

Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães

[*Inhibitory effect of uremic serum on neutrophils oxidative metabolism from dogs*]

T.S. Barbosa^{1,4}, C.K. Mori², P.C. Ciarlini³

¹Aluna de pós-graduação - Ciência Animal - UNESP – Araçatuba, SP

²Aluna de graduação - Medicina Veterinária - FOA-UNESP – Araçatuba, SP

³Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - FOA-UNESP – Araçatuba, SP

⁴Bolsista da CAPES

RESUMO

Foi testada a hipótese de que, à semelhança do que ocorre em humanos, os componentes do soro urêmico inibem o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. Para isto, o sangue total de 10 cães foi incubado com soro homólogo urêmico e não urêmico e posteriormente comparado quanto à produção neutrofílica de superóxido estimada pelo método citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT). A produção de superóxido gerada pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos tratados com soro urêmico apresentou significativa redução ($P < 0,05$) em relação aos tratados com plasma autólogo e homólogo com níveis normais de ureia. Concluiu-se que os componentes presentes no soro urêmico inibem *ex vivo* o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães portadores de insuficiência renal e que, portanto, têm sua imunidade inata comprometida.

Palavras-chave: cão, tetrazólio nitroazul, insuficiência renal, superóxido

ABSTRACT

*The hypothesis that the uremic compounds decrease the neutrophil oxidative metabolism in dogs, as occurs in humans was tested. Whole blood from 10 dogs was incubated with uremic and non-uremic homologous sera and the superoxide production by activated neutrophils was quantified by the nitroblue tetrazolium reduction test (NBT). The superoxide production generated by neutrophils in the presence of uremic serum was significantly decreased ($P < 0.05$) in comparison with autologous and homologous sera with normal urea levels. It was concluded that the presence of components of uremic serum inhibits the *ex vivo* neutrophil oxidative metabolism in dogs, suggesting that, similarly to humans, dogs with renal failure may have the innate immunity response compromised.*

Keywords: dog, nitroblue tetrazolium, renal failure, superoxide

INTRODUÇÃO

A insuficiência renal é caracterizada por lesões intrarrenais e ocorre quando 75% ou mais dos néfrons tornam-se afuncionais, resultando na retenção de restos de produtos nitrogenados não proteicos no organismo, podendo manifestar-se de forma aguda (IRA) ou crônica (IRC) (DiBartola, 2004). Nos casos de IRA, a concentração plasmática normal de uréia, entre 3 e 8mmol/L, eleva-se abruptamente para valores

acima de 35mmol/L, geralmente mais altos que os observados na IRC (Kerr, 2003). A IRC é a afecção renal mais comum em cães, sendo progressiva, irreversível e de mau prognóstico. Porém, quando adequadamente tratada, o cão portador de IRC pode sobreviver com boa qualidade de vida por muitos meses (DiBartola, 2004). Em cães com IRC cujos valores de ureia plasmática são mais baixos que 20mmol/L, as chances de resposta a uma terapia alimentar são grandes; entretanto, valores acima de 60mmol/L

Recebido em 27 de abril de 2009

Aceito em 15 de outubro de 2010

E-mail: tatiana.barbosa@bol.com.br

indicam prognóstico ruim (Kerr, 2003). Apesar de a concentração sérica da ureia ser bem aceita como um bom marcador para a severidade da falência renal, seu papel na patogênese da síndrome urêmica ainda é controverso (Lim et al., 1995).

Cohen et al. (1997) relataram que as toxinas urêmicas circulantes de pacientes nefropatas graves são provenientes da redução da excreção, assim como resultantes do aumento da sua síntese durante a uremia. Segundo Vanholder et al. (2008), a ureia *per se* parece não ser tóxica, contudo seu efeito tóxico se faz pelo acúmulo concomitante de outras substâncias de ação biológica. As guanidinas, a leptina, o p-cresol, a ureia e a β 2-microglobulina representam um dos 100 solutos urêmicos identificados em pacientes com nefropatias graves e que potencialmente alteram a função neutrofilica (Vanholder et al., 2008). Especula-se que cada toxina urêmica tenha efeitos distintos na função e viabilidade dos neutrófilos (Sardenberg et al., 2006).

A produção de fatores quimiotáticos para os neutrófilos aparentemente é normal em pacientes urêmicos. Porém a integridade da locomoção dos referidos neutrófilos ao sítio de infecção, a capacidade de fagocitose e a sua ação bactericida parecem estar diminuídas (Chretien e Garagusi, 1972). Uma vez fagocitado, o microrganismo é destruído por meio de enzimas lisossomais e agentes oxidantes. De acordo com Ferreira e Matsubara (1997), no metabolismo celular aeróbio normal, o oxigênio sofre redução, formando água, processo no qual são formadas as espécies reativas do oxigênio, tais como os radicais superóxido, hidroperoxila, hidroxila, peróxido de hidrogênio e compostos halogenados que atuam como bactericidas, viricidas e fungicidas (Babior, 2004).

O metabolismo oxidativo e a produção de superóxido dos neutrófilos de pacientes humanos com insuficiência renal têm sido avaliados por meio de diferentes métodos, tais como a quimioluminescência, a citometria de fluxo e o tetrazólio nitroazul (NBT), gerando resultados discordantes (Gastaldello et al., 2000). O NBT é um corante supravitais, amarelo-claro, que se transforma em formazan, azul-escuro, após a sua redução pelo superóxido produzido pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos. A principal causa de valor elevado de redução do

NBT é a infecção bacteriana, e esta redução pode ocorrer antes mesmo de qualquer alteração clínica e/ou laboratorial (Richardson et al., 1998).

Hirabayashi et al. (1988) afirmaram que pacientes humanos com insuficiência renal apresentaram menor produção de radicais de oxigênio. Cendoroglo et al. (1999) observaram menor produção de superóxido em neutrófilos de pacientes humanos quando incubados com plasma homólogo urêmico. McLeish et al. (1996) e Rysz et al. (2004) verificaram maior produção de radicais de oxigênio nos neutrófilos de insuficientes renais, enquanto Paul et al. (1991), Gastaldello et al. (2000) e Anding et al. (2003) não observaram, em pacientes urêmicos, alteração no metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Embora a insuficiência renal seja uma nefropatia comum em cães, não há relatos na literatura veterinária quanto ao efeito da uremia sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos nesta espécie. A fim de preencher esta lacuna de conhecimento, este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que a produção de superóxido gerado pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães sadios diminui quando incubado com soro urêmico.

MATERIAL E MÉTODO

Vinte e um cães machos e fêmeas adultos, de diferentes raças, foram submetidos a exame físico geral e a exames laboratoriais, como hemograma completo e determinação da concentração sérica de ureia e creatinina. Assim, com base nos resultados dos supracitados exames, os animais foram agrupados em: grupo-controle (GC), constituído de 11 cães sem evidências de alterações clínicas e laboratoriais. Destes, 10 foram utilizados para a realização dos ensaios e um teve seu plasma utilizado como homólogo sadio; grupo urêmico (GU), constituído de 10 cães com quadro clínico-laboratorial de uremia, conforme critérios de Kerr (2003) e DiBartola (2004), sem insuficiência cardíaca, ruptura vesical e obstrução pós-renal.

De ambos os grupos foram excluídos, previamente, cães com qualquer histórico de tratamento recente com antibióticos e anti-

inflamatórios que pudessem interferir no metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Para as colheitas de sangue dos animais, utilizaram-se agulhas hipodérmicas descartáveis 25x8mm, próprias para tubos a vácuo estéreis siliconizados e heparinizados (Becton-Dickson - New Jersey, EUA). De cada animal do GC colheram-se 6mL de sangue total, sendo 2mL destinados à avaliação do metabolismo oxidativo, 2mL para realização do hemograma e 2mL para obtenção de plasma para análises bioquímicas. Dos cães do GU foram colhidos 4mL de sangue total em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro, destinados aos ensaios *ex vivo* e a análises bioquímicas, e

2mL, acondicionados em tubos plásticos contendo K²-EDTA (Becton-Dickson) para o hemograma. O soro obtido foi acondicionado a -20°C, e as amostras sanguíneas mantidas refrigeradas até o momento do processamento laboratorial.

Os plasmas dos animais do GC foram submetidos à prova sorológica de pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp. por meio de ELISA, como descrito por Lima et al. (2003). Ao sangue total dos 10 cães do GC foram, concomitantemente, acrescentados plasma autólogo e homólogo sadio e soro urêmico, conforme protocolo apresentado (Tab. 1).

Tabela 1. Protocolo experimental dos diferentes ensaios realizados para avaliar o metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães do grupo-controle (GC) imediatamente após a colheita

Protocolo	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Sangue total heparinizado do GC	200µL	200µL	200µL	200µL
Centrifugação 700 x g/15min		X	X	X
Retirada de 100µL do plasma sobrenadante		X	X	X
Acréscimo de 100µL de soro homólogo do GU				X
Acréscimo de 100µL de plasma homólogo do GC			X	
Reposição de 100µL do plasma autólogo do GC		X		
Homogeneização por ressuspensão		X	X	X
Determinação da concentração de ureia			X	X
Incubação em banho-maria 37°C/2h		X	X	X
Determinação do superóxido (NBT)	X	X	X	X

Os valores do hemograma foram obtidos utilizando-se contador eletrônico de células sanguíneas (Contador eletrônico hematológico veterinário, Mod. CC-530, CELM - São Paulo, SP) e a contagem diferencial das células foi feita pelo método de microscopia de esfregaços corados com panótico (Instant-Prov, NEWPROV - Pinhais, PR.). A determinação do volume globular foi realizada pelo método de micro-hematócrito, segundo as recomendações de Kerr (2003). A concentração de ureia plasmática foi obtida, em duplicata, pelo método enzimático cinético (37°C), utilizando-se conjunto de reativo comercial (Ureia enzimática, Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. - Belo Horizonte, MG) com leitura em espectrofotômetro (E-205, CELM) previamente calibrado, conforme recomendação do fabricante.

A produção de superóxido foi quantificada pelo método citoquímico de redução espontânea do NBT, conforme Ciarlini et al. (2004), utilizando-

se reagente tamponado (Nitrobluetetrazolium, Sigma - St. Louis, EUA). De cada ensaio, realizaram-se dois esfregaços, corados com reagente hematológico comercial (Instant-Prov, NEWPROV). A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos, sendo apenas consideradas as células que apresentavam qualquer grânulo intracitoplasmático de cor azul enegrecida típica de formazan.

Após os estudos de distribuição das variáveis quanto à normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (teste Bartlett), conforme preconizado por Zar (1984), utilizou-se o teste de Friedman para comparar os grupos, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa computacional SAS/1997 e os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do hemograma e das concentrações séricas de ureia dos cães do GC apresentaram-se dentro dos intervalos de referências de normalidade descritas por Kerr (2003), confirmando a boa condição de saúde sugerida pelo exame clínico geral. A concentração média final de ureia das 10 amostras submetidas aos ensaios com plasma autólogo (ensaio 2) e com plasma homólogo sadio (ensaio 3) variou dentro da faixa de normalidade para a espécie, enquanto as amostras tratadas com soro urêmico (ensaio 4)

apresentaram concentração elevada, comum a cães portadores de IRC (Tab. 2).

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos, quando analisado individualmente, apresentou heterogeneidade nos diferentes ensaios (Fig. 1), provavelmente devido ao método e à presença de subpopulações de neutrófilos. Estudos realizados em seres humanos (Vouter et al., 1996) e em cães (Webb et al., 2007) verificaram variações no metabolismo oxidativo de neutrófilos devido à presença de subpopulações de neutrófilos, as quais respondem de diferentes maneiras a diferentes condições.

Tabela 2. Valores de tendência central e dispersão (média±desvio-padrão) da concentração final de ureia e porcentagens (%) da taxa neutrofílica de redução espontânea do tetrazólio nitroazul (NBT) de 10 cães hígdos submetido a diferentes ensaios

Amostra	Ureia (mmol/L)	% redução NBT
Ensaio 1	7,57±1,10a*	14,4±11,5a*
Ensaio 2	7,57±1,10a	15,3±5,5ab
Ensaio 3	6,38±0,79a	23,5±14,4b
Ensaio 4	26,81±6,25b	1,7±2,8c

* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

Ensaio 1: utilização de sangue total imediatamente após a colheita; ensaio 2: sangue total incubado com plasma autólogo; ensaio 3: sangue total incubado com plasma homólogo sadio; e ensaio 4: sangue total incubado com soro homólogo urêmico.

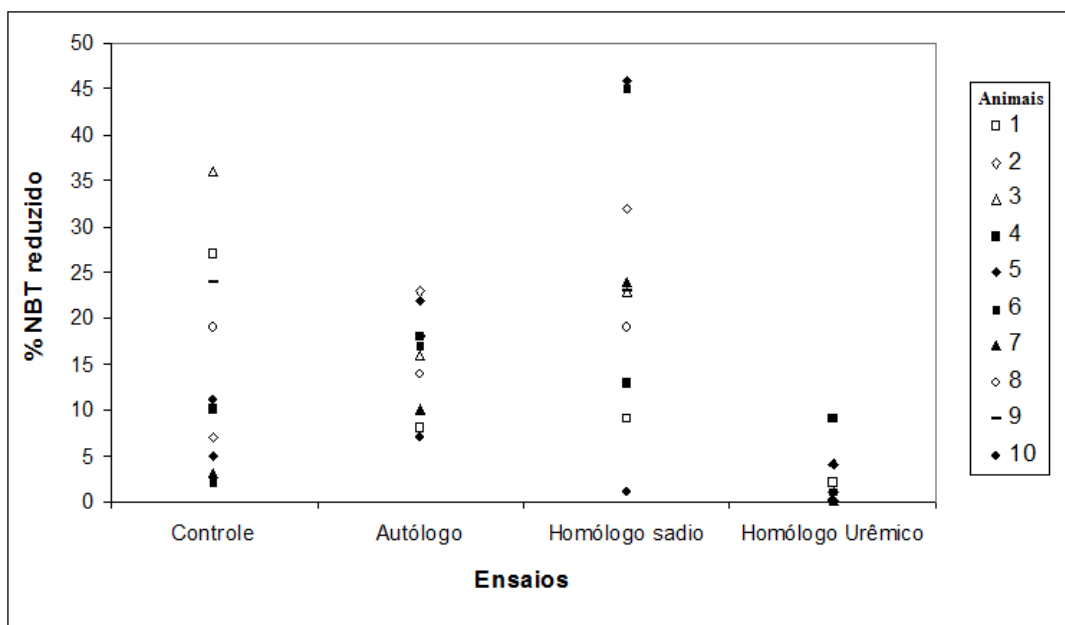


Figura 1. Variação da taxa de redução espontânea neutrofílica do NBT em 10 cães hígdos submetidos a diferentes ensaios: ensaio 1: utilização de sangue total imediatamente após a colheita; ensaio 2: sangue total incubado com plasma autólogo; ensaio 3: sangue total incubado com plasma homólogo sadio; e ensaio 4: sangue total incubado com soro homólogo urêmico.

A incubação com plasma homólogo sadio (ensaio 3) promoveu maior ativação do metabolismo oxidativo de neutrófilos do que a utilização de plasma autólogo (ensaio 2). Porém, as taxas de redução do NBT nesses dois ensaios não diferiram significativamente entre si e nem em relação ao ensaio 1. A maior ativação com plasma homólogo (ensaio 3) não ocorreu em todas as amostras, sendo que 40% apresentaram valores de redução do NBT semelhantes ou menores do que o ensaio 2, que utilizou plasma autólogo (Fig. 1). Considerando-se o modelo experimental adotado ter sido pareado, portanto com a mesma subpopulação de neutrófilos, é provável que a maior produção de superóxido, observada no ensaio 3 em relação ao ensaio 2, tenha ocorrido, bem como alguma diferença na composição do plasma autólogo em relação ao homólogo.

A porcentagem média de neutrófilos redutores de NBT logo após a colheita (ensaio 1) foi semelhante aos valores de referência descritos por Ciarlini et al. (2004), porém mais baixa que os observados por Trevelin et al. (2008) e mais alta que os observados por Poli et al. (1973) e por Emanuelli (2007). Tais discrepâncias são comuns em estudos que avaliam o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (Cendoroglo et al., 1999; Gastaldello et al., 2000; Wann et al., 2007). Reconhecidamente, os resultados obtidos pelo método de redução do NBT são principalmente influenciados pela temperatura e pelo tempo de incubação (Sela et al., 2005), pelo tipo e pela concentração do anticoagulante (Freitas et al., 2008) e pelo estimulante (Cendoroglo et al., 1999).

Quatro cães foram soropositivos para *Leishmania* sp. (1, 2, 3 e 8), sendo que dois deles apresentaram neutrófilos com taxa de redução de NBT elevadas (1, 3), enquanto nos outros dois a taxa foi considerada normal (Fig. 1). Tais achados diferem dos observados por Vuotto et al. (2000), que verificaram menor produção de superóxido em cães infectados com *L. infantum*. Os cães sorologicamente positivos foram mantidos no estudo, uma vez que todos possuíam neutrófilos com metabolismo oxidativo funcional e não tinham qualquer alteração clínica ou laboratorial compatível com leishmaniose.

Independentemente da fonte de variação, a taxa neutrofílica de redução do NBT do ensaio 1,

obtida logo após a colheita, demonstrou que, no momento inicial do experimento, todas as amostras utilizadas, nos diferentes ensaios, apresentavam neutrófilos com metabolismo oxidativo funcional, passíveis de serem testados quanto ao efeito inibidor da uremia, comprovando que a manipulação das células nos diferentes ensaios não comprometeu a capacidade dos neutrófilos de produzirem o superóxido. A taxa de redução do NBT do ensaio 2 não diferiu significativamente das obtidas no ensaio 1 (Tab. 2).

Não ocorreu ativação ou inibição significativa do metabolismo oxidativo devido a qualquer componente presente no plasma homólogo, uma vez que a taxa de redução neutrofílica do NBT, após o acréscimo de plasma homólogo de cães sadios (ensaio 3), não diferiu ($P>0,05$) das taxas dos ensaios 1 e 2.

De modo homogêneo, 100% das amostras incubadas com soro urêmico (ensaio 4) apresentaram inibição do metabolismo oxidativo (Fig. 1), sendo a taxa de redução neutrofílica do NBT significativamente mais baixa que a dos demais ensaios (Tab. 2), reproduzindo *ex vivo* em cão o efeito inibidor dos componentes urêmicos sobre o metabolismo oxidativo. Embora seja aceito que cães com IRC tenham sua imunidade comprometida (DiBartola, 2004), não existem relatos na literatura que forneçam evidências, como as obtidas no presente estudo, quanto ao efeito inibitório da uremia sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Diante de tais achados obtidos *ex vivo*, torna-se imperativo comprovar se o efeito imunossupressor da uremia ocorre também *in vivo*, contribuindo, dessa maneira, para melhor esclarecer os mecanismos que promovem a imunossupressão de cães com IRC.

Pesquisas realizadas em seres humanos também demonstraram o efeito inibidor da uremia sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (Lewis et al., 1988; Cendoroglo et al., 1999). Entretanto, Sela et al. (2005) verificaram a ativação do metabolismo na uremia, enquanto Chretien e Garagusi (1972) observaram taxa de redução neutrofílica do NBT de pacientes urêmicos (7,5%) semelhante à de pacientes sadios (7,2%). Segundo Sardenberg et al. (2006), os resultados conflitantes sobre o efeito da uremia sob a produção de superóxido não se restringem aos

diferentes estimulantes utilizados para ativar o metabolismo dos neutrófilos, mas a vários fatores, como meio de cultivo, concentração de plasma autólogo, técnicas de isolamento e métodos analíticos.

Cendoroglo et al. (1999) realizaram um estudo *ex vivo* similar e verificaram, igualmente, menor produção de superóxido em neutrófilos humanos isolados e incubados com plasma homólogo urêmico. É amplamente aceito que o aumento do metabolismo oxidativo acelera a apoptose celular (Whyte et al., 1993). Cendoroglo et al. (1999) levantaram a hipótese que *in vivo*, em um primeiro momento, a uremia promove um aumento do metabolismo oxidativo neutrofilico que induz à apoptose celular, e essa, por sua vez, compromete o funcionamento dos neutrófilos.

Portanto, o protocolo utilizado no presente estudo reproduziu *ex vivo* o efeito da uremia sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos tal qual observado em humanos, sugerindo que *in vivo* tal efeito possa ocorrer em cães com insuficiência renal e, dessa maneira, comprometer a imunidade inata, favorecendo a instalação de infecções bacterianas e a morte provocada por elas. Diante de tais indícios *ex vivo*, torna-se necessário realizar outras investigações para averiguar se a uremia *in vivo* também promove a inibição do metabolismo oxidativo ou outras disfunções dos neutrófilos em cães. Outrossim, a complementação do presente estudo poderá confirmar a potencial utilização do cão como modelo para estudos comparativos sobre as disfunções neutrofilicas associadas à uremia.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que *ex vivo* o soro de cães urêmicos compromete a produção de superóxido dos neutrófilos de cães hígdos, similarmemente à inibição do metabolismo oxidativo que ocorre em pacientes humanos portadores de insuficiência renal crônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDING, K.; GROSS, P.; ROST, J.M. et al. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.18, p.2067-2073, 2003.

BABIOR B.M. NADPH oxidase. *Curr. Opin. immunol.*, v.16, p.42-47, 2004.

CENDOROLO, M.; BERTRAND, L.J.; BALAKRISHNAN, V.S. et al. Neutrophil apoptosis and disfunction in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.10. p.93-100, 1999.

CHRETIEN, J.H.; GARAGUSI, V.F. Phagocytosis and nitroblue tetrazolium reduction in uremia. *Experientia*, v.29, p.612-613, 1972.

CIARLINI, P.C.; PATRÍCIO, R.F.; COUTO, R. et al. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. *Arq. Inst. Biol.*, v.71, p.323-327, 2004.

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

DiBARTOLA, S.P. Abordagem clínica e laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Eds). *Tratado de medicina interna veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, p.1686-1720.

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

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43, p.107-110, 1997.

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

GASTALDELLO, K.; HUSSON, C.; WENS, R. et al. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.15, p.1638-1646, 2000.

HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T.; NISHIKAWA, A. et al. Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal failure. *Nephron*, v.49, p.305-312, 1988

- KERR, M.G. *Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia veterinária*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003.
- LEWIS, S.L.; VAN EPPS, D.E.; CHENOWETH, D.E. Alterations in chemotactic factor-induced responses of neutrophils and monocytes from chronic dialysis patients. *Clin. Nephrol.*, v.30, p.63-72, 1988.
- LIM, J.; GASSON, C.; KAJI, D.M. Urea inhibits NaK₂CI cotransport in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, v.96, p.2126-2132, 1995.
- LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, p.485-489, 2003.
- McLEISH, K.R.; KLEIN, J.B.; LENDERER, E.L. et al. Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Int.*, v.50, p.407-416, 1996.
- PAUL, J.L.; ARVEILLER, M.R.; MAN, N.K. et al. Influence of uremia on polymorphonuclear leukocytes oxidative metabolism in end-stage renal disease and dialyzed patients. *Nephron*, v.57, p.428-432, 1991.
- POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T) test nel cane. *Folia Vet. Lat.*, v.3, p.215, 1973.
- RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M. et al. A simple flow cytometry assay dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J. Immunol. Methods.*, v.219, p.187-193, 1998.
- RYSZ, J.; KASIELSKI, M.; APANASIEWICZ, J. et al. Increased hydrogen peroxide in the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.19, p.158-163, 2004.
- SARDENBERG, C.; SUASSUNA, P.; ANDREOLI, M.C.C. et al. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.21, p.160-165, 2006.
- SELA, S.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; COHEN-MAZOR, M. 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.*, v.16, p.2431-2438, 2005.
- TREVELIN, S.C.; TRINCONI, C.M.; BARBOSA, T.S. et al. Efeito do plasma rico em ureia sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães domésticos. *Vet. Zootec.*, v.15, supl.1, p.96, 2008. (resumo)
- VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr. Nephrol.*, v.23, p.1211-1221, 2008.
- VOUTER, J.; JANSSON, S.E.; REPO, H. Standardization of a flow cytometric assay for phagocyte respiratory burst activity. *Scand. J. Immunol.*, v.43, p.329-334, 1996.
- VUOTTO, M.L.; DE LUNA, R.; IELPO, M.T.L. et al. Chemiluminescence activity in whole blood phagocytes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Luminescence*, v.15, p.251-255, 2000.
- WANN, J.G.; HSU, Y.; YANG, C. et al. Neutrophils in acidotic haemodialysed patients have lower intracellular pH and inflamed state. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.22, p.2613-2622, 2007.
- WEBB, C.; MC CORD K.; DOW, S. Neutrophil function in septic dogs. *J. Vet. Int. Med.*, v.21, p.982-989, 2007.
- WHYTE, M.K.B.; MEAGHER, L.C.; MACDERMOT, J. et al. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.*, v.150, p.5124-5134, 1993.
- ZAR, J.H. *Bioestatistical analysis*. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718p.