaram uma significativa diminuição na capacidade de reduzir o NBT na ausência de estímulo com PMA (Tabela 2). Utilizando protocolo similar em cão, porém com sangue total, Barbosa (2009), igualmente evidenciou uma marcante inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos incubados com soro urêmico. Entretanto, ao utilizar neutrófilos isolados, Barbosa (2009) verificou um efeito inibitório mais discreto da uremia sobre a produção de superóxido e hipotetizou que o tempo de incubação foi responsável por tal diferença, visto que em seu estudo os neutrófilos isolados foram incubados com soro urêmico por apenas

20 minutos, enquanto que no ensaio com neutrófilos de sangue total a incubação foi por duas horas. Sela et al. (2005) afirmam que a produção de superóxido é dependente da temperatura e tempo de incubação das amostras. Colaborando com estes autores, verificou-se que o maior tempo de incubação adotado no presente estudo (2 horas) permitiu melhor evidenciar o efeito inibitório dos compostos urêmicos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos isolados.

Cendoroglo et al. (1999) constataram que a inibição da produção de superóxido em neutrófilos humanos isolados ocorreu apenas após 24 horas de incubação com soro urêmico e afirmam que a ativação promovida pelo isolamento dos neutrófilos pode mascarar o efeito inibidor da uremia sobre o metabolismo oxidativo. A redução do NBT por neutrófilos tratados com plasma azotêmico foi mais discreta do que no tratamento com plasma urêmico, e não significativa no teste estimulado (Tabela 2). É provável que o estímulo prévio dos neutrófilos durante o procedimento de isolamento tenha mascarado o efeito inibidor da azotemia sobre a produção de superóxido. Apesar deste provável mascaramento, a taxa de redução de NBT de neutrófilos ativados com PMA e incubados com plasma urêmico foi significativamente inferior aos incubados com plasma autólogo (Tabela 2). Deve ser considerado ainda que o plasma de pacientes urêmicos, além de elevadas concentrações de compostos nitrogenados, contém outras toxinas e proteínas que inibem a função dos neutrófilos (Vanholder, et al. 2008) que podem não estar presentes no plasma de pacientes com azotemia não renal.

O efeito inibitório do plasma urêmico sobre a produção de superóxido detectado pelo teste de redução do NBT (Tabela 2) foi concordante com Sardenberg et al. (2006), que observaram em pacientes humanos nefropatas, uma redução da função neutrofílica e Barbosa (2009) que verificou em cães com insuficiência renal, uma redução da produção de superóxido, quando comparado a cães saudáveis. Entretanto divergiu de Mcleish et al. (1996) e Rysz et al. (2004) que constataram aumento na produção de ERO e de outros que não observaram qualquer alteração no metabolismo oxidativo em neutrófilos de pacientes humanos urêmicos (PAUL et al., 1991; GASTALDELLO et al., 2000; ANDING et al., 2003).

O efeito da uremia sobre o metabolismo oxidativo de PMN em humanos ainda é muito contraditório, contudo sabe-se que parte dessas divergências é devido ao método de isolamento dos neutrófilos e quantificação das ERO (SARDEMBERG et al., 2006). Reafirmando tais contradições, a produção de superóxido quantificada por citometria de fluxo a partir da sonda HE divergiu dos resultados obtidos pelo método de redução do NBT (Tabela 2). Embora não estatisticamente significante, utilizando-se a sonda HE, a produção de superóxido foi maior nos tratamentos com plasma urêmico e azotêmico, sendo inverso aos resultados observados pela técnica de redução do NBT (Tabela 2).

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), entretanto este efeito não explica o fato da inibição do metabolismo ter sido detectado por este método e não pelo HE. Os resultados obtidos pelo método de redução do NBT e HE são também influenciados pela temperatura e tempo de incubação (SELA et al., 2005), tipo e concentração do anticoagulante (FREITAS et al., 2008) e estimulante (CENDOROGLO et al., 1999; TUNG et al. 2009). Considerando que as condições de temperatura, tempo, tipo e concentração de anticoagulante adotado foram semelhantes para os dois métodos utilizados para quantificar a produção de superóxido, é provável que a divergência dos resultados seja, pelo menos em parte, devido as limitações da técnica do HE, que ainda deve ser analisada com cautela, pois, de acordo com Zielonka e Kalyanaraman (2010) outros produtos de oxidação do HE em células continuam a ser descobertos.

A citometria de fluxo utilizando sondas é considerada uma metodologia mais simples, rápida e sensível por permitir mensurar o metabolismo oxidativo de milhares de neutrófilos em um período muito curto de tempo, refletindo o comportamento celular com maior precisão (BASS et al., 1983; BITZINGER et al. 2008; ELBIM e LIZARD, 2009; ZIELONKA e KALYANARAMAN, 2010), entretanto são escassos os estudos que utilizaram a sonda HE para quantificação de superóxido em neutrófilos de cães (SUCH et al., 1999, EICKHOFF et al., 2004), necessitando ainda cuidado na interpretação dos resultados obtidos com esta metodologia. Além disso, Zhao et al. (2003) afirmam que a seleção adequada dos filtros de fluorescência é crucial para o

aumento da seletividade e sensibilidade da detecção de superóxido intracelular, utilizando HE como sonda fluorescente.

O índice apoptótico de neutrófilos incubados com plasma autólogo sadio, urêmico e azotêmico estimado pelo método morfológico não diferiram (Tabela 3), concordando com Barbosa (2009) que igualmente não observou aceleração da apoptose de neutrófilos incubados com soro urêmico de cão. Tais resultados divergem de estudos realizados em humanos que verificaram significativa aceleração da apoptose de neutrófilos em pacientes urêmicos (MAJEWSKA et al., 2003; SARDEMBERG et al., 2006) e em células sadias incubadas com soro urêmico (CENDOROGLO et al., 1999). Estes resultados contradizem ainda Koller et al. (2004) que observaram um retardo da apoptose dos neutrófilos. Deve-se considerar que Cendoroglo et al. (1999) avaliaram a apoptose de neutrófilos isolados após 24 horas de incubação com soro urêmico, período superior ao do presente estudo. É possível ainda que as toxinas presentes nos plasmas urêmicos e azotêmicos utilizados para os tratamentos, tenham sofrido diluição ao serem acrescentadas à suspensão de neutrófilos, contribuindo para o mascaramento do efeito de aceleração da apoptose e inibição da produção de superóxido, como já descrito em humanos com IRC (CENDOROGLO et al. 1999).

**Tabela 3** – Valores médios e desvios-padrão do índice apoptótico de neutrófilos de cães normais incubados com plasma canino autólogo (PA), urêmico (PU) e azotêmico (PZ), obtido pelo método morfológico, com e sem o uso de Camptotecina (CAM) como indutor de apoptose.

Plasma	Índice apoptótico	
	Sem CAM	Com CAM
<b>Autólogo</b>	24,3 ± 7,73	72,4 ± 6,02
<b>Urêmico</b>	22,8 ± 8,70	68,2 ± 7,74
<b>Azotêmico</b>	23,5 ± 7,24	69,9 ± 4,93
<b>p -value</b>	0,8627	0,1155

Na presença do CAM, os índices apoptóticos foram superiores em todos os tratamentos (Tabela 3), comprovando o efeito indutor de apoptose dessa droga sobre neutrófilos de cães, conforme descrito por Nagami et al. (2002). Este efeito indutor de apoptose do CAM já foi anteriormente descrito em estudos realizados com células neoplásicas (SEN, et al, 2004; FU et al. 2006; WANG et al. 2008) e linfócitos humanos (DOLZHANSKLY e BASCH, 1995), porém em PMN sua utilização ainda é recente (BARBOSA, 2009).



A mensuração da apoptose dos neutrófilos por citometria de fluxo, utilizando-se o sistema anexina V-PE, permitiu uma melhor avaliação dos tratamentos, quantificando e diferenciando simultaneamente a porcentagem de células viáveis e de células em apoptose inicial e final (Tabela 4). Devido a maior sensibilidade e poder discriminatório, por citometria foi possível detectar um efeito de aceleração da apoptose espontânea em neutrófilos incubados com plasma urêmico e azotêmico (Tabela 4). Estes resultados coincidem com os de Cendoroglo et al. (1999) que observaram um aumento de 33% na taxa de apoptose dos PMN humanos normais incubados com soro urêmico, enquanto que no presente estudo este aumento foi em média de 26%.

**Tabela 4** – Valores médios e desvios-padrão da porcentagem de neutrófilos viáveis e apoptóticos inicial (AI), final (AF) e total (AT), obtido pelo sistema Anexina V-PE, utilizando citometria de fluxo capilar, de neutrófilos de dez cães normais incubados com plasma canino autólogo, urêmico e azotêmico, com e sem o uso de Camptotecina (CAM) como indutor de apoptose.

Plasma	% de Neutrófilos							
	Sem CAM				Com CAM			
	Viáveis	AI	AF	AT	Viáveis	AI	AF	AT
<b>Autólogo</b>	99,3±0,80	0,11±0,1	0,08±0,06 b*	0,19±0,14	62,6±20,7	8,6±7,2	24,5±21,3	33,1±22,5
<b>Urêmico</b>	98,44±1,64	0,24±0,26	0,46±0,95 a	0,70±1,15	58,9±15,2	7,07±5,8	28,5±17,3	35,5±17,4
<b>Azotêmico</b>	97,88±3,72	0,37±0,69	0,21± 0,16 a	0,58±0,80	58,2±18,9	8,5±7,2	26,0±15,9	36,4±20,5
<b>p-value</b>	0,3130	0,2929	0,0019	0,2755	0,3257	0,5588	0,4144	0,4452

\* Letras não coincidentes na mesma coluna representa diferenças estatísticas significativas.

O protocolo adotado no presente estudo permitiu reproduzir *ex vivo* a aceleração da apoptose de neutrófilos causada pela uremia em cão, assim como descrito *in vivo* em pacientes humanos com insuficiência renal (MAJEWSKA et al., 2003, SARDENBERG et al., 2006), podendo ser utilizado em estudos comparativos a fim de obter melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pela imunossupressão urêmica humana e canina.

Em outras espécies não há registros de estudos sobre o efeito da azotemia não renal sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Os resultados do presente estudo evidenciam que a azotemia, assim como a uremia, possui efeito inibidor sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos quiescentes, necessitando assim de maiores investigações.



## 5. CONCLUSÃO

O plasma azotêmico e urêmico diminuem *ex vivo* a produção de superóxido e aceleram a apoptose de neutrófilos de cães saudáveis.

## 6. REFERÊNCIAS

ALBERTO B, JOHNSON Q, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Molecular Biology of the Cell. United States of America: Garland Science (Taylor & Francis Group); 2002.*

AMBRUSO, D.R., CUSACK, N., THURMAN, G. NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation. *Molecular Genetics and Metabolism*. V.81, n.4, p.313-321, 2004.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, v.1, n.1, p.37-58, 2007.

ANDING, K., GROSS, P., ROST, J. M., DIRK ALLGAIER, D., JACOBS, E. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.18, n.10, p. 2067-2073, 2003.

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.

ARORA, P.; VERRELI, M. *Chronic renal failure*. 2008. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/238798-overview>>. Acesso em 08 abril, 2009.

BASS, D.A.; PARCE, J.W.; DECHATELET, L.R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.*, v.130, n. 4, p. 1910 - 1917, 1983.

BARBOSA, T.S. *Efeito do soro urêmico de cães com insuficiência renal sobre o metabolismo oxidativo e apoptose dos polimorfonucleares*. 63 f. Dissertação (Mestrado – Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, 2009.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845-59, 2004.

BITZINGER, D.I.; SCHLACHETZKI, F.; LINDNER, R.; TRABOLD, B.; DITTMAR, M.S. Flow-Cytometric Measurement of Respiratory Burst in Rat Polymorphonuclear Granulocytes: Comparison of Four Cell Preparation Procedures, and Concentration—Response Evaluation of Soluble Stimulants. *Cytometry Part A*. n.73A, p.643-650, 2008.

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

BOTHA, A.J.; MOORE, F.; MOORE, E.; KIM, F.; BANERJEE, A.; PETERSON, V. Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock*, v.3, n.3, p.157-66, 1995.

BRAUN, J.P.; LEFEBVRE, H.P.; WARSON, A.D. Creatinine in the dog: a review. *Veterinary Clinical Pathology*, v.32, n.4, p.162-179, 2003.

BROWN, S.A. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Vet. Clin. North AM. Small Anim. Pract.*, v. 38, n. 1, p.157-166, 2008.

CASTRO, A. A. Revisão sistemática e meta-análise. 2001. Disponível em : <<http://www.metodologia.org/meta1.PDF> >. Acesso em: 1 mar. 2008.

CENDOROGLIO, M., BERTRAND, L.J., BALAKRISHNAN, V.S., PERIANAYAGAM, M., KING, A.J., PEREIRA, B.J.G. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.10, p. 93-100, 1999.

CHONCHOL, M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis*, v. 19, n. 4, p. 291-6, 2006.

CHRETIEN, J.H.; GARAGUSI, V.F. Phagocytosis and nitroblue tetrazolium reduction in uremia. *Experientia*, v. 29, n. 5, p.612-613, 1973.

CIARLINI P.C., PATRÍCIO R.F., COUTO R., BONELLO F.L. 2004. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. *Arq. Inst. Biol.* 73(3):323-327.

COHEN, G.; HAAG-WEBER, M.; HÖRL, W. H. Immune dysfunction in uremia. *Kidney International*, v. 52, p. S79 – S82, 1997.

COHEN, G; RUDNIKI, M; WALTER, F.; NIWA, T.; HÖLL, W. H. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. *Journal American Society Nephrology*, v. 12, p. 1264-1271, 2001.

DeCOURSEY, T.E., LIGETI, E. Regulation and Termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and Molecular Life Science*. V.62, n.19, p.2173-2193, 2005.

DiBARTOLA, S.P. Abordagem clínica e laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, Cap.167, p.1686-1720; 2004.

DOLZHANSKIY, A. e BASCH, R.S. Flow cytometric determination of apoptosis in heterogeneous populations. *J. Immunol. Methods*. 180; 131-140, 1995.

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*. 101; p.109-121, 2004.

EL-BENNA, J., DANG, P.M.C., POCIDALO, M.G., ELBIM,C. Phagocyte NADPHoxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp*. N.53, p.199-206, 2005.

ELBIM, C.; LIZARD, G. Flow Cytometric Investigation of Neutrophil Oxidative Burst and Apoptosis in Physiological and Pathological Situations. *Cytometry Part A*. n.75A, p.475-481, 2009.

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

FERNÁNDEZ-FRESNEDO, G.; RAMOS, M. A.; GONZÁLES-PARDO, M. C.; FRANCISCO, A. L. M.; LÓPEZ-HOYOS, M.; ARIAS, M. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated *in vitro* apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.15, p.502-510, 2000.

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

FLOCCARI, F., ALOISI, C., CRASCI, E., SOFI, T., CAMPO, S., TRIPODO, D., CRISEO, M., FRISINA, N., BUEMI, M. Oxidative Stress and Uremia. *Medicinal Research Reviews*, v.25, n.4, p.473-486, 2005.

FREITAS M., PORTO G., LIMA, J.L.F.C. .FERNANDES E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.* 41:570-575, 2008.

FU, Y.R.; YI, Z.J.; YAN, Y.R.; QIU, Z.Y. Hydroxycamptothecin-induced apoptosis in hepatoma SMMC-7721 cells and the role of mitochondrial pathway. *Mitochondrion*. n.6, p.211-217, 2006.

GASTALDELLO, K.; HUSSON, C.; WENS, R.; VANHERWEGHEM, J. L.; TIELEMANS, M. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.15, p.1638-46, 2000.

GORDON, A.M.; ROWAN, R.M.; BROWN, T.; CARSON, H.G. Routine application of the nitroblue-tetrazolium test in the clinical laboratory. *J. Clin. Pathol.*, v.26, n.1, p. 52-56, 1973.

GRAUER, G.F.; LANE, I.F. Acute renal failure: ischemic and chemical nephrosis. In: OSBORNE, C.A; FINCO, D.R. *Canine and feline nephrology and urology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. p. 441 – 459.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochemical Society*, v. 386, p. 401-416, 2005.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica*, 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 31, p. 354-355, 2002.

HAAG-WEBER, M., MAI, B., HÖRL, W.H. Isolation of a granulocyte inhibitory protein from uremic patients with homology to beta-2-microglobulin. *Nephrol Dial Transplant*, v. 9, p. 382–388, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine Oxford:Claredon, 1989. 543 p.

HART, S.P., DRANSFIELD, I., ROSSI, A.G. Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods*. N.44, p.280-285, 2008.

HIRABAYASHI, Y., KOBAYASHI, T., NISHIKAWA, A., OKASAKI, H., AOKI, T., TAKAYA, J., KOBAYASHI, Y. Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal failure. *International Society of Nephrology*, v. 49, n. 4, p. 305-312, 1988.

HIRAYAMA, A, NORONHA-DUTRA, A.A., GORDGE, M.P., NEILD, G.H., HOTHERSALL, J.S. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidino compounds. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.11, p. 648-689, 2000.

HÖRL, W.H. Neutrophil function and infections in uremia. *Am. J. Kidney Dis.*, v. 33,n. 2, p.xlv – xvliii, 2001.

JABER, B. L.; CENDOROGLO, M.; BALAKRISHNAN, V.S.; PERIANAYAGAM, M.C.; KING, A.J.; PEREIRA, B. J. G. Apoptosis of leukocytes: Basic concepts and implications in uremia. *J. Leukoc. Biol.*, v. 69, p.1006-1012, 2001.

JAIN, N.C. Hematologic techniques. In:\_\_\_\_\_ *Schalm's veterinary hematology*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. Chap. 2, p.20-86.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. I. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap.2. p. 37-48.

KANNAN, K.; JAIN, S. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, v. 7, n.3, p. 153–163, 2000.

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

KHAN, D.R., AHMAD, N., ANZAR, M., CHANNA, A.A. Apoptosis in fresh and cryopreserved buffalo sperm. *Theriogenology*, n.71, p.872-876, 2009.

KITCHEN, E., ROSSI, A.G., CONDLIFFE, A.M., HASLETT, C., CHILVERS, E.R. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood*. V.88, n.11, p. 4330-4337, 1996.

KOLLER, H.; HOCHEGGER, K.; ZLABINGER, G.J.; Apoptosis of human polymorphonuclear neutrophils accelerated by dialysis membranes via the activation of the complement system. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 19, n. 12, p.3104-3111, 2004.

LEWIS, S.L.; VAN EPPS, D.E.; CHENOWETH, D.E. Alterations in chemotactic factor-induced responses of neutrophils and monocytes from chronic dialysis patients. *Clin. Nephrol.*, v. 30, p.63-72, 1988.

LIN, J., LIU, X., BAO, Y., HOU, S., AN, L., LIN, X. Effects of isocamptothecin, a novel camptothecin analogue, on proliferation, apoptosis and telomerase activity in HaCaT cells. *Experimental Dermatology*, n.17, p.530-536, 2008.

MACDONALD-WICKS, L.K., WOOD, L.G., GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *J. Sci. Food. Agric.* v. 86, p. 2046–2056, 2006.

MAJEWSKA, E, BAJ, Z, SULOWSKA, Z, RYSZ, J, LUCIAK, M. Effects of uraemia and haemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.18, p. 2582-2588, 2003.

MARTINS, P.S. Expressão de receptores de superfície em neutrófilos e avaliação do metabolismo oxidativo em neutrófilos e monócitos de pacientes sépticos e sua associação com disfunção de órgãos. 2005, 144 f. Tese (Doutorado – Ciências) – Escola Paulista de Medicina, 2005.

MCGOWAN, A.J.; FERNANDES, R.S.; SAMALI, A. Anti-oxidants and apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 24, n. 1, p. 229–233, 1996.

MCLEISH, K.R., KLEIN, J.B., LENDERER, E.L. HEAD, K.Z.; WARD, R.A. Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Inter.*, v. 50, p. 407-416, 1996.

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.

NAGAMI, K., KAWASHIMA, Y., KUNO, H., KEMI, M. & MATSUMOTO, H. In Vitro cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils. *J. Toxicol. Sci.* 27(3):191-203, 2002.

OTTONELLO, L.; PAOLA, G.; BERTOLOTTO, M.; MANCINI, M.; DAPINO, P.; RUSSO, R.; GARIBOTTO, G.; BARRECA, T.; DALLEGRI, F. Leptin as uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.15, p.2366-2372, 2004.

PAHL, M.V., GOLLAPUDI, S., SEPASSI, L., GOLLAPUDI, P., ELAHIMEHR, R., VAZIRI, N.D. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant*. 2009.

PAUL, J.L., ARVEILLER, M.R., MAN, N.K., LUONG, N., MOATTI, N.; RAICHWARG, D. Influence of uremia on polymorphonuclear leukocytes oxidative metabolism in end-stage renal disease and dialyzed patients. *Nephron.*, v. 57, p. 428-432, 1991.

POLI, G., NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T) test nel cane. *Folia Vet. Lat.* 3:215, 1973.

POLZIN, D.J., OSBORNE, C.A., JACOB, F., ROSS, S. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, Cap.169, p.1721-1751.



RACHID, M.A.; VASCONCELOS, A. C.; NUNES, V.A. Apoptose na depleção linfocitária induzida pela toxina T-2 em frangos de corte. Histomorfometria da bolsa de Fabricius. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.6, 2000.

RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple flow cytometry assay dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J. immunol. Methods.*, v.219, p.187-193, 1998.

RYSZ, J.; KASIELSKI, M.; APANASIEWICZ, J.; KRÓL, M.; WOŹNICKI, A.; LUCIAK, M. NOWAK, D. Increased hydrogen peroxide in the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.19, p.158-163, 2004.

SANTOS, K.C. Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativado e ativado com PMA um análogo de diacilglicerol. 2007, 110 f. Dissertação (Mestrado – Patologia molecular) – Universidade de Brasília, 2007.

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. *Nephrol. Dial. Transplant.* V.21, p.160-165, 2006.

SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; GOEMAN, J.; EYCKEN, J. V.; VANHOLDER, R. P-cresylsulphate, the main *in vivo* of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.22, p.592-596, 2007.

SELA, S.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; COHEN-MAZOR, M.; MAZOR, R.; CHEZAR, J.; SHAPIRO, G.; HASSAN, K.; SHKOLNIK, G.; GERON, R.; KRISTAL, B. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 16, p. 2431–2438, 2005.

SEN, N.; DAS, B.B.; GANGULY, A.; MUKHERJEE, T.; TRIPATHI, G.; BANDYOPADHYAY, S.; RAKSHIT, S.; SEN, T.; MAJUMDER, H.K. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death and Differentiation*. n.11, p.924-936, 2004.

SHALEKOFF, S.; PAGE-SHIPPI, L.; TIEMESSEN, C. T. Effects of anticoagulants and temperature on expression of activation markers CD11b and HLA-DR on human leukocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 5, n. 5, p. 695-702, 1998.

SHEPPARD, F.R., KELHER, M.R., MOORE, E.E., MCLAUGHLIN, N.J.D., BANERJEE, A., SILLIMAN, C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of Leukocyte Biology*, v.78, p.1025-1042, 2005.

SILVA, A.C.R.A., MACEDO, L.K.L., CIARLINI, P.C. Efeito do EDTA no teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT). *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v.15, p. 94, Suplemento, 2008.

SOEIRO, CS, PESTANA, FL, FEITOSA, FLF, CIARLINI, PC. Valor do teste de redução de Tetrazólio Nitroazul (NBT) no diagnóstico dos processos inflamatórios de bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009 (Enviado para publicação Pesquisa Veterinária).

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.

THARLL, M. A., BAKER, D.C., CAPBELL, T.W., DENICOLA, D., FETTMAN, M.J., LASSEN, E.D., REBAR, A., WEISER, G. Neutrophil production, trafficking, and kinetics. In: \_\_\_\_ *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, caph.11, p. 131-134, 2004.

TREVELIN, S.C., TRINCONI, C.M., BARBOSA, T.S., CIARLINI, P. C. Efeito do plasma rico em uréia sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v.15, p.97, Suplemento, 2008.

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

TUNG, J.P.; FRASER, J.F.; WOOD, P.; FUNG, Y.L. Respiratory burst function of ovine neutrophils. *BMC Immunology*. v.10, n.5, 2009.

VANHOLDER. R., DE SMET, R., JACOBS, V., VAN LANDSCHOOT, N., WATERBOOS, M.A., VOGELEERE, P., RINGOIR, Uremic toxic retention solutes depress polymorphonuclear response to phagocytosis. *Nephrol Dial Transplant*, v.9, p.1271-1278, 1994.

VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr. Nephrol.*, v.23, p.1211–1221, 2008.

WANG, L.M.; LI, Q.Y.; ZU, Y.G.; FU, Y.J.; CHEN, L.Y.; LV, H.Y.; YAO, L.P.; JIANG, S.G. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line. *Chemico- Biological Interactions*. n.176, p.165-172, 2008.

WARD, R.A. e McLEISH, K.A. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1697-1702, 1995.

WARE, W.A. Distúrbios do trato urinário: insuficiência renal. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina interna de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 583 – 597.

WHYTE, M.K, MEAGHER, L.C., MacDERMOT, J., HASLETT, C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *Journal Immunology*, v. 150, p. 5124-5134, 1993.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GOMES-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.*, v.183, n.4, p. 1533–1544, 1996.

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

ZHAO, H., KALIVENDI, S., ZHANG, H., JOSEPH, J., NITHIPATIKOM, K., VIVAR, J.V., KALYANARAMAN, B. Superoxide Reacts With Hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*. V.34, n.11, p.1359-1368, 2003.

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