

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO P-CRESOL SOBRE O
METABOLISMO OXIDATIVO E APOPTOSE DOS
NEUTRÓFILOS DE CÃES**

Anelise Maria Bosco

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2014

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO P-CRESOL SOBRE O
METABOLISMO OXIDATIVO E APOPTOSE DOS
NEUTRÓFILOS DE CÃES**

Anelise Maria Bosco

Orientador: Prof. Adj. Paulo César Ciarlini

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

ARAÇATUBA – SP

2014



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação in vitro do p-cresol sobre o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos de cães.

AUTORA: ANELISE MARIA BOSCO

ORIENTADOR: Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr. WAGNER LUIS FERREIRA


Dr. ALVARO JOSÉ DOS SANTOS NETO


Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 21 de março de 2014.



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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANELISE MARIA BOSCO – Natural de Araçatuba, São Paulo, nascida em 30 de abril de 1987, filha de Aparecida de Fátima do Amaral Bosco e Valdir Bosco. Em 2006, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Centro-Oeste, onde se graduou como Médica Veterinária em dezembro de 2010 com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Insuficiência renal crônica” sob orientação da Prof.^a Dr.^a Liane Ziliotto. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba-SP, em março de 2012, sob orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini. Desde então tem participado dos Projetos de Pesquisa do grupo sob auxílio financeiro da FAPESP de onde também obteve bolsa de mestrado, sempre em relação aos temas de estresse oxidativo, metabolismo oxidativo e apoptose de neutrófilos e doença renal crônica em cães.

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

(Geroge Bernard Shaw)

Aos meus pais, Fatima e Valdir, por todo o apoio e incentivo dedicados aos meus estudos e por sempre acreditarem na minha capacidade.

À minha avó Lia por sempre orar e acreditar em meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, por sempre guiar meus caminhos, me protegendo e reservando boas surpresas.

Aos meus pais pelo amor e carinho que vocês me proporcionaram durante toda minha existência, abrindo muitas vezes mão de seus sonhos em função dos meus. Também ao meu irmão Luis e minha cunhada Flávia e aos meus avôs Lia e Antenor, a todos eles meu amor e minha gratidão por sempre acreditarem em mim.

À minha avó Maria que nos deixou no ano de 2008, obrigada pelo amor e carinho que sempre me proporcionou.

Ao meu orientador de mestrado Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini por todo apoio, amizade e ensinamentos transmitidos durante esse período. Exemplo de competência, ética e profissionalismo.

À meus amigos de Araçatuba, em especial Fábio Faustino e Michele Datore pelo apoio e palavras de incentivo e também às minhas grandes amigas de Guarapuava-PR Veridiana Ribeiro, Cintia Santos e Fatiane Mello pessoas que levarei sempre em minha memória. À minha orientadora de graduação Prof.^a Dr.^a Liane Ziliotto pelo apoio e estímulo à pesquisa durante o período de faculdade.

Aos grandes amigos do Laboratório Clínico Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Laine Gabas, Jucilene Souza, Kelly Vendrame, Lilian Baptistiolli, Rafaela Pintor, Daniela Matono, Gabriela Quideroli, Mirtes da Silva e Renata Figueiredo. Em especial, ao Breno Fernando, a Priscila Preve e ao Luis Gustavo pelas orientações e ensinamentos que foram essenciais para finalização desse trabalho.

Ao colega Diego Borba mestrando da USP de São Carlos que sempre ficou a disposição para orientações e pela participação neste projeto. Às residentes do Hospital Veterinário, Karina Yukie e Flávia Volpato pelo auxílio durante a seleção dos animais.

Aos professores doutores Álvaro José Neto, Wagner Luis Ferreira e Valéria Marçal Félix de Lima por todo o auxílio na execução desse projeto de pesquisa e pela tão estimada disposição a ajudar no que fosse preciso.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa auxílio de mestrado concedida (Proc. 2011/16018-0).

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

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

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução dessa pesquisa, sem vocês nada disso seria possível!

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1 Contextualização do problema.....	13
2 Pesquisa bibliográfica.....	13
3 Importância dos neutrófilos para a defesa imune inespecífica.....	15
4 Uremia e a disfunção dos neutrófilos.....	17
5 A relação da toxina urêmica p-cresol com o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos.....	19
6 Objetivo.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2 - O P-CRESOL LIVRE ALTERA A FUNÇÃO NEUTROFÍLICA DE CÃES.....	33
1 Introdução.....	34
2 Material e Métodos.....	36
2.1 Seleção dos animais.....	36
2.2 Delineamento.....	37
2.3 Colheita das amostras e análises laboratoriais.....	37
2.4 Dosagem cromatográfica do p-cresol livre.....	39
2.5 Isolamento dos neutrófilos.....	40
2.6 Avaliação do metabolismo oxidativo neutrofílico.....	40
2.7 Avaliação da viabilidade e índice apoptótico dos neutrófilos.....	41
2.8 Análise estatística.....	41
3 Resultados.....	42
3.1 Aumento da concentração plasmática de p-cresol e do estresse oxidativo em cães urêmicos.....	42

3.2. Correlação entre o p-cresol plasmático, o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães urêmicos.....	44
3.3 Efeito do p-cresol livre sobre o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis.....	46
4 Discussão.....	48
4.1 O estresse oxidativo em cães urêmicos não está associado com aumento do p-cresol livre plasmático em cães urêmicos.....	48
4.2 Em cães urêmicos o aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos está associado à maior concentração plasmática de p-cresol livre.....	49
4.3 O p-cresol livre afeta o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis.....	49
5 Conclusão.....	52
6 Agradecimentos.....	53
REFERÊNCIAS.....	53

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO P-CRESOL SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO E APOPTOSE DOS NEUTRÓFILOS DE CÃES

RESUMO – Em humanos, a imunossupressão que ocorre em pacientes urêmicos está associada com a disfunção dos neutrófilos causada pelas toxinas urêmicas. O p-cresol se acumula no sangue de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) promovendo a inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. O presente trabalho teve como objetivo mensurar as concentrações plasmáticas de p-cresol em cães hígidos e com IRC e testar a hipótese de que o p-cresol livre causa disfunção neutrofílica. Para tal, foi quantificada a concentração plasmática de p-cresol por cromatografia de fase líquida (HPLC) em cães hígidos e com IRC no estágio IV. Também foi avaliado *in vitro* o efeito específico do p-cresol sobre o metabolismo oxidativo e a taxa de apoptose de neutrófilos de cães hígidos, considerando-se a maior concentração plasmática desta toxina observada *in vivo* em cães com IRC. Neutrófilos isolados de 20 cães saudáveis foram incubadas em meio de RPMI puro ou enriquecido com p-cresol e com plasma de cães com IRC. O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado por citometria de fluxo capilar utilizando as sondas hidroetidina e 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína com ou sem estímulos de acetato miristato de forbol e n-formil-metionil-leucil-fenilalanina. A apoptose e a viabilidade dos neutrófilos foi quantificada em citômetro de fluxo capilar utilizando sistema Anexina V-PE, com ou sem estímulo de camptotecina. Cães com IRC apresentaram *in vivo* o quadro de estresse oxidativo e aumento do p-cresol plasmático. A maior concentração do p-cresol causou disfunção neutrofílica *in vitro*. Conclui-se que p-cresol pode estar envolvido com quadro de estresse oxidativo *in vivo* e que sua alta concentração diminua a viabilidade e leve a uma redução da produção de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-Chave: explosão respiratória, leucócitos, morte celular, uremia.

IN VITRO EVALUATION OF P-CRESOL ON THE OXIDATIVE METABOLISM AND APOPTOSIS OF NEUTROPHILS FROM DOGS

SUMMARY – In humans, the immunosuppression observed in uremic patients is associated with the neutrophil dysfunction caused by uremic toxins. P-cresol accumulates in the blood of patients with chronic renal failure (CRF) promoting the inhibition of neutrophil oxidative metabolism. This study aimed to measure the plasma concentrations of p-cresol in dogs with CRF and test the hypothesis that free p-cresol causes neutrophil dysfunction. To this end, plasma concentration of p-cresol was determined using high pressure liquid chromatography (HPLC) in dogs presenting stage IV of CRF. The *in vitro* specific effect of p-cresol on the oxidative metabolism and apoptosis rate of neutrophils from healthy dogs was also evaluated, considering the highest plasma concentration of this toxin observed on the *in vivo* measurement of dogs with CRF. Isolated neutrophils from 20 healthy dogs were incubated in RPMI medium alone, supplemented with p-cresol or plasma from dogs with CRF. Neutrophil oxidative metabolism was assessed by capillary flow cytometry using the probes hydroethidine and 2',7'- dichlorofluorescein diacetate with or without stimulus with phorbol myristate acetate and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Apoptosis and viability of neutrophils were quantified also in capillary flow cytometry using Annexin V-PE system with or without stimulus with camptothecin. Dogs with CRF presented oxidative stress and increased plasma levels of p-cresol, the higher concentration of p-cresol caused *in vitro* neutrophil dysfunction. It can be concluded that p-cresol may be involved with *in vivo* oxidative stress that its higher concentration decreases the viability and lead to a reduced production of reactive oxygen species.

Keywords: respiratory burst, leukocyte, cell death, uremia.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Contextualização do problema

A relação entre o estresse oxidativo e seus efeitos deletérios na resposta imune de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) está bem estabelecida em humanos, porém só recentemente foi evidenciado que a condição urêmica também altera o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães com IRC. Tem sido postulado que as toxinas urêmicas promovam inicialmente uma ativação do metabolismo oxidativo e que o excesso de espécies reativas de oxigênio geradas, numa segunda etapa, promovam o aumento da apoptose e conseqüente diminuição da produção de superóxido dos neutrófilos. Para evitar as infecções por imunossupressão em pacientes com IRC é fundamental desenvolver estratégias que minimizem os efeitos deletérios das toxinas urêmicas que comprovadamente afetam a função dos neutrófilos. Para tal é essencial investigar quais das dezenas de toxinas urêmicas descritas aumentam suas concentrações plasmáticas durante o quadro de imunossupressão da IRC. Conforme as diretrizes do grupo Europeu de Toxinas Urêmicas, não menos importante é comprovar *in vitro* o efeito isolado de cada uma dessas toxinas sobre a disfunção celular. O p-cresol, por não ser filtrado durante a hemodiálise, é uma das várias toxinas urêmicas que se acumulam em pacientes com IRC e que, em humanos, comprovadamente inibe o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, predispondo tais pacientes a infecções secundárias. Os mecanismos pelos quais o p-cresol afeta o metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos ainda está em construção e não há estudos sobre o efeito dessa toxina na espécie canina.

2 Pesquisa bibliográfica

Antes e durante a realização do presente estudo foi realizada uma revisão de literatura sistemática sobre o tema em alguns bancos de dados eletrônicos de interesse disponíveis no portal da Pesquisa (Pubmed, Web

Science, Scielo). As perguntas para a realização da revisão foram estruturadas com três elementos conceituados na Medicina Baseada em Evidências, conforme preconizado por Castro (2001):

Pergunta 1: Situação: cromatografia; Intervenção: p-cresol; Desfecho: uremia. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca na base de dados da Pubmed: (("chromatography"[MeSH Terms] OR "chromatography"[All Fields]) AND ("4-cresol"[Supplementary Concept] OR "4-cresol"[All Fields] OR "p cresol"[All Fields]) AND ("uraemia"[All Fields] OR "uremia"[MeSH Terms] OR "uremia"[All Fields])) AND ("animals"[MeSH Terms:noexp] OR "humans"[MeSH Terms]). A busca resultou quinze trabalhos na espécie humana sendo utilizados apenas cinco destes trabalhos, não foi encontrado nenhum trabalho na espécie canina.

Pergunta 2: Situação: neutrófilo; Intervenção: p-cresol; Desfecho: espécie reativa de oxigênio. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca na base de dados da Pubmed: (("neutrophils"[MeSH Terms] OR "neutrophils"[All Fields] OR "neutrophil"[All Fields]) AND ("4-cresol"[Supplementary Concept] OR "4-cresol"[All Fields] OR "p cresol"[All Fields]) AND species[All Fields] AND reactive[All Fields]) AND ("animals"[MeSH Terms:noexp] OR "humans"[MeSH Terms]) foi encontrado apenas um trabalho e devido a escassez dos resultados foi expandida para a seguinte estratégia de busca (immune[All Fields] AND response[All Fields] AND ("4-cresol"[Supplementary Concept] OR "4-cresol"[All Fields] OR "p cresol"[All Fields]) AND species[All Fields] AND reactive[All Fields]) AND ("animals"[MeSH Terms:noexp] OR "humans"[MeSH Terms]) que resultou em mais dois trabalhos.

Pergunta 3: Situação:neutrophil; Intervenção: p-cresol; Desfecho: apoptose. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca na base de dados da Pubmed: (("neutrophils"[MeSH Terms] OR "neutrophils"[All Fields] OR "neutrophil"[All Fields]) AND ("4-cresol"[Supplementary Concept] OR "4-cresol"[All Fields] OR "p cresol"[All Fields]) AND ("apoptosis"[MeSH Terms] OR

"apoptosis"[All Fields])) AND ("animals"[MeSH Terms:noexp] OR "humans"[MeSH Terms]) resultando em apenas um trabalho.

Devido a escassez de artigos localizados (n=9) no PubMed a revisão foi expandida para outros bancos de dados (Portal da Pesquisa, Web Science, Scielo e Google Acadêmico). Não foi utilizado limite de busca quanto ao idioma, data de publicação e espécie. O período da pesquisa bibliográfica se estendeu até o dia 15/2/2014.

3 Importância dos neutrófilos para a defesa imune inespecífica

Os neutrófilos são células que integram a primeira linha de defesa do organismo (KAUFMANN, 2008). Estes polimorfonucleares possuem meia-vida curta, cerca de 12 horas na corrente sanguínea, período após o qual migram para os tecidos normais ou são atraídos por estímulos quimiotáticos para os tecidos inflamados, onde em poucas horas sofrem apoptose e são fagocitados (KUMAR; SHARMA, 2010). Quando efetivos, os neutrófilos são considerados “fagócitos profissionais”, pois possuem enzimas proteolíticas e um metabolismo oxidativo produtor de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO) que exercem importantes funções microbicidas (ARAZNA et al., 2013).

Segundo Swain et al. (2002) existem três fenótipos distintos de neutrófilos: quiescente, estimulado e ativado. Os neutrófilos quiescentes circulam na corrente sanguínea, não expressam receptores de membrana e possuem morfologia arredondada. Os neutrófilos estimulados ou também conhecidos como *primed* são considerados as células "prontas" por expressarem moléculas de adesão e apresentarem alterações em sua morfologia que permite a diapedese, porém difere do neutrófilo ativado por produzir pouca ERO e por poder voltar ao estágio de repouso. Vários agentes podem atuar como estimuladores de neutrófilos, com o formil peptídeo met-leu-phe (fMLP), lipopolissacarídeo (LPS), fator de agregação plaquetária (PAF), acetato miristato de forbol (PMA) (EI-BENNA et al., 2008)

Os neutrófilos quando estimulados podem expressar e secretar IL-8, que é essencial para a quimiotaxia e ativação de outros neutrófilos (FU et al., 2004).

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 ERO, incluindo o superóxido e o peróxido de hidrogênio (HUIMIN et al., 2000). O NADPH é oxidado pela ativação da enzima NADPH-oxidase que transfere dois elétrons para cada duas moléculas de oxigênio, gerando ânion superóxido, essencial para a função bactericida dos neutrófilos (BABIOR, 2002).

A NADPH oxidase é formada por complexo enzimático que contém três subunidades presentes no citosol (p40phox, p47phox e p67phox) e um complexo protéico de membrana p22phox - p91phox (WITKO-SARSAT et al., 2000). Devido à ativação dos neutrófilos ocorre fosforilação da subunidade p47 e as subunidades enzimáticas presentes no citosol migram para a membrana plasmática. Esta associação torna o complexo enzimático ativo capaz de gerar ânion superóxido (O_2^-) a partir da forma molecular comum do oxigênio (O_2). (BABIOR, 2002).

O ânion superóxido é substrato para a geração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros oxidantes mais importantes por meio da reação envolvendo a enzima superóxido dismutase. Dentre as ERO que são geradas a partir de H_2O_2 encontram-se o ácido hipocloroso cuja formação depende da ação da mieloperoxidase (MPO) juntamente com ânion cloro. Este ácido é um potente oxidante citotóxico e possui uma grande importância na destruição de vírus, fungos e bactérias (SMITH, 2000). Já a hidroxila pode ser produzida via reação de Fenton independentemente de H_2O_2 e O_2^- (BEUTLER, 2004).

Para evitar o extravasamento excessivo de ERO e danos oxidativos, os neutrófilos entram rapidamente em apoptose após ativação e migração aos tecidos (DUPRÉ-CROCHET et al., 2013). As caspases são enzimas presentes no processo de apoptose celular e atuam inibindo proteínas essenciais para a sobrevivência celular, levando assim à morte celular e acarretando alterações morfológicas típicas do processo (SALVESEN; DIXIT, 1999). As ERO também são controladas pelas defesas antioxidantes endógenas e exógenas provenientes da dieta como vitaminas E e C, carotenoides e selênio

(HALLIWELL et al., 2011). Uma incapacidade celular em conter a produção ou mesmo remoção destas ERO resulta em um acúmulo anormal dessas substâncias gerando o chamado estresse oxidativo (CHATTERJEE, 2007).

O estresse oxidativo pode comprometer a função celular e desempenhar importante função na patogênese de vários processos biológicos (REUTER et al., 2010), além de também estar envolvido na patogenia de inúmeras doenças como anemia hemolítica (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008), aterosclerose (BONOMINI et al., 2008), lesões de reperfusão teciduais (PARK; LUCCHESI, 1999) e tem também potencial carcinogênico (WEINBERG; CHANDEL, 2009).

Existem uma gama de métodos para avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, como o teste de redução do tetrazólio de nitroazul (NBT), a redução do ferrocitocromo C, a quimiluminescência e a determinação da mieloperoxidase. (DUPRÉ-CROCHET et al., 2013). Recentemente a citometria de fluxo vem sendo a metodologia mais utilizada para quantificar os produtos do metabolismo oxidativo, sendo um método mais simples e capaz de mensurar a atividade de centenas de neutrófilos em um período muito curto de tempo (ELBIN; LIZARD et al., 2009). As diferentes metodologias utilizadas podem ser responsáveis por resultados conflitantes da produção de ERO vistos na literatura (SARDENBERG et al., 2006).

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

A uremia é um termo genérico usado para definir e caracterizar o estado de IRC em que os rins perdem capacidade de exercer suas funções primordiais como eliminar substâncias tóxicas que seriam filtradas em condições normais. Os principais sinais clínicos encontrados em casos de uremia são perda de apetite, vômito, diarreia, letargia e perda de peso, gastrite urêmica e úlceras orais (POLZIN, 2011). Pacientes com IRC são considerados grupo de risco por desenvolverem frequentes casos de infecções (COHEN; HÖRL et al., 2012),

A IRC é diagnosticada com frequência em pequenos animais (LUND et al., 1999) e a alta mortalidade desta afecção ainda não está esclarecida, porém

sabe-se que em humanos a disfunção neutrofílica é uma das principais causas (COHEN; HÖRL et al., 2012). A presença da imunossupressão em pacientes com IRC tem sido comumente atribuída à toxinas urêmicas, má nutrição, excesso de ferro, aumento do cálcio citosólico e deficiência de zinco no organismo (HÖRL, 1999; IBS; RINK, 2003).

Entretanto, os resultados de estudos envolvendo a uremia ainda são contraditórios, principalmente envolvendo o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Enquanto alguns autores verificaram aumento do metabolismo oxidativo neutrofílico (KLEIN et al., 1999; MCLEISH et al., 1996) outros observaram diminuição das ERO (COHEN et al., 2011; HIRAYAMA et al., 2000; SARDENBERG et al., 2006) e até mesmo ausência de alteração (HUGHES et al., 1996). Tais divergências podem ser atribuídas à diferença entre as metodologias utilizadas para avaliar o metabolismo oxidativo neutrofílico ou devido à fase da IRC avaliada (SARDENBERG et al., 2006). Já se sabe que as toxinas urêmicas possuem efeitos distintos sobre as células, num estágio inicial essas toxinas podem causar aumento do metabolismo oxidativo causando estresse oxidativo nas células (CENDOROGLO et al., 1999), dessa forma ocorre um efeito pró-inflamatório que pode predispor inclusive a doenças cardíacas (COHEN; HÖRL et al., 2012). Enquanto outras toxinas tem efeito inibidor sobre a produção de ERO (CARVALHO et al., 2011; HIRAYAMA et al., 2000), o que poderia favorecer quadros infecciosos.

A taxa de apoptose dos neutrófilos é elevada em pacientes humanos com uremia, esta maior apoptose é responsável pela menor produção de superóxido e conseqüentemente pela menor capacidade bactericida dos neutrófilos (CENDOROGLO et al., 1999). Uma possível explicação para esse efeito pró-apoptótico em paciente com IRC pode ser devido a maior expressão do Fas nesta afecção, (JABER, 2001) que é um ativador das caspases (ELMORE, 2007). Estudo realizado por Majewska et al. (2003), *in vivo*, apontam uma aceleração da apoptose dos neutrófilos em pacientes urêmicos que era dependente do aumento do fator de expressão Fas/Apop-1 gerados durante a uremia.

Em cães já existem evidências que altas concentrações plasmáticas de ureia promovem *in vitro* a aceleração da apoptose dos neutrófilos (TREVELIN et al., 2008), sugerindo que a IRC nessa espécie também pode contribuir para a imunossupressão. Nessa espécie também já foi observado que as toxinas do soro urêmico diminuem a produção de superóxido de neutrófilos de cães saudáveis (BARBOSA et al., 2010). Recentemente foi relatado que o estresse oxidativo em cães com IRC está associado a maior (ALMEIDA et al., 2013) ou menor (SILVA et al., 2013) produção neutrofílica de superóxido. Segundo Silva et al. (2013), durante o estresse oxidativo da IRC canina o aumento da taxa de apoptose diminui o número de neutrófilos viáveis e a produção neutrofílica de superóxido. Entretanto, ainda é necessário determinar os mecanismos de como o estresse oxidativo da uremia acelera a apoptose e diminui o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães.

5 A relação da toxina urêmica p-cresol com o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos

Existem mais de 100 outras toxinas urêmicas que podem contribuir para alteração do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos (SARDENBERG et al., 2006). O p-cresol, as guanidinas e a leptina representam alguns dos solutos urêmicos identificados em pacientes com IRC e que podem modificar a função neutrofílica (HIRAYAMA et al., 2000; OTTONELLO et al., 2004 SCHEPERS et al., 2007; VANHOLDER et al., 2008).

O p-cresol (4-metilfenol) é uma das principais toxinas urêmicas estudadas atualmente, sendo um metabólito da fenilalanina e tirosina produzido principalmente pelas bactérias intestinais (De SMET et al., 2003). Esta toxina urêmica é caracterizada por possuir uma proteína de forte ligação, tornando sua remoção difícil na maioria das técnicas de diálise atualmente disponíveis, incluindo a diálise de alto fluxo (CARVALHO et al., 2011), por isso vem sendo associada com a alta taxa de mortalidade em pacientes hemodialisados (BAMMENS et al., 2006).

No soro de pacientes com IRC, a concentração de p-cresol é 10 vezes maior do que em pessoas saudáveis (CERINI et al., 2004). O p-cresol se encontra no plasma na forma livre e ligada a proteína, principalmente a albumina, sendo estas duas formas juntas consideradas o p-cresol total (VANHOLDER; De SMET et al.,1999). Esta toxina urêmica também é transformada no fígado em seu conjugado p-cresilsulfato por meio de sulfatação (VANHOLDER; De SMET et al.,1999). Já foram desenvolvidos métodos sensíveis para determinar o p-cresol total e livre, sendo a cromatografia de fase líquida (HPLC) a metodologia mais utilizada nestes estudos. Bammens et al. (2006) encontraram concentrações de 1mg/L p-cresol livre e 10mg/L de p-cresol total em humanos com IRC, sendo o p-cresol total 10 vezes maior nestes pacientes que pacientes sem IRC, a mesma diferença relatada anteriormente por De Smet et al. (1998).

Entretanto, estudo realizado por De Smet et al. (2003) verificaram que a hipoalbuminemia presente em pacientes com uremia favorece um aumento da porção livre do p-cresol e que este fato está relacionado com alta frequência de pacientes internados por quadros infecciosos. O mesmo estudo demonstrou *in vitro* que a concentração encontrada de p-cresol livre levou a uma inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, o que sugere que o efeito tóxico do p-cresol possa estar relacionado com fração livre presente na circulação. Este estudo está de acordo com os resultados de Bammens et al. (2006) que sugerem que os níveis séricos do p-cresol livre estejam ligados com a alta mortalidade de pacientes urêmicos durante o tratamento com hemodiálise. Além disso, num estudo recente realizado por Brocca et al. (2013) foi comprovado que a fração livre do p-cresol provoca uma reação tóxica em células tubulares renais, o que leva à morte celular, principalmente em altas concentrações do p-cresol, podendo ocorrer apoptose ou necrose celular e agravando ainda mais o quadro urêmico.

Há evidência de que a imunossupressão causada pelo p-cresol deve-se a uma menor produção de ERO (SCHEPERS et al., 2007) e a uma menor capacidade de migração dos neutrófilos (CARVALHO et al., 2011). Existem

poucos relatos do efeito do p-cresol sobre a função neutrofílica, conforme pode ser observado na Tabela 1. Já foram descritas diferentes metodologias para avaliar *in vitro* o efeito do p-cresol em neutrófilos humanos, resultando de maneira geral na inibição no metabolismo oxidativo sem alteração da apoptose dos neutrófilos.

Tabela 1 - Resumo das metodologias e principais resultados de estudos sobre efeito *in vitro* do p-cresol no metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos em humanos.

Autores	Vanholder et al. (1995)	De Smet et al. (2003)	Scherpes et al. (2007)	Carvalho et al. (2011)
Número de pacientes	6	13	8	25
Método de análise	Quimiluminescência, produção CO ₂ e citometria de fluxo	Quimiluminescência	Citometria de fluxo	Citometria de fluxo (sonda DCFH)
Tempo de incubação	10, 60 e 120min	10min	10min	10min, 4h, 18h e 24h
Concentração de p-cresol	0, 5, 10, 30 e 50 mg/mL	P-cresol livre: 7,5 e 40,0 mg/L	40,7 mg/L	40,7 mg/L
Diluyente do p-cresol	Metanol	Metanol	Metanol	Metanol
Estímulos	Látex, zymosan e PMA	Zymosan	fMLP, PMA e <i>S. aureus</i>	PMA e <i>S. aureus</i>
Efeito no metabolismo oxidativo	Inibição nas provas espontâneas e estimuladas	Inibição apenas na prova estimulada	Inibição apenas na prova estimulada	Inibição apenas no estímulo com PMA.
Efeito na viabilidade e apoptose	Não avaliado	Não avaliado	Sem efeito	Sem efeito

*DCFH- 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína; PMA-acetato miristato de forbol; fMLP- n-formil-metionil-leucil-fenilalanina.

Carvalho et al. (2011) e Schepers et al. (2007) verificaram que o p-cresol causa uma inibição apenas do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos ativados, sem alteração nas células quiescentes. Dessa forma, Carvalho et al. (2011) sugeriram que o p-cresol agiria inibindo a proteína quinase C, diminuindo a “explosão respiratória” após estímulo com o acetato miristato de

forbol (PMA). Quando os neutrófilos são expostos ao PMA, a ativação da proteína quinase C leva a uma forte ativação da NADPH oxidase e consequente aumento da produção de superóxido dos neutrófilos (GABLER et al., 2003). Entretanto, contrariando tal hipótese Vanholder et al. (1995) verificaram ação inibitória do p-cresol também em neutrófilos quiescentes.

Diferentemente do p-cresol, o seu conjugado p-cresilsulfato aumenta o metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos quiescentes (SCHEPERS et al., 2007), o p-cresilsulfato agiria por ser desulfatado, voltando à forma de p-cresol, isso porque os neutrófilos humanos são uma fonte rica de arissulfatases que catalisam a hidrólise de ésteres aromáticos de sulfato. Dessa forma o p-cresol continuaria agindo nas imediações dos leucócitos prejudicando a resposta de pacientes urêmicos à infecções. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para um melhor entendimento da cinética desta toxina.

O mecanismo que seria responsável pela disfunção neutrofílica em pacientes humanos com IRC parece estar associado à aceleração da apoptose dos neutrófilos com consequente diminuição do metabolismo oxidativo dessas células (CENDOROGLO et al., 1999). Entretanto, Carvalho et al. (2011) e De Smet et al. (2003) não observaram alteração na apoptose e viabilidade de neutrófilos de pacientes humanos saudáveis incubadas com p-cresol. São escassos os estudos relacionando o efeito do p-cresol sobre a taxa de apoptose dos neutrófilos, dificultando a investigação do assunto.

Além das altas concentrações de p-cresol estarem associadas com a alta frequência de infecções em pacientes urêmicos, existe também aumento da ocorrência de doenças cardiovasculares (MEIJERS et al., 2008; PENG et al., 2013), inibição da agregação plaquetária (CHANG et al., 2011), alterações hepáticas (ABREO et al., 1997) e disfunções endoteliais (CERINE et al., 2004) associadas ao acúmulo desta toxina.

Métodos terapêuticos para diminuir a concentração desta toxina urêmica estão sendo investigados em humanos, Vanholder; De Smet et al., (1999) citam que a concentração sérica de p-cresol em pacientes urêmicos pode ser diminuída adotando-se uma dieta com baixos teores de proteína. Métodos

alternativos são necessários uma vez que a hemodiálise é ineficaz em filtrar o p-cresol de forma eficiente, sendo o acúmulo desta toxina então atribuída à maior quantidade de óbitos em pacientes com IRC (BAMMENS et al., 2006; MARTINEZ et al., 2005). De acordo com Faure et al. (2006), é grande a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para otimizar a eliminação do p-cresol em pacientes humanos urêmicos.

Apesar de a insuficiência renal crônica ser uma das enfermidades comumente diagnosticadas em cães, existem poucos relatos na medicina veterinária quanto à disfunção neutrofílica na doença renal, entretanto, já existem evidências que a uremia em cães, à semelhança que ocorre em humanos, também afeta função neutrofílica (ALMEIDA et al., 2013; SILVA et al., 2013). Embora há muito tempo a eliminação do p-cresol tenha sido investigada em cães (BRAY et al., 1950), até o momento não há registros sobre a concentração plasmática dessa toxina durante a uremia e seu efeito sobre os neutrófilos nesta espécie.

6 Objetivos

Com base nas evidências obtidas na revisão de literatura sistemática algumas hipóteses foram formuladas com o objetivo de estabelecer e melhor compreender a relação da toxina p-cresol e a disfunção dos neutrófilos:

Testar a hipótese de que, *in vivo*, à semelhança do que ocorre em humanos, as concentrações plasmáticas de p-cresol aumentam em cães com IRC.

Testar a hipótese de que, *in vivo*, o aumento das concentrações plasmáticas de p-cresol em cães com IRC no estágio IV está associado com a alteração do metabolismo oxidativo e taxa de apoptose dos neutrófilos circulantes.

Testar *in vitro* a hipótese que o p-cresol em concentrações semelhantes às que ocorrem no plasma de cães com IRC alteram o metabolismo oxidativo e a taxa de apoptose dos neutrófilos isolados de cães saudáveis.

Testar *in vitro* a hipótese de que as alterações do metabolismo oxidativo e da taxa de apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis incubados com o plasma urêmico de cães com IRC são similares às alterações dos neutrófilos incubados em meio enriquecido com p-cresol.

REFERÊNCIAS

ABREO, K.; SELLA, M.; GRAUTREAU, S.; De SMET, R.; VOGELEERE, P.; RINGOIR, S.; VANHOLDER, R. P-Cresol, a uremic compound, enhances the uptake of aluminum in hepatocytes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.8, n.6, p.935-942, 1997.

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v.198, n.3, p.599-605, 2013.

ARAZNA, M.; PRUCHNIAK, M.P.; DEMKOW, U. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: Strategies for escaping from killing. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v.187, n.1, p.74-77, 2013.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, n.1, p.33-44, 2000.

BAMMENS, B.; EVENEPOEL, P.; KEULEERS, H.; VERBEKE, K.; VANRENTERGHEM, Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. **Kidney International**, v.69, n.6, p.1081-1087, 2006.

BARBOSA, T.S.; MORI, C.K.; CIARLINI, P.C. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1352-358, 2010.

BONOMINI, F.; TENGATTINI, S.; FABIANO, A.; BIANCHI, R.; REZZANI, R. Atherosclerosis and oxidative stress. **Histology and Histopathology**, v.23, n.3, p.381-390, 2008.

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

BRAY, H.G.; THORPE, W.V.; WHITE, K. Metabolism of derivatives of toluene: cresols. **Biochemical**, v.46, n.3, p.275-278, 1950.

BROCCA, A.; MVIRZÌ, G.; De CAL, M.; CANTALUPPI, V.; RONCO, C. Cytotoxic Effects of p-Cresol in Renal Epithelial Tubular Cells. **Blood Purification**, v.36, n.3, p.219-225, 2013.

CARVALHO, J.T.G.; DALBONI, M.A.; WATANABE, R.; PERES, A.T.; GOES, M.A.; MANFREDI, S.R.; CANZIANI, M.E.; CENDOROGLO, G.S.; GUIMARÃES-SOUZA, N.; BATISTA, M.C.; CENDOROGLO, M. Effects of Spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Artificial Organs**, v.35, n.2, p.27-32, 2011.

CASTRO, A. A. **Revisão sistemática e meta-análise**. 2001. Disponível em: <<http://www.metodologia.org/meta1.PDF> > Acesso em: 17 Jan. 2013.

CENDOROGLO, M.; JABER, B.L.; BALAKRISHNAN, V.S.; PERIANAYAGAM, M.; KING, A.J.; PEREIRA, B.J. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.10, n.1, p.93-100, 1999.

CERINI, C.; DOU, L.; ANFOSSO, F.; SABATIER, F.; MOAL, V.; GLORIEU, G.; DE SMET, R.; VANHOLDER, R.; DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOL, J.; BERLAND, Y.; BRUNET, P. P-Cresol, a uremic retention solute, alters the endothelial barrier function in vitro. **Thrombosis and Haemostasis**, v.92, n.1, p.140-150, 2004.

CHANG, M. C.; WANG, T.M.; YEUNG, S.Y.; JENG, P.Y.; LIAO, C.H.; LIN, T.Y.; LIN C.C.; LIN, B.R.; JENG, J.H. Antiplatelet effect by p-cresol, a uremic and environmental toxicant, is related to inhibition of reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production. **Atherosclerosis**, v.219, n.2, p.559-566, 2011.

CHATTERJEE, P.K. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.376, n.1-2, p.1-43, 2007.

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

COHEN, G.; RAUPACHOVA, J.; ILIC, D.; WERZOWA, J; HÖRL, W.H. Effect of leptin on polymorphonuclear leucocyte functions in healthy subjects and haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.26, n.7, p.2271-2281, 2011.

De SMET, R.; VAN KAER, J.; VAN VLEM, B.; CUBBER, A.; BRUNET, P; LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. **Clinical Chemistry**, v.49, n.3, p.470-478, 2003.

De SMET, R.; DAVID, F.; SANDRA, P.; VAN VLEM, B.; LESAFFER, G.; DHONDT, A.; LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-cresol in patients with chronic renal failure. **Clinical Chimica Acta**, v.278, n.1, p.1-21, 1998.

DUPRÉ-CROCHET, S.; ERARD, M.; NÜBE, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **Journal of Leukocyte Biology**, v.94, n.4, p.657-670, 2013.

EL-BENNA, J.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and

NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Seminars in Immunopathology**, v.30, n.3, p.279-289, 2008.

ELBIM, C.; LIZARD, G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. **Cytometry Part A**, v.75, n.6, p.475-481, 2009.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n.4, p.495-516, 2007.

FAURE, V.; CERINI, C.; PAUL P.; BERLAND, Y.; DIGNAT-GEORGE F.; BRUNET, P. The uremic solute p-cresol decreases leukocyte transendothelial migration *in vitro*. **Oxford Journals**, v.18, n.10, p.1453-1459, 2006.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current Molecular Medicine**, v.8, n.7, p.609-619, 2008.

FU, H.; BYLUND, J.; KARLSSON, A.; PELLMÉ, S.; DAHLGREN, C. The mechanism for activation of the neutrophil NADPH-oxidase by the peptides formyl-Met-Leu-Phe and Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met differs from that for interleukin-8. **Immunology**, v.112, n.2, p.201-210, 2004.

GLABER, W. L.; BULLOCK W.W.; CREAMER H. R. Phorbol myristate acetate induction of chemotactic migration of human polymorphonuclear neutrophils. **Inflammation**, v.73, n.4, p.369-509, 1993.

HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants—quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, n.3, p.125-130, 2011.

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, n.4, p. 648-689, 2000.

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, n.16, p.6353-6357, 1999.

HUGHES, D.A.; SMITH, G.C.; DAVIDSON, J.E.; MURPHY, A.V.; BEATTIE, T.J. The neutrophil oxidative burst in diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. **Pediatric Nephrology**, v.10, n.4, p.445-447, 1996.

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

IBS, K.H.; RINK, L. Zinc-altered immune function. **Journal of Nutrition**, v.133, n.5, p.1452-1456, 2003.

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

KAUFMANN, S.H. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature Immunology**, v.9, n.7, p.705-712, 2008.

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

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v.10, n.11, p.1325-1334, 2010.

LUND, E.; ARMSTRONG, P.J.; KIRK, C.A.; KOLAR, L.M.; KLAUSNER, J.S. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.214, n.9, p.1336-1341, 1999.

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, n.12, p.2582-2588, 2003.

MARTINEZ, A.W.; RECHT, N.S.; HOSTETTER, T.H.; MEYER, T.W. Removal of p-cresol sulfate by hemodialysis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.16, n.11, p.3430-3436, 2005.

MCLEISH, K.R.; KLEIN, J.B.; LEDERER, E.D.; HEAD, K.Z.; WARD, R.A. Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. **Kidney International**, v.50, n.2, p.407-416, 1996.

MEIJERS, B.K.; BAMMENS, B.; DE MOOR, B.; VERBEKE, K.; VANRENTERGHEM, Y.; EVENEPOEL, A. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. **Kidney International**, v.73, n.10, p.1174-1180, 2008.

OTTONELLO, L.; GNERRE, P.; BERTOLOTTO, M.; MANCINI, M.; DAPINO, P.; RUSSO, R.; GARIBOTTO, G.; BARRECA, T.; DALLEGRI, F. Leptin as uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.15, n.9, p.2366-2372, 2004.

PARK, J.L.; LUCCHESI, B.R. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. **Annals of Thoracic Surgery**, v.68, n.5, p.1905-1912, 1999.

PENG, Y.S.; LIN, Y.T.; WANG, S.D.; HUNG, K.Y.; CHEN, Y.; WANG, S.M. P-cresol induces disruption of cardiomyocyte adherens junctions. **Toxicology**, v.5, p.176-184, 2013.

POLZIN, D.J. Chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.41, n.1, p.15-30, 2011.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**. v.49, n.11, p.1603-1616, 2010.

SALVESEN, G.S.; DIXIT, V.M. Caspase activation: the induced-proximity model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.20, p.10964-10967, 1999.

SARDENBERG, C.; SUASSUNA, P.; ANDREOLI, M.C.; WATANABE, R.; DALBONI, M.A.; MANFREDI, S.R.; DOS SANTOS, O.P.; KALLAS, E.G.; DRAIBE, S.A.; CENDOROGLIO, M. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, n.1, p.160-165, 2006.

SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; GOEMAN, J.; VAN DER EYCKEN, J.; VANHOLDER, R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.22, n.2, p.592-596, 2007.

SILVA, A. C. R. A.; ALMEIDA, B. F. M.; SOEIRO, C. S.; FERREIRA, W. L.; DE LIMA, V. M. F.; CIARLINI, P.C. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.77, n.2, p.136-141, 2013.

SMITH, G.S. Neutrophils. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.281-296.

SWAIN, S.D.; ROHN, T.T.; QUINN, M.T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.4, n.1, p.69-83, 2002.

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

VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; WATERLOOS, M. A.; VAN LANDSCHOOT, N.; VOGELEERE, P.; HOSTE, E.; RINGOIR, S. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. **Kidney International**, v.47, n.2, p.510-517, 1995.

VANHOLDER, R.; De SMET, R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.10, p.1815-1823, 1999.

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

WEINBERG, F.; CHANDEL, N.S. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, n.23, p.3663-3673, 2009.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**, v.80, n.5, p.617-653, 2000.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 - O P-CRESOL LIVRE ALTERA A FUNÇÃO NEUTROFÍLICA DE CÃES

BOSCO, A.M.^{1*}; PREVE, P.P.¹; ALMEIDA, B.F.M.¹; NARCISO, L.G.¹; SANTOS NETO², A.; FERREIRA, W. L.³; CIARLINI, P.C.³

Resumo - Objetivando uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela disfunção neutrofílica recentemente descrita em cães com insuficiência renal crônica (IRC), foi feita uma comparação entre a concentração plasmática do p-cresol livre em cães controles (n=20) e no estágio IV da IRC (n=20). Foi determinado o grau de correlação entre os valores plasmáticos do p-cresol e os marcadores de estresse oxidativo, metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos de cães urêmicos. O efeito deste composto sobre o metabolismo oxidativo e apoptose foi avaliado em neutrófilos isolados de 20 cães saudáveis incubados em meio RPMI enriquecido com p-cresol (0,405 mg/L) e comparado com meio enriquecido com plasma urêmico. Para tal, a concentração plasmática de p-cresol foi quantificada por cromatografia de fase líquida (HPLC). O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado por citometria de fluxo capilar quantificando a produção de superóxido com uso da sonda hidroetidina (HE) e a produção de peróxido de hidrogênio com a sonda 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH), com ou sem estímulos de acetato miristato de forbol (PMA) e n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). A apoptose e a viabilidade dos neutrófilos foi quantificada em citômetro de fluxo capilar utilizando sistema Anexina V-PE, com ou sem estímulo de camptotecina (CAM). O p-cresol livre induziu em neutrófilos de cães sadios um aumento da apoptose e a diminuição da

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

*Autor para correspondência: anebosco@hotmail.com

² Docente, Departamento de Química e Física Molecular, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

³ Docente, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil.

produção de ERO. Conclui-se que o quadro apresentado durante a uremia concomitante com aumento do p-cresol livre plasmático pode contribuir para a presença da imunossupressão em cães com IRC.

Palavras-Chave: explosão respiratória, morte celular, superóxido, uremia.

1 Introdução

A imunossupressão descrita na insuficiência renal crônica (IRC) em humanos (CHONCHOL, 2006; COHEN; HÖLL et al., 2012) provavelmente ocorre em cães urêmicos. Recentemente foi relatado que o estresse oxidativo em cães com IRC está associado a maior (ALMEIDA et al., 2013a) ou menor (SILVA et al., 2013) produção neutrofílica de superóxido. A produção de superóxido e seus derivados exercem importante função bactericida, entretanto uma produção excessiva desses oxidantes pode resultar em lesão de vários componentes orgânicos devido ao estresse oxidativo (KAO et al., 2010) e aumentar a taxa de apoptose neutrofílica (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2006).

O estresse oxidativo desempenha importante função na patogênese de uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a apoptose (GALLI et al., 1999). Os neutrófilos em apoptose apresentam redução da taxa quimiotática, fagocitose e produção de superóxido (WHYTE et al., 1993), conseqüentemente menor capacidade de combater microrganismos (ANDING et al., 2003; SARDENBERG et al., 2006). Os mecanismos pelos os quais a disfunção dos neutrófilos ocorre na uremia está em construção. Uma das hipóteses seria que as toxinas urêmicas promovam inicialmente uma ativação do metabolismo oxidativo e que o excesso de espécies reativas de oxigênio, em uma segunda etapa, promova o aumento da apoptose e conseqüente diminuição da produção de superóxido dos neutrófilos (ALMEIDA et al., 2013a; CENDOROGLO et al., 1999).

Existem mais de 100 toxinas urêmicas que podem contribuir para alteração do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos (SARDENBERG et al., 2006). O p-cresol (4-metilfenol) é um metabólito da fenilalanina e tirosina que é produzido especialmente pelas bactérias intestinais (De SMET et al., 2003). No soro de pacientes humanos com IRC, a concentração de p-cresol é 10 vezes maior do que o normal (De SMET et al., 1998). A hipoalbuminemia presente em pacientes com IRC favorece um aumento da porção livre do p-cresol e este fato parece estar relacionado com a alta frequência de pacientes internados por quadros infecciosos (De SMET et al., 2003), provavelmente devido à imunossupressão.

Os poucos estudos que avaliaram o efeito do p-cresol sobre a função dos neutrófilos demonstraram que esta toxina urêmica pode contribuir para a imunossupressão de pacientes urêmicos, inibindo o metabolismo oxidativo (CARVALHO et al., 2011; SCHERPERS et al., 2007) sem acelerar a apoptose dos neutrófilos (CARVALHO et al., 2011; De SMET et al., 2003).

Embora a IRC seja comum em cães, os estudos sobre o efeito das toxinas urêmicas na função neutrofílica desta espécie são escassos. Barbosa et al. (2010) observaram que os compostos presentes no plasma de cães urêmicos diminuem *in vitro* a produção de superóxido de neutrófilos isolados de cães saudáveis. Até o momento não se conhece qual a concentração plasmática de p-cresol em cães com IRC e se o aumento dessa toxina, à semelhança do que ocorre em humanos, afeta o metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Objetivando ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos com a disfunção dos neutrófilos de cães com IRC, o presente estudo testou a hipótese de que à semelhança do que ocorre em humanos, o aumento da concentração plasmática do p-cresol livre está associado com estresse oxidativo e a alteração do metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com IRC. Aditivamente foi comparada a produção de superóxido e apoptose de neutrófilos de cães urêmicos com os de cães saudáveis incubados com plasma urêmico e p-cresol.

2 Material e Métodos

O experimento ocorreu de acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA-00762/2012).

2.1 Seleção dos animais

Foram selecionados 60 cães adultos de diferentes raças e sexo, sendo 40 controle e 20 urêmicos. Para tal, todos cães foram submetidos à exames clínicos e laboratoriais como hemograma completo, urinálise tipo I e concentração plasmática de proteína total, fibrinogênio, albumina, ureia, creatinina, bilirrubina total, ácido úrico, colesterol, glicose, cálcio, fósforo, capacidade antioxidante total (TAC) e peroxidação lipídica mensurada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Com base nos exames supracitados, considerou-se como critério de inclusão no grupo urêmico o cão ter IRC no estágio IV ($\geq 440 \mu\text{mol/L}$ de creatinina) com sinais clínicos sistêmicos (hipertensão, gastrite, úlcera bucal, anemia normocítica normocrômica, baixa densidade urinária, dentre outros) de acordo com o sistema de estadiamento da *International Renal Interest Society* (INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY, 2006). No grupo controle foi incluído apenas cães sem qualquer alteração nos exames clínico e laboratoriais.

Animais de ambos os grupos experimentais recentemente tratados com vacina ou medicamento que sabidamente afetem a função leucocitária e o estado antioxidante não foram incluídos no estudo. Cães soro positivos para leishmaniose visceral pelo método ELISA (LIMA et al., 2003) também não foram incluídos no estudo.

2.2 Delineamento

Os indicadores de estresse oxidativo no plasma (TAC, TBARS, albumina, ácido úrico e bilirrubina), a produção de superóxido, viabilidade e apoptose dos

neutrófilos dos cães dos grupos controle (n=20) e urêmicos (n=20) foram quantificadas e correlacionadas com a concentração plasmática de p-cresol.

Para avaliar o efeito isolado do p-cresol sobre o metabolismo oxidativo, utilizando-se sondas específicas, foi quantificada a produção de superóxido e de peróxido de hidrogênio em neutrófilos isolados de cães saudáveis do grupo controle (n= 20), com e sem a ativação com acetato miristato de forbol (PMA) e n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Para fins de controle, todos os ensaios foram comparados com meios enriquecidos com e sem plasma urêmico e o solvente metanol utilizado para diluir o p-cresol.

Conforme recomendações do grupo europeu de toxinas urêmicas (COHEN et al., 2007) nos ensaios *in vitro* foi utilizada a maior concentração de p-cresol encontrada no plasma de cães do grupo urêmico (0,405 mg/L). Resumidamente, de 20 cães saudáveis do grupo controle, uma suspensão de neutrófilos isolados (10^6 /mL) foi submetida a três diferentes tratamentos: incubação em meio RPMI 1640 puro (Controle); incubação em RPMI com 0,8% de metanol (Controle diluente); incubação em RPMI enriquecido com “pool” de plasma de 20 cães do grupo urêmico e incubação com RPMI enriquecido com 0,405 mg/L de p-cresol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). A solução mãe de p-cresol diluída em metanol foi preparada imediatamente antes do uso. Todos os ensaios foram realizados pareados, sendo os neutrófilos incubados por 3 horas em termociclador à 37°C.

2.3 Colheita das amostras e análises laboratoriais

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

As análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical

Eletronics Co., Nanshan, China) previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II e utilizando reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). Foi determinado o teor de ureia (método enzimático UV urease/glutamato desidrogenase); creatinina (método cinético do picrato alcalino); albumina (método do verde de bromocresol); colesterol (método enzimático oxidase/peroxidase); proteína plasmática total (método do biureto); bilirrubina (método sulfanílico diazotado); ácido úrico (método enzimático uricase/peroxidase); cálcio total (método colorimétrico da cresolftaleína complexona), fósforo inorgânico (método colorimétrico do molibdato); AST e ALT (método cinético IFCC) e proteína urinária (método vermelho de pirogalol). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

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

A TAC plasmática foi determinada pelo método colorimétrico do cátion ABTS (*2,2'-azino-bis 3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid*) em que substâncias antioxidantes presentes no plasma inibem a oxidação dos substratos presentes nos reagentes, impedindo a mudança de cor do meio e, assim, determinando a capacidade antioxidante do plasma. Os resultados foram expressos em mmol de equivalente de Trolox/L após comparação das amostras com uma curva padrão com diversas concentrações de Trolox (EREL, 2004).

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada a partir da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico utilizando reagente comercial (TBARS Assay Kit, ZeptoMetrix Corporation, USA) e leitora

automática de placas de 96 poços (Readwell Touch, Robonik PVT LTD, Thane, India) em 545 nm, segundo recomendações do fabricante.

2.4 Dosagem cromatográfica do p-cresol livre

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Shimadzu, série Prominence 20A com detector UV/Vis em 278 nm, seguindo o método proposto por De Smet et al. (1998). Resumidamente, as amostras de plasma de cães foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, sendo retirada uma alíquota de 250µL do sobrenadante. Em seguida as amostras foram submetidas à ultra filtração a 6.000 rpm em um dispositivo de ultra filtração Centrifree de 30.000 Da. Uma alíquota de 100 µL do filtrado foi transferida para um microtubo adicionando-se 15 µL de solução dos padrões internos 2,6-dimetilfenol (padrão interno do p-cresol, concentração de 500 µg/L), 5,6 µL de KOH 6,5 mol/L e 9,1 µL de solução de ninidrina 1,8 mol/L. Após o tempo de reação de 15 minutos, foram adicionados 49,9 µL de solução de ácido ascórbico 10% (m/v) e 6,45 µL de H₃PO₄ 10 mol/L. As amostras foram submetidas a aquecimento em forno a 90°C por 30 minutos, resfriadas a temperatura ambiente e injetadas no sistema HPLC Shimadzu Proeminence 20A com detector de fluorescência Shimadzu RF-10AxL, utilizando como fase móvel água com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila. Para a detecção do p-cresol foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 270 nm e emissão em 300 nm. Foi utilizado o método de eluição gradiente, com composição da fase móvel variando de 5-23% de acetonitrila em 9 minutos, 23-50% de acetonitrila em 3 minutos, 50-5% em 1 minuto e constante em 5% de acetonitrila por 4 minutos, totalizando o tempo de análise cromatográfica de 17 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL e a temperatura do forno 45°C.

2.5 Isolamento dos neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados do sangue total heparinizado conforme protocolo descrito por Silva et al. (2013). Resumidamente quatro mililitros de

sangue heparinizado foram utilizados para o isolamento dos neutrófilos em duplo gradiente de separação contendo 3 mL de Histopaque-1119[®] e 3 mL de Histopaque-1070[®] (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). As células isoladas foram então lavadas duas vezes com solução aquosa de cloreto de amônio (0,14 M) e uma vez com Solução Salina Balanceada de Hanks (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Após contagem em hemocitômetro, as células foram diluídas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) na concentração 10⁶/mL. A viabilidade foi estimada pelo método de exclusão do azul de tripan e a pureza foi determinada por citologia. Apenas os isolamentos que obtiveram viabilidade e pureza acima de 95 e 93%, respectivamente, foram incluídos no estudo.

2.6 Avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos

O metabolismo oxidativo foi avaliado determinando-se a produção de superóxido com a sonda hidroetidina (HE) e a produção de peróxido de hidrogênio com a sonda diacetato de diclorofluoresceína (DCFH). Para determinação com HE foi utilizada metodologia descrita por Almeida et al. (2013b). Resumidamente, em um volume de 180 µL de suspensão de neutrófilos (10⁶/mL) em meio RPMI 1640 foram acrescentados 20 µL de solução tamponada de HE (0,1 mmol/L). Esta suspensão de neutrófilos, com e sem o estímulo de 0,55 µM de PMA e 100 nM de fMLP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) foi incubada em um termociclador a 37°C por 10 minutos. Após a incubação a suspensão de neutrófilo foi mantida em banho de gelo e protegida da luz até o momento da leitura. A média de fluorescência vermelha de brometo de etídio gerada pela oxidação do HE pelo superóxido foi quantificada em um citômetro de fluxo capilar (Guava EasyCyte Mini[®], Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA).

Para determinação com DCFH (fluorescência verde) a metodologia foi similar à da HE, variando apenas na concentração final da sonda que foi de 5 mol/L, também foram utilizados os mesmos estímulos com PMA e fMLP.

2.7 Avaliação da viabilidade e índice apoptótico dos neutrófilos

A viabilidade e a apoptose total foram estimadas por citometria de fluxo capilar utilizando o sistema Anexina V-PE (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, USA), conforme descrito por Silva et al. (2013). Resumidamente, uma solução de neutrófilos (10^6 /mL) dos diversos tratamentos foi incubada com e sem o indutor camptotecina 6 mM (CAM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Após incubação por 4 horas a 37°C, com agitação por um minuto (600 rpm) a cada 15 minutos em termociclador microprocessado (Thermomixer, Eppendorf, Mod. Comfort, Hamburg, Germany), a suspensão de células foi aliqüotada em 100 µL e acrescida de 100 µL de Anexina V-PE, com posterior incubação por 20 minutos em temperatura ambiente sob proteção da luz. Utilizando-se citômetro de fluxo capilar, os resultados de 10.000 eventos foram analisados em programa computacional específico após a compensação do citômetro para o fluorocromo vermelho para reação positiva de 7-AAD e fluorocromo amarelo para reação positiva da Anexina V. Foi possível quantificar as seguintes populações celulares: células viáveis (anexina V- e 7-AAD-); apoptose inicial (anexina V+ e 7-AAD-) e apoptose final (anexina V+ e 7-AAD+). A apoptose total foi obtida após soma das populações de células em apoptose inicial e final.

2.8 Análise estatística

Nos ensaios *in vivo*, todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste Bartlett) e para verificar as diferenças entre os grupos analisados foram utilizados os testes de Mann-Whitney e teste t não pareado. As correlações entre os teores de p-cresol com os parâmetros bioquímicos e metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos foram realizadas utilizando teste de Spearman. Nos ensaios *in vitro* para verificar o efeito do p-cresol sobre metabolismo oxidativo e viabilidade dos neutrófilos, as variáveis foram testadas quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a diferença entre os grupos foi determinada pelos testes de T pareado ou Wilcoxon. Foram consideradas significantes as diferenças entre os

grupos quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 5.01, 2007).

3 Resultados

Comparado ao grupo controle, os cães urêmicos apresentaram caquexia, halitose urêmica, ulceração oral e na língua, desidratação, intensa azotemia, baixa densidade urinária, elevado UPC, anemia normocítica e normocrômica e hipoalbuminemia (Tabela 1). Estes achados laboratoriais confirmam que todos os cães urêmicos selecionados se encontravam no estágio IV da IRC (INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY, 2006).

3.1 Aumento da concentração plasmática de p-cresol e do estresse oxidativo em cães urêmicos

O p-cresol livre plasmático em cães urêmicos foi significativamente maior que do Grupo controle ($0,024 \pm 0,008$ vs $0,07 \pm 0,091$ mg/L) (Figura 1A), sendo que a concentração máxima observada foi de 0,405 mg/L.

Os cães urêmicos, comparados aos controles, apresentaram aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos antioxidantes plasmáticos (TAC, ácido úrico e albumina), confirmando que ocorreu um aumento do estresse oxidativo durante a uremia (Figura 1). Porém, não houve correlação significativa entre o p-cresol livre e qualquer marcador de estresse oxidativo e alterações do perfil bioquímico.

Tabela 1 - Frequência de sinais clínicos, hemograma, perfil bioquímico e urinálise (média e desvio-padrão) de cães do grupo controle e urêmico no estágio IV da insuficiência renal crônica.

Parâmetro	Controle (n=40)	Urêmico (n=20)
Sinais clínicos		
Caquexia	Ausente	70%
Halitose urêmica	Ausente	92%
Ulceração oral e na língua	Ausente	96%
Desidratação	Ausente	65%
Exames laboratoriais		
Hemograma		
Volume globular (%)	47,7 ± 3,3	24,56 ± 9,03
Hemácias (10¹²/L)	6,5 ± 0,5	3,45 ± 1,32
Hemoglobina (g/dL)	15,9 ± 1,0	8,06 ± 2,73
VCM (fL)	73,2 ± 2,9	71,36 ± 4,95
CHCM (%)	33,3 ± 0,2	33,08 ± 2,22
Leucócitos totais (10⁹/L)	9,9 ± 2,6	13,72 ± 7,82
Bioquímica		
Albumina (g/L)	31,8 ± 1,6	22,42 ± 6,37
ALT (UI/L)	44,29 ± 13,2	61,76 ± 55,42
AST (UI/L)	26,1 ± 8,1	46,76 ± 16,86
Colesterol (mg/dL)	178,3 ± 51,4	265,40 ± 71,96
Creatinina (mg/dL)	1,07 ± 0,16	8,08 ± 3,03
Glicose (mg/dL)	94,9 ± 10,7	101,71 ± 33,43
Proteína total (g/L)	65,8 ± 6,3	74,46 ± 14,70
Ureia (mg/dL)	32,6 ± 8,1	362,75 ± 105,58
Urinálise		
Densidade urinária	1,043 ± 0,003	1,016 ± 0,004
UPC	0,2 ± 0,07	3,7 ± 2,1

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

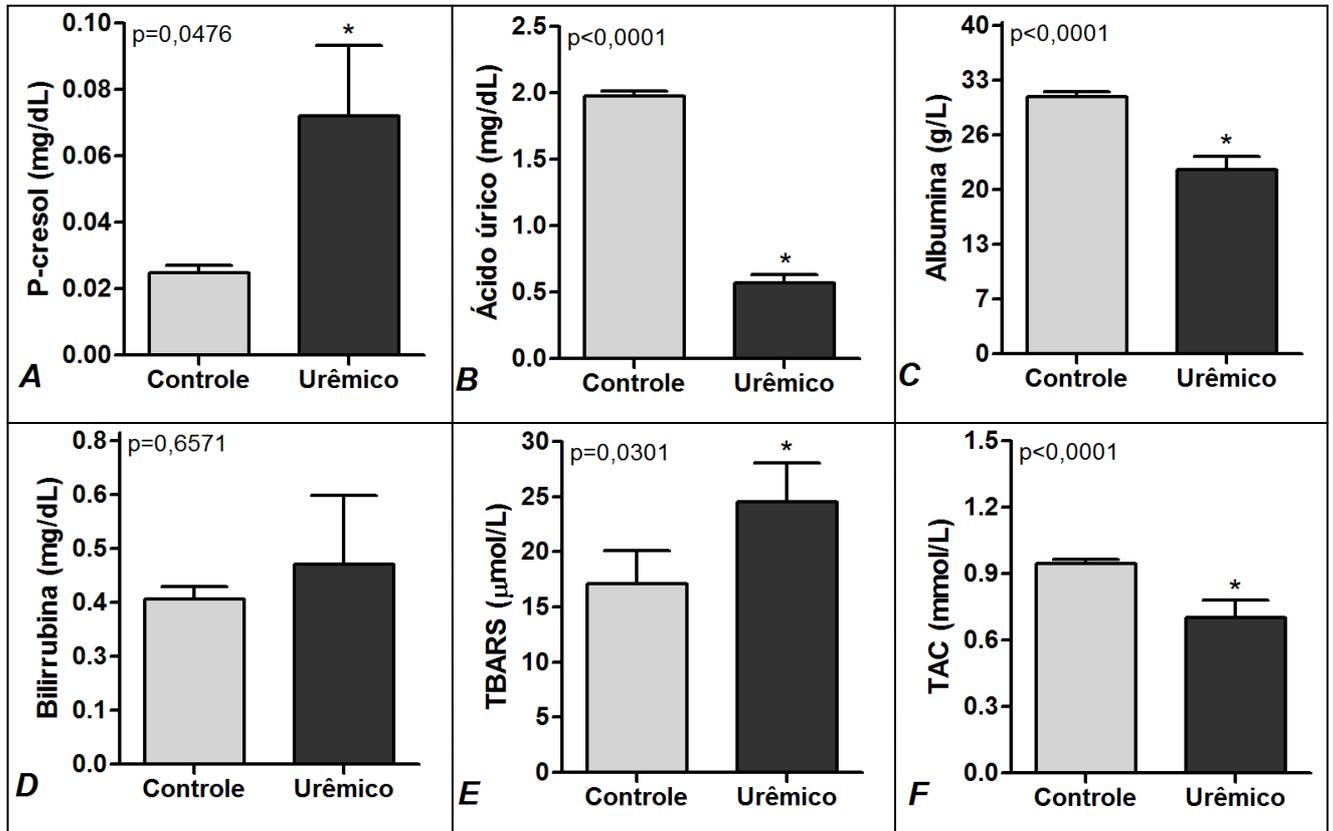


FIGURA 1 - Concentração plasmática de p-cresol livre (A) e marcadores de estresse oxidativo como ácido úrico (B), albumina (C), bilirrubina (D), peroxidação lipídica mensurada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBARS (E) e capacidade antioxidante-TAC (F) de cães controle e urêmicos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística.

3.2 Correlação entre o p-cresol plasmático, o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães urêmicos

A produção espontânea de superóxido de cães urêmicos foi apenas discretamente maior que a do grupo controle (Figura 2A). Sob estímulo do PMA, os neutrófilos de cães urêmicos produziram uma quantidade superóxido significativamente maior (Figura 2B).

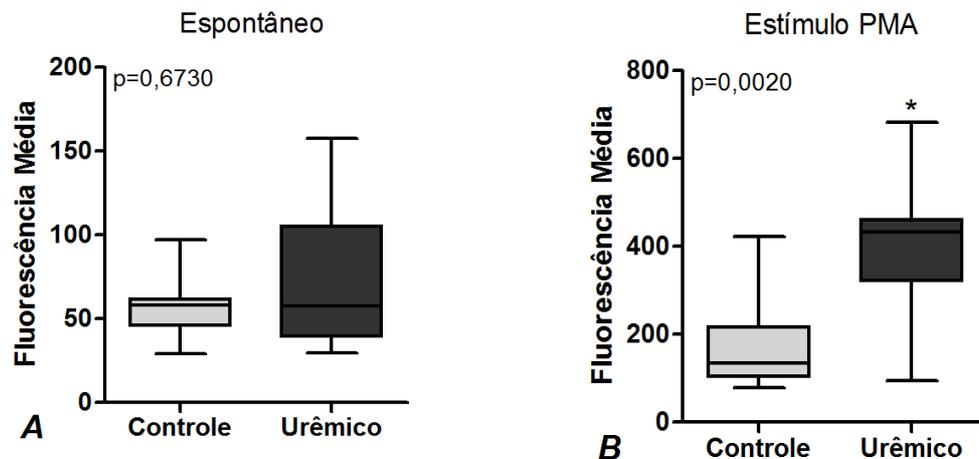


FIGURA 2 - *Boxplot* do metabolismo oxidativo neutrofílico avaliado pela fluorescência média do brometo de etídio em neutrófilos de cães controle e urêmicos, na ausência (espontânea, A) ou presença do estímulo com PMA (estimulado, B). Os valores para o primeiro quartil, mediana e terceiro quartil são indicados em cada caixa, e as barras fora da caixa indicam valores mínimos e máximos. Estatísticas: * $p=0,002$

Concomitante ao aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos (Figura 2B) e ao quadro de estresse oxidativo (Figura 1), ocorreu uma diminuição da viabilidade e aumento da apoptose dos neutrófilos de cães urêmicos sob indução com CAM (Tabela 2).

A concentração de p-cresol plasmática apresentou uma forte correlação ($r=0,71$, $p=0,005$) com a produção espontânea de superóxido em neutrófilos de cães urêmicos, porém sem correlação com a apoptose.

Tabela 2- Taxa de apoptose neutrofílica avaliada por citometria de fluxo capilar e sistema Anexina V-PE (média e desvio-padrão) de cães controle e urêmicos.

	Controle	Urêmico	p-valor
Viabilidade NE (%)	98,77 ± 0,29	98,42 ± 0,61	0,1500
Viabilidade CAM (%)	85,5 ± 2,96	78,05 ± 4,30*	0,0001
Apoptose total NE (%)	0,29 ± 0,12	0,36 ± 0,12	0,4307
Apoptose total CAM (%)	7,51 ± 2,43	16,39 ± 4,80*	0,0001

CAM- Camptotencina

NE-Não estimulado

* $p<0,05$ indica diferença estatística.

3.3 Efeito do p-cresol livre sobre o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis

A possível interferência do metanol no metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos foi investigada. Na mesma concentração utilizada para dissolver o p-cresol, o metanol promoveu um aumento na produção de superóxido espontânea dos neutrófilos (Figura 3A), já nas provas estimuladas o metanol diminuiu o metabolismo oxidativo em neutrófilos estimulados com o PMA (Figura 3A), porém um efeito inverso foi observado sob o estímulo do fMLP (Figura 3A). Já a produção de peróxido de hidrogênio quantificada com a sonda DCFH não se alterou em neutrófilos incubados com metanol (Figura 3B). Um aumento da taxa de apoptose total de neutrófilos induzida com CAM foi observada na presença do metanol (Tabela 3).

No presente estudo os neutrófilos foram incubados com a maior concentração de p-cresol livre encontrada em cães do grupo urêmico (0,405 mg/L) e o seu efeito sobre o metabolismo oxidativo variou de acordo com a sonda e o estímulo utilizado. A produção espontânea de superóxido em neutrófilos caninos (Figura 3A) incubados com plasma urêmico ($243,06 \pm 120,85$) e p-cresol ($125,03 \pm 21,92$) foi maior do que a do grupo controle ($98,32 \pm 22,65$) e metanol ($115,08 \pm 24,71$). Quando estimulados com o PMA, a produção de superóxido dos neutrófilos incubados com plasma urêmico ($349,55 \pm 124,76$) e com o p-cresol ($657,60 \pm 190,36$) foi significativamente menor que a do controle ($907,34 \pm 239,60$), não diferindo do efeito do metanol (Figura 3A). De modo contrário, sob o efeito de outro ativador, o fMLP, a produção de superóxido de neutrófilos incubados com plasma urêmico ($291,29 \pm 43,67$) e p-cresol ($128,08 \pm 23,51$) foi maior que a do controle ($102,29 \pm 21,53$), não diferindo do efeito do metanol (Figura 3A).

A produção de peróxido de hidrogênio (Figura 3B) quantificada com a sonda DCFH em neutrófilos incubados com o p-cresol ($41,35 \pm 21,97$) foi menor que a do grupo controle ($44,722 \pm 19,98$) na ausência de estímulo e na presença do PMA ($141,12 \pm 34,58$ vs $126,57 \pm 51,31$) e do fMLP ($50,181 \pm 20,34$ vs $44,83 \pm 20$). O plasma urêmico também promoveu uma diminuição da

produção de peróxido de hidrogênio em neutrófilos ativados com PMA, porém tal redução não ocorreu na ausência de estímulo ou diante da ativação com fMLP.

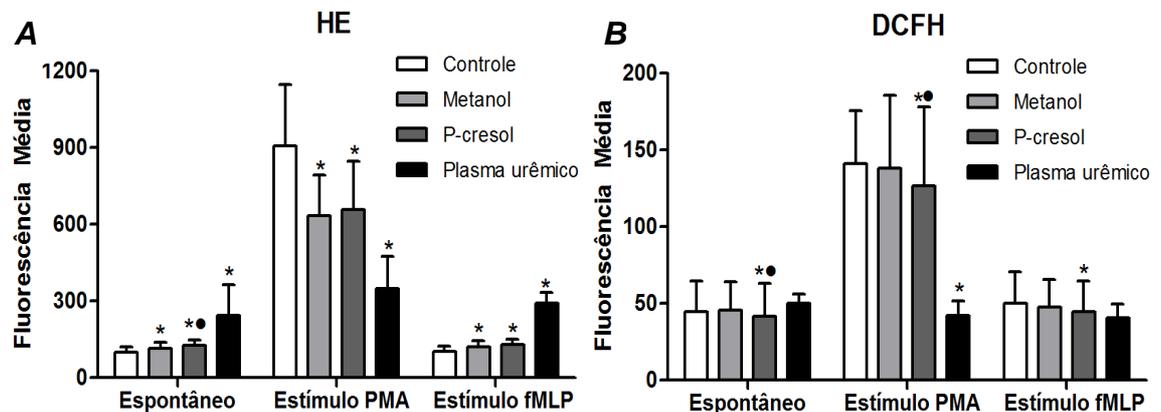


FIGURA 3 - Avaliação do metabolismo oxidativo neutrofilico de cães saudáveis incubados em meio RPMI puro, com metanol (0,8%), com p-cresol livre (0,405 mg/L) e com plasma urêmico na ausência ou presença do estímulo com PMA ou fMLP utilizando sonda hidroetidina-HE (A) e diacetato de diclorofluoresceína-DCFH (B). Estatísticas: * $p < 0,05$ vs controle; • $p < 0,05$ vs metanol.

A diminuição da viabilidade e aumento da apoptose neutrofilica observada em cães com uremia (Tabela 2) na presença do indutor CAM também ocorreu em neutrófilos incubados com p-cresol livre e com plasma urêmico (Tabela 3). Assim como verificado em relação ao metabolismo oxidativo, o efeito pró-apoptótico do plasma urêmico foi mais intenso quando comparado ao do p-cresol livre.

TABELA 3 - Viabilidade e apoptose total (valor médio \pm desvio-padrão) de neutrófilos cães saudáveis incubados em meio RPMI 1640 puro (Controle), com Metanol (0,8%) ou com p-cresol (0,405 mg/L), sem (NE) ou com o indutor camptotecina (CAM). Estatísticas: * $p < 0,05$ vs controle; † $p < 0,05$ vs metanol.

Parâmetro	Controle	Metanol	Plasma urêmico	P-cresol
Viabilidade NE (%)	98,36 \pm 0,34	98,34 \pm 0,29	99,40 \pm 0,25*	98,60 \pm 0,61
Viabilidade CAM (%)	45,89 \pm 4,83	44,00 \pm 3,69	31,58 \pm 2,68*	42,65 \pm 5,22*
Apoptose total NE (%)	0,27 \pm 0,27	0,25 \pm 0,35	0,10 \pm 0,06*	0,24 \pm 0,29
Apoptose total CAM (%)	53,94 \pm 4,60	56,69 \pm 4,48*	68,23 \pm 2,69*	57,32 \pm 5,04*

Estatísticas: * $p < 0,05$ vs controle.

4 Discussão

Os exames hematológicos e bioquímicos de cães saudáveis do grupo controle (Tabela 1) corresponderam aos valores de normalidade da espécie (KERR et al. 2002; THRALL, 2007) e certificam a saúde dos animais selecionados como doadores de neutrófilos para os ensaios *in vitro*. As alterações laboratoriais e clínicas observadas nos cães urêmicos foram similares aos descritos recentemente em cães nos estágios finais da IRC (ALMEIDA et al., 2013a; SILVA et al., 2013) e equivalem ao estágio IV da doença renal segundo o critério da *International Renal Interest Society* (INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY, 2006).

4.1 O estresse oxidativo em cães urêmicos não está associado com aumento do p-cresol livre plasmático em cães urêmicos

O aumento do p-cresol livre plasmático em cães com IRC foi similar ao descrito em humanos (De SMET et al., 2003), sendo esta, provavelmente, a primeira evidência de que a elevação dessa toxina durante o quadro urêmico coincide com o aumento do estresse oxidativo e a disfunção dos neutrófilos em cães. Em cães urêmicos, o aumento da peroxidação lipídica estimada pela concentração plasmática de TBARS associada a uma diminuição plasmática de antioxidantes (ácido úrico, albumina e TAC) confirmam que durante a uremia ocorre o estresse oxidativo já descrito em humanos (BIANCHI et al., 2009), felinos (KEEGAN; WEBB, 2010) e cães (ALMEIDA et al., 2013a; SILVA et al., 2013). Entretanto, não foi possível estabelecer uma boa correlação entre os indicadores de estresse oxidativo analisados no presente estudo e o p-cresol livre plasmático, sugerindo que esta toxina é apenas uma dentre várias que afetam a relação oxidante e antioxidante em cães com IRC.

4.2 Em cães urêmicos o aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos está associado à maior concentração plasmática de p-cresol livre

Como a maior parte do p-cresol (90%) está ligado a albumina (VANHOLDER et al., 1995), o p-cresol livre é considerado a forma biológica mais relevante, especialmente na IRC devido à hipoalbuminemia que ocorre e pela sua comprovada ação citotóxica sobre as células renais (BROCCA et al., 2013). O aumento do p-cresol livre tem sido associado a elevadas taxas de infecções e alta mortalidade em pacientes humanos com insuficiência renal (BAMMENS et al., 2006; De SMET et al., 2003).

No presente estudo, a produção espontânea de superóxido de cães urêmicos foi apenas discretamente superior ao do grupo controle, porém muito maior após estímulo com PMA, caracterizando o estado *primed* dos neutrófilos de cães urêmicos recentemente descrito (ALMEIDA et al., 2013a). É postulado que os neutrófilos neste estado de ativação, a longo prazo, podem causar um estresse oxidativo capaz de acelerar a apoptose (MAZOR et al., 2008). O aumento na produção de superóxido e de seus derivados nos neutrófilos pode causar consumo excessivo de antioxidantes, peroxidação lipídica e aumento da apoptose devido ao estresse oxidativo (COHEN et al., 2012; SELA et al., 2012). Colaborando com esta hipótese, a presença de neutrófilos *primed* em cães urêmicos ocorreu concomitante ao aumento do estresse oxidativo e da apoptose.

4.3 O p-cresol livre afeta o metabolismo oxidativo e a apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis

Já havia sido evidenciado que as toxinas presentes no soro de cães urêmicos *in vitro* aceleram a apoptose e diminuem a produção de superóxido dos neutrófilos (BARBOSA et al., 2010). Comprovar *in vitro* quais dentre as muitas toxinas urêmicas plasmáticas contribuem para a disfunção neutrofílica é fundamental para entender os mecanismos responsáveis pela imunossupressão que acomete pacientes com IRC (COHEN et al., 2012). Os

poucos trabalhos sobre o tema são concordantes quanto ao fato de que *in vitro* o p-cresol total (CARVALHO et al., 2011; SCHEPERS et al., 2007) e livre (De SMET et al., 2003) inibem o metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos.

No presente estudo o efeito do p-cresol livre no metabolismo oxidativo variou de acordo com a sonda e o estímulo utilizado. Embora a produção espontânea de superóxido tenha aumentado em neutrófilos caninos incubados com plasma urêmico e p-cresol, após o estímulo com o PMA a produção diminuiu. Esta inibição do metabolismo oxidativo diante do estímulo com PMA também foi observado com neutrófilos humanos (CARVALHO et al., 2011; SCHERPES et al., 2007; VANHOLDER et al., 1995). Diferentemente, sob a ativação do fMLP os neutrófilos caninos produziram mais superóxido quando incubados com plasma urêmico e p-cresol. Esta diferença deve ser considerada com reserva, pois a produção espontânea de superóxido foi similar à gerada após a ativação com fMLP, comprovando que o PMA comparativamente foi um ativador mais potente. Este aumento na produção de superóxido induzida com fMLP, além de discreta, não condiz com a diminuição da produção de seu derivado peróxido de hidrogênio observado nos demais ensaios. A produção de peróxido de hidrogênio quantificada com a sonda DCFH em neutrófilos incubados com o p-cresol livre diminuiu tanto sob a ativação com PMA quanto com fMLP. O plasma urêmico também promoveu uma diminuição da produção de peróxido de hidrogênio em neutrófilos ativados com PMA, porém tal redução não ocorreu na ausência de estímulo ou diante da ativação com fMLP. Carvalho et al. (2011) também observaram que o p-cresol total inibe a produção do peróxido de hidrogênio em neutrófilos humanos ativados com PMA, porém não obteve o mesmo efeito quando utilizou um ativador similar ao fMLP. Outros estudos *in vitro* também têm relatado respostas contraditórias dos neutrófilos humanos diante de diferentes sondas e estímulos. É sabido que a sonda HE é mais específica para verificar a produção superóxido e o DCFH para quantificar o peróxido de hidrogênio (MYHERE et al., 2003) oriundo da transformação do superóxido por meio da ação da enzima superóxido dismutase (BABIOR, 2000). Segundo Hirayama et

al. (2000), o estímulo do PMA se diferencia do fLMP por promover o aumento da produção de superóxido, via ativação da proteína quinase C, que independe do aporte de adenosina trifosfato (BURKEY et al., 1993).

Parte dos resultados obtidos no presente estudo colaboram com a hipótese de Schepers et al. (2007) de que a diminuição do metabolismo oxidativo em neutrófilos é na realidade um efeito inibidor do metanol utilizado para diluir o p-cresol nos ensaios *in vitro*. De fato, no presente estudo foi possível comprovar que o metanol interfere na produção de superóxido de neutrófilos de cães. Entretanto este solvente não interferiu na produção do peróxido de hidrogênio quantificada com a sonda DCFH, assim como já havia sido relatado por Carvalho et al. (2011).

Independentemente do tipo de sonda e estímulo utilizado, de modo geral no presente estudo o p-cresol livre promoveu o mesmo efeito do plasma urêmico na apoptose e no metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães, porém a intensidade foi menor em todos os ensaios realizados. Este fato permite especular que outros compostos presentes no plasma urêmico amplificam o efeito isolado gerado pelo p-cresol livre sobre o metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos.

Há necessidade de se considerar as limitações dos ensaios *in vitro* realizados no presente estudo. Por exemplo, o estado *primed* dos neutrófilos isolados de cães urêmicos não se reproduziu nos ensaios *in vitro*. O estado *primed* de neutrófilos incubados com o p-cresol livre, embora tenha sido observado em cães urêmicos no presente estudo e por Almeida et al. (2013a), diverge da inibição do metabolismo oxidativo relatado por Silva et al. (2013). Tais conflitos de resultados sobre o efeito das toxinas urêmicas sobre a função dos neutrófilos em parte podem ser explicados pelas diferentes metodologias empregadas para avaliar o metabolismo oxidativo, como comprovado no presente estudo.

Outra explicação seria que tanto ativação quanto a inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos ocorrem na dependência da variação de diversos fatores que compõem *in vivo* e *in vitro* o complexo mecanismo

responsável pela imunossupressão de pacientes urêmicos. Segundo Cenderoglo et al. (1999), em humanos a uremia promove um quadro inicial de ativação dos neutrófilos que contribui para o aumento do estresse oxidativo e apoptose neutrofílica, sendo que numa segunda etapa ocorre uma inibição do metabolismo oxidativo das células apoptóticas. Colaborando com esta hipótese, no presente foi observado que o aumento do estresse oxidativo em cães urêmicos ocorreu concomitante ao aumento do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos. Também foi observada uma forte correlação entre a concentração plasmática de p-cresol livre e a produção espontânea de superóxido em neutrófilos de cães urêmicos.

Estudos realizados nos últimos anos em relação às toxinas urêmicas têm contribuído para o desenvolvimento de diferentes estratégias de tratamento e assim evitar as complicações na presença da uremia (VANHOLDER et al., 2008). Terapias que inibem a síntese intestinal do p-cresol podem ter resultados promissores em humanos (GOTO et al., 2011). É provável que os resultados do presente sejam a primeira evidência de que em cães urêmicos ocorre o aumento plasmático do p-cresol livre e que esta toxina é capaz de inibir o metabolismo oxidativo e a acelerar a apoptose dos neutrófilos, podendo dessa maneira contribuir para um quadro imunossupressor. Entretanto os mecanismos pelos quais o p-cresol livre afeta a função dos neutrófilos necessitam ser melhor elucidados a fim de orientar novas estratégias de tratamentos em cães urêmicos.

5 Conclusão

O aumento da concentração plasmática de p-cresol livre, o estado *primed* dos neutrófilos circulantes e o aumento do estresse oxidativo ocorrem de modo concomitante durante a uremia e potencialmente podem contribuir para o quadro de imunossupressão em cães com IRC. Os neutrófilos *primed* observados em cães urêmicos não são formados quando células quiescentes de cães saudáveis são incubados com o p-cresol livre, entretanto a capacidade dessa toxina em inibir o metabolismo oxidativo e acelerar a apoptose pode

contribuir para imunossupressão que ocorre na IRC canina. O efeito *in vitro* do p-cresol livre sobre o metabolismo oxidativo e a viabilidade dos neutrófilos de cães saudáveis foi semelhante ao do plasma urêmico, porém menos intenso.

6 Agradecimentos

FAPESP (Proc. 2011/16018-0) pela bolsa auxílio de mestrado e pelo financiamento do projeto (Proc. 2011/18746-3) e Laine Margareth Gabas pelo auxílio na pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; BOSCO, A.M.; PREVE, P.P.; BRAGA, E.T.; MARCONDES, M.; CIARLINI, P.C. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.1-2, p.6-12, 2013b.

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v.198, n.3, p.599-605, 2013a.

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

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, n.1, p.33-44, 2000.

BAMMENS, B.; EVENEPOEL, P.; KEULEERS, H.; VERBEKE, K.; VANRENTERGHEM, Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. **Kidney International**, v.69, n.6, p.1081-1087, 2006.

BARBOSA, T.S.; MORI, C.K.; CIARLINI, P.C. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1352-358, 2010.

BIANCHI, P. D.; BARP, J.; THOMÉ, F. S.; BELLÓ-KLEIN, A. Efeito de uma sessão de hemodiálise sobre o estresse oxidativo sistêmico de pacientes renais crônicos terminais. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.31, n.3, p.175-182, 2009

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C.C.; GAUSSON, V.; NGUYEN, A.T.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; DRUEKE, T.; WITKO-SARSAT, V. Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, n.6, p.1555-1563, 2006.

BROCCA, A.; MVIRZÌ, G.; De CAL, M.; CANTALUPPI, V.; RONCO, C. Cytotoxic Effects of p-Cresol in Renal Epithelial Tubular Cells. **Blood Purification**, v.36, p.219-225, 2013.

BURKEY, T.H.; WEBSTER, R.O. Adenosine inhibits fMLP-stimulated adherence and superoxide anion generation by human neutrophils at an early step in signal transduction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1175, n.3, p.312-318, 1993.

CARVALHO, J.T.G.; DALBONI, M.A.; WATANABE, R.; PERES, A.T.; GOES, M.A.; MANFREDI, S.R.; CANZIANI, M.E.; CENDOROGLO, G.S.; GUIMARÃES-SOUZA, N.; BATISTA, M.C.; CENDOROGLO, M. Effects of spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Artificial Organs**, v.35, n.2, p.27-32, 2011.

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, n.1, p.93-100, 1999.

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

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

COHEN, G.; GLORIEUX, G.; THORNALLEY, P.; SCHEPERS, E.; MEERT, N.; JANKOWSKI, J.; JANKOWSKI, V.; ARGILES, A.; ANDERSTAM, B.; BRUNET, P.; CERINI, C.; DOU, L.; DEPPISCH, R.; MARESCAU, B.; MASSY, Z.; PERNA, A.; RAUPACHOVA, J.; RODRIGUEZ, M.; STEGMAYR, B.; VANHOLDER, R.; HÖRL, W.H.; European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro - towards a standardized approach for research on uraemia. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, p.3381-3390, 2007.

De SMET, R.; VAN KAER, J.; VAN VLEM, B.; CUBBER, A.; BRUNET, P.; LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. **Clinical Chemistry**, v.49, n.3, p.470-478, 2003.

De SMET, R.; DAVID, F.; SANDRA, P.; VAN VLEM, B.; LESAFFER, G.; DHONDT, A.; LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-cresol in patients with chronic renal failure. **Clinical Chimica Acta**, v.278, n.1, p.1-21, 1998.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v.37, n.4, p.277-285, 2004.

GALLI, F.; CANESTRARI F.; BUONCRISTIANI, U. Biological effects of oxidant stress in haemodialysis: the possible roles of vitamin E. **Blood Purification**, v.17, n.2, p.79-94, 1999.

GOTO, S.; YOSHIYA, K.; KITA, T.; FUJII, H.; FUKAGAWA, M. Uremic toxins and oral adsorbents. **Therapeutic apheresis and dialysis**. v.15, p.132–134, 2011.

HIRAYAMA, A.; NORONHA-DUTRA, A.A.; GORDGE, M.P.; NEILD, G.H.; HOTHERSALL, J.S. Uremic concentrations of guanidino compounds inhibit neutrophil superoxide production. **Kidney International Supplement**, v.78, p.89-92, 2001.

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

KAO, M.P.C.; ANG, D. S.; PALL, A.; STRUTHER, A. D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of Human Hypertension**, v.24, n. 1 p.1-8, 2010.

KEEGAN, R.F.; WEBB, C.B. Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.3, p.514-519, 2010

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

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.

MAZOR, R.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; FARAH, R.; KRISTAL, B.; SHAPIRO, G.; DORLECHTER, F.; COHEN-MAZOR, M.; MEILIN, E.; TAMARA, S.; SELA, S. Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between

inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients. **Atherosclerosis**, v.197, n.2, p.937-943, 2008.

MYHRE, O.; ANDERSEN, J. M.; AARNES, H.; FONNUM, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology**, v.65, n.10, p.1575-1582, 2003.

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

SARDENBERG, C.; SUASSUNA, P.; ANDREOLI, M.C.C.; WATANABE, R.; DALBONI, M. A.; MANFREDI, S.R.; DOS SANTOS, O. P.; KALLAS, E.G.; DRAIBE, S. A.; CENDOROGLIO, M. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, n.1, p.160-165, 2006.

SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; GOEMAN, J.; VAN DER EYCKEN, J.; VANHOLDER, R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.22, n.2, p.592-596, 2007.

SELA, S.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; AWAD, J.; SHAPIRO, G.; NASSER, L.; SHASHA, S.M.; KRISTAL, B. The involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in cigarette smokers. **Israel Medical Association Journal**, v.4, n.11, p.1015-1019, 2002.

SILVA, A. C. R. A.; ALMEIDA, B. F. M.; SOEIRO, C. S.; FERREIRA, W. L.; DE LIMA, V. M. F.; CIARLINI, P.C. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.77, n.2, p.136-141, 2013.

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

VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; WATERLOOS, M. A.; VAN LANDSCHOOT, N.; VOGELEERE, P.; HOSTE, E.; RINGOIR, S. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. **Kidney International**, v.47, n.2, p.510-517, 1995.

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

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