

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

**ESTRESSE OXIDATIVO, PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO  
E A APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS DE CÃES COM  
INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

**Adriana Carolina Rodrigues Almeida Silva**  
Biomédica

**ARAÇATUBA - SP  
2011**

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

**ESTRESSE OXIDATIVO, PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO  
E A APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS DE CÃES COM  
INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

**Adriana Carolina Rodrigues Almeida Silva  
Orientador: Prof. Adj. Paulo César Ciarlini**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina  
Veterinária – 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**

**ADRIANA CAROLINA RODRIGUES ALMEIDA SILVA** – nascida em 07 de junho de 1986, na cidade de Jí-Paraná/RO, iniciou e concluiu o Curso de Biomedicina no Centro Universitário de Votuporanga/ Votuporanga-SP (2004 - 2007). Durante o período acadêmico desenvolveu atividades tais com estágios extracurriculares e curriculares. Em 2008 iniciou estágio voluntário no Laboratório Clínico Veterinário da 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. No ano de 2010 integralizou os créditos e desenvolveu seu projeto de pesquisa. Em 05 de abril de 2011 foi aprovada no exame geral de qualificação intitulado “Relação entre o estresse oxidativo, a produção de superóxido e a apoptose de neutrófilos de cães urêmicos e azotêmicos.” no qual faz parte desta dissertação.

*“Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as  
coisas; glória, pois, a Ele eternamente”  
Romanos 11:36*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, porque sem ele eu nada posso. Ele é o motivo de tudo e a razão pela qual eu consigo realizar os meus sonhos e projetos.

Ao Professor Paulo César Ciarlini por toda atenção, compreensão, ajuda e orientação, porque muitas vezes agiu com sabedoria e paciência.

Aos meus pais, que abriram mão dos seus sonhos para fazer dos meus sonhos realidade e por serem exemplos de caráter e determinação. Não há palavras que possam expressar o quão grata sou por todo apoio e incentivo.

Aos meus avós (in memória) que sonharam e acreditaram no meu futuro junto comigo, muito do que já conquistei em minha vida devo a eles.

Ao meu irmão Alexandre que sempre foi meu amigo e acompanha todas as minhas conquistas com muita alegria.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado durante todo o processo e munidos de muito carinho me animaram para finalizar esta etapa da minha vida. Especialmente a Pri Pagan, amiga de todas as horas, que com muito amor me apoiou.

A Tatiana Barbosa e Carol Mori que fizeram parte desse projeto e se tornaram amigas, garantindo muitas risadas, incentivo e conselhos.

À Técnica do Laboratório Clínico Laine Margareth, que foi peça fundamental para a conclusão deste trabalho, além de ter se tornado uma amiga especial.

Aos pós-graduandos Carolina Soares e Breno Almeida por toda ajuda, companheirismo e incentivo, sem o qual eu não teria finalizado o meu trabalho.

À minha banca de qualificação, Profa. Adj. Valéria Marçal Félix de Lima e Prof. Ass. Dr. Wagner Luis Ferreira, 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 pela oportunidade de realizar este curso de mestrado.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

### Página

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 .....                                                                                                  | 9  |
| Considerações Gerais .....                                                                                        | 10 |
| Objetivos .....                                                                                                   | 18 |
| Referências .....                                                                                                 | 19 |
| CAPÍTULO 2 .....                                                                                                  | 23 |
| ESTRESSE OXIDATIVO, PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO E A APOPTOSE<br>DE NEUTRÓFILOS DE CÃES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA |    |
| Resumo.....                                                                                                       | 24 |
| Introdução.....                                                                                                   | 27 |
| Material e Métodos .....                                                                                          | 29 |
| Resultados .....                                                                                                  | 34 |
| Discussão .....                                                                                                   | 35 |
| Conclusão .....                                                                                                   | 39 |
| Referências.....                                                                                                  | 39 |
| ANEXO .....                                                                                                       | 46 |
| Normas da Revista.....                                                                                            | 47 |

## **ESTRESSE OXIDATIVO, PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO E A APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS DE CÃES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

**RESUMO** – À semelhança do que ocorre em homens e gatos, o estresse oxidativo associado à insuficiência renal crônica (IRC) canina pode afetar a função dos neutrófilos. Em cães urêmicos com IRC ocorre aumento do estresse oxidativo e os neutrófilos tornam-se menos viáveis e funcionais. Dezoito cães adultos urêmicos com insuficiência renal crônica foram comparados com 10 cães adultos controle. Foram determinados o hemograma, a urinálise, o perfil bioquímico plasmático, a peroxidação lipídica plasmática, a capacidade antioxidante total (CAT) do plasma, a produção de superóxido, a taxa de viabilidade e a apoptose dos neutrófilos. As taxas plasmáticas de uréia ( $P < 0,01$ ), creatinina ( $p < 0,01$ ) e colesterol ( $p < 0,001$ ) de cães urêmicos foram significativamente superiores aos do controle. Em cães com uremia o volume globular ( $p < 0,0001$ ), a densidade urinária ( $p < 0,015$ ) e a peroxidação lipídica plasmática ( $p < 0,001$ ) foram significativamente menores quando comparado aos do grupo controle. Os neutrófilos de cães urêmicos apresentaram uma maior taxa de apoptose espontânea ( $0,018 \pm 0,016$  vs  $0,30 \pm 0,23$ ,  $p < 0,001$ ) e induzida com Camptotecina ( $4,34 \pm 3,93$  vs  $26,29 \pm 18,52$ ,  $p < 0,01$ ). Comparado aos do grupo controle, os valores médios da fluorescência gerada pela produção de superóxido dos neutrófilos isolados de cães urêmicos foi menor na presença ( $162,93 \pm 173,09$  vs  $49,10 \pm 41,22$ ,  $p < 0,001$ ) e na ausência de estímulo com PMA ( $1182,5 \pm 1253,5$  vs  $212,9 \pm 294,25$ ,  $p < 0,01$ ). Durante o estresse oxidativo em cães urêmicos portadores de IRC ocorre uma aceleração da apoptose que diminui o número de neutrófilos viáveis e a produção neutrofílica de superóxido. Os mecanismos de como o estresse oxidativo da uremia acelera a apoptose e diminui o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães permanecem a ser determinados.

**Palavras - chave:** metabolismo oxidativo, peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total, imunossupressão.

## **OXIDATIVE STRESS, APOPTOSIS AND SUPEROXIDE PRODUCTION OF NEUTROPHILS FROM DOGS WITH CHRONIC RENAL FAILURE**

**SUMMARY** - Similar to what occurs in men and cats oxidative stress associated with chronic renal failure (CRF) can affect the function of canine neutrophils. In uremic dogs with CRF is increased oxidative stress and neutrophils become less viable and functional. Eighteen dogs adult uremic patients with chronic renal failure were compared with 10 control adult dogs. We measured the blood count, urinalysis, serum biochemical profile, lipid peroxidation, plasma total antioxidant capacity (TAC) of plasma, the production of superoxide, the rate of viability and apoptosis of neutrophils. Plasma levels of urea ( $P < 0.01$ ), creatinine ( $p < 0.01$ ) and cholesterol ( $p < 0.001$ ) in uremic dogs were significantly above baseline. In dogs with uremia the packed cell volume ( $p < 0.0001$ ), urine specific gravity ( $p < 0.015$ ) and plasma lipid peroxidation ( $p < 0.001$ ) were significantly lower when compared to the control group. Neutrophils in uremic dogs showed a higher rate of spontaneous apoptosis ( $0.018 \pm 0.016$  vs.  $0.30 \pm 0.23$ ,  $p < 0.001$ ) and induced with Camptothecin ( $4.34 \pm 3.93$  vs  $26.29 \pm 18.52$ ,  $p < 0.01$ ). Compared to the control group the mean fluorescence generated by the superoxide production of neutrophils isolated from uremic dogs was lower in the presence ( $162.93 \pm 49.10$  vs  $173.09 \pm 41.22$ ,  $p < 0.001$ ) and in the absence of stimulation with PMA ( $1182.5 \pm 212.9$  vs.  $1253.5 \pm 294.25$   $p < 0.01$ ). During the oxidative stress in uremic dogs with CRF is an acceleration of apoptosis which reduces the number of viable neutrophils and neutrophil production of superoxide. As the mechanisms of oxidative stress in uremia accelerates apoptosis and oxidative metabolism of neutrophils in dogs it remains to be determined.

**Keywords:** oxidative metabolism, lipidic peroxidation, antioxidant status, immunosuppression

## Capítulo 1

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1. Definição 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 neutrófilos.

### **2. A uremia e o estresse oxidativo.**

Por definição, uremia é o conjunto de sintomas clínicos e alterações bioquímicas que estão associados diretamente com a perda crítica de néfrons funcionais, comprometendo a capacidade dos rins de depurar o sangue (NELSON e COUTO, 2001). A insuficiência renal (IR) é caracterizada pelo comprometimento de 75% ou mais das funções renais devido a retenção dos restos de produtos nitrogenados não protéicos no corpo, podendo se

classificada em insuficiência renal aguda (IRA) ou insuficiência renal crônica (IRC), (CHEW e DiBARTOLA, 1992 ; POLZIN et al.,1995).

Em cães com rim funcional a taxa de uréia plasmática normal é de 3 – 8 mmol/L, porém na uremia a concentração plasmática de uréia supera 35 mmol/L, atingindo valores superiores a 100 mmol/L na insuficiência renal, sendo que o nível de creatinina eleva-se na proporção de 1% do valor da uréia (KERR, 2003).

A IRC é a doença renal mais comum em cães e acomete mais frequentemente os animais com idade média de 6,5 anos. Apesar da IRC ser considerada irreversível, progressiva e ter mau prognóstico a longo prazo, seu portador pode sobreviver com boa qualidade de vida por muitos meses a anos (POLZIN et al. 2004).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas normalmente em baixo nível pelo metabolismo celular aeróbico e podem interagir e lesionar diversas estruturas celulares quando presentes em excesso. O radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila (OH) são importantes ERO presentes nos rins. (HASANOGLU et al., 1994).

A fonte mais importante na geração de ERO pelos glomérulos e células tubulares é a liberação<sup>11</sup> de oxigênio ativado das mitocôndrias durante a respiração oxidativa. A concentração de ERO e a limitação da peroxidação lipídica é mantida por meio de defesas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, óxido nítrico, vitamina C e E) que interrompem a cadeia de peroxidação, removendo os ERO. (BROWN, 2008).

Quando há um desequilíbrio no qual a geração de ERO é superior a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante nos rins, os radicais livres nas membranas celulares aumentam, resultando no estresse oxidativo citotóxico que danificam os componentes celulares, podendo levar a apoptose celular (ANAZETTI e MELO, 2007).

Atualmente, pesquisadores têm procurado avaliar esta peroxidação lipídica; entretanto, é difícil quantificar os radicais livres produzidos *in vivo*, pois eles têm alta reatividade e meia-vida curta. Hoje, são utilizados métodos que medem os produtos de oxidação de lipídeos, proteínas, glicídeos e ácidos nucléicos como indicadores indiretos da produção endógena de ERO (MAFRA et al. 1992). O malondialdeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sua formação ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, células e tecidos (BONNES e GUÉRIN, 1992).

Uma menor atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) têm sido observadas nos pacientes com IRC, sob tratamento conservador e diálise peritoneal domiciliar contínua (CAPD), o que sugere que os mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos estão diminuídos nos pacientes com insuficiência renal crônica (DURAK et al., 1994).

De acordo com Baliga et al. (1997), existem pelo menos duas razões para se considerar os efeitos das ERO na toxicidade das doenças renais: primeiro, porque o estudo das ERO atualmente se apresenta como uma área

nova e emergente da biologia e, segundo, porque as pesquisas nessa área podem oferecer uma oportunidade terapêutica na redução da morbidade em pacientes portadores de doença renal.

### 3. Estresse oxidativo dos leucócitos na uremia.

Os neutrófilos quando apropriadamente estimulados expressam e secretam IL-8 que, dentre vários efeitos biológicos, induz a quimiotaxia e ativação dos neutrófilos. Duas vias metabólicas são ativadas durante a fagocitose, uma envolve o metabolismo da glicose via hexosemonofosfato e outra a via adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase) que produz espécies reativas de oxigênio, incluindo o superóxido (HÜIMIN et al., 2000). O IP dispara a liberação de cálcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  e o DAG ativa a proteína C quinase, de modo que em neutrófilos esta mudança de  $[Ca^{2+}]_i$  estimula vários receptores e é importante para produção de superóxido. O superóxido produzido pela explosão respiratória de neutrófilos ativados depende do NADPH da via hexosemonofosfato. O NADPH é oxidada pela ativação da enzima NADPH-oxidase que transfere dois elétrons para cada duas moléculas de oxigênio, gerando o anion superóxido essencial para função bactericida dos neutrófilos (DOBOS et al. 1997).

O neutrófilo exerce função crucial na defesa do organismo contra as infecções e têm sido objeto de extensos estudos, em particular sobre seu metabolismo oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio. Hörl et al. (1990) identificaram em paciente com IRC uma proteína inibidora de

granulócitos que compromete a atividade quimiotática e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos diminuindo a atividade glicolítica e níveis de ATP intracelular. Estudos também indicam que a uremia afeta a função do receptor Fc dos leucócitos e suprime sua atividade glicolítica (RUIZ et al. 2000).

A infecção bacteriana é responsável por 15% das mortes de nefropatas terminais e pacientes submetidos à hemodiálise (CENDOROGLO et al.,1999). Acredita-se que a alta mortalidade por infecções bacterianas em paciente humanos com lesões renais terminais seja devido a 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 entendida, porém é atribuída a sobrecarga de ferro e deficiência de zinco, ao aumento de cálcio ionizado intracelular devido hiperparatireoidismo, a anemia, a desnutrição e a própria diálise (ANDING et al. 2003). Entretanto, estudos que investigam a fagocitose e a produção de ERO em leucócitos de pacientes com IR apresentam resultados conflitantes. Antes da diálise, a produção espontânea e estimulada de ERO tem sido reportada como normal, diminuída ou aumentada (WARD, 1995; HAAG-WEBER et al. 1996; GASTALDELLO et al. 2000).

Várias toxinas urêmicas como o p-cresol e diferentes componentes guanidínicos afetam a função do neutrófilo. O p-cresol afeta 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).

Hattersley e Engels (1974) observaram em pacientes urêmicos hipersegmentação neutrofílica sem anemia macrocítica. Pesquisadores acreditam que o metabolismo do ferro e a produção de radicais hidroxil são intimamente relacionados com o dano oxidativo do DNA dos leucócitos. Usando o 8-hidroxi 2'-desoxiguanosina (8-OHdG) como marcador, Tarng et al. (2002) demonstraram que o DNA de leucócitos periféricos é progressivamente danificado durante o curso da IRC e que estes danos são exacerbados com a diálise peritoneal.

O neutrófilo que sofre apoptose tem suas funções de quimiotaxia, fagocitose e produção de superóxido prejudicada (WHYTE et al., 1993). Cendoroglo et al. (1999) constataram *in vitro* que o plasma urêmico acelera a apoptose de neutrófilos normais, de modo similar ao observado em pacientes urêmicos, entretanto, Majewska et al. (2003) verificaram que a hemodiálise não acelera apoptose dos neutrófilos como a uremia, apenas produz um seqüestro das células apoptóticas.

Huimin et al. (2000) verificaram que existe uma diminuição na expressão do gene gp-91<sup>phox</sup> no sangue periférico de paciente com IRC, indicando um comprometimento do sistema NADPH-oxidase. Neste estudo verificou-se que os paciente submetidos a hemodiálise possuem leucócitos que expressam espontaneamente IL-8, sugerindo que as toxina urêmicas, a diálise e/ou a anemia presente nos paciente com IRC promova uma pré-ativação que pode

induzir um defeito funcional do neutrófilo. Estudo de Hirayama et al. (2000) demonstraram que neutrófilos tratados com componentes guanidinos tiveram a produção de superóxido inibida devido a diminuição da concentração de ATP e do fluxo glicolítico. Gastaldello et al. (2000) concluíram que a capacidade de produção de  $H_2O_2$  de paciente com IRC é normal e especula que o aumento do metabolismo oxidativo após a hemodiálise está relacionado com a produção de fator ativador de plaquetas (PAF). Diferentemente, Rysz et al. (2004) acreditam que a uremia associada à IRC humana favorece o aumento de produção leucocitária de  $H_2O_2$  e diminui a atividade da enzima glutathione peroxidase responsável pela decomposição do  $H_2O_2$ , causando um estresse oxidativo.

Em pacientes humanos com IRC observou-se uma correlação linear entre os níveis séricos de creatinina e moléculas de adesão leucocitária, sugerindo que os rins tenham importante função no seu catabolismo (BONOMINI et al., 1998). Há evidências de que os níveis séricos das moléculas de adesão dos leucócitos (ICAM-1, VCAM-1 e MCP-1) aumentam em paciente hemodialisado provavelmente por aumento de síntese, secreção ou excreção (PAPAYANNI et al., 2002).

Enquanto que em humanos o neutrófilo exerce importante função de defender o periodonto contra infecções (KHOCHT, 1996), em cães a doença periodontal tem sido relacionada com nefropatia (DE BOWES et al. 1996). Recentemente, Barbudo-Selmi (2004) verificaram que a resposta inflamatória gengival de cães com IRC difere daqueles com função renal normal. Embora

tais estudos sugeriram que, a semelhança do que ocorre em humanos, a função do neutrófilo possa estar comprometida em cães nefropatas, não encontramos na literatura investigações que confirmem esta hipótese.

**OBJETIVO**

Testar *in vivo* a hipótese de que em cães urêmicos com IRC ocorre aumento do estresse oxidativo e os neutrófilos tornam-se menos viáveis e funcionais e que este está associado com a diminuição do estado antioxidante total do plasma.

## REFERÊNCIAS

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., ALLGAIER, D., JACOBS, E. The influence of uremia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.18, p.2067-2073, 2003.

BALIGA, R., UEDA, N., EALKER, P.D., SHAH, S.V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *American Journal of Kidney Diseases*, v.29, n.3, p.465-467, 1997.

BARBUDO-SELMÍ, G. R., CARVALHO, M.B, SELMI, A.L, MARTINS, S.E.C. Periodontal disease characterization in dogs with normal renal function or chronic renal failure. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p.113-118, 2004.

BONNES, T., GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? *Biochemical Pharmacology*, v.44, n.5, p.985-988, 1992.

BONOMINI, M, HEALE, M, SANTARELLI, P, STUARD, S, SETTEFRATI, N, ABERTAZZI, A. A Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron*, v.79, p.399-407, 1998.

BROWN, S. A. Oxidative stress and chronic renal failure. *Veterinary. Clinics. Small. Animal Practice*, v. 38, p.157-166, 2008.

CENDOROGLO, 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.

CHEW, D.J; DIBARTOLA, S.P. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: ETTINGER, S.J. *Tratado de medicina veterinária: moléstias do cão e do gato*. 3 ed. São Paulo: Manole, 1992. Cap. 107, p.1975-2046.

COHEN, G, RUDNICKI, M., WALTER, F., NIWA, T., HÖRL, W. Glucose-Modified Protein Modulate Essential Functions and Apoptosis of Polymorphonuclear Leukocytes. *Journal American Society of Nephrology*, v.12, p.1264-1271, 2001.

COHEN, G., HAAG-WEBER, M., HÖRL, W.H. Immune dysfunction in uremia. *Kidney International*, v.52, Suppl. 62, p.79-82, 1997.

DE BOWES, J.L. et al. Association of periodontal disease and histopathologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, v.13, n.2, p.57-60, 1996.

DOBOS, G.J., BURGER, M., KUHLMANN, J., PASSLICK-DEETJEN, J., SCHOLLMEYER, P., BÖHLER, J. Improved cytosolic free calcium mobilization and superoxide production in bicarbonate-based peritoneal dialysis solution. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.12, p.973-977, 1997.

DURAK, I., AKYOL, O., BASESME, E., CANBOLAT, O., KAVUTCUM, M. Reduced erythrocyte defense mechanism against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron*, v.66, n.1, p.76-80, 1994.

GASTALDELLO, K., HUSSON, C., WENS, R., JEAN-LOUIS, V., TIELEMANS, C. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.15, p.1638-1646, 2000.

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.

GRAVES, D.T, NAGUIB, G, LU, H, LEONE, C., HSUE, H, KRALL, E. Inflammation is More Persistent in Type 1 Diabetic Mice. *Journal Dentistry Research*, v.84, n.4, p.324-328, 2005.

HAAG-WEBER, M.; HABLE, M.; SHOLLMEYER, P.; HÖRL, W.H. Metabolic response of neutrophils to uremia and dialysis. *Kidney International*, v. 36, n. 27, p. 293-298, 1989

HASANOGLU, E., ALTAN, N., SINDEL, S., ONGUN, C.O, BALI, M., ALTINTAS, E. The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma levels of some trace elements (Al, Cu, Zn) of dialysis patients. *General Pharmacology*, v.25, n.1, p.107-110,1994.

HATTERSLEY, P.G., ENGELS, M.T. Neutrophilic Hypersegmentation Without Macrocytic Anemia. *The Western Journal of Medicine*, v.121, p.179-184, 1974.

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. Fonction du polynucléaire neutrophile dans L'insuffisance rénale. *Flammarion Médecine-Sciences – Actualités Néphrologiques*, p. 157-172, 2001.

HÖRL, W.H., HAAG-WEBER, M., GEORGOPOULOS, A., BLOCK, L.H. Physicochemical characterization of a polypeptide present in uremic serum that inhibits the biological activity of polymorphonuclear cells. *Medical Sciences*, v.87, p.6353-6357, 1990.

HUIMIN, J., QINJUN, X., PEIJUN, Z., YANDE, D., ZHENG, Z., PEIQING, Y. Impaired GP-91<sup>PHOX</sup> gene expression and dysfunction of peripheral blood neutrophils in patients maintaining hemodialysis. *Chinese medical Journal*, v.113, n.2, p.120-123, 2000.

KERR, M.G. The nitrogenous substances. In: \_\_\_\_\_. *Veterinary Laboratory Medicine*. 2. ed. Iowa: Blackwell Science, 2004. Chap.7, p. 101-110.

KHOCHT, A. Periodontitis associated with chronic renal failure: a case report. *Journal of Periodontology*, v.67, n.11, p.1206-1209, 1996.

MAFRA, D., ABDALLA, D.S.P., COZZOLINO, S.M.F. Lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. *Revista de Nutrição*, v.12, n.3, p.205-212, 1992.

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.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina interna de pequenos animais*. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2001. p.493-499.

PAPAYIANNI, A., ALEXOPOULOS, E., GIAMALIS, P., GIONANLIS, L., BELECHRI, A-M, KOUKOUDIS, P., MEMMOS, D. Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.17, p.435-441, 2002.

POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; DELMAR, R.F. Pathophysiology of renal failure and uremia. In: \_\_\_\_\_. *Canine and feline nephrology and urology*. Philadelphia: Williams e Wilkins, 1995. Cap. 16.

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.

RUIZ, P., GOMES, F., SCHREIBER, A.D. Impaired function of macrophage Fc receptors in renal disease. *New England Journal of Medicine*, v.113, n.2, p.120-123, 2000.

RYSZ, J, KASIELSKI, M., APANASIEWICZ, J, KRÓL, M., WOZNICKI, A, LUCIAK, M, NOWAK, D. Increased hydrogen peroxide in the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.19, p.158-163, 2004.

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).

TARG,D.C., CHEN, T.W, HUANG, T.P., CHEN, C.L., LIU, T.Y., WEI, Y.H. Increased Oxidative Damage to Peripheral Blood Leukocyte DNA in Chronic Peritoneal Dialysis Patients. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.13, p.1321-1320, 2002.

WARD, R.A., McLEISH, R. Polymorphonuclear Leukocyte Oxidative Burst is Enhanced in Patients With Chronic Renal Insufficiency. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.5, p.1697-1702, 1995.

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.

## Capítulo 2

**Estresse oxidativo, produção de superóxido e a apoptose de neutrófilos  
de cães com insuficiência renal crônica**

Oxidative stress, apoptosis and superoxide production of neutrophils from dogs  
with chronic renal failure

A.C.R.A. Silva<sup>1</sup>; C.S. Soeiro<sup>1</sup>; B.F.M. Almeida<sup>1</sup>; W.L. Ferreira<sup>2</sup>; V.M.F. Lima<sup>2</sup>; P.C. Ciarlini<sup>2\*</sup>

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

2 Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba -  
FMVA, UNESP, Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil

\*Autor para correspondência: e-mail: [ciarlini@fmva.unesp.br](mailto:ciarlini@fmva.unesp.br).\*

**Abreviaturas:**

ABTS – 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid

CAM - camptotencina

CAT – capacidade antioxidante total

ERO – espécies reativas de oxigênio

HBSS – solução salina balanceada de Hanks

HE - hidroetidina

IRC – insuficiência renal crônica

MDA - malondialdeído

NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

PMA - phorbol 12-myristate 13-acetate

PMN - polimorfonucleares

RPMI - medium RPMI-1640

TBARS – substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

**RESUMO**

**Justificativa:** À semelhança do que ocorre em homens e gatos, o estresse oxidativo associado à insuficiência renal crônica (IRC) canina pode afetar a função dos neutrófilos.

**Hipótese:** Em cães urêmicos com IRC ocorre aumento do estresse oxidativo e os neutrófilos tornam-se menos viáveis e funcionais.

**Animais:** Dezoito cães adultos urêmicos com insuficiência renal crônica foram comparados com 15 cães adultos controle.

**Métodos:** Foi determinado o hemograma, a urinálise, o perfil bioquímico plasmático, a peroxidação lipídica plasmática, a capacidade antioxidante total (CAT) do plasma, a produção de superóxido, a taxa de viabilidade e a apoptose dos neutrófilos.

**Resultados:** As taxas plasmáticas de uréia ( $P < 0,01$ ), creatinina ( $p < 0,01$ ) e colesterol ( $p < 0,001$ ) de cães urêmicos foram significativamente superiores aos do controle. Em cães com uremia o volume globular ( $p < 0,0001$ ), a densidade urinária ( $p < 0,015$ ) e a peroxidação lipídica plasmática ( $p < 0,001$ ) foram significativamente menores quando comparado aos do grupo controle. Os neutrófilos de cães urêmicos apresentaram uma maior taxa de apoptose espontânea ( $0,018 \pm 0,016$  vs  $0,30 \pm 0,23$ ,  $p < 0,001$ ) e induzida com Camptotecina ( $4,34 \pm 3,93$  vs  $26,29 \pm 18,52$ ,  $p < 0,01$ ). Comparado aos do grupo controle, os valores médios da fluorescência gerada pela produção de superóxido dos neutrófilos isolados de cães urêmicos foi menor na ausência ( $162,93 \pm 173,09$  vs  $49,10 \pm 41,22$ ,  $p < 0,001$ ) e na presença de estímulo com PMA ( $1182,5 \pm 1253,5$  vs  $212,9 \pm 294,25$ ,  $p < 0,01$ ).

**Conclusão:** Durante o estresse oxidativo em cães urêmicos portadores de IRC ocorre uma aceleração da apoptose que diminui o número de neutrófilos viáveis e a produção neutrofílica de superóxido. Os mecanismos de como o estresse oxidativo da uremia acelera a apoptose e diminui o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães permanecem a serem determinados.

**Palavras - chave:** metabolismo oxidativo, peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total, imunossupressão.

## **ABSTRACT**

**Background:** Similar to what occurs in men and cats oxidative stress associated with chronic renal failure (CRF) can affect the function of canine neutrophils.

**Hypothesis:** In uremic dogs with CRF is increased oxidative stress and neutrophils become less viable and functional.

**Animals:** Eighteen dogs adult uremic patients with chronic renal failure were compared with 10 control adult dogs.

**Methods:** We measured the blood count, urinalysis, serum biochemical profile, lipid peroxidation, plasma total antioxidant capacity (TAC) of plasma, the production of superoxide, the rate of viability and apoptosis of neutrophils.

**Results:** Plasma levels of urea ( $P < 0.01$ ), creatinine ( $p < 0.01$ ) and cholesterol ( $p < 0.001$ ) in uremic dogs were significantly above baseline. In dogs with uremia the packed cell volume ( $p < 0.0001$ ), urine specific gravity ( $p < 0.015$ ) and plasma lipid peroxidation ( $p < 0.001$ ) were significantly lower when compared to the control group. Neutrophils in uremic dogs showed a higher rate of spontaneous apoptosis ( $0.018 \pm 0.016$  vs.  $0.30 \pm 0.23$ ,  $p < 0.001$ ) and induced with Camptothecin ( $4.34 \pm 3.93$  vs  $26.29 \pm 18.52$ ,  $p < 0.01$ ). Compared to the

control group the mean fluorescence generated by the superoxide production of neutrophils isolated from uremic dogs was lower in the presence ( $162.93 \pm 49.10$  vs  $173.09 \pm 41.22$ ,  $p < 0.001$ ) and in the absence of stimulation with PMA ( $1182.5 \pm 212.9$  vs.  $1253.5 \pm 294.25$   $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** During the oxidative stress in uremic dogs with CRF is an acceleration of apoptosis which reduces the number of viable neutrophils and neutrophil production of superoxide. It remains to be determined as the mechanisms of oxidative stress in uremia accelerates apoptosis and oxidative metabolism of neutrophils in dogs.

**Key-words:** oxidative metabolism, lipidic peroxidation, antioxidant status, immunosuppression.

## INTRODUÇÃO

Em humanos, a insuficiência renal é uma importante causa de imunossupressão<sup>1</sup> que aumenta o risco de morte por infecção bacteriana devido a uma disfunção dos neutrófilos<sup>2</sup> que está associada ao estresse oxidativo.<sup>3</sup>

Os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir da ativação da enzima NADPH-oxidase, gerando o ânion superóxido essencial para função bactericida dos neutrófilos.<sup>4</sup> Embora as ERO derivadas do superóxido sejam necessárias para o mecanismo de defesa dos neutrófilos, os radicais livres produzidos em excesso podem lesar diversas estruturas

celulares, induzindo assim à peroxidação lipídica e aumentando os níveis de apoptose.<sup>5</sup> O aumento do ânion superóxido em neutrófilos de humanos com IRC altera a função da célula endotelial, mesangial e do podócito, além de reduzir o fluxo e excreção de sódio renal.<sup>6,7</sup>

O efeito imunossupressor associado a IRC tem sido pobremente investigado na Medicina Veterinária. Recentemente, Kralova et al.<sup>8</sup> verificaram que diferente do que ocorre em humanos, a IRC em cães não altera a capacidade dos neutrófilos de fagocitar. Já Barbosa et al.,<sup>9</sup> à semelhança do que ocorre em humanos, verificaram *in vitro* que o soro de cães urêmicos afeta o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães. O estresse oxidativo também foi verificado em gatos com IRC e estes apresentam uma diminuição da capacidade antioxidante do plasma e um aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.<sup>10</sup>

Em humanos, é aceito que a viabilidade e função dos neutrófilos são afetadas pelo estresse oxidativo e toxinas urêmicas.<sup>3</sup> Há evidências de que a uremia aumenta a taxa de apoptose e diminui a produção de superóxido de neutrófilos humanos.<sup>11</sup> Entretanto, são conflitantes os resultados dos estudos que avaliaram o estado antioxidante total e endógeno como ácido úrico e albumina em pacientes humanos portadores de IRC.<sup>12,13</sup>

A progressão da IRC em humanos<sup>11</sup> e em gatos<sup>10</sup> está associada com os efeitos deletérios do estresse oxidativo, havendo necessidade de investigar se tal estresse igualmente ocorre em cães e se este altera a produção de superóxido e a sobrevivência dos neutrófilos. Para tal, foi testada a hipótese de que

em cães com IRC ocorre estresse oxidativo e que nesta condição os neutrófilos tornam-se menos viáveis e funcionais.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Seleção dos animais**

Foram utilizados 33 cães adultos de várias raças e ambos os sexos, agrupados de acordo com o perfil clínico e laboratorial. Para o grupo IRC foram selecionados dezoito cães urêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, São Paulo, Brasil, os cães eram portadores de insuficiência renal crônica equivalente ao estágio III e IV do sistema de estadiamento IRIS.<sup>14</sup> O grupo controle foi constituído de 15 cães sem histórico de doença crônica ou sistêmica, com valores inferiores a 8 mmol/L de uréia e de 0,8 µmol/L de creatinina, sem qualquer alteração no exame físico e laboratorial (hemograma completo, urinálise, dosagem plasmática de MDA, capacidade antioxidante total, uréia, creatinina, proteína total, albumina, glicose, colesterol e ácido úrico). Para a formação dos grupos experimentais, todos os cães foram examinados em pelo menos dois diferentes momentos. Animais com histórico de tratamento recente que pudesse interferir na função renal ou leucocitária foram excluídos do estudo. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (COBEA 2007-006096).

### **Preparação das amostras**

Em tubos siliconizados heparinizados a vácuo<sup>a</sup>, de cada animal foram colhidos 4mL de sangue total destinados para isolamento dos neutrófilos e 3mL para obtenção de plasma para análises bioquímicas. Em tubos plásticos contendo K<sub>2</sub>EDTA<sup>b</sup> foram colhidos outros 3mL de sangue total para realização do hemograma. O hemograma e o isolamento dos neutrófilos foram realizados logo após a obtenção das amostras sanguíneas. O plasma utilizado para as análises bioquímicas, quantificação da peroxidação lipídica e determinação da capacidade antioxidante total foi acondicionado a -20°C para posterior análise.

### **Hemograma, urinálise e bioquímico**

As taxas totais de leucócitos, eritrócitos e hemoglobina foram obtidas com auxílio de contador eletrônico de células sanguíneas<sup>c</sup> e o volume globular pelo método microcapilar de Strumia (centrifugação 12700 G/5 minutos). A contagem diferencial de leucócitos foi feita em esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico panótico rápido comercial<sup>d</sup>, segundo as recomendações e critérios de Jain.<sup>15</sup> Todas as análises bioquímicas foram realizadas a 37°C em um analisador automatizado<sup>e</sup> previamente calibrado com calibrador comercial<sup>f</sup> e reações monitoradas com controles de nível I<sup>g</sup> e II<sup>h</sup>. Utilizando conjunto de reativo comercial, a concentração plasmática de ureia foi determinada pelo método enzimático UV urease/Glutamato desidrogenase<sup>i</sup>; de creatinina pelo método cinético Picrato alcalino<sup>j</sup>; de albumina pelo método de verde de bromocresol<sup>k</sup>, ácido úrico pelo método enzimático uricase/peroxidase<sup>l</sup>,

do colesterol pelo método enzimático oxidase/peroxidase<sup>m</sup> e glicose pelo método enzimático glicose oxidase/peroxidase<sup>n</sup>.

### **Mensuração do estresse oxidativo**

Além da mensuração dos antioxidantes plasmáticos albumina e ácido úrico, foi quantificada a CAT do plasma pelo método de inibição da formação de cátion de ABTS<sup>®</sup>. As análises da CAT foram monitoradas com padrão antioxidante específico para automatização<sup>p</sup>.

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada pela quantificação de MDA pelo método de TBARS, utilizando-se um conjunto de reativo comercial<sup>q</sup>. A absorbância (530 nm) das reações foi mensurada em um leitor de placa<sup>r</sup>. Segundo as recomendações do fabricante, a partir de uma solução padrão comercial de MDA (500 µM) e utilizando-se programa computacional<sup>s</sup>, foi elaborada uma curva referente às concentrações finais de 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25 e 50 nmol/mL de MDA. Cada ponto da curva foi obtido a partir do valor médio de 10 repetições.

### **Isolamento dos neutrófilos**

De cada animal, quatro mililitros de sangue total heparinizado (10 UI/mL) foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno estéreis contendo duplo gradiente de separação composto de volumes iguais (3 mL) de Histopaque-1119<sup>t</sup> e 1077<sup>u</sup>. Após centrifugação a 340 G por 30 minutos, a camada de polimorfonucleares (PMN) foi aspirada e lavada duas vezes com solução

aquosa de cloreto amônio (4,01g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,8 g EDTA-Na; ,42g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) para total lise dos eritrócitos residuais. Em seguida a amostra foi centrifugada (100 G) durante cinco minutos com solução salina balanceada de Hanks (HBSS)<sup>v</sup> sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e ao sedimento celular foi acrescido um mililitro de RPMI<sup>w</sup>. A concentração celular foi determinada em hemocítômetro e a viabilidade celular estimada pelo método de exclusão do azul tripan.<sup>16</sup> A amostra do isolado de PMN foi diluída em meio RPMI para obter concentração celular final de  $1 \times 10^6$  mL, com pureza e viabilidade de neutrófilos igual ou superior a 90 e 95%, respectivamente.

#### **Determinação da produção neutrofílica de superóxido**

Para a determinação de superóxido dos neutrófilos utilizou-se a sonda HE.<sup>17,x</sup> Resumidamente, em 180  $\mu\text{L}$  de suspensão de neutrófilos ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) em RPMI foi acrescida 20  $\mu\text{L}$  uma solução tamponada de HE (0,1 mmol/L) sem e com 20  $\mu\text{L}$  de PMA<sup>y</sup> (1,47  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ). Após incubação a 37°C por 15 minutos a amostra foi mantida em banho de gelo e protegida da ação luz até o momento da leitura. A média de fluorescência foi quantificada em citômetro de fluxo capilar<sup>z</sup> ajustado para o comprimento de onda máximo para emissão (593 nm) e excitação (473 nm) do brometo de etídio. Para eliminar debris selecionou-se a população com maior tamanho. Os resultados de 10.000 eventos foram analisados em programa computacional específico<sup>aa</sup> e considerada a unidade arbitrária da porcentagem média-x de fluorescência vermelha do brometo de etídio formado a partir da oxidação espontânea e estimulada de HE.

### **Determinação do índice apoptótico dos neutrófilos**

A porcentagem de apoptose espontânea e induzida foi estimada por citometria de fluxo capilar, utilizando-se sistema Anexina V-PE<sup>bb</sup>. Na prova induzida, às alíquotas de 100 µL de uma suspensão de neutrófilos ( $1 \times 10^6$ /mL) foram acrescidas 100 µL do indutor Camptotecina (CAM)<sup>cc</sup> (6,0 µM), enquanto que na prova não induzida 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 um termociclador microprocessado<sup>dd</sup>. Em seguida, a suspensão de células foi aliquoteada em 100 µL e acrescida de 100 µL de Anexina V-PE e posteriormente incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Utilizando-se citômetro de fluxo capilar<sup>ee</sup>, os resultados de 10.000 eventos foram analisados em programa computacional específico<sup>ff</sup>, sendo que 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 três populações celulares: células não apoptóticas (anexina V- e 7-AAD -); apoptose inicial (anexina V+ e 7-AAD -) e apoptose final ou necrose (anexina V+ e 7-AAD +).

### **Análise estatística**

Após os estudos das distribuições das variáveis quanto à normalidade e homocedasticidade, conforme preconizado por Zar,<sup>18</sup> utilizou-se o teste de

Kruskal-Wallis e ANOVA para comparar os grupos. Para a correlação das variáveis normais foi determinado o coeficiente de Pearson e para as variáveis não paramétricas o coeficiente de Sperman. Para comparações múltiplas os pós-testes de Tukey e Dunn. As análises estatísticas supracitadas foram feitas com auxílio de um programa computacional estatístico<sup>99</sup>, sendo considerado significativo  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os valores do perfil hematológico, urinálise e bioquímico dos cães do grupo controle e IRC estão sumarizados na tabela 1. A densidade urinária, o hematócrito, a capacidade antioxidante total e MDA plasmático de cães urêmicos foram significativamente menores que os do controle. Já os níveis plasmáticos de colesterol, ureia e creatinina de cães com IRC foram significativamente superiores aos do controle, não havendo diferença entre grupos quanto ao ácido úrico, albumina e glicose plasmática.

A produção de superóxido, a viabilidade e taxa de apoptose dos neutrófilos de cães com IRC e controle diferiram significativamente (tabela 2). A viabilidade e a produção de superóxido dos neutrófilos de cães com IRC foram inferiores tanto em repouso como após o estímulo com PMA e CAM. Observou-se ainda um aumento da taxa de apoptose em neutrófilos em cães com IRC (tabela 2).

## DISCUSSÃO

Os valores do perfil hematológico e bioquímico dos cães sadios selecionados para o grupo controle permaneceram dentro da faixa de normalidade<sup>19</sup>, comprovando assim a higidez destes cães. Os sinais clínicos e o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol, uréia, creatinina e anemia normocítica normocrômica não responsiva (Tab.1) observados durante a seleção dos animais do grupo IRC persistiram (tabela 1), permitindo concluir que todos os cães desse grupo apresentavam insuficiência renal no estágio III ou IV até o momento da avaliação do estresse oxidativo, conforme critérios IRIS.<sup>14</sup>

**Tabela 1** - Os valores médios e desvios-padrão do hematócrito, contagem de leucócitos, densidade urinária, capacidade antioxidante total (CAT), malondialdeído (MDA) e outros constituintes plasmáticos de cães do grupo controle e com insuficiência renal crônica (IRC).

| Grupo                           | Controle      | IRC                        | p-value |
|---------------------------------|---------------|----------------------------|---------|
| Hematócrito (%)                 | 48,42± 2,81a  | 27,8± 13,63b               | 0,0001  |
| Leucócitos x10 <sup>3</sup> /ul | 12,88± 9,22a  | 19,57± 12,88b              | 0,023   |
| Densidade urinária (U sp grav)  | 1,044± 0,018a | 1,016± 0,002b              | 0,0105  |
| Albumina (g/l)                  | 30,36± 3,29a  | 25,80 ± 5,21 <sup>a</sup>  | 0,064   |
| Colesterol (mg/dl)              | 161 ± 104,74a | 291,75 ± 107,43b           | 0,001*  |
| Creatinina (mg/dl)              | 1,06 ± 0,10a  | 4,78 ± 3,29b               | 0,01*   |
| Glicose (mg/dl)                 | 75,1± 10,67a  | 85,85 ± 22,74 <sup>a</sup> | 0,11    |
| Ureia (mg/dl)                   | 46,45 ± 9,85a | 293,88 ± 173,5b            | 0,001*  |
| Ac. urico (mg/dl)               | 1,33 ± 0,59a  | 1,13 ± 0,77 <sup>a</sup>   | 0,73    |
| MDA (nmol/ml)                   | 43,4 ± 8,39a  | 23,18± 9,38b               | 0,001** |
| CAT (mmol/l)                    | 2,73 ± 0,24a  | 2,01± 0,45b                | 0,001*  |

\* Letras não coincidentes na mesma linha representa diferenças significativas nos teste de Tukey (\*) e Dunn(\*\*).

Os antioxidantes plasmáticos albumina e ácido úrico declinaram em cães com IRC, entretanto tal declínio não foi tão significativo quanto o da CAT (Tab.1). A albumina humana exerce importante papel antioxidante durante o estresse oxidativo da IRC, porém à semelhança do observado no presente

estudo, a sua concentração plasmática não se altera significativamente.<sup>20</sup> A albumina plasmática parece ser um marcador de estresse oxidativo pouco sensível na IRC, sendo nesta condição melhor observado um aumento da concentração de albumina com estrutura molecular alterada pelas ERO.<sup>21</sup> Provavelmente devido ao uso de diferentes metodologias, os resultados sobre o ácido úrico plasmático em humanos portadores de IR são conflitantes.<sup>12,13</sup>

O status antioxidante total foi significativamente menor em cães com IRC, confirmando que o estresse oxidativo anteriormente descrito em humanos<sup>22</sup> e gatos<sup>10</sup> também ocorre em cães. O declínio da CAT observado colabora com a hipótese de que outro antioxidante que não a albumina e ácido úrico declinam em cães com IRC. Tal diminuição da capacidade antioxidante não promoveu um esperado aumento de MDA (Tab.1), pelo contrário, a peroxidação lipídica nos plasmas de cães IRC foi inferior. O fato da produção de superóxido em cães IRC ter sido muito menor (Tab.2) pode ter contribuído para menor formação de MDA, não obstante este grupo ter apresentado uma hipercolesterolemia (Tab.1) e a produção de superóxido dos neutrófilos ter correlacionado positivamente com o colesterol ( $r=0,70$ ,  $p<0,05$ ) em cães com IRC.

**Tabela 2** - Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães saudáveis e urêmicos com e sem ativação do 13-acetato de forbol éster 12-miristato (PMA), expressa em valores médios e desvios-padrão da fluorescência vermelha média do brometo de etídio obtida em citômetro de fluxo utilizando a sonda hidroetídina (HE). Porcentagem média e desvios-padrão de neutrófilos viáveis e em apoptose de cães controle e com insuficiência renal crônica (IRC), com e sem o uso de camptotecina (CAM) como indutor de apoptose.

| Grupo    | Fluorescência média de brometo |                             |
|----------|--------------------------------|-----------------------------|
|          | Sem PMA                        | Com PMA                     |
| Controle | 162,93±173,09 <sup>a</sup>     | 1182,5± 1253,5 <sup>a</sup> |
| IRC      | 49,10±41,22 <sup>b</sup>       | 212,9±294,25 <sup>b</sup>   |
| p- value | 0,001*                         | 0,01*                       |
| Grupo    | Viabilidade (%)                |                             |
|          | Sem CAM                        | Com CAM                     |
| Controle | 99,74±0,20 <sup>a</sup>        | 76,02±13,43 <sup>a</sup>    |
| IRC      | 97,29±2,42 <sup>b</sup>        | 60,53±19,53 <sup>a</sup>    |
| p- value | 0,01*                          | >0,05                       |
| Grupo    | Apoptose (%)                   |                             |
|          | Sem CAM                        | Com CAM                     |
| Controle | 0,018±0,016 <sup>a</sup>       | 4,34±3,93 <sup>a</sup>      |
| IRC      | 0,30± 0,23 <sup>b</sup>        | 26,29±18,52 <sup>b</sup>    |
| p- value | 0,001*                         | 0,01*                       |

\* Letras não coincidentes na mesma coluna representa diferenças significativas no teste de Tukey.

Os resultados das investigações sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos em IRC em humanos ainda são muito contraditórios, contudo sabe-se que parte dessas divergências é devido ao método de isolamento dos neutrófilos e quantificação das ERO.<sup>23</sup> 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.<sup>24-26</sup>

A menor produção de superóxido (Tab.2) comprova a hipótese de que *in vivo* a uremia contribuiu para diminuição do metabolismo oxidativo desses neutrófilos, podendo ser este um importante mecanismo que afeta a resposta imune inata de cães com insuficiência renal, assim como já previamente havia sido relatado em humanos<sup>23</sup>, em gatos<sup>10</sup> e *in vitro* em cães.<sup>9</sup> Entretanto tal resultado divergiu de McLeish et al.<sup>25</sup> e Rysz et al.<sup>26</sup> que constataram aumento na produção de ERO e de outros que não observaram qualquer alteração no metabolismo oxidativo em neutrófilos de pacientes humanos urêmicos.<sup>2,29,30</sup>

A mensuração da apoptose dos neutrófilos por citometria de fluxo, utilizando-se o sistema anexina V-PE, permitiu uma boa avaliação dos tratamentos, quantificando e diferenciando simultaneamente a porcentagem de células viáveis e de células em apoptose (Tab. 2). A porcentagem de apoptose final no teste sem indução em cães saudáveis e com IRC em média foi respectivamente 25 e 87 vezes menor do que nas amostras induzidas, demonstrando ser o CAM um bom indutor de apoptose de neutrófilos caninos (Tab. 2). Este efeito indutor de apoptose do CAM já havia sido descrito em estudos realizados com células neoplásicas,<sup>31-33</sup> linfócitos<sup>34</sup> e neutrófilos de humanos,<sup>35</sup> porém não na espécie canina.

À semelhança do que ocorre em humanos<sup>36</sup>, cães com IRC apresentaram uma taxa de apoptose espontânea e induzida significativamente maior do que a do grupo controle (Tab.2). Estes resultados contrariam Kralova et al.<sup>8</sup> que afirmam que a IRC não altera a função dos leucócitos de cães, porém é concordante com as observações de Barbosa et al.<sup>9</sup> que obtiveram

evidências *in vitro* de que as toxinas urêmicas de cães promovem uma ativação inicial do metabolismo oxidativo dos neutrófilos que posteriormente induzem à aceleração da apoptose e diminuição da produção de superóxido. Portanto, o conjunto dos resultados obtidos *in vivo* no presente estudo é concordante com as observações *in vitro*<sup>9</sup> e colaboram com a hipótese de que na fase inicial da uremia ocorre um aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, de modo que as substâncias oxidantes produzidas se acumulam e causam, apenas numa fase mais tardia, dano celular capaz de acelerar a apoptose e afetar a produção de superóxido.<sup>11</sup>

## CONCLUSÃO

Ocorre estresse oxidativo em cães com IRC e este está associado com a inibição do metabolismo oxidativo e a aceleração da apoptose dos neutrófilos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr. Nephrol* 2008; 23:1211–1221.
2. Anding K, Gross P, Rost JM, Dirk-Allgaier D, Jacobs E. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2003;18:2067-2073.

3. Chonchol M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis* 2006;19:291-296.
4. Huimin J, Qinjun X, Peijun Z, Yande D, Zheng Z, Peiqing Y. Impaired GP-91<sup>PHOX</sup> gene expression and dysfunction of peripheral blood neutrophils in patients maintaining hemodialysis. *Chinese Medical Journal* 2000;113:120-123.
5. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of Immune Dysfunction in End-stage Renal Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1526–1533.
6. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, et al. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 2003;63:179–185.
7. Nistala R, Whaley-Connell A, Sowers JR. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:2047–2089.
8. Kralova S, Leva L, Toman M. Polymorphonuclear function in naturally occurring renal failure in dogs. *Veterinarni Medicina* 2009;54:236-243.
9. Barbosa TS, Mori CK, Ciarlini PC. P.C. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2010;62:1352-1358.
10. Keegan RF, Webb CB. Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. *J Vet Intern Med* 2010;24:514-519.
11. Cendoroglo M, Bertrand LJ, Balakrishnan VS, Perianayagam M, King AJ, Pereira BJG. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999;10:93-100.

12.Clermont G, Lecour S, Lahet JJ, Siohan P, Vergely C, Chevet D, Rifle G, Rochette L. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovascular Research* 2000;47:618-623.

13.Erdogan C, Ünlüerci Y, Türkmen A, Kuru A, Çetin Ö, Bekpinar S. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clinica Chimica Acta* 2002;322:157-161.

14.Iris. Iris Staging of Chronic Renal Disease. International Renal Interest.Society. [http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging\\_ckd.shtml](http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml) 2006.

15.Jain NC. Hematologic techniques. In:\_\_\_\_\_ Schalm's veterinary hematology. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. Chap. 2: 20-86.

16.Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK. Functions related to Microbicidal Activity. In:\_\_\_\_\_. Laboratory manual of Neutrophil Function. New York:Raven Press, 1986;5:87-143.

17.Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparasion of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta* 2003;331:103-110.

18.Zar JH. Bioestatistical analysis. 2.ed. Englewood Cliffs, Pretice Hall 1984;718p.

19. Stocham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Iowa, University Press 2002;384
20. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: Examination with the redox state of albumin. *Kidney International* 2004;66:1988-1993.
21. Imai E, Nakajima H, Kaimori JY. Albumin turns on a vicious spiral of oxidative stress in renal proximal tubules. *Kidney International* 2004;66:2085–2087.
22. Bianchi PD, Barp J, Thomá FSBelló-Klein A. Efeito de uma sessão de hemodiálise sobre o estresse oxidativo sistêmico de pacientes renais crônicos terminais. *J. Bras. Nefrol.* 2009;31:175-182.
23. Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MCC, Watanabe R, Dalboni MA, Manfredi SR, Santos OP, Kallas EG, Draibe SA, Cendoroglo M. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006;21:160-165.
24. Bitzinger DI, Schlachetzki F, Lindner R, Trabold B, Dittmar MS. 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* 2008;73A:643-650.

25. Elbim C, Lizard G. Flow Cytometric Investigation of Neutrophil Oxidative Burst and Apoptosis in Physiological and Pathological Situations. *Cytometry Part A*. 2009;75A:475-481.

26. 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* 2010;48:983-1001.

27. McLeish KR, Klein JB, Lenderer EL, Head KZ, Ward RA. Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Inter*. 1996;50:407-416.

28. Rysz J, Kasielski M, Apanasiewicz J, Król M, Wonicki A, Luciak M, Nowak D. Increased hydrogen peroxide in the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2004;19:158-163.

29. Paul JL, Arveiller MR, Man NK, Luong N, Moatti N, Raichwarg D. Influence of uremia on polymorphonuclear leukocytes oxidative metabolism in end-stage renal disease and dialyzed patients. *Nephron*. 1991;57:428-432.

30. Gastadello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans M. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2000;15:1638-46.

31. Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, Rakshit S, Sen T, Majumder HK. Camptothecin induced mitochondrial

dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death and Differentiation*. 2004;11:924-936.

32. Fu YR, Yi ZJ, Yan YR, Qiu ZY. Hydroxycamptothecin-induced apoptosis in hepatoma SMMC-7721 cells and the role of mitochondrial pathway. *Mitochondrion*. 2006;6:211-217.

33. Wang LM, Li QY, Zu YG, Fu YJ, Chen LY, Lv HY, Yao LP, Jiang SG. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line. *Chemico- Biological Interactions*. 2008;176:165-172.

34. Dolzhanskiy A, Basch RS. Flow cytometric determination of apoptosis in heterogeneous populations. *J. Immunol. Methods*. 1995;180:131-140.

35. 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. *The Journal of Toxicological Science* 2002;27:191-203.

36. 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* 2003;18:2582-2588.

## NOTAS

<sup>a</sup> Vacutainer plus plastic Heparin, Cod. 367993, Becton-Dickson, New Jersey, USA.

<sup>b</sup> Vacutainer plus plastic K2 EDTA, Cod. 367841, Becton-Dickson, New Jersey, USA.

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

<sup>d</sup> Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais, Brasil.

<sup>e</sup> Analisador automático BTS, Mod. 370 plus, BioSystems, Spain.

<sup>f</sup> Calibrator serum, Cod. 18011, BioSystems, Spain

<sup>g</sup> Assayed control serum level I, Cod. 18005, BioSystems, Spain.

<sup>h</sup> Assayed control serum level II, Cod. 18007, BioSystems, Spain.

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

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

- <sup>k</sup> Albumine, Cod.11574, BioSystems, Barcelona, Spain.
- <sup>l</sup> Uric acid, Cod.11802, BioSystems, Barcelona, Spain
- <sup>m</sup> Cholesterol, Cód.11505, BioSystems, Barcelona, Spain
- <sup>n</sup> Glucosa, Cod.11503, BioSystems, Barcelona, Spain
- <sup>o</sup> Total antioxidante status, cat. NX2332, Randox laboratories, UK
- <sup>p</sup> Anti-oxidants standard, cat. NX2615, Randox laboratories, UK.
- <sup>q</sup> TBARS Assay Kit, cat. 10009055, Cayman Chemical Company, USA.
- <sup>r</sup> Leitor Spectra Count <sup>TM</sup>, Packard Bio Science Company,U.S.A.
- <sup>s</sup> GraphPad Prism, version 4, GraphPad Software Inc, San Diego, USA
- <sup>t</sup> Histopaque®-1119, Cod. 1119-1, Sigma, St. Louis, USA.
- <sup>u</sup> Histopaque®-1077, Cod. 1077-1, Sigma. St. Louis, USA
- <sup>v</sup> Hanks balanced salt solution (HBSS) modified, Cod. H 9394, Sigma, St. Louis, USA.
- <sup>w</sup> Medium RPMI 1640, Cat. R0883, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- <sup>x</sup> Hydroethidine<sup>TM</sup> (Dihydroethidium bromide),Cat. 17084,Polysciences, Inc.,Valley Road,Warrington, USA.
- <sup>y</sup> Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Cat. P8139, Sigma, St. Louis, USA
- <sup>z</sup> Guava EasyCyte Mini ®, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.
- <sup>aa</sup> Guava Express, CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software. Personal Cell Analysis, v.4.1, 2006. Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.
- <sup>bb</sup> Guava Nexin Kit, Cat. 4500-0010, Guava Technologies, USA.
- <sup>cc</sup> Camptothecin, Cod. C9911. Sigma, St. Louis, USA.
- <sup>dd</sup> Thermomixer, Eppendorf, Mod. Comfort, Hamburg, Germany.
- <sup>ee</sup> Guava EasyCyte Mini ®, Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.
- <sup>ff</sup> Guava Express, CytoSoft Data Acquisition and Analysis Software. Personal Cell Analysis, v.4.1, 2006. Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA.
- <sup>gg</sup> SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA.

**Anexo**

## Journal of Veterinary Internal Medicine

### Author Guidelines

Guidelines for preparation of manuscripts submitted to the Journal of Veterinary Internal Medicine

### A. Editorial Policy

The mission of the *Journal of Veterinary Internal Medicine* is to advance veterinary medical knowledge and improve the lives of animals by publication of authoritative scientific articles about animal diseases. The *Journal of Veterinary Internal Medicine (JVIM)*, the Official Publication of the American College of Veterinary Internal Medicine, provides an international forum for communication and discussion of the latest developments in large and small animal internal medicine.

The JVIM has an editorial policy of continuous quality improvement by raising the standards of evidence in articles published by the JVIM. The JVIM encourages submission of manuscripts describing studies that use the highest standards of Evidence Based Medicine. To raise standards of evidence in manuscripts published in JVIM, the following manuscript types and study designs will be prioritized for publication:

- Meta-analyses of common conditions
- Prospective and randomized clinical trials
- Prospective case series that include a control population
- Epidemiology or population-based studies with robust statistical power

In reporting on studies, authors are strongly encouraged to consider the CONSORT guidelines for reporting of clinical trials. Additionally, for studies involving livestock species, authors should prepare reports using the REFLECT guidelines (see J. Vet. Int. Med. 2010:24 (1)).

Reviewers will be asked to consider these guidelines when reviewing manuscripts submitted to the Journal. The JVIM does not mandate that manuscripts satisfy all aspects of the CONSORT and REFLECT guidelines in order to be published in the Journal, but these guidelines will be used to assess the suitability of manuscripts for publication in the Journal.

Beyond general quality and scientific rigor, important criteria for acceptance are originality and interest to the broader readership of the Journal. Thus, articles that are otherwise scientifically sound may be rejected because they are felt to lack breadth of appeal or are outside the interest area of the Journal. Manuscripts that fall into the following categories are unlikely to be accepted for publication unless there are exceptional reasons:

- Simple descriptive and observational studies with no specific question and no substantial discovery, especially where these deal with diseases that have been previously reported
  - Single case reports unless they provide thoroughly documented and important mechanistic insights, illuminate a novel principle, or describe a newly recognized disease or important variation of a well-recognized disease
  - Retrospective case series, particularly for common or well-described conditions, unless they provide important mechanistic insights, illuminate a novel principle, or challenge the conventional dogma
  - Reports of new diagnostic or investigative tests or reagents without characterization of their utility in diagnosing or detecting the target disorder or application to specific questions
  - Studies involving only healthy animals.

Preferred are studies that report results on animals with the target disorder, compare results in healthy animals with those of animals with the target disorder, or combine results with results of studies that examine clinically relevant variables.

- Findings that are repetitive of previously published information and provide no further mechanistic insight
- Studies of non- mammalian or exotic species

***Prior publication, multiple publication, and fragmentary publication:***

Manuscripts will be considered for publication with the clear understanding that their contents have not been previously published (abstracts < 250 words presented at scientific meetings are excepted) and have not been (and will not be) submitted or published elsewhere while acceptance by JVIM is under consideration. Abstracts published by the JVIM as part of the ACVIM Forum Proceedings are exempt from the 250 word limit.

The *JVIM* strongly discourages authors from fragmented reporting of aspects of a single investigation or clinical study. Authors submitting a manuscript that is one of a number of existing or planned manuscripts related to a single study must include a statement in the cover letter that so states, and justifies use of a fragmented approach. Related manuscripts, published or unpublished, should also be included with the submitted manuscript. The submitted manuscript itself must clearly explain and justify the fragmented approach and reveal the full extent of the investigation.

***Historical controls:***

The *JVIM* discourages submission of manuscripts describing studies in which formal comparison, including but not limited to statistical analysis, is made between a contemporaneous group of animals and historical controls (that is, information obtained by retrospective review of case records).

***Copyright:***

Publication in the *JVIM* is subject to the condition that the article (as a whole or in part) has not been published or submitted for publication elsewhere. In submitting the manuscript to the publisher, the author certifies that neither the author's contribution nor any text or figures procured and included by the author infringes upon the rights of a third party, and that the author alone is authorized to dispose of the existing right of utilization with regard to copyright. For the duration of the lawful copyright, the author grants the publisher, regardless of location the exclusive right of duplication and dissemination (right of publication) without restriction as to the amount or number of downloads and for all print and electronic editions in tangible or intangible form as well as the issuance of licenses to third parties nationally and abroad for the exercise of the ancillary rights granted. The publisher is authorized to make use of the utilization rights to which he is entitled; however, he is not obligated to do so.

Correspondence to the *JVIM* is accepted on the understanding that the contributing author licenses the publisher to publish the letter as part of the *JVIM* or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the *JVIM* and its contents. Receipt of a signed Copyright Transfer Agreement (CTA) is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless this has been received by the Editorial Office. (Government employees in both the US and the UK must complete the form as explained in the CTA.)

**Authorship:**

The JVIM follows the guidelines of the World Association of Medical Editors regarding authorship ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)). The editors will not attempt to resolve disputes among authors or potential authors of a manuscript that are related to authorship.

**Conflict of interest:**

Authors of research articles must disclose at the time of submission any financial arrangement they have with the company whose product features prominently in the submitted manuscript, or with a company making a competing product. Such information will be held in confidence while the paper is under review and will not influence the editorial decision, but if the article is accepted for publication, the editor may discuss with the author the manner in which such information is to be communicated to the reader.

**Manuscript review:**

All manuscripts are reviewed by experts in the field who advise the editors of the manuscript's scientific quality. Decisions regarding publication are made by the Co-Editors-in-Chief acting on the advice of reviewers and Associate Editors.

At the editor's discretion, particularly meritorious manuscripts that are of unusually high priority and significance will be considered for expedited publication. Authors will be notified by the Editorial Office upon scheduling of their manuscript as a rapid publication.

**OnlineOpen:**

Available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee (currently \$3,000) to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository or other free public server. For more information, please visit:

<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>.

**B.1.1. Manuscript Preparation**

Manuscripts should be prepared as described below. Manuscripts that do not follow the specified format will be returned for correction before being sent out for review.

Manuscripts must be double-spaced, using US (8½" x 11") page settings (A4 page settings not accepted), and leaving at least 1-inch margins.

Page numbers must be included in the upper right-hand corner of each page.

Manuscripts must be formatted with line numbers in the left hand margin.

Figures and graphs must conform to the JVIM guidelines (see B.1.4., B.1.5., B.1.8. and B.1.9.).

Manuscripts must be submitted in English using American spelling and must be grammatically correct. Authors whose native language is not English are advised to seek assistance in manuscript preparation from someone fluent in written English, or use professional services ([www.blackwellpublishing.com/bauthor/english\\_language.asp](http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp)).

**B. 1.2. Standard Paper**

The length of a standard paper must not exceed 5000 words including text, references, tables, figure legends and footnotes.

**Title page:**

The first page of the manuscript must include the following (in addition to this information being entered at the JVIM submission website):

- Title of the manuscript.
- Names of the authors with their institutions and affiliations.
- Short title (maximum 6 words) for use as a running head.
- Keywords (maximum 4 words) not already used in the manuscript title.
- List of abbreviations used in the manuscript.
- Name, address, and e- mail address of the corresponding author.
- Separate paragraphs for the following:
  - Where the work was done.
  - Whether the study was supported by a grant or otherwise.
  - Meeting, if any, at which the paper was presented.
  - Acknowledgments

**Abstract:**

The abstract must not exceed 250 words.

The abstract must be included in the manuscript as well as uploaded to the submission website. They must be identical and must be constructed using the following subheadings:

Background – A brief explanation of why the study was performed.

Hypothesis/Objectives – A statement of the principal hypothesis tested in the study, a brief statement of the major objectives, or both.

Animals – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g., research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g., disease status).

Methods – A statement of overall study design (e.g., randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and principal interventions or methods.

Results – Concise statement of important results including numerical description of critical variables and statement of statistical significance.

Conclusions and clinical importance – A summary of conclusions based on results of the study and statement of clinical importance of these conclusions. The results should not be restated.

**Introduction:**

The introduction should not exceed approximately 500 words.

The introduction is untitled. Please provide a clear statement of the objective and rationale of the study, and provide only pertinent references. A brief overview of the topic is appropriate in setting the context for the study. Do not review basic physiology, pathophysiology, medical principles, or aspects of the disease that were not studied. An extensive review of the subject will not be accepted.

**Materials and Methods:**

The materials and methods should be provided in sufficient detail that another investigator could replicate the study:

Study design should be clearly described using accepted terminology (e.g., randomized double-blind placebo controlled study, retrospective review of medical records).

Common methods or procedures need not be described in detail, and where possible citation should be made to techniques that have been reported elsewhere. A statement of animal care must be made (e.g., animals were cared for according to the principles outlined in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). A concise description of the statistical methods should be provided including analytical software and citation of sources for unusual methods. Additional guidelines are included in the Statistical Guidelines for The Journal of Veterinary Internal Medicine online at [http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jvim/STATISTICAL\\_GUIDELINES\\_JVIM.pdf](http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jvim/STATISTICAL_GUIDELINES_JVIM.pdf).

### **Results:**

State concisely, in logical sequence, the results of the study using the following guidelines:

Subheadings may be used for particular sections (e.g., clinical findings, radiographic findings)

Tables are a concise means of presenting large amounts of numerical data in a logical format.

Do not reproduce the same data in both tables and figures.

Tables containing raw data for a number of variables for each individual animal are not appropriate. Such data should be provided, either in a table or in the text, using summary or descriptive statistics.

Tables should not contain only two rows with two or more columns or two columns with two or more rows (e.g., a table providing hematologic data for one group of animals). Such data should be reported in the text.

Do not editorialize or discuss the implication or importance of results in the "Results" section.

### **Discussion:**

The discussion should explain the relevance and importance of the study. Excessive detail can obscure important findings.

- The first paragraph of the discussion should provide an overview of the results and a brief description of the importance of these results.
- The discussion must be concise. Focus on the novel and innovative aspects and discuss the results of your study in light of earlier studies. Do not discuss aspects of the topic that you did not study (e.g., treatment options if you did not study treatment).
- Address any limitations of your study so that the reader is aware of constraints to interpretation of your results.

### **Text:**

In order to insure consistency in the JVIM, authors are requested to adhere to the following guidelines:

When referring to a drug, use the generic name approved by the US Food and Drug Administration or recognized as the US-adopted name. The trade name (if one exists), manufacturer's name, city and state abbreviation should be provided in an endnote the position of which is marked in the text by a superscripted lower case letter. Begin superscripts with letter "a" and label endnotes (including references to abstracts) alphabetically in the order in which they appear in the text. For products not approved by the United States Food and Drug Administration (FDA), the final concentration of the active ingredient or ingredients, identity of excipients, and name and address (as an endnote) of the compounder or manufacturer must be provided in the text.

Laboratory values should be reported in conventional (US) units. Système Internationale (SI) units can be used in addition to conventional units.

With the exception of laboratory values as discussed above, all measurements should be expressed in metric units. Analyte concentrations should be expressed in conventional units

(e.g., mg/dL, g/dL) but authors may also include Système International (SI) units (e.g., mmol/L,  $\mu$ mol/L). If confusion could result, include other measurement systems in parentheses.

The JVIM adheres to the principles specified in *Nomina Anatomica*, *Nomina Histologica*, *Nomina Embryologica*, *Nomina Anatomica Veterinaria* and *Nomina Anatomica Avium* where appropriate. The JVIM strictly follows the American Medical Association Manual of Style: A Guide for Authors and Editors, 9th edition.

When describing products or equipment, the generic name should be used in the text and the details of the product (brand name, manufacturer, city and state) should be provided in an endnote. The endnotes should be labelled with superscripted letters, beginning with "a."

### **B.1.3. References**

References are cited in the text and details provided in a numbered list at the end of the manuscript.

Number references consecutively in the order in which they are first cited in text (or tables and legends), using Arabic numerals. References must be verified by the author against the original documents. Unpublished observations, personal communications, submitted papers not yet accepted, and abstracts cannot appear in the reference section. Citations to abstracts should be made in the text using superscripted letters (see #1 under "Text" for details) with the reference details provided in an endnote. References with 5 or more authors may include the names of the first 3 authors followed by "et al."

Please see a recent issue of the JVIM for examples of reference format. A complete listing of formatting guidelines for references is provided online at [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

### **B.1.4. Tables**

Place each table on a separate page, double-spaced. Number tables consecutively, as cited in text, and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Put explanatory matter in footnotes, not the heading: for example - ELISA, enzyme-linked immunoabsorbant assay; HR, heart rate. Do not provide tables of values from individual animals. Tables can be included at the end of the article file, after References, or submitted as a separate file.

### **B.1.5. Legends for Illustrations**

Legends should be double-spaced, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. Explain clearly in the legends any symbols, arrows, numbers, or letters used to identify parts of the illustrations. For photomicrographs, identify method of staining and magnification. Legends should be included at the end of the article file, after References.

### **B.1.6. Abbreviations**

Spell out any term that will be abbreviated the first time it is used followed by the abbreviation in parentheses. Example: gestational diabetes mellitus (GDM). Use only the abbreviation from that point forward in the manuscript. Supply a list of abbreviations and definitions unique to the article at time of submission. The editor will decide at the time of editing which abbreviations will be included in an "abbreviation table" for the published article. The editor reserves the right to determine when, and how often, an abbreviation is used.

The following abbreviations do not need to be spelled out or included in an "abbreviation table."

IM, IV, SC, PO, CC, PCV, ACTH, ELISA, ECG, EKG, PQ interval, PR, QRS duration, QT interval, ST, T wave, Pwave, aVR, aVL, aVF.

### **B.1.7. Numbers**

Use a leading zero on values less than 1. Example: 0.3 instead of .3

Do not express numbers using excessive precision. Use the appropriate number of significant digits.

For further details concerning manuscript preparation consult the American Medical Association's *Manual for Authors & Editors: Editorial Style and Manuscript Preparation* and/or *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*.

#### **B.1.8. Illustrations**

For the electronic submission of your manuscript, the illustrations must be submitted as separate files. The system will merge the manuscript and figures together and create a PDF.

Submit artwork in digital format. Save line artwork (vector graphics) as Encapsulated PostScript (EPS) files and bitmap files (halftones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF), with a resolution of at least 300 dpi at final size. Do not send native file formats. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/author.asp>.

Black-and-white illustrations, in the form of glossy prints, will be reproduced free of charge, but the editor reserves the right to establish a reasonable limit. Color illustrations may be published, but the editor reserves the right to decide if color is needed to convey meaning and will establish a reasonable limit.

The following instructions are provided to guide authors in the preparation of figures and graphs for publication in JVIM. Figures and graphs must conform to these guidelines in order for the manuscript to be considered for publication in JVIM. For preparation of graphs, the use of purpose-designed software is usually necessary. Graphs created by Microsoft Excel rarely meet the requirements set out below. Do not use color in graphs unless it is absolutely necessary (the editors will make the final assessment about the reproduction of color figures).

#### **Sizing:**

Authors should size graphs to 1 column width (8 cm) and half tone images to 2 column width (16 cm). The height of the image should be proportional to its width (it is unlikely that height would ever be more than 1.5 times width).

#### **Legend:**

The figure legend should stand alone and be explanatory of the graph or figure. The legend should include a statement of the number of animals, intervention, variables depicted, an explanation of the symbols (key) used in the graph including those used to identify groups of animals or variables, or statistical significance. Do not include figure legends in the graph. Do not include interpretation of results in the figure legend.

#### **Photographs:**

Photomicrographs: Photomicrographs must be of good visual quality (focus, clarity, color) and must include a scale bar. Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained tissues will be published in black and white. Photomicrographs of tissues stained with other stains may be published in color, at the editor's discretion.

Photographs of animals, organs, or gross lesions: Photographs of animals are rarely useful, but if used must be of excellent quality. Photographs of animals must be aesthetically pleasing. Photographs of animals that are in obvious pain or discomfort or undergoing experimental procedures should not be used. Line drawings are often preferable and a better means of depicting abnormalities or procedures. Photographs that are limited to lesions are preferred to those of the animal or whole organs. The photograph must be of excellent quality and the

lesion must be readily apparent. Use of arrows or other means of identifying the lesion is recommended.

### **Graphs:**

**Boxes:** Do not include boxes around graphs.

**Graph type:** Continuous data should be depicted as scatter plots or box plots. Bar graphs, either horizontal or vertical, should be reserved for depiction of frequency data (e.g., counts) and are not an appropriate means of depicting continuous data. Do not use lines connecting data points if doing so implies a temporal relationship between the connected points, when such a relationship does not exist. Do not use the “spline” function to produce smoothing or interpolation of lines between data points.

**Axes:** Include only those axes necessary for presentation and interpretation of the data in the graph. Usually, this means that graphs should have only left and bottom axes, and no top or right axes. There will be graphs in which more than one vertical axis is needed, for example when the graph includes 2 dependent variables of different units, but this is the only instance in which multiple vertical axes are required.

**Grid lines:** Do not include grid lines (horizontal, vertical, or both) in graphs.

**Data:** All graphs that include an estimate of central tendency (mean, median) must include an estimate of variance (standard deviation, range, or confidence intervals).

**Symbols:** Symbols should be unequivocal when reproduced in black and white. Lines should be readily identified and discernible in black and white. In bar graphs in which there are multiple bars of different fill, the fill and pattern should be such that bars are readily identified in black and white. Shades of grey reproduce poorly and are not easily differentiated. Please use solid fill (black or white), with or without bold patterns (stripes, lines, cross hatch).

**Font type, size, and color:** Use Arial font in all graphs. Internal labels for axis labels, tick labels, symbols (e.g., \*, †), and notations on the graph should be 8 point font (combination of capitals and lower case as necessary). 10 point capital letters (upper case) should be used for designating multiple images or graphs within a figure (i.e., A, B, C, D). These designations should be BOLD and placed in the UPPER LEFT corner of the individual image within the multiple-image figure.

### **B.1.9. Supporting Information (formerly known as Supplementary Material) and Video**

The Journal, through Wiley-Blackwell, is able to host online approved supporting information that authors submit with their paper. Supporting information must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the Journal.

Supporting information will be published as submitted and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains entirely with the authors. A disclaimer will be displayed to this effect with any supporting information published.

Supporting information may also be displayed on an author or institutional website. Such posting is not subject to the Journal's embargo date as specified in the Copyright Assignment

or Exclusive License form. In such cases, it is the author's responsibility to ensure that the supplied URL for the supporting information remains valid for the lifetime of the article.

Neither the Journal nor Wiley-Blackwell provide technical support for the creation of supporting information. If technical support is required to output supporting information in a suitable format and size as outlined below, authors should seek the assistance of their local IT department.

All supporting information must be supplied with a legend stating what it is, what format it is, and where necessary how it was created.

Further details regarding the format of supporting materials is available at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

### **C.1.1. Other Submissions**

The guidelines for letters to the editor, brief communications, case reports, and review articles as they relate to title page, illustrations, references, etc., are the same as those for the standard paper.

### **C.1.2. Letters**

Letters must not exceed 1200 words in length, including references, supplemental material and authors' names and addresses.

The letters to the editor section provides a forum for issues in veterinary internal medicine. Letters can relate to any aspect of internal medicine, as well as provide an opportunity for the reader to respond to the contents of JVIM. The editors reserve the right to decline to publish letters that do not contribute to the discussion, make personal allegations against individuals, or are libellous.

Preliminary findings of new investigations will also be considered for publication in letter format.

### **Letters should be sent to:**

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1997 Wadsworth Boulevard, Suite A, Lakewood, CO 80214-5293; Phone: 303-231-9933 or 800-245-9081 (US or Canada); Fax: 303-231-0880; E-mail: [JVIM@ACVIM.org](mailto:JVIM@ACVIM.org).

### **C.1.3. Brief Communications**

Must not exceed 2500 words, excluding references which should be limited to 10, and should be clearly marked "Brief Communication."

The JVIM contains a separate section of brief communications. This section does not necessarily contain conventional subdivisions but must be accompanied by a brief structured abstract, in the same form as specified for regular articles (see above), and essential references, not to exceed 10. This section is meant to accommodate reports of small completed investigations or new techniques. Brief communications usually have the same priority for publication as regular manuscripts.

### **C.1.4 Case Reports**

Case reports should not exceed 2500 words excluding references, which should be limited to 25, and including tables.

Case reports should not have an abstract but should have a title page. The accompanying letter must indicate why the case is reported (i.e., describe its unique features).

The JVIM contains a separate section for case reports. This section will accommodate case descriptions of newly recognized clinical entities, cases in which findings or clinical outcome are unique or unexpected, or cases in which new diagnostic methods or treatments have been used. In order to be considered for publication, case reports must clearly indicate the novel nature of the disease or condition being reported, how reporting the case will alter conventional diagnosis or treatment of the condition, or how reporting the case will advance fundamental understanding of the disease.

Authors should be aware that the acceptance rate for case reports submitted to the JVIM is low with many submissions rejected after editorial review.

Case reports include a detailed description of each animal in the report. The report should focus on the novel aspects of the case and not include a detailed description of routine clinical management. Avoid chronological descriptions of animal care and detailed descriptions of routine treatment.

The number of animals in a case report is usually 3 or fewer, and never exceeds 5. For case series including more than 5 animals, the report should be formatted as a regular article using the Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion format. Results for articles in the regular format should be reported as measures of central tendency and variance or range.

Values for individual animals should not be reported in this format. Note that the JVIM does not publish tables with results from individual animals.

### **C.1.5. Review Articles**

Review articles should not exceed 7500 words (excluding references).

The use of color illustrations, line drawings and figures in review articles is encouraged.

Abstracts of review articles are narrative and not structured as are abstracts for regular articles.

Review articles, which may be solicited by the editorial board or submitted unsolicited by the authors, are meant to provide the reader with an overview of the state of the art in a specialized area of veterinary internal medicine. They should be submitted by individuals who are actively working in the area, and not by those who have reviewed the literature as a prelude to beginning a project in the area. The review should be informative and of value to generalists as well as specialists.

### **D.1.1. Permissions**

Permissions of author and publisher must be obtained for the use of previously published material (e.g., text, photographs, drawings) and must accompany the manuscript when it is submitted for publication.

### **E.1.1. Editing and Inclusion of Additional Material to Final Draft**

The final draft of the manuscript will be edited by one of the Editors-in-Chief. The manuscript must be revised to incorporate all of the recommended editorial changes. Furthermore, no additional material, except where specifically requested by the Editor-in-Chief, may be added to the manuscript during the final revision or galley proof stages. All material contained within the manuscript must have been subject to peer review. For this reason, inclusion of additional

material (including data, figures, tables and text) is not permitted after review of the manuscript.

#### **F.1.1. Submission**

Manuscripts may be submitted only through the JVIM website <http://mc.manuscriptcentral.com/jvim>.

Authors must submit cover letters, manuscripts and figures as separate files. The system will create a PDF when merging the manuscript and figures into one file.

#### **F.1.2. Submission Fee**

A \$50.00 non-refundable fee (payable in US funds only) is required at the time of submission. The fee can be paid through the e-commerce feature of the manuscript submission website. Visa, MasterCard and American Express accepted.

We also accept check/money order (payable to the ACVIM and funds drawn on an American Bank) or university purchase order.

If not paying through the e-commerce feature, payment information MUST be included in a cover letter submitted with the manuscript (as a separate file) or emailed to [JVIM@ACVIM.org](mailto:JVIM@ACVIM.org) at the time of submission.

Manuscripts will not be processed unless the submission fee is paid. Payment guidelines are online at [http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jvim/Payment\\_Options.pdf](http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jvim/Payment_Options.pdf).

You can contact JVIM through the ACVIM office: American College of Veterinary Internal Medicine, 1997 Wadsworth Blvd., Suite A, Lakewood, CO 80214-5293, Toll free (US and Canada): 800-245-9081 Phone: 303-231-9933 Fax: 303-231-0880, [JVIM@ACVIM.org](mailto:JVIM@ACVIM.org).

**Revised April 5, 2011.**