

## EFEITO DO PLASMA RICO EM URÉIA NA APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS DE CÃES<sup>1</sup>

Cristiana de Melo Trinconi<sup>2\*</sup>  
Silvia Cellone Trevelin<sup>3</sup>  
Tatiana de Sousa Barbosa<sup>4</sup>  
Paulo César Ciarlini<sup>5</sup>

### RESUMO

A aceleração da apoptose dos neutrófilos em pacientes humanos nefropatas e sua relação com as toxinas urêmicas têm sido, nos últimos anos, amplamente investigada devido sua importância como elemento imunossupressor. A insuficiência renal crônica (IRC) é a nefropatia mais comum observada em cães, no entanto, não há relatos na literatura quanto ao efeito da uremia na apoptose para esta espécie. Considerando que a uréia é a toxina mais rotineiramente quantificada na abordagem clínica da IRC, propõe-se testar a hipótese de que a uréia é capaz de alterar a morfologia dos neutrófilos de cães e acelerar seu processo de morte celular programada e que este efeito é dependente do tempo de exposição. Para tal, plasma sanguíneo de dez cães saudáveis foi substituído por plasma homólogo enriquecido com duas diferentes concentrações de uréia (114,6 e 62,9 mmol/L) e incubado a 37° C por quatro horas. A concentração de uréia foi determinada pelo método enzimático UV e o índice apoptótico por morfometria. A taxa de neutrófilos apoptóticos aumentou após duas e quatro horas de incubação ( $p < 0,05$ ), independente da adição de uréia. O índice apoptótico de neutrófilos incubados com plasma rico em uréia foi maior do que aquelas com plasma não enriquecido, entretanto tal diferença não foi significativa. Conclui-se que o aumento da concentração de uréia plasmática “ex vivo” isoladamente não promove a aceleração da apoptose de neutrófilos de cães. É possível que o efeito imunossupressor da uréia “in vivo”, à semelhança do que ocorre em humanos, também está associado a outros mecanismos e em sinergismo com outras toxinas urêmicas.

**Palavras-chave:** morte celular programada, toxina urêmica, uremia, polimorfonuclear, disfunção leucocitária.

### EFFECT OF RICH UREA PLASMA IN APOPTOSIS OF NEUTROPHILS IN DOGS

#### ABSTRACT

The acceleration of neutrophil apoptosis in human patients with kidney disease and its relationship with the uremic toxins have been, in recent years, widely investigated due to its

<sup>1</sup> Agência financiadora: FAPESP

<sup>2</sup> Mestranda em Ciências no Programa de Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 1.374, CEP: 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: cristinconi@usp.br.

<sup>3</sup> Médica Veterinária graduada na Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana n° 793, CEP: 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil. E-mail: ediosmar@ig.com.br.

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana n° 793, CEP: 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil. E-mail: tatiana.barbosa@bol.com.br

<sup>5</sup> Professor Assistente Doutor, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Laboratório de Análises Clínicas Animal, Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana n° 793, CEP: 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil. E-mail: [ciarlini@fmva.unesp.br](mailto:ciarlini@fmva.unesp.br).

\* Endereço: Cristiana de Melo Trinconi, Rua Prof° Paul Hugon, 77, Bairro Vila Aurora, Cep: 02410-120, São Paulo – SP, Brasil. Telefones: (011) 2952-2069 (res), (011) 3091-7334 (fax). E-mail: cristinconi@usp.br.

importance as an immunosuppressant. Chronic renal failure (CRF) is the most common nephropathy observed in dogs, however, there are no reports in the literature about the effect of uremia in the apoptosis for this species. Considering that urea is the most routinely uremic toxin measured in the CRF clinic addressing, it is proposed to test the hypothesis that urea is able to change the morphology of dog's neutrophils and to accelerate their programmed cell death and that this effect is dependent on the time of exposure. Blood plasma of ten healthy dogs was replaced by homologue plasma enriched with two different concentrations of urea (114.6 and 62.9 mmol/L) and incubated at 37°C for four hours. The concentration of urea was determined by UV enzymatic method and the apoptotic index evaluated by morphometry. The rate of apoptotic neutrophils increased after two and four hours of incubation ( $p < 0.05$ ), regardless of the addition of urea. The apoptotic index of neutrophils incubated with plasma rich in urea was higher than those containing non-enriched plasma, but this difference was not significant. In conclusion, the increase of plasmatic urea concentration "ex vivo" alone does not promote the acceleration of dog's neutrophils apoptosis. It is possible that the "in vivo" immunosupresor effect of urea, is similar to that observed in humans, where it is also associated with other mechanisms and in synergism with others toxins.

**Key-Words:** programmed cell death, uremic toxin, polymorphonuclear, leukocyte dysfunction.

## EFEECTO DEL PLASMA RICO EN UREA EN LA APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS DE PERROS

### RESUMEM

La aceleración de la apoptosis de los neutrófilos en pacientes humanos nefróticas y su relación con las toxinas urémicas han sido en los últimos años ampliamente investigadas debido su importancia como elemento inmunosupresor. La insuficiencia renal crónica (IRC) es la nefropatía más común observada en perros, mientras tanto, no hay relatos de literatura en cuanto al efecto de la uremia en la apoptosis para esta especie. Considerando que la urea es la toxina más rutinariamente cuantificada abordando en el diagnóstico de IRC, se propone probar la hipótesis de que la urea es capaz de alterar la morfología de los neutrófilos de perros y acelerar su proceso de muerte celular programada y que este efecto es dependiente del tiempo de exposición. Para esto, el plasma sanguíneo de diez perros sanos fue substituido por plasma homólogo enriquecido con dos diferentes concentraciones de urea (114,6 e 62,9 mmol/L) e incubado a 37°C, por cuatro horas. La concentración de urea fue determinada por el método enzimático UV y el índice apoptótico fue determinado por morfometría. La tasa de neutrófilos apoptóticos aumentó después de dos a cuatro horas de incubación ( $p < 0,05$ ), independientemente de la adición de urea. El índice apoptótico de neutrófilos incubados con plasma rico en urea fue mayor de aquellas con plasma no enriquecido, por tanto tal diferencia no fue significativa. Se concluye que el aumento de la concentración de urea plasmática "in vivo" aisladamente no promueve la aceleración de la apoptosis de neutrofilos de perros. Es posible que el efecto inmunosupresor "in vivo" de la urea es semejante a lo que ocurre en humanos, donde está asociado a otros mecanismos y en sinergismo con otras toxinas urémicas.

**Palabras-clave:** muerte celular programada, toxina urémica, uremia, polimorfonuclear, disfunción leucocitaria.

## INTRODUÇÃO

Os neutrófilos podem ser considerados a primeira linha de defesa do organismo, movendo-se rapidamente em direção ao patógeno para destruí-lo (1). Contudo, estas células são programadas a sofrer a apoptose, o que limita seu potencial em exterminar os microorganismos patogênicos (2). A apoptose, ou morte celular programada, pode ser iniciada por estímulos fisiológicos ou patológicos, como exposição às toxinas, danos no DNA ou sinais extracelulares (3,4). A regulação anormal da apoptose pode iniciar uma desordem, como um câncer, depleção de linfócitos (como na AIDS) e doenças degenerativas (5), tendo uma significativa implicação na imunodeficiência observada em pacientes urêmicos (4).

A apoptose é caracterizada pela contração e rompimento da arquitetura do citoesqueleto da célula, formação de vesículas na membrana plasmática, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica (5,6). Inicialmente as funções mitocondriais e ribossomais são mantidas enquanto o núcleo se condensa. Por último, os fragmentos celulares transformam-se em aglomerados de membrana (corpos apoptóticos), os quais são removidos por células fagocitárias, principalmente os macrófagos (3,7-10). Caso não ocorra a fagocitose pelos macrófagos, os corpos apoptóticos eventualmente iniciam uma necrose secundária (10).

A aceleração da morte dos neutrófilos é o principal fator da imunodeficiência de pacientes urêmicos, uma vez que ocorre redução das funções neutrofílicas (fagocitose, metabolismo oxidativo e quimiotaxia) durante o processo apoptótico (11,4,12). Estudos feitos em humanos relatam o aumento da apoptose de polimorfonucleares (PMN) de pacientes urêmicos e de PMN de indivíduos saudáveis incubados em soro urêmico (13-15). Entretanto, Cohen e colaboradores (16) não encontraram diferenças na apoptose dos PMNs de pacientes urêmicos e do grupo controle.

A uréia, o p-cresol, a  $\beta$ 2-microglobulina modificada, as guanidinas e a leptina representam alguns dos mais de 100 solutos identificados em pacientes com nefropatias graves e que potencialmente alteram a função neutrofílica. Aqueles que exercem função bioquímica/biológica são definidos como “toxinas urêmicas” (17). A mistura de várias toxinas no soro urêmico parece resultar no aumento da morte celular programada dos PMN, e o processo de diálise pode reduzir esta aceleração da apoptose (15). Cendoroglo et al. (18) observaram um aumento do índice apoptótico de neutrófilos em pacientes com uremia e demonstraram que o plasma urêmico, quando incubado com neutrófilos de pacientes saudáveis, também acelera a apoptose. Tais resultados sugerem a existência de algum(s) determinado(s) fator(es) solúvel(s) no plasma urêmico que induz (em) a apoptose, resultando em uma disfunção similar àquela observada em neutrófilos de pacientes com insuficiência renal.

A elevação da uréia em cães pode ocorrer em situações pré-renais, renais e pós-renais (19). Contudo, a razão mais comum para a mensuração das concentrações plasmáticas da uréia é o diagnóstico de insuficiência renal. Valores de uréia plasmática inferiores a 20 mmol/L em pacientes com IRC indicam bom prognóstico, pois as chances de resposta a uma terapia alimentar são grandes, entretanto, valores superiores a 60 mmol/L indicam mau prognóstico (19). Embora a IRC seja a nefropatia mais comum em cães (19), não há relatos na literatura quanto ao efeito da azotemia sobre a apoptose nesta espécie. Enquanto a concentração da uréia é bem aceita como marcador para a severidade da falência renal, o papel isolado da mesma na patogênese da síndrome urêmica é controverso (20,21). A fim de preencher esta lacuna de conhecimento, foi testada a hipótese de que o plasma enriquecido com uréia acelera a apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis *ex vivo*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção dos animais

Foram selecionados 20 cães adultos e sadios das raças Pastor Alemão, Rotweiller e Labrador, com idade entre três e cinco anos, provindos do canil da Polícia Militar do Município de Araçatuba – SP, todos sem alterações no exame clínico geral (22), com hemograma e concentração sérica de uréia normal, sem recente vacinação ou tratamentos com medicamentos antimicrobianos, antiinflamatórios e imunossupressores.

### Preparação do plasma homólogo enriquecido e não enriquecido

Utilizando-se seringas e agulhas descartáveis realizou-se flebocentese da jugular de 10 cães. O sangue colhido foi acondicionado sob refrigeração em tubos de vidro siliconizados (10 mL) contendo 10 U heparina sódica<sup>1</sup>/ml e posteriormente submetido à centrifugação a 700 g durante 15 minutos para a obtenção do plasma. O plasma foi utilizado para formar um “pool” de plasma homólogo normal (PHN) com concentração 5,62mmol/l de uréia e enriquecido com uréia ultra-pura<sup>2</sup> em duas diferentes concentrações PHU1 (62,93mmol/l) e PHU2 (114,6 mmol/L). O PHN, PHU 1 e PHU 2 foram armazenados em tubos de polipropileno a -20° C até o momento do uso.

O sangue total dos outros 10 cães foi submetido a quatro diferentes tratamentos: incubação com plasma autólogo (PA), homólogo normal (PHN), homólogo enriquecido com baixa (PHU1) e alta concentração de uréia (PHU2), conforme protocolo descrito quadro 1.

Quadro 1. Protocolo experimental

PROTOCOLO	PA	PHN	PHU1	PHU2
1. Acréscimo do sangue total heparinizado	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
2. Centrifugação 700g durante 15 minutos.				
3. Retirada do plasma	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
4. Acréscimo de plasma autólogo obtido na etapa 3	0,5 ml	–	–	–
5. Acréscimo de plasma homólogo (5,62 mmol/l)	–	0,5 ml	–	–
6. Acréscimo de plasma homólogo rico em uréia (62,93 mmol/l)	–	–	0,5 ml	–
7. Acréscimo de plasma homólogo rico em uréia (114,6 mmol/l)	–	–	–	0,5 ml
8. Homogeneização				
9. Retirada 0,5ml do sangue de cada tubo para determinação da concentração de uréia e índice apoptótico				
10. Incubação em banho-maria 37°C por 2 horas				
11. Homogeneização e retirada de 25 µl para determinação do índice apoptótico				
12. Incubação em banho-maria 37°C por mais 2 horas				
13. Homogeneização e retirada de 25 µl para determinação do índice apoptótico				

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

<sup>2</sup> Uréia ultra purê, GibCobril, Lifetecnologies, USA

## Determinação da uréia plasmática

Utilizando-se um analisador bioquímico semi-automatizado<sup>1</sup>, ajustado com controle e conjunto de reativo comercial<sup>2</sup>, a concentração sérica de uréia foi determinada pelo método enzimático UV (urease/ glutamato desidrogenase). Todas as reações bioquímicas foram processadas em duplicada a 37°C conforme orientação dos fabricantes.

## Índice apoptótico

Em cada momento foram realizados dois esfregaços por amostra corados com panótico rápido<sup>3</sup>. Para a determinação do índice apoptótico, um número mínimo de 100 neutrófilos foram analisados morfológicamente por microscopia óptica em aumento de 1.000X, conforme protocolo descrito por Campos et al. (23) e Batista et al. (24). Para a quantificação das células apoptóticas, foram contadas somente as que apresentaram pelo menos três das seguintes características morfológicas peculiares do processo: condensação do citoplasma (intensa coloração citoplasmática), condensação nuclear (compactação da cromatina nuclear em massas densas e uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear), fragmentação nuclear (convolução e fragmentação da membrana nuclear sem cariorrexe ou ruptura), fragmentação celular (formação de corpos apoptóticos). Os corpos apoptóticos em grande número e próximos uns dos outros foram quantificados como o resultado de uma única célula em apoptose. Quando distantes entre si, foram considerados como resultados de apoptose em células diferentes e contabilizados como tal.

A fim de excluir corpos apoptóticos de linfócitos na avaliação em questão, levou-se em consideração as informações descritas por Nagami e colaboradores (25), em que corpos apoptóticos de linfócitos apresentam citoplasma basofílico (coloração azulada), menor tamanho e fragmentos nucleares mais irregulares, enquanto os de neutrófilos possuem citoplasma eosinofílico e são de tamanho maior.

## Análise estatística dos dados

Com auxílio de um programa estatístico computadorizado<sup>4</sup> e conforme preconizado por Zar (26), após os estudos das distribuições das variáveis quanto à normalidade (teste KS) e homocedasticidade (teste Bartlett), para as comparações entre momentos em cada ensaio experimental foram utilizadas as provas de Friedmann e ANOVA, das variáveis não paramétricas e paramétricas, respectivamente, ao nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de uréia plasmática dos animais após acréscimo de plasma autólogo e plasma homólogo sem enriquecimento ficaram dentro da faixa de normalidade (19) para a espécie, enquanto as amostras acrescidas de plasma homólogo rico em uréia na menor (PHU1) e na maior (PHU2) concentração corresponderam a de um cão portador de insuficiência renal crônica e aguda (Tabela 1), respectivamente.

O fato de não ter ocorrido alteração significativa ( $P>0,05$ ) na apoptose dos neutrófilos imediatamente após o acréscimo do plasma autólogo, homólogo enriquecido ou não com uréia (Tabela 1), confirmam que as manipulações realizadas com as amostras durante os

<sup>1</sup> Espectrofotômetro E-205, CELL-M, Brasil.

<sup>2</sup> Ureia enzimática, Katal, Katal Biotecnológica Indústria e comércio LTDA, Belo Horizonte- MG, Brasil .

<sup>3</sup> NewProv, Maringá-PR

<sup>4</sup> SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

diferentes ensaios do protocolo não afetaram a morte celular programada dos neutrófilos. Este resultado também revela que no momento inicial a taxa de apoptose dos neutrófilos dos diferentes ensaios era baixa e semelhante, certificando que todas as amostras selecionadas para estudo não estavam sob efeito prévio de qualquer fator indutor de apoptose “*in vivo*”.

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão da concentração plasmática final de uréia pré-incubação, do índice apoptótico de neutrófilos (%) de cães sadios incubados (37° C) com plasma autólogo (PA); homólogo normal (PHN) e enriquecido com duas diferentes concentrações de úrea (PHU1 e PHU2), antes e após duas e quatro horas de incubação.

Amostra	Concentração final de uréia (mmol/L)	Índice apoptótico		
		Pré-incubação	2 horas de incubação	4 horas de incubação
PA	6,41±1,28	1,4 ± 0,84 <sup>Aa</sup>	3 ± 1,05 <sup>Aa</sup>	8,2 ± 4,89 <sup>Ba</sup>
PHN	6,11 ± 1,12	2,3 ± 1,25 <sup>Aa</sup>	3,5 ± 2,79 <sup>Aa</sup>	9,07 ± 5,58 <sup>Ba</sup>
PHU <sub>1</sub>	26,55 ± 2,79	2,1 ± 1,85 <sup>Aa</sup>	5,7 ± 3,77 <sup>Aa</sup>	16,7 ± 9,78 <sup>Ba</sup>
PHU <sub>2</sub>	52,23 ± 6,23	2,3 ± 1,64 <sup>Aa</sup>	4,2 ± 3,23 <sup>Aa</sup>	13,3 ± 8,45 <sup>Ba</sup>

\* Letras maiúsculas não coincidentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ); letras minúsculas não coincidentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ).

A semelhança entre a taxa de apoptose dos neutrófilos incubados com soro autólogo e com soro homólogo não enriquecido com uréia (Tabela 1) indica que as diferenças na composição sérica dos indivíduos sadios utilizados no ensaio não promoveram uma variação importante na morte programada desses poliformonucleares.

Após duas horas de incubação a taxa de apoptose elevou-se discretamente em todos os ensaios, porém não foram verificadas diferenças significativas entre os ensaios com soro autólogo, homólogo com ou sem enriquecimento de uréia (Tabela 1), provavelmente pelo curto período de tempo de incubação. Nas condições experimentais adotadas, em ensaio piloto, foi verificado o surgimento de hemólise a partir de quatro horas de incubação do sangue total de cães. Os eritrócitos de cães sabidamente são mais frágeis que outras espécies (27), o que dificulta o desenvolvimento de ensaios prolongados sem o isolamento celular nesta espécie. A hemólise promove a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, gerando espécies reativas de oxigênio que aceleram a apoptose (28). Embora seja fato que os protocolos com sangue total podem sofrer interferência da hemólise, a resposta celular com esse modelo aproxima-se mais das condições *in vivo* do que aqueles realizados com isolamento celular. Há muita divergência quanto aos resultados obtidos em ensaios feitos com neutrófilos isolados (18,15). Isto se deve à maior ou menor agressão sofrida pela célula durante os processos de filtração, lavagens, centrifugações e meios de cultura (15).

Segundo Tizard et al. (29), o neutrófilo desenvolve rápida apoptose, tendo uma meia vida de aproximadamente 12 horas *in vivo*. Em condições *ex vivo* a taxa de apoptose sofre influência da temperatura e tempo de incubação das amostras (30), tipo e concentração do anticoagulante (31), bem como do estimulante utilizado nos ensaios (18). Mesmo na ausência de sinais de hemólise, tanto em plasma autólogo, como homólogo enriquecido ou não com uréia (Tabela 1) ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da taxa de apoptose após quatro horas de incubação, sugerindo que o estresse da manipulação e maior tempo de incubação acelerou a morte celular dos neutrófilos.

O aumento da taxa de apoptose, embora não significativo, foi evidentemente maior nos ensaios com soro homólogos enriquecidos, porém tal aceleração da morte dos neutrófilos não foi diretamente proporcional à concentração de uréia plasmática (Tabela 1). Deve ser ressaltado que no presente estudo considerou-se células positivas apenas aquelas que

apresentavam três ou mais alterações morfológicas compatíveis com a apoptose. Entretanto, verificou-se uma elevação do número de células com pelo menos duas alterações apoptóticas após 4 horas de incubação, sugerindo a necessidade de realizar outras investigações com maior tempo de observação a fim de melhor evidenciar um possível efeito apoptótico tardio da uréia sobre os neutrófilos.

Não há estudos anteriores que avaliaram o efeito isolado da uréia sobre a apoptose. Sabe-se que a uréia, embora seja considerada *per se* de baixa toxicidade, é um pequeno soluto hidrossolúvel que age sob o influxo de  $K^+$  alterando o potencial da célula (32). Entretanto, há indícios de que em condições fisiológicas o cianato é gerado espontaneamente a partir da uréia e que este composto reage com os grupos thiol e amino das proteínas (33), de modo que a albumina carboxilada “*in vitro*” a partir do cianato inibe a produção de superóxido por neutrófilos isolados de humanos sadios (21). De forma semelhante, Kraus et al. (20) observaram que há um decréscimo na geração de superóxido quando neutrófilos de humanos sadios são incubados com cianato, sendo a redução no metabolismo oxidativo diretamente proporcional ao tempo de exposição e concentração desta substância. É provável que a maior taxa de apoptose verificada nos ensaios com soros homólogos enriquecidos com uréia (Tabela 1) deva-se a outros fatores que não o cianato gerado pela uréia uma vez que neste caso haveria uma menor produção de espécies reativas de oxigênio que aceleram a morte celular por oxidação.

## CONCLUSÃO

Plasmas enriquecidos com altas concentrações de uréia isoladamente não promovem *ex vivo* a aceleração da apoptose dos neutrófilos de cães sadios.

## AGRADECIMENTOS

A FAPESP pela bolsa auxílio (processo 07/58669-2), ao Canil da Polícia Militar do Município de Araçatuba- SP por ceder os cães para o experimento, e a Lane Margareth pelo auxílio técnico.

## REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
2. Majewska E, Sulowska Z, Baj Z. Spontaneous apoptosis of neutrophils in whole blood and its relation to apoptosis gene proteins. Scand J Immunol. 2000;52:496-501.
3. Rachid MA, Vasconcelos AC, Nunes VA. Apoptose na depleção linfocitária induzida pela toxina T-2 em frangos de corte. Histomorfometria da bolsa de Fabricius. Arq Bras Med Vet Zootec. 2000;52:592-8.
4. Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJJ. Apoptosis of leukocytes: basic concepts and complications in uremia. J Leukoc Biol. 2001;69:1006-12.
5. Grivicich I, Regner A, Rochal AB. Morte celular por apoptose. Rev Bras Cancerol. 2007;53:335-43.

6. Anzetti MC, Melo PS. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesqui.* 2007;1:37-58.
7. Bonini AL, Moura LAR, Franco M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. *J Bras Nefrol.* 2000;22:70-7.
8. Cohen G, Rudniki M, Walter F, Niwa T, Höll WH. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:1264-71.
9. Alberto B, Johnson Q, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Science Taylor & Francis Group; 2002.
10. Melley DD, Evans TW, Quinlan GJ. Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Sci.* 2005;108:413-24.
11. Cohen G, Rudniki M, Höll WH. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney Int.* 2001;59:S48-S52.
12. Anding K, Gross P, Rost JM, Allgaier D, Jacobs E. The influence of uremia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:2067-73.
13. Jaber BL, Perianayagam MC, Balakrishnan VS, King AJ, Pereira BJJ. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. *Kidney Int.* 2001;59:S197-S205.
14. Majewska E, Baj Z, Sulowska Z, Rysz J, Luciak M. Effects of uraemia and hemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:2582-8.
15. Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MCC, Watanab R, Dalboni MA, Manfredi SR, et al. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:160-5.
16. Cohen G, Raupachova J, Wimmer T, Deicher R, Hörl WH. The uraemic retention solute para-hydroxy-hippuric acid attenuates apoptosis of polymorphonuclear leukocytes from healthy subjects but not from haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;4:1-8.
17. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol.* 2008;23:1211-21.
18. Cendoroglo M, Jaber BL, Balakrishnan VS, Perianayagam M, King AJ, Pereira BJJ. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:93-100.
19. Kerr MG. *Exames laboratoriais em medicina veterinária bioquímica clínica e hematológica.* São Paulo: Roca; 2003.
20. Kraus LM, Elberger AJ, Handorf CR, Pabst MJ, Kraus AP. Urea-derived cyanate forms epsilon-amino-carbamoyl-lysine (homocitrulline) in leukocyte proteins in patients with end-stage renal disease on peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med.* 1994;123:882.



21. Jaisson S, Delevallée-Forte C, Touré F, Rieu P, Garnotel R, Gillery P. Carbamylated albumin is a potent inhibitor of polymorphonuclear neutrophil respiratory burst. *FEBS Lett.* 2007;581:1509-13.
22. Feitosa FLF. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico.* São Paulo: Roca; 2008.
23. Campos PP, Vanconcelos AC, Melo MM. Apoptose no placentomo de cabras gestantes intoxicadas experimentalmente com cipó-preto – *Tetrapteryx multiglandulosa*. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;56:19-24.
24. Batista JJ, Martins AS, Morol L, Vasconcelos AC. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticóide. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005;57:457-64.
25. Nagami K, Kawashima Y, Kuno H, Kemi M, Matsumoto H. In vitro cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils. *J Toxicol Sci.* 2002;27:191-203.
26. Zar JH. *Bioestatistical analysis.* Englewood Cliffs: Prentice Hall; 1984.
27. Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. *Veterinary hematology.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1985.
28. Graça-Souza AV, Arruda MAB, Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood.* 2009;99:4160-5.
29. Tizard IR. *Imunologia veterinária.* São Paulo: Editora Roca; 2002.
30. Sela S, Shurtz-Swirski R, Cohen-Mazor M, Mazor R, Chezar J, Shapiro G, et al. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2431-8.
31. Freitas M, Porto G, Lima JL, Fernandes E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin Biochem.* 2008;41:570-5.
32. Etzioni A, Obedeau N, Levy Y, Merzbach D, Benderly A, Shehadeh N. Effect of urine and urine components on the chemiluminescent response of bacteria-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Isr J Med Sci.* 1991;27:369-74.
33. Qian M, Eaton JW, Wolff SP. Cyanate-mediated inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity. *Biochem J.* 1997;15:159-66.

**Recebido em: 28/08/09**

**Aceito em: 11/05/11**