

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS GUANIDINA E
ÁCIDO GUANIDINOÁCETICO SOBRE O METABOLISMO
OXIDATIVO E APOPTOSE EM NEUTRÓFILOS DE CÃES**

Priscila Preve Pereira
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS GUANIDINA E
ÁCIDO GUANIDINOÁCETICO SOBRE O METABOLISMO
OXIDATIVO E APOPTOSE EM NEUTRÓFILOS DE CÃES**

Priscila Preve Pereira

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Dissertação apresentada à faculdade de Medicina Veterinária-Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção de título de mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

**ARAÇATUBA
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Aracatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



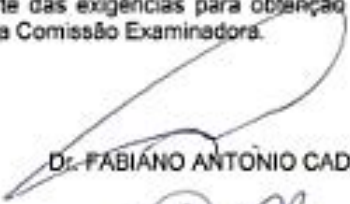
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

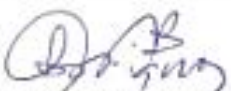
TÍTULO: Efeito das toxinas urêmicas guanidina e ácido guanidino acético sobre o metabolismo
oxidativo e apoptose em neutrófilos de cães.

AUTORA: PRISCILA PRÊVE PEREIRA

ORIENTADOR: Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

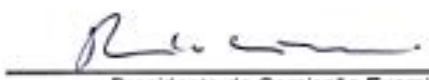
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(Ciência Animal) pela Comissão Examinadora.


Dr. FABIANO ANTÔNIO CADIOLI


Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA


Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 17 de janeiro de 2013.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Priscila Preve Pereira – Natural de Florianópolis, Santa Catarina, nascida em 26 de fevereiro de 1987, filha de Valdete Préve Pereira e Wanderley Antônio Pereira. Em 2006, ingressou no curso de Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), onde se graduou como Médica Veterinária em dezembro de 2010. Possui experiência em Patologia Clínica Veterinária, à qual dedicou os últimos dois anos de sua formação acadêmica no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário "Lauro Ribas Zimmer" pela mesma Universidade, como aluna de iniciação científica sob orientação da Professora Doutora Mere Erika Saito. Participou do grupo de pesquisa no Laboratório de Patologia Clínica na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Araçatuba, como aluna especial sob orientação do Professor Adjunto Paulo César Ciarlini. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Campus de Araçatuba – SP, em março de 2012, sob orientação do mesmo professor. Tem participado de projetos de pesquisa do grupo sob auxílio financeiro da FAPESP, sempre atuando nos temas de estresse oxidativo, metabolismo oxidativo e apoptose de neutrófilos e doença renal crônica em cães.

“Ignorar o inesperado (ainda que fosse possível) seria viver sem oportunidade,
sem espontaneidade e sem os ricos momentos dos quais a vida é feita”

Stephen Cohen

Aos meus pais, Valdete e Wanderley, por todo apoio e incentivo nesses anos.

A Deus, por ter me acompanhado nesse momento, me dando força, fé e
proteção para alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me ter dado a oportunidade desta profissão, por me ter acompanhado nesta trajetória, dando-me forças, determinação para seguir em frente com cautela e discernimento para meu caminho não ser desviado.

Aos meus pais, Wanderley e Valdete que, como casal, são um exemplo a ser seguido, juntos construíram uma família maravilhosa e me ensinaram os valores mais importantes da vida.

Aos meus queridos irmãos, Fernando e Eduardo, pela paciência, compreensão, fraternidade e amor incondicional, que foi essencial para meu crescimento; apesar da distância, sempre estiveram presentes, apoiando, aconselhando e torcendo por mim.

Em especial ao Prof. Dr. Paulo César Ciarlini, que sempre tive grande respeito, admiração e orgulho pela oportunidade de ter sua orientação e todo o conhecimento passado, mostrando-me assim, os desafios para alcançar o aprendizado e, com compreensão e paciência, nunca medindo esforços para me orientar.

Aos membros da Banca, Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e Prof. Dr. Fabiano Cardioli, pelas contribuições relevantes que elevaram a minha formação acadêmica e aprimoraram este trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório, impossível não agradecer em especial, Breno Fernando Martins de Almeida, Luis Gustavo Narciso e Anelise Maria Bosco, pelo trabalho em equipe, companheirismo e conhecimento adquiridos nesses anos.

Ao pessoal do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, em especial o médico veterinário Saulo Avanço, bem como, aos funcionários Ocilane, Valério e Moisés, por todo empenho e auxílio dedicados durante a seleção dos animais.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado durante um ano de curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa, do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (Proc. 2011/18746-3).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade oferecida na a realização do curso de Mestrado.

Aos proprietários dos cães saudáveis do grupo controle e dos cães portadores de doença renal crônica, por autorizarem a coleta de sangue e inclusão dos animais no experimento.

Aos cães, objeto de estudo do presente trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução dessa pesquisa e os aqui não citados, mas que tiveram uma participação importante na minha formação acadêmica, sem vocês nada disso seria possível!

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
ABSTRACT	21
CAPÍTULO 1	11
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1 Contextualização do problema	12
2 Pesquisa bibliográfica	12
3 Neutrófilos e sua importância para a defesa imune inespecífica	14
4 Relação entre a uremia, o metabolismo oxidativo e a apoptose de neutrófilos	16
5 Compostos guanidínicos e sua importância na função leucocitária	18
6 Objetivos	20
7 REFERÊNCIAS	20
CÁPITULO 2	26
AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E SEU EFEITO SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS DE CÃES	27
RESUMO	27
ABSTRACT	29
1 Introdução	30
2 Materiais e Métodos	33
3 Resultados	38
4 Discussão	42
5 Conclusão	46
6 Agradecimentos	46
7 REFERÊNCIAS	47

EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS GUANIDINA E ÁCIDO GUANIDINOÁCETICO SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E APOPTOSE EM NEUTRÓFILOS DE CÃES

RESUMO

Recentemente, foi relatado que na insuficiência renal crônica (IRC) canina ocorre estresse oxidativo e que a disfunção dos neutrófilos está associada ao aumento da apoptose. Dentre as muitas toxinas urêmicas que se concentram na IRC, há evidências em humanos de que as guanidinas inibem o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, afetando a sua função bactericida. Uma revisão sistemática foi realizada sobre a relação entre os compostos guanidínicos e os neutrófilos em cães. Verificou-se que a literatura, sobre este tema, é escassa e contraditória, de modo que, foi investigado no presente estudo a relação entre a concentração de guanidina plasmática, a produção de superóxido e a apoptose de neutrófilos de cães com IRC. Aditivamente, foi investigado “in vitro” o efeito isolado do composto ácido guanidinoacético (AGA) sobre a produção de superóxido e a apoptose de neutrófilos de cães saudáveis. Foi possível comprovar que o grande aumento da guanidina plasmática observado em cães com IRC não está associado à alteração do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos. O AGA inibiu o metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães saudáveis sem afetar a viabilidade dessas células.

Palavras-chave: explosão respiratória, guanidina, leucócitos, uremia.

THE EFFECT OF THE UREMIC TOXINS GUANIDINE AND GUANIDINE ACETIC ACID ON THE OXIDATIVE METABOLISM AND APOPTOSIS OF NEUTROPHILS IN DOGS

ABSTRACT

It has been recently reported that in canine chronic renal failure (CRF) there occurs oxidative stress, and that neutrophil dysfunction is associated with the increase of apoptosis. Among the many uremic toxins found in higher concentrations due to CRF, there is evidence – in humans – that guanidines inhibit the oxidative metabolism of neutrophils, affecting their bactericidal function. In this study, a systematic review of the relationship between guanidine compounds and neutrophils in dogs was undertaken. It was found that the literature on this subject is scarce and conflicting, which prompted this investigation of the relationship between the plasmatic concentration of guanidine, the production of superoxide, and the apoptosis of neutrophils in dogs with CRF. Moreover, the effect of the isolated compound guanidine acetic acid (GAA) on the production of superoxide and on neutrophil apoptosis in healthy dogs was investigated *in vitro*. It was possible to verify that the large increase of plasmatic guanidine observed in dogs with CRF is not associated with the altered oxidative metabolism and the apoptosis of the neutrophils. The GAA inhibited the oxidative metabolism of the neutrophils in healthy dogs without affecting the viability of these cells.

Keywords: respiratory burst, guanidine, leukocytes, uremia

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Contextualização do problema

Recentemente, foi comprovado que a insuficiência renal crônica (IRC) causa estresse oxidativo em cães. Dentre as muitas toxinas que se concentram na IRC os compostos guanidínicos são amplamente investigados em pacientes humanos. Nesta espécie essa toxina urêmica causa disfunção neutrofílica, mais especificamente promove a inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, afetando dessa maneira a sua função bactericida. Há evidências *in vitro* de que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães saudáveis é afetado quando incubado com soro urêmico, ureia e creatinina, porém até o momento não há estudos sobre o efeito específico da guanidina sobre a função dos neutrófilos nesta espécie e sua relação com o comprometimento na imunidade em cães com insuficiência renal.

2 Pesquisa bibliográfica

Para sustentar e conhecer melhor o tema proposto, realizamos uma pesquisa bibliográfica, nos moldes de uma revisão sistemática, e para iniciá-la, o primeiro passo foi à formulação da pergunta de pesquisa. Esta deve ser bem clara e composta de três elementos: situação, intervenção e desfecho. A partir desses conceitos foram definidas as palavras-chave para certificar que na revisão obtiveram-se todos os artigos importantes e de algum impacto científico. Neste estudo, a pergunta científica foi a seguinte: *o aumento da concentração plasmática de guanidina, em cães urêmicos, leva à diminuição da função neutrofílica, pelo aumento do índice apoptótico e alterações no metabolismo oxidativo nessas células?*

Para a realização da revisão sistemática é essencial a escolha de uma base de dados adequada, visando maximizar as estratégias de busca em um

tempo reduzido, não sendo importante apenas a associação de termos adequados. Assim foram escolhidas duas bases de dados, a Pubmed e a Portal da Pesquisa, as quais têm uma maior especificidade e sensibilidade ao tema.

Com isso foram propostas duas estratégias de pesquisa demonstradas nas situações seguintes.

Situação 1: nesse caso foram utilizadas nos bancos de dados, Pubmed e Portal da Pesquisa as indexadas: uraemia (*situação*); guanidine (*Intervenção*); e neutrophil (*desfecho*), o boleador utilizado foi *and* com o intuito de adicionar os três termos na busca. Além disso, a pesquisa foi limitada para trabalhos de idioma inglês e a sua extensão para os últimos 15 anos (1997-2011). A busca no Pubmed resultou em 5 trabalhos, desses 2 foram relevantes (HIRAYAMA et al., 2000); NISHIMURA et al., 1997). No Portal da Pesquisa foram encontrados 58 artigos, desses foram selecionados 14 artigos de interesse, porém apenas dois foram selecionados como relevantes (HIRAYAMA et al., 2000), (HIRAYAMA et al., 2001)

Situação 2: Nessa estratégia de pesquisa foram utilizadas as seguintes palavras-chave: uraemia (*situação*), uremic toxins (*intervenção*), oxidative metabolism (*desfecho*), entre as palavras foi usado o boleador *and*. A pesquisa foi limitada pelo idioma inglês. No banco de dados Pubmed foram encontrados 44 artigos e desses foram selecionados sete trabalhos (JABER et al., 2001; RUTKOWSKI et al. 2006; MIYATA et al., 2001; HORL et al., 2000; NAKAMURA et al., 1990; COHEN et al., 2009; NIWA et al. 2010) . No Portal da Pesquisa obteve um resultado de 46 artigos, desses foram selecionados 11 trabalhos (CHONCHOL et al. 2006; NIWA, et al. 2010; TAES et al. 2007; VANHOLDER et al. 2008; RUTKOWSKI et al. 2006; SARDENBERG et al., 2005; ANDING et al., 2003; GLORIEUX et al., 2003; MAJEWSKA et al., 2003, VANHOLDER et al., 2003, KAO et al., 2010).

A estratégia de busca obteve um resultado final de 19 artigos. Devido a escassez de artigos localizados em outros bancos de dados (Web Science, Scielo e Science Direct e Google acadêmico) a pesquisa se estendeu para outras espécies, sendo limitada em artigos publicados nos últimos 5 anos. Não foi utilizado limite de busca quanto ao idioma. O período da pesquisa bibliográfica se estendeu até o dia 01/12/2013.

3 Neutrófilos e sua importância para a defesa imune inespecífica

No século XIX, Paul Ehrlich desenvolveu uma nova coloração para os leucócitos identificando um novo grupo de “núcleos polimorfos” que apresentavam uma tendência em reter o corante, por isso foi denominado de neutrófilos (AMULIC et al., 2012). O biólogo Metchnikoff (1893), descobriu a capacidade de fagocitose dos neutrófilos ao observar o recrutamento por essas células em lesões de embriões de estrela do mar.

Os neutrófilos, polimorfonucleares, são considerados os principais componentes da imunidade inata e são vitais na função imunológica (HOSTETTER, 2012). Quando recrutados para o local de infecção, expressam receptores de membrana responsáveis pela sua aderência ao endotélio vascular, possibilitando-o migrar por quimiotaxia até o local da infecção e liberar seus mecanismos de defesa. Para proteger o hospedeiro, os neutrófilos possuem uma impressionante variedade de armas microbidas que podem ser exercidas em um patógeno invasor, incluindo uma variedade de espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas (AMULIC et al., 2012).

A intensidade da resposta neutrofílica é regulada para evitar danos teciduais, assim a célula reage de acordo com a gravidade do estímulo. No estado *priming*, os neutrófilos liberam pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio, e podem retornar ao estado de repouso diferindo das células ativadas. O estado primed pode ser relacionado com a gravidade da doença e sua evolução (SWAIN et al., 2002).

A formação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos é um processo necessário para manter as defesas do organismo contra as infecções bacterianas (KLEBANOFF et al., 2005). Somente o superóxido não é considerado um potente agente oxidante, no entanto sua associação com outros agentes oxidantes, como H_2O_2 , geram potentes EROS, e para tal envolvem a enzima superóxido dismutase (SOD). Assim como, espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito, podem ser produzidas por reação espontânea tendo superóxido como substrato (BEUTLER, 2004). Esse processo envolve inicialmente a formação de superóxido pela NADPH oxidase e a geração de agentes bactericidas como o ácido hipocloroso e o peroxinitrito, e é denominado explosão respiratória (HIRAYAMA et al., 2000; NORDENFELT; TAPPER, 2011).

A “explosão respiratória” possui um papel importante na resposta inata do sistema imunológico devido à produção de superóxido e seus derivados e estes possuem ação bactericida, fungicida e viricida (SMITH, 2000). Porém a produção deficiente ou exacerbada de ERO implica no comprometimento da função celular acarretando ao aumento da taxa de apoptose (GROEMPING; RITTINGER, 2005).

A apoptose é caracterizada pela contração e rompimento da arquitetura do citoesqueleto celular, com perturbação e formação de bolhas na membrana plasmática. As funções mitocondriais e ribossomais são inicialmente mantidas enquanto ocorre condensação da cromatina e fragmentação do DNA internucleossomal. Por último, os fragmentos celulares transformam-se em aglomerados de membrana denominados corpos apoptóticos, os quais são removidos por células fagocitárias, principalmente por macrófagos (SQUIER et al, 1995; COHEN et al., 2001).

4 Relação entre a uremia, o metabolismo oxidativo e a apoptose de neutrófilos

Em humanos portadores de uma doença que leva ao comprometimento renal, ocorre a retenção de muitos compostos, que em condições normais seriam filtrados pelos rins, sendo instalado um quadro de síndrome urêmica. Esses solutos retidos interagem negativamente com as funções metabólicas, e são denominados toxinas urêmicas (VANHOLDER et al., 2001).

Estudos em pacientes humanos saudáveis, em que foram isolados os polimorfonucleares, e essas células incubadas em plasma urêmico, observou-se um alto índice de apoptose comparado aos que foram incubadas com plasma normal e aos pacientes controles (COHEN et al., 2008). Segundo Whyte et al. (1993) neutrófilos em apoptose apresentam sua taxa quimiostática, fagocitose e produção de superóxido reduzida.

O estado urêmico leva ao estresse oxidativo devido ao aumento de oxidantes e a diminuição de antioxidantes, situação que alteram a estrutura e a função das proteínas (MIYATA et al., 2000). A geração de compostos oxidantes é fisiologicamente importante para o mecanismo de defesa contra micro-organismos invasores, e uma ativação inapropriada do estresse oxidativo pode resultar em lesão vascular e na progressão de arteriosclerose (KAO et al., 2010).

Já se sabe que neutrófilos de humanos urêmicos aceleram a apoptose exibindo um padrão disfuncional que é semelhante à observada em células urêmicas (JABER et al., 2001). O aumento da taxa de apoptose de neutrófilos contribuiria de forma significativa para uma maior susceptibilidade às infecções bacterianas em pacientes urêmicos no estágio final da IRC (CENDOROGLO et al., 1999).

Jaber et al. (2001), comprovou que esta susceptibilidade é determinada pelo grau de função renal, indicando que a retenção de solutos na uremia pode resultar na apoptose, isso seria devido ao aumento da expressão Fas/FasL. O

sistema Fas / FasL é uma importante via de regulação de morte celular por apoptose atuando em diversos tecidos. Antígeno Fas é amplamente expresso em proteína de membrana que pertencem à família TNF- α (fatores de necrose tumoral) (OEHM et al., 1992). O antígeno FasL é uma proteína de tipo II com um domínio extracelular que é homóloga com a família de TNF e tem relativamente limitando a expressão constitutiva (SUDA et al., 1995; LEE et al., 1999).

Embora a apoptose mediada por Fas/FasL seja independente de intermediários das espécies reativas de oxigênio (ERO), a expressão de FasL pode ser induzida por ERO (BAUER et al, 1995). Os neutrófilos de humanos urêmicos com maior nível de ERO basal, principalmente peróxido de hidrogênio, podem induzir em parte, a expressão Fas e FasL, resultando na aceleração da morte celular (WARD et al., 1995; KLEIN, et al.1999).

Cohen et al. (2003) mostram que cadeias de imunoglobulina leve reduzem a apoptose espontânea de polimorfonucleares, aumentam assim a taxa dessas células viáveis e dessa forma propicia a um melhor nível basal inflamatório em pacientes humanos urêmicos, possibilitando uma melhor defesa do hospedeiro contra infecções.

Trinconi et al. (2011) constataram uma aceleração da apoptose nos PMN de sangue total de cães sadios incubados com soro homólogos enriquecidos com ureia. Barbosa et al.(2009) observou que neutrófilos isolados e incubados com plasma de cães urêmicos apresentaram diminuição do metabolismo oxidativo e aceleração da apoptose, fortalecendo a hipótese de que cães com insuficiência renal têm sua imunidade inata comprometida.

Há evidência *in vitro* de que as toxinas urêmicas em cães promove a ativação inicial do metabolismo oxidativo de neutrófilos, que posteriormente induz a aceleração da apoptose e diminuiu a produção de superóxido (SILVA et al., 2013). Estudos que nos estágios iniciais da IRC ocorre um aumento no metabolismo oxidativo de neutrófilos, de tal modo que se acumulam oxidantes

e, eventualmente, causar danos às células aceleram a apoptose e afetam a produção de superóxido numa fase posterior (CENDOROGLO et al., 1999).

Almeida et al. (2013) avaliaram a função dos neutrófilos de acordo com os estágios de cães com leishmaniose, a qual é uma doença que altera a função renal, observaram que nos estágios iniciais da doença ocorre aumento da produção de superóxido sem alteração da viabilidade dos neutrófilos. Enquanto que no estágio final da doença uma menor produção de superóxido ocorre associada ao aumento da taxa de apoptose dos neutrófilos e uremia.

Pacientes com insuficiência renal crônica apresentam alterações na adesão de células endoteliais, redução de EROS, alteração na liberação de enzimas microbianas, sendo essas disfunções associadas às toxinas urêmicas, contudo levando a uma maior incidência de septicemia (CHONCHOL et al., 2006).

5 Compostos guanidínicos e sua importância na função leucocitária

Em condições normais muitos compostos são filtrados pelos rins, mas quando o paciente é portador de uma doença que leva a insuficiência renal, muitos compostos são retidos no organismo, sendo instalado um quadro de síndrome urêmica. Os solutos retidos interagem negativamente com as funções metabólicas, e são denominados toxinas urêmicas (VANHOLDER et al., 2001).

O grupo das guanidinas, que integra a família das toxinas urêmicas, pertence às moléculas de baixo peso molecular, hidrossolúveis e originadas da arginina e da ureia. Essas toxinas reduzem o influxo de potássio levando a uma alta incidência de mortalidade em pacientes uremicos (VANHOLDER et al., 2003). As mesmas são removidas na hemodiálise, porém sua concentração é significativamente mais elevada em humanos submetidos tanto a hemodiálise como a diálise peritoneal, quando comparados às pessoas saudáveis (DE DEYN et al., 1987). Contudo interferem na atividade das células de defesa e na ligação das proteínas à hemocisteína sendo consideradas citotóxicas (TAES et al., 2008; DE DEYN et al., 1987).

Dentre os metabólitos urêmicos, os compostos guanidínicos são de grande interesse por interagirem com diferentes formas de espécies reativas de oxigênio e assim atua como uma toxina metabólica (DE DEYN et al., 1987). Essas toxinas têm sido determinadas no plasma, urina, fluido cerebrospinal e cérebro de pacientes urêmicos. As mesmas são oriundas do resultado de proteínas e metabolismo de aminoácidos tornando parte do grupo guanidino quando se associam as proteínas (NAKAMURA et al, 1991) .

A mensuração da metilguanidina em cães urêmicos foi determinada por Giovannetti et al. (1973), que evidenciaram uma alta concentração sanguínea dessa toxina em cães urêmicos após ligadura de ureter e sinais clínicos semelhantes aos que ocorre em casos de IRC. Segundo estes autores a concentração no soro de metilguanidina em cães com anúria foi em média de 0,21 mg/100ml e em cães normais 0,01 mg/100ml. Um único estudo *in vivo* em cães com IRC revelou aumento na concentração plasmática e excreção urinária de metilguanidina (BROOKS et al., 1989).

De acordo com De Deyn et al. (2009), as guanidinas, principalmente a creatinina, guanidina, metilguanidina e ácido guanidinosucínico, causam um efeito excitatório no sistema nervoso central que pode ser explicado pela inibição dos receptores Gabaérgicos (GABA), e ativação seletiva dos receptores dimetilaminoaspartato (NMDA), levando a quadros convulsivos em pacientes humanos urêmicos.

A síntese desses compostos está diretamente relacionada com o alto nível sérico de uréia em pacientes com insuficiência renal, na qual a uréia é um inibidor da argininosuccinase, levando ao aumento da produção de argininosuccinato e que formará posteriormente a guanidinosuccinato. Esse composto junto com guanidinopropionato inibe a produção de superóxido pelos neutrófilos, e os compostos guanidínicos suprimem a resposta das células Natural Killer pelas interleucinas-2 (RUTKOWSKI et al, 2006).

Hirayama et al (2000), comprovaram em seu experimento que concentrações plasmáticas de compostos guanidínicos semelhantes ao plasma urêmico levam à diminuição energética dos neutrófilos. Isso resulta da inibição da produção de superóxido pelos neutrófilos.

Além disso, os compostos guanidínicos, tais como, ácido guanidinosucínico, creatinina, e ácido guanidinopropiônico, inibem a proliferação celular da linhagem HL-60 e K562 (NATHAN et al., 1989). Autore et al. (1999), demonstraram que metilguanidina age diminuindo a regulação para liberação de TNF- α por macrófagos ativados, porém outros compostos de guanidina não foram avaliados.

Sendo de suma importância o estudo separado de cada composto guanidínico, pois cada composto age diferentemente. Isso pode ser explicado devido à composição química heterogênea das guanidina e assim atuar de forma distinta na função dos leucócitos (GLORIEUX et al., 2004).

6 Objetivos

Testar a hipótese de que *in vivo*, a semelhança do que ocorre em humanos, a concentração de guanidina é elevada em cães com IRC. E avaliar se nessa situação ocorre alteração do metabolismo oxidativo e taxa de apoptose dos neutrófilos circulantes.

Testar *in vitro* a hipótese que ácido guanidinoacético em concentrações semelhantes as que ocorrem no plasma de cães com IRC alteram o metabolismo oxidativo e a taxa de apoptose dos neutrófilos isolados de cães normais.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.F.M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.1-2, p.6-12, 2013.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, v.30, p. 459-489, 2012.

AUTORE, G. et al. In vitro and in vivo TNF-alpha synthesis modulation by methylguanidine, a uremic catabolyte. **Life Sciences**, v.65, n. 11, p. 121-127, 1999.

BAUER, M. K. A., VOGT, M., LOS, M. Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 8048–8055, 1998.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 845-859, 2004.

BROOKS, D. P. et al. Production of methylguanidine in dogs with acute and chronic renal failure. **Clinical Science**, v. 77, n.6, 1989.

CENDOROGLO, M. et al. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 1, p. 93-100, 1999.

CHONCHOL, M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. **Seminare in Dialysis**, v.19, n.4, p.291-296, 2006.

COHEN, G. et al. The uraemic retention solute *para*-hydroxy-hippuric acid attenuates apoptosis of polymorphonuclear leukocytes from healthy subjects but not from haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.23, n.8, p.2512-2519, 2008.

COHEN, G.; RUDNICKI, M.; HÖORL, W.H. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney International*, v.78, p. 548-552, 2001.

DE DEYN, P.P. et al. Guanidino compounds in serum and cerebrospinal fluid of non-dialyzed patients with renal insufficiency. *Clinica Chimica Acta*, v. 167, n.1, p. 81-88, 1987.

DEYN, P. P. et al. Guanidino compounds as uremic (neuro)toxins. *Seminars in Dialysis*, v.22, n.4, p.340-345, 2009.

GIOVANNETTI, S.; BALESTRI, P.L. Methyguanidine in uremia. ***Archives of Internal Medicine***, v.131,1973.

GLORIEUX, G. L. et al. In vitro study of the potential role of guanidines in leukocyte functions related to atherogenesis and infection. ***Kidney International***, v.65, n. 6, p.2184-2192, 2004.

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

HIRAYAMA, A. et al. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidino compounds. ***Journal of the American Society of nephrology***, Londres, v.11, n.4, p. 684-689, 2000.

HOSTETTER, S. J. Neutrophil function in small animals. ***Veterinary Clinics of North America Small Animal Practica***, v. 42, n. 1, p. 157-171, 2012.

JABER, B. L. et al. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. ***Journal of Leukocyte Biology***, v. 69, n.6, p.1006-1012, 2001.

KAO, M.P.C. et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. ***Journal of Human Hypertension***, v.24, n.1 p.1-8, 2010.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. ***Journal of Leukocyte Biology***, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KLEIN, J. B., MCLEISH, K. R., WARD, R. A. Transplantation, not dialysis, corrects azotemia-dependent priming of the neutrophil oxidative burst. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 33, n.3, p.483-491, 1999.

LEE, J., Richburg, J. H., Shipp, E. B., Meistrich, M. L., Boekelheide, K. (1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. **Endocrinology**, v.140, n. 2, p. 852-858.

METCHNIKOFF E. 1893. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. **Annabere Institut Pasteur**, v. 7, p.348-357, 1893.

MIYATA, T.; KUROKAWA,K.; STRIHOU, C.V.Y. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications **Kidney International**, v.76, p. 5120-5125, 2000.

NAKAMURA, K. et al. Production of methylguanidine from creatinine via creatol by active oxygen species: analyses of the catabolism *in vitro*. **Nephron**, v. 58, n.1, p. 42-46, 1991.

NATHAN, I. et al. Effect of uremic toxins guanidino compounds and creatinine on proliferation of HL60andK562celllines. **Nephron**, v. 52, n.3, p. 251–252, 1989.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v.90, n.2, p.271-284, 2011.

OEHM, A. et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n.15, p. 10709-10715. 1992.

RUTKOWSKI, P. et al. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. **Journal of Renal Nutrition**, v.16,n.3, p.190-193, 2006.

SILVA, A. C. R. A. et al. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.77, n.2, p.136-141, 2013.

SMITH, G. S. Neutrophils. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 281-296.

SQUIER, M. K.; SEHNERT, A. J.; COHEN, J. J. Apoptosis in leukocytes.

Journal of Leukocyte Biology, v.57, n. 1, p. 2-10, 1995

SUDA, T. et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. **The Journal of Immunology**, v.154, n. 8, p. 3806-3813, 1995.

SWAIN, S. D.; ROHN, T.T.; QUINN, M.T. Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents. **Antioxidants & redox signaling**, v. 4,n. 1, p. 69-83, 2002.

TAES, Y.E.C. et al. Guanidino compounds after creatine supplementation in renal failure patients and their relation to inflammatory status. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.23, n. 4, p.1330-1335, 2008.

TRINCONI, C.M. et al. Efeito do plasma rico em ureia sobre a apoptose de neutrófilos de cães. **Veterinária e Zootecnia, Botucatu**, v.18, n. 3, p.432-440, 2011.

VANHOLDER, R. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, n. 5, p.1934-1943, 2003.

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.9, n.5, p.1697-1702, 1995.

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

AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E SEU EFEITO SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS DE CÃES

PEREIRA, P.P.¹; BOSCO, A.M.¹; ALMEIDA, B.F.M.^{1*}; NARCISO, L.G.¹; CIARLINI, P.C.²; SANTOS NETO, A.J.³

RESUMO

Recentemente, foi comprovado que na insuficiência renal crônica (IRC) ocorre inibição do metabolismo oxidativo e aumento da apoptose dos neutrófilos em cães e que esta alteração pode comprometer a imunidade inespecífica, favorecendo a um quadro infeccioso. Dentre as toxinas urêmicas que comprovadamente afetam a função neutrofílica na IRC em humanos, destacam-se os compostos guanidínicos. A fim de melhor entender os mecanismos que afetam a imunidade em pacientes urêmicos, no presente trabalho foi investigado em 20 cães saudáveis e em 20 cães com IRC a correlação entre a concentração plasmática da guanidina, o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos. Foi também avaliado *in vitro* o efeito isolado dessa toxina sobre a apoptose e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Para tal neutrófilos isolados de 10 cães saudáveis foram incubados em RPMI puro (controle) e enriquecido com 5 mg/L de ácido guanidinoacético (AGA) por quatro horas. A concentração plasmática de guanidina foi quantificada por cromatografia de fase líquida (HPLC). Para avaliar o metabolismo oxidativo foi quantificada a produção de superóxido dos neutrófilos utilizando-se a sonda hidroetidina com e sem estímulo e com acetato miristato de forbol (PMA). Os índices apoptóticos foram quantificados por meio do sistema Anexina V-PE, com e sem o efeito indutor da camptotecina (CAM). A concentração de

¹ Pós-graduando em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

*Autor para correspondência: priscilappvet@gmail.com

² Docente, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

³ Docente, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

guanidina plasmática em cães com IRC foi maior ($p < 0.001$) que o do grupo controle. Os neutrófilos isolados e incubados em meio enriquecido com AGA, quando ativados com PMA, produziram significativamente uma menor quantidade de superóxido ($p < 0.001$), porém a viabilidade e a taxa de apoptose não foram afetadas por esta toxina. Esta é provavelmente a primeira evidência de que ocorre aumento de guanidina plasmática em cães com IRC e que o AGA inibe o metabolismo oxidativo de neutrófilos dessa espécie e potencialmente pode contribuir para a imunossupressão em cães com IRC.

Palavras-chave: explosão respiratória, insuficiência renal, leucócitos, superóxido, uremia

ASSESSMENT OF GUANIDINE COMPOUNDS AND OF THEIR EFFECTS ON THE OXIDATIVE METABOLISM AND APOPTOSIS OF NEUTROPHILS IN DOGS

ABSTRACT

It has been recently shown that in dogs with chronic renal failure (CRF) there occurs an inhibition of oxidative metabolism and an increase in the apoptosis of neutrophils, and that such alteration may impair nonspecific immunity, favoring infections. Among the uremic toxins proven to affect the neutrophil function in humans with CRF, guanidine compounds stand out. In this study, in order to better understand the mechanisms that affect the immunity of uremic patients, the correlation between the plasma concentration of guanidine, the oxidative metabolism and the apoptosis of neutrophils was investigated in 20 healthy dogs and 20 dogs with CRF. The isolated effect of this toxin on apoptosis and on the oxidative metabolism of neutrophils was also assessed *in vitro*. To this end, neutrophils isolated from 10 healthy dogs were incubated in pure RPMI (control) and supplemented with 5 mg/L of guanidine acetic acid (GAA) for four hours. The plasma concentration of guanidine was quantified through high-performance liquid chromatography (HPLC). The superoxide production by neutrophils was quantified by using a probe (hydroethidine) – with and without phorbol myristate acetate (PMA) – with the purpose of assessing oxidative metabolism. Apoptotic indices were quantified by using the Annexin V-PE system – with and without the inductive effect of camptothecin (CAM). The concentration of plasmatic guanidine in dogs with CRF was higher ($p < 0.001$) than in dogs in the control group. Neutrophils isolated and incubated in a medium supplemented with GAA produced a significant smaller amount of superoxide ($p < 0.001$) when activated with PMA, but the viability and the rate of apoptosis were not affected by this toxin. This is probably the first evidence that

there occurs an increase in plasmatic guanidine in dogs with CRF and that GAA inhibits the oxidative metabolism of neutrophils in this species, and that it may potentially contribute to immunosuppression in dogs with CRF.

Keywords: respiratory burst, kidney failure, leukocytes, superoxide, uremia

1 Introdução

Nos últimos anos houve significativo aperfeiçoamento da tecnologia empregada para mensurar as toxinas e seus efeitos em diferentes tipos celulares, de modo que a lista de toxinas urêmicas vem sendo continuamente revisada e ampliada. Inicialmente foram classificadas como toxinas urêmicas noventa compostos diferentes (VANHOLDER et al., 2003) e após cinco anos mais 25 outros solutos foram incluídos (VANHOLDER et al., 2008).

Em pacientes humanos portadores de insuficiência renal crônica (IRC), devido ao aumento de sua síntese e menor excreção renal, os compostos guanidínicos derivados do metabolismo proteico se destacam entre as demais toxinas urêmicas por atingir altas concentrações no sangue (HIRAYAMA et al., 2000). Embora sejam removidos durante a diálise, a concentração de compostos guanidínicos ainda permanece elevada em pacientes submetidos à hemodiálise ou diálise peritoneal (DE DEYN et al., 1987).

Cães saudáveis apresentam baixa concentração sérica de metilguanidina ($0,08 \pm 0,02$ mg/L) sendo o valor máximo de 5 mg/L foi observado em cães urêmicos nefrectomizados (BALESTRI et al., 1970; GIOVANNETTI et al., 1973). Estes autores conseguiram, na época, mimetizar a síndrome urêmica em 20 cães saudáveis, cronicamente intoxicados com injeções diárias de metilguanidina. Não obstante os avanços nas metodologias analíticas das toxinas urêmicas nas últimas décadas nenhuma outra pesquisa quantificou a concentração sanguínea de guanidinas em cães hígidos e urêmicos, assim como, não há qualquer estudo que tenha investigado se tais toxinas afetam o metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Os estudos sobre o efeito das guanidinas na função neutrofílica são escassos e contraditórios. Hirayama et al. (2000) observaram *in vitro* que compostos guanidínicos (ácido guanidinosuccínico; ácido guanidinopropiônico; ácido guanidinobutírico) comprometem o fluxo de energia de tal modo que a produção de superóxido dos neutrófilos diminui sob diversos estímulos, exceto quando estimulados com acetato miristato de forbol (PMA). Curiosamente, neste estudo, o ácido guanidinoacético (AGA) se diferenciou dos demais compostos de guanidina, por não inibir o metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Divergindo de tais resultados, Glorieux et al. (2004) constataram que o AGA suprime a produção de superóxido em neutrófilos, quando estimulados com PMA. Há de se considerar ainda, que o efeito inibitório das guanidina sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos obtido *in vitro* por Hirayama et al. (2000) se contrapõe ao fato de que em paciente humanos com IRC, os neutrófilos são *primed* e produzem mais superóxido quando sofrem um segundo estímulo (Ward; McLeish, 1995). Tal efeito inibitório sobre a produção neutrofílica também não condiz com o fato de que em ratos foi descrita uma associação entre a biossíntese de compostos guanidínicos e o estresse oxidativo (AOYAGI et al., 1996).

A inter-relação entre as toxinas urêmicas e o estresse oxidativo é um ponto importante na nefrologia (RUTKOWSKI et al., 2006). O estado urêmico causa estresse oxidativo devido ao aumento de agentes oxidantes e à diminuição de antioxidantes, alterando assim a estrutura e a função das proteínas (COHEN; HÖRL, 2012; MIYATA et al., 2000). A geração de compostos oxidantes é fisiologicamente importante para o mecanismo de defesa contra microrganismos invasores e uma ativação inapropriada do metabolismo oxidativo resulta em lesão de vários componentes orgânicos (KAO et al., 2010) e aumento da taxa de apoptose dos neutrófilos (BLANDIN et al., 2006). Sabe-se que neutrófilos em apoptose apresentam taxa quimiotática, fagocitose e produção de superóxido reduzidas (WHYTE et al., 1993) e consequentemente menor capacidade de combater microrganismos (ANDING et al., 2003; SARDENBERG et al., 2006).

Acredita-se que o mecanismo responsável pela redução da função neutrofílica em paciente humanos com IRC está associado à aceleração da apoptose (CENDOROGLO et al., 1999) porém, até o momento, não há estudos sobre o efeito específico das guanidinas na viabilidade e apoptose de neutrófilos.

Embora a IRC seja comum em cães, os estudos sobre o efeito das toxinas urêmicas na função neutrofílica desta espécie são escassos. Barbosa et al. (2010) observaram que os compostos presentes no plasma de cães

urêmicos diminuem *in vitro* a produção de superóxido de neutrófilos isolados de cão sadio. Mais recentemente foi evidenciado que cães com IRC sofrem estresse oxidativo e que a produção neutrofílica de superóxido diminui a medida que a apoptose dos neutrófilos aumenta (ALMEIDA et al., 2013a; SILVA et al., 2013).

Objetivando ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos com a disfunção dos neutrófilos de cães com IRC, foi quantificada as concentrações plasmáticas da guanidina em cães sadios e com IRC. Aditivamente foi testada *in vitro* a hipótese de que a AGA isoladamente contribui para a inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos acelerando a sua apoptose.

2 Materiais e Métodos

A presente investigação foi realizada de acordo com os princípios éticos no uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA-00762/2012).

2.1 Ensaio *in vivo*

2.1.1 Seleções dos animais

Foram selecionados intencionalmente 20 animais de diferentes raças e sexo, sendo o grupo controle (GC) constituído de 20 cães adultos hígdos, sem qualquer alteração nos exames clínico gerais e laboratoriais (hemograma completo, fibrinogênio plasmático, urinálise tipo I e perfil bioquímico plasmático como, ácido úrico, proteína total, albumina, bilirrubina total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia, creatinina, colesterol, fósforo e cálcio total).

Com base no exame clínico e exames laboratoriais supracitados, um segundo grupo urêmico (GU) foi constituído de 20 cães com IRC com nível 4 (INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY, 2006).

Animais recentemente tratados com drogas que alterarem a função neutrofílica não foram incluídos no estudo.

2.1.2 Colheita e processamento das amostras

Após jejum alimentar de 8 a 12 horas, 10 mililitros de sangue total foram colhidos de cada animal do grupo controle por punção da veia jugular, dos quais 9 mL foram acondicionados em tubos heparinizados estéreis para realização do isolamento dos neutrófilos e obtenção de plasma para análises bioquímicas. O restante do sangue foi acondicionado em tubo com EDTA-K₂ para realização do hemograma.

As análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China) previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II e utilizando reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). Foi determinado o teor de ureia (método enzimático UV urease/glutamato desidrogenase); creatinina (método cinético do picrato alcalino); albumina (método do verde de bromocresol); colesterol (método enzimático oxidase/peroxidase); proteína plasmática total (método do biureto); bilirrubina (método Van der Bergh); ácido úrico (método enzimático uricase/peroxidase); cálcio total (método colorimétrico da cresolftaleína complexona), fósforo inorgânico (método colorimétrico do molibdato); aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (ambas pelo método cinético UV segundo IFCC) e proteína urinária (método vermelho de pirogalol). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

O hemograma foi realizado a partir de um contador veterinário automatizado de células (BC-2800Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China). A urina foi colhida por cistocentese, para realização do exame de urina tipo I e determinação da relação proteína/creatinina urinária (UPC). A densidade urinária foi obtida por refratometria, o exame químico foi realizado utilizando-se de tiras reagentes comerciais (Combur10 test[®], Roche, Mannheim, Germany) a análise do sedimento feita segundo recomendações de Osborne et al. (1995).

2.1.3 Isolamento dos neutrófilos

Foram avaliados o metabolismo oxidativo e taxa de apoptose dos grupos controle e urêmico, para tal as células foram isoladas conforme o protocolo descrito por Silva et al. (2013). Resumidamente quatro mililitros de sangue heparinizado foram utilizados para o isolamento dos neutrófilos em duplo gradiente de separação (Histopaque 1119[®] e 1070[®] Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). O isolado de células foi lavado duas vezes com solução aquosa de cloreto de amônio (0,14 M) para eliminar os eritrócitos residuais. Em seguida o isolado foi reconstituído com solução salina tamponada de Hanks (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) numa concentração final de neutrófilos de $1 \times 10^6/\text{mL}$. A viabilidade foi estimada pelo método de exclusão do azul de tripan e a pureza estimada por análise da citologia do isolado de neutrófilos conforme preconizado por METCALF et al. (1986). Apenas os neutrófilos, que apresentam viabilidade e pureza acima de 95 e 93%, respectivamente, foram incluídos no estudo.

2.1.4 Avaliações do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos

O metabolismo oxidativo foi avaliado, determinando-se a produção de superóxido dos neutrófilos por meio da sonda hidroetidina (HE), utilizando-se metodologia descrita por Almeida et al. (2013a). Resumidamente, em um volume de 180 μL de suspensão de neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) em meio RPMI 1640 foram acrescentados 20 μL de solução tamponada de HE (0,1 mmol/L). Esta suspensão de neutrófilos, com e sem o estímulo de 0,55 μM de acetato miristato de forbol (PMA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) foi incubada em um termociclador a 37°C por 10 minutos. Após a incubação a suspensão de isolado de neutrófilo foi mantida em banho de gelo e protegida da luz até o momento da leitura. A média de fluorescência vermelha de brometo de etídio gerada pela oxidação do HE pelo superóxido foi quantificada em um citômetro de fluxo capilar (Guava EasyCyte Mini®, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA) previamente ajustado para o comprimento de onda máximo para emissão (593 nm) e excitação (473 nm). Os resultados de 10.000

eventos foram analisados em programa computacional específico (Guava Express, CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software. Personal Cell Analysis, v.4.1, 2006. Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA). Para eliminação dos debris celulares, selecionou-se a população com maior tamanho compatível com a população de neutrófilos.

A viabilidade e o índice apoptótico total foram estimados por citometria de fluxo capilar utilizando o sistema Anexina V-PE (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, USA), conforme descrito por Silva et al. (2013). Resumidamente, uma solução de neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) em meio RPMI 1640 foi incubada com e sem 6 mM de camptotecina (CAM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Após incubação por 10 minutos a 37°C em um termociclador microprocessado (Thermomixer, Eppendorf, Mod. Comfort, Hamburg, Germany) a suspensão de células foi aliquoteada em 100 μL e acrescida de 100 μL de Anexina V-PE, com posterior incubação por 20 minutos em temperatura ambiente sob proteção da luz. Utilizando-se citômetro de fluxo capilar (Guava EasyCyte Mini®, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA) os resultados de 10.000 eventos foram analisados em programa computacional específico, após a compensação do citômetro para o fluorocromo vermelho para reação positiva de 7-AAD e fluorocromo amarelo para reação positiva da Anexina V. Foi possível quantificar as seguintes populações celulares: células viáveis (anexina V– e 7-AAD–); apoptose inicial (anexina V+ e 7-AAD–) e apoptose final (anexina V+ e 7-AAD+). A apoptose total foi obtida após soma das populações de células em apoptose inicial e final.

2.1.5 Quantificações das concentrações plasmáticas de guanidina em cães hígidos e urêmicos por análise cromatográfica

As concentrações plasmáticas de guanidina dos cães do grupo controle (GC) e urêmico (GU) foram obtidas a partir da extração líquido-líquido (LLE). as amostras de plasma foram centrifugadas por 10 minutos a 10000rpm, sendo retirada uma alíquota de 250µL do sobrenadante. Em seguida as amostras foram submetido à ultrafiltração a 6000rpm em um dispositivo de ultrafiltração Centrifree de 30KDa. Uma alíquota de 100µL do filtrado foi transferida para um eppendorf adicionando-se 15µL de solução dos padrões internos 2,6-dimetilfenol (padrão interno do p-cresol, concentração de 500µg.L⁻¹) e etilguanidina (padrão interno das guanidinas, concentração de 1500µg.L⁻¹), 5,6µL de KOH 6,5mol L⁻¹ e 9,1µL de solução de ninidrina 1,8mol L⁻¹. Após o tempo de reação de 15 minutos, foi adicionado 49,9µL de solução de ácido ascórbico 10% (m/v) e 6,45µL de H₃PO₄ 10mol L⁻¹. As amostras foram aquecidas em forno a 90°C por 30 minutos, resfriadas à temperatura ambiente e injetadas no sistema HPLC Shimadzu Proeminence 20A com detector de fluorescência Shimadzu RF-10AxL, utilizando como fase móvel água com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila. Para a detecção dos compostos guanidínicos foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 390nm e emissão em 470nm. Foi utilizado o método de eluição gradiente, com composição da fase móvel variando de 5-23% de acetonitrila em 9 minutos, 23-50% de acetonitrila em 3 minutos, 50-5% em 1 minuto e constante em 5% de acetonitrila por 4 minutos, totalizando o tempo de análise cromatográfica de 17 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 10µL e a temperatura do forno 45°C. A leitura foi realizada nas áreas de pico da guanidina e essas áreas são associadas com as concentrações através das curvas de calibração.

2.2 Ensaio *in vitro*

Foram selecionados 10 cães saudáveis de acordo com o item 2.1.1, e colhido o sangue e processado de acordo com o item 2.1.2, após esse

processo foi realizado o isolamento dos neutrófilos de acordo com o item 2.1.3, a avaliação do metabolismo oxidativo e apoptose de acordo com o item 2.1.4.

2.2.1 Incubação dos neutrófilos com ácido guanidinoacético (AGA)

Uma suspensão de neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) dos 10 cães selecionados foi incubado em meio RPMI, com ou sem AGA (5 mg/L) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) durante 4 horas em um termociclador a 37°C. Posteriormente foi feita a análise do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos conforme a metodologia descrita no item 2.1.4.

2.3 Análises estatística

Para verificar se houve diferença nos teores de guanidina entre os grupos, as variáveis foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade pelo Teste Bartlett, a diferença entre os grupos foi determinada pelo teste de Mann-Whitney. As correlações entre os teores de guanidina e os parâmetros bioquímicos foram realizadas com o teste de Spearman. Para verificar o efeito *in vitro* do AGA sobre metabolismo oxidativo e viabilidade dos neutrófilos, as variáveis foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk com a diferença entre os grupos determinada pelos testes de T pareado ou Wilcoxon. Foram consideradas significantes as diferenças entre os grupos quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada com o programa SAS (SAS Institute Inc., release 9.2, Cary: NC, 2008).

3 Resultados

3.1 Alterações clínico-laboratoriais de cães com IRC e sua correlação com os níveis plasmáticos de guanidina

Os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos de cães sadios do grupo controle (Tabela 1) corresponderam aos valores de normalidade da espécie considerados por Thrall (2007) e Kerr (2002) e certificam a higidez dos animais utilizado como fonte doadora de neutrófilos nos ensaios *in vitro*.

Nos cães urêmicos foi observada uma baixa densidade urinária, alto UPC, anemia normocítica e normocrômica não responsiva, caquexia, halitose urêmica, ulceração oral e na língua, desidratação e hipoalbuminemia (Tabela 1), resultados que caracterizam as alterações típicas da uremia decorrente de IRC (WAKII et al., 2010). Estes achados laboratoriais confirmam que todos os cães urêmicos selecionados se encontravam no estágio IV da IRC (INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY, 2006).

Cães urêmicos apresentaram valores plasmáticos de guanidina significativamente superiores aos de cães sadios (Tabela1), porém não houve correlação significativa entre os níveis dessa toxina com qualquer uma das alterações laboratoriais realizadas.

De modo geral, as alterações laboratoriais, observadas no presente estudo foram similares aos descritos em cães nos estágios finais da IRC (ALMEIDA et al., 2013a; SILVA et al., 2013). Dentre as alterações observadas, destaca-se o aumento da atividade de AST plasmática, em cães com IRC. Este achado é concordante com recentes estudos em cães, onde igualmente verificaram que o aumento da atividade de AST está associado à doença renal (ZYGNER et al., 2012). Segundo esse autor, a relação AST/ALT pode ser utilizada como um marcador de lesão renal na ausência de lesão hepática, muscular e hemólise, conforme ocorreu no presente estudo.

Tabela 1 - Sinais clínicos apresentados, hemograma, perfil bioquímico sérico e urinálise de cães controles e urêmicos no estágio IV da insuficiência renal crônica

Parâmetro	Controle (n=20)	Urêmico (n=20)
<i>Sinais clínicos</i>		
Caquexia	Ausente	70%
Halitose urêmica	Ausente	92%
Ulceração oral e na língua	Ausente	96%
Desidratação	Ausente	65%
<i>Exames laboratoriais</i>		
Hemograma		
Volume globular (%)	47,7 ± 3,3	24,56 ± 9,03
Hemácias (10 ¹² /L)	6,5 ± 0,5	3,45 ± 1,32
Hemoglobina (g/dL)	15,9 ± 1,0	8,06 ± 2,73
VCM (fL)	73,2 ± 2,9	71,36 ± 4,95
CHCM (%)	33,3 ± 0,2	33,08 ± 2,22
Leucócitos totais (x 10 ⁹ /L)	9,9 ± 2,6	13,72 ± 7,82
Bioquímica		
Albumina (g/L)	31,8 ± 1,6	22,42 ± 6,37
ALT (UI/L)	44,29 ± 13,2	61,76 ± 55,42
AST (UI/L)	26,1 ± 8,1	46,76 ± 16,86
Colesterol (mg/dL)	178,3 ± 51,4	265,40 ± 71,96
Creatinina (mg/dL)	1,07 ± 0,16	8,08 ± 3,03
Glicose (mg/dL)	94,9 ± 10,7	101,71 ± 33,43
Proteína total (g/L)	65,8 ± 6,3	74,46 ± 14,70
Ureia (mg/dL)	32,6 ± 8,1	362,75 ± 105,58
Urinálise		
Densidade urinária (UG)	1,043 ± 0,003	1,016 ± 0,004
UPC	0,2 ± 0,07	3,7 ± 2,1
Guanidina (mg/L)	79.6±25.49	1121.2±3659.55

* VCM – Volume corpuscular médio; CHCM – Concentração hemoglobínica corpuscular média; UPC – Relação proteína/creatinina urinária.

3.2 Parâmetros *in vivo* do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis e urêmicos.

Podemos observar que houve uma diminuição significativa da viabilidade dos neutrófilos induzidos com camptotecina (CAM), o mesmo não ocorreu no espontâneo. A taxa de apoptose final foi maior no grupo urêmico, sendo significativo esse aumento nos neutrófilos sem indução. Na apoptose total houve um aumento significativo em neutrófilos induzidos pela CAM (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetro *in vivo* de neutrófilos de cães saudáveis e urêmicos. Análise da taxa de apoptose (%) de neutrófilos de cães saudáveis e urêmicos na presença (CAM) e ausência (NE) da indução com camptotecina (CAM), denominada não-estimulada e espontânea, respectivamente

Parâmetros	Controle	Urêmico	p-valor
Viabilidade NE (%)	98,77 ± 0,29	98,42 ± 0,61	0,1500
Viabilidade CAM (%)	85,5 ± 2,96a	78,05 ± 4,30b	0,0001
Apoptose final NE (%)	0,15 ± 0,07a	0,26 ± 0,09b	0,0024
Apoptose final CAM (%)	5,4 ± 1,49	7,0 ± 1,67	0,1087
Apoptose total NE (%)	0,29 ± 0,12	0,36 ± 0,12	0,4307
Apoptose total CAM (%)	7,51 ± 2,43a	16,39 ± 4,80b	0,0001

Análise *in vivo* do metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães saudáveis e urêmicos indicou maior produção de superóxido em cães em uremia, em que mostrou um aumento significativo quando estimulado com PMA (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise *in vivo* do metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães saudáveis (Controle) e urêmicos, estimado pela fluorescência média do brometo de etídio em neutrófilos da produção espontânea de superóxido e da produção de superóxido de neutrófilos ativados com PMA

Grupos	Espontânea	PMA
Controle	55,96 ± 16,71	159,7 ± 79,4a
Urêmico	69,44 ± 38,05	397,45 ± 154,36b
p-valor	0,6730	0,002

3.3 Efeito do AGA sobre o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos de cães sadios.

Em cães o AGA inibiu *in vitro* o metabolismo oxidativo (Figura 1) sem alterar viabilidade e apoptose dos neutrófilos (Tabela 2).

A produção espontânea basal de superóxido não foi afetada, quando os neutrófilos foram incubados com o AGA. Entretanto, esta toxina promoveu uma

diminuição significativa da produção de superóxido nos neutrófilos ativados com PMA (Figura 1).

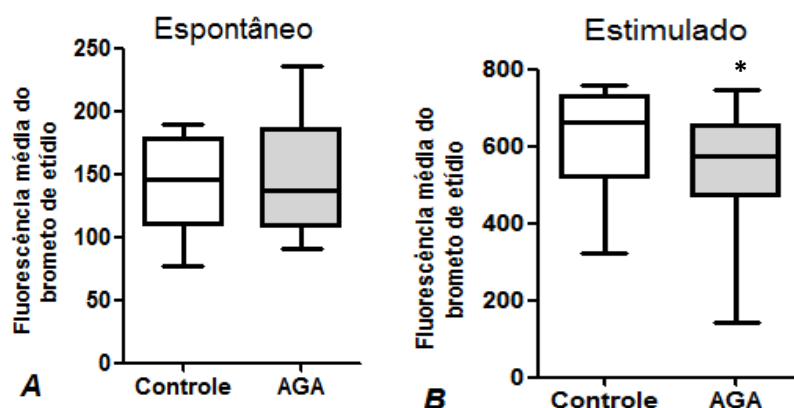


Figura 1 – Efeito inibitório do ácido guanidinoacético (AGA) sobre o metabolismo oxidativo de cães saudáveis. Valores da produção de superóxido estimado pela fluorescência média do brometo de etídio em neutrófilos incubados em meio RPMI puro (Controle) e em RPMI enriquecido com 5 mg/dL de AGA. Figura A representa resultados da produção espontânea de superóxido de neutrófilos sem ativação. Figura B representa a produção de superóxido de neutrófilos ativados com PMA. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Tabela 4 – Avaliação *in vitro* da taxa de apoptose (%) de neutrófilos de cães saudáveis incubados em meio RPMI 1640 (Controle) e com ácido guanidinoacético (AGA), na presença e ausência da indução com camptotecina (CAM), denominada não-estimulada e espontânea, respectivamente

Parâmetro	Controle	AGA	p-valor
Viabilidade NE (%)	98,28 ± 0,61	98,19 ± 0,49	0,6224
Viabilidade CAM (%)	59,35 ± 7,21	59,42 ± 7,68	0,7999
Apoptose inicial NE (%)	0,24 ± 0,24	0,19 ± 0,12	0,3035
Apoptose inicial CAM (%)	20,18 ± 3,40	20,31 ± 4,23	0,8783
Apoptose final NE (%)	0,33 ± 0,20	0,37 ± 0,14	0,4354
Apoptose final CAM (%)	20,05 ± 5,02	19,89 ± 5,58	0,8750
Apoptose total NE (%)	0,65 ± 0,41	0,48 ± 0,30	0,9646
Apoptose total CAM (%)	40,24 ± 7,07	34,84 ± 15,84	0,9833

4 Discussão

4.1 O aumento da concentração sérica da guanidina em cães com IRC não está associada a alteração do metabolismo oxidativo e apoptose em neutrófilos de cães.

Cendoroglo et al. (1999) comprovou em humanos que na fase inicial da IRC ocorre o aumento do metabolismo oxidativo os neutrófilos capaz de gerar estresse oxidativo, em que nessa situação o excesso de ERO lesiona estruturas celulares vitais e acelerar a apoptose. Assim como neutrófilos *primed* de cães com IRC podem, em longo prazo, causar estresse oxidativo capaz de afetar a função e a viabilidade dos neutrófilos (ALMEIDA et al., 2013a; SILVA et al., 2013).

Quando comparado neutrófilos de cães saudáveis com uremicos notou-se um efeito *priming* que resultou numa maior produção de superóxido nos neutrófilos em repouso e após a ativação com o PMA, seria quando os neutrófilos são pré - estimulados, e na presença de um segundo estímulo, no caso o PMA, essas células se tornam ativada. No estado *priming*, liberam pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio, e podem retornar ao estado de repouso. O nível de neutrófilos *primed* pode ser relacionado com a gravidade da doença e sua evolução (STEVE et al., 2002).

Os nossos resultados contradizem a Hirayama et al. (2000), que notaram um diminuição da produção de superóxido em neutrófilos incubados com vários compostos guanidínicos. Isso pode ser explicado pelo fato de cada composto guanidínicos agir de uma forma diferente, devido à composição química das guanidina terem uma heterogeneidade e assim atuar de forma distinta na função dos leucócitos (GLORIEUX, et al., 2004).

4.2 A IRC causa aumento da concentração plasmática de guanidina em cães.

A concentração plasmática de guanidina, até então, não havia sido quantificada em cães normais e urêmicos. Os valores de guanidina plasmática obtidos no presente estudo foram similares aos descritos em humanos saudáveis e com IRC (DE DEYN et al., 1987; VANHOLDER et al., 2003) e, aproximadamente, 10 vezes menor que a da metilguanidina, relatada em cães urêmicos nefrectomizados (BALESTRI et al., 1970; GIOVANETTI et al., 1973). Nos estudos realizados em humanos também foi observado que as concentrações séricas de guanidina são na mesma proporção menores do que a da metilguanidina (DE DEYN et al., 1987; VANHOLDER et al., 2003). Portanto, é razoável supor que os cães com IRC se assemelham em relação à retenção desses solutos guanidínicos em humanos.

A guanidina assim como a ureia e a creatinina é um derivado do catabolismo protéico e sua concentração no sangue decorre da falha na excreção renal (VANHOLDER et al., 2003). Entretanto, não houve qualquer correlação significativa entre esta toxina e as demais alterações do perfil bioquímico de cães com IRC, sugerindo que o aumento da guanidina plasmática, observado no presente estudo, não expressou apenas a falha de excreção dos compostos nitrogenados. Assim como ocorre em pacientes humanos e com a ureia sanguínea, o aumento de guanidina no sangue pode ser atribuído também, ao aumento da sua síntese, decorrente do maior catabolismo proteico em pacientes com IRC (KISHORE et al., 1989).

4.3 O AGA inibe o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães

Neutrófilos ativados com PMA apresentam um aumento na produção de superóxido, entretanto este aumento foi significativamente menor na presença da guanidina (Figura 1). Hirayama et al. (2000) indicaram que neutrófilos, incubados com uma mistura de compostos guanidínicos reduziram a produção de superóxido em vários ativadores, devido a redução energética do fluxo glicolítico. Porém, ao ser ativado com o PMA, não houve alteração do metabolismo oxidativo. De acordo com Burkey et al. (1993) este ativador

promove o aumento da produção de superóxido, via ativação da proteína quinase C, que independe de aporte de ATP.

Curiosamente Hirayama et al. (2000) ao avaliar o AGA, observaram que o AGA divergiu de outras guanidinas, por promover a inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, mesmo quando estimulados com zymozan e FMLP. Entretanto tais resultados não condizem com o efeito inibidor do AGA sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilo ativados com PMA, observado no presente estudo e por Glorieux et al.(2004).

O PMA utilizado no presente estudo e por Glorieux et al.(2004) é um ativador solúvel, análogo ao diacilglicerol, que permeia a membrana plasmática neutrofílica e ativa diretamente as isoformas das proteínas quinase C (PKC) intracelulares, que por sua vez, ativam o sistema NADPH oxidase, promovendo a explosão respiratória (SANTOS, 2007). Outros estudos são necessários para esclarecer a razão para tais divergências e o mecanismo pelo qual a guanidina AGA afeta o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães.

Resultados divergentes, sobre efeito de diferentes toxinas, são comuns, de forma que, o grupo europeu de toxinas tem procurado estabelecer protocolos para estudos *in vitro* (VANHOLDER et al., 2003). A comparação dos resultados fica prejudicada, uma vez que, num estudo, utilizou-se neutrófilo de humanos saudáveis (HIRAYAMA et al., 2000) e noutro, monócitos leucêmicos humanos (GLOREAUX et al.,2004). Há de se considerar ainda, que há outras diferenças entre os estudos, quanto ao delineamento (concentrações e tempo de incubação com a toxinas), e quanto à metodologia utilizada para a ativação e quantificação da produção de superóxido dos neutrófilos.

Identificar os fatores que influenciam a função e a apoptose dos neutrófilos é o primeiro passo para entender a causa da imunossupressão que ocorre na uremia (COHEN et al., 2001). Já havíamos demonstrado que os compostos presentes no plasma de cães urêmicos diminuem *in vitro* a produção de superóxido de neutrófilos de cães (BARBOSA et al., 2010). Em outro estudo havíamos demonstrado que em cães com IRC ocorre estresse oxidativo e que a produção neutrofílica de superóxido diminui à medida que a

apoptose dos neutrófilos aumenta (ALMEIDA et al., 2013b; SILVA et al., 2013). Com base nestes estudos anteriores foi formulada a hipótese inicial de que, o efeito inibitório da guanidina sobre o metabolismo oxidativo estaria associado ao aumento da apoptose.

Os resultados obtidos negam parcialmente a hipótese inicial, comprovam que o AGA isoladamente, inibe o metabolismo oxidativo de cães, porém, não contribuem para o estresse oxidativo ou aumento da apoptose dos neutrófilos, já descritos (BARBOSA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013a; SILVA et al., 2013).

O efeito inibitório do AGA sobre a produção neutrofílica de superóxido, obtido *in vitro*, necessita ser confirmado, *in vivo*, em cães com IRC. O presente estudo é o ponto de partida para futuras investigações sobre as toxinas urêmicas. A fim de preservar a resposta imune de cães com IRC, torna-se necessário entender, como o AGA e outras toxinas urêmicas afetam a função dos neutrófilos. O melhor entendimento, desse tema, poderá contribuir para o estabelecimento de novas estratégias de tratamento, incluindo o desenvolvimento de membranas de hemodiálise com maior capacidade de filtrar compostos guanidínicos e drogas capazes de inibir a produção ou o efeito dessas toxinas.

5 Conclusão

O aumento da guanidina em cães com IRC não está associada a alteração do metabolismo oxidativo e apoptose em neutrófilos de cães. O ácido guanidinoacético isoladamente promove a inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos *in vitro* sem afetar a viabilidade dessas células.

6 Agradecimentos

FAPESP pelo financiamento do projeto (Proc. 2011/18746-3) e Laine Margareth Gabas pelo auxílio na pesquisa.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.F.M. et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, .n. 198, n. 3, p.599-605, 2013a.

ALMEIDA, B.F.M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.1-2, p.6-12, 2013b.

ANDING, k. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, n.10, p.2067-2073, 2003.

AOYAGI, K. et al. Role of reactive oxygen and argininosuccinate in guanidinosuccinate synthesis in isolated rat hepatocytes. **Enzyme e Protein**, Tsukuba, v. 49, n. 4, p. 205–211, 1996.

BALESTRI, P.L. et al. Uremic Toxins. **Archives of Internal Medicine**, v.126, n.5, p. 843 – 845, 1970.

BARBOSA, T.S.; MORI, C.K.; CIARLINI, P.C. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1352-1358, 2010.

BLANDIN, C.C. et al. Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Paris, v.21, n.6, p.1555-1563, 2006.

CENDOROGLIO, M. et al. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.10, n. 1, p. 93-100, 1999.

COHEN G; HÖLL, W. H. Immune dysfunction in uremia-an update. **Toxins**, v.4, n.11, p.962-990, 2012.

COHEN, G.; RUDNICKI, M.; HÖORL, W.H. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. **Kidney International**, v. 78, p. 548-552, 2001.

DE DEYN, P.P. et al. Guanidino compounds in serum and cerebrospinal fluid of non-dialyzed patients with renal insufficiency. **Clinica Chimica Acta**, v. 167, n.1, p. 81-88, 1987.

GIOVANNETTI, S.; BALESTRI, P.L; BARSOTTI, G. Methyguanidine in uremia. **Archives of Internal Medicine**, v.131, n. 5, p. 709-713, 1973.

GLORIEUX, G. et al. In vitro study of the potential role of guanidines in leukocyte functions related to atherogenesis and infection. **Kidney International**, v.65, p.2184-2192, 2004.

GLORIEUX, G. Uraemic retention and apoptosis: what is the balance for the inflammatory status in uraemia? **European Journal of Clinical Investigation**, v.33,n.8, p. 631-634, 2003.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Iris staging of chronic renal disease. 2006. Disponível em <http://www.iris-kidney.com/awards/en/2006.shtml>. Acesso em: 13 dez 2013.

HIRAYAMA, A. et al. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidino compounds. **Journal of the American Society of nephrology**, Londres, v.11, n.4, p. 684-689, 2000.

KAO, M.P.C. et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of Human Hypertension**, v.24, n. 1 p.1-8, 2010.

KERR, M.G. the nitrogenous substance. In:_____ **Veterinary laboratory medicine clinical biochemistry and haematology**. 2.ed. Berlin: Blackwell science, 2002. Cap.7, p.101-110.

KISHORE, B.K. Clinico-biochemical aspects of guanidine compounds in uraemic toxicity. **International Urology and Nephrology**, v.21, n.2, p.223-232, 1989.

MIYATA, T.; KUROKAWA,K.; STRIHOU, C.V.Y. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. **Kidney International**, v.76, p. 5120-5125, 2000.

OSBORNE, C.A.; STEVENS, J.B.; LULICH, J.P.; ULRICH, J.P.; BIRD, K.A.; KOEHLER, L.A.; SWANSON, L.L. A Clinic's analysis of urinalysis. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Williams & Wilkins: Baltimore, 1995. Cap.7, p.136-210, 1995.

RUTKOWSKI, P. et al. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. **Journal of Renal Nutrition**, v.16, n. 3, p.190-193, 2006.

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

SARDENBERG, C. et al. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, n.1, p.160-165, 2006.

SILVA, A. C. R. A. et al. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.77, n.2, p.136-141, 2013.

SWAIN, S. D.; ROHN, T.T.; QUINN, M.T. Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents. **Antioxidants & redox signaling**, v. 4,n. 1, p. 69-83, 2002.

THRALL, M.A. et al. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca, 2007.

VANHOLDER, R. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v.63, n. 5, p. 1934-1943, 2003.

VANHOLDER, R.; LAECKE, S.V.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology**, v.23, n.8, p. 1211-1221, 2008.

VANHOLDER, R. et al. Uremic toxicity: present state of the art. **The International Journal of Artificial Organs**, V. 24, n.10, p.695-725, 2001.

WAKIL, M.F. et al. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos - abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, v.40, n.10,p. 2226-2234, 2010.

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*, Louisville, v. 5, n.9, p. 1697–1702, mar. 1995.

WHYTE, M.K. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis, **Journal Immunology**, v.150, n.11, p.5124-5134, 1993.

ZYGNER, W. et al. Increased AST/ALT ratio in azotaemic dogs infected with *Babesia canis*. **Polish Journal of Veterinary Science**,v. 15, n.3. p. 483-486, 2012.