

# Efeito do soro de cães portadores de insuficiência renal sobre a apoptose e o metabolismo oxidativo dos polimorfonucleares<sup>1</sup>

*Effect of serum from dogs with renal failure on apoptosis and oxidative metabolism of polymorphonuclear*

Tatiana de Sousa Barbosa<sup>2\*</sup>, Carolina Kimie Mori<sup>3</sup>, Paulo César Ciarlini<sup>3</sup>

Recebido em 05/07/2013; aprovado em 04/07/2014.

## RESUMO

Nos últimos anos, as toxinas urêmicas têm sido amplamente investigadas como elemento imunossupressor em pacientes nefropatas. Este trabalho objetivou testar a hipótese de que, à semelhança do que ocorre em humanos, a taxa de apoptose e a produção de superóxido em leucócitos polimorfonucleares de cães tratados com soro urêmico se alteram. Foi comparada a produção de superóxido e o índice apoptótico de leucócitos polimorfonucleares de 10 cães sadios incubados com o soro autólogo e homólogo de indivíduos sadios e urêmicos. Com isso, verificou-se efeito parcial de inibição do metabolismo oxidativo na uremia sem correlação com a aceleração da apoptose dos leucócitos polimorfonucleares de cães.

**PALAVRAS-CHAVE:** Explosão respiratória, morte celular programada, leucócitos, superóxido.

## ABSTRACT

In recent years, uremic toxins have been widely investigated as an immunosuppressive factor for nephropathic patients. This study aimed to test the hypothesis that, as it was similarly observed in humans, the rate of apoptosis and superoxide production in polymorphonuclear leukocytes are changed in dogs treated with uremic serum. The superoxide production of polymorphonuclear

leukocytes and apoptotic index of 10 healthy dogs incubated with autologous and homologous serum from healthy and uremic dogs was compared. Thus, there was an effect of partial inhibition of oxidative metabolism in uremia without correlation with the acceleration of polymorphonuclear leukocytes apoptosis in dogs.

**KEYWORDS:** Burst respiratory, programmed cell death, leukocyte, superoxide.

## INTRODUÇÃO

A primeira linha de defesa do organismo contra infecções, constituída dentre outros elementos por leucócitos polimorfonucleares (PMN), fica comprometida em pacientes humanos com uremia, acarretando mortes por infecções (SARNAK e JABER, 2000). O metabolismo oxidativo dos PMN gera superóxido e derivados que atuam benéficamente como bactericidas, mas também promove danos oxidativos que comprometem a função leucocitária e induz a apoptose (KANNAN e JAIN, 2000).

Os mecanismos relacionados às disfunções dos PMN na uremia não estão totalmente esclarecidos (SARDENBERG et al., 2006), havendo evidências que esteja associada com a aceleração da apoptose (CENDOROGLO et al., 1999). Estudos sobre o metabolismo oxidativo dos PMN nesta situação são contraditórios, tendo sido observado normalidade (GASTALDELLO

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Universidade de Marília - UNIMAR. Av. Hygino Muzzy Filho, 1001 Campus Universitário, CEP 17525-902, Marília, SP, Brasil. Email: tatianasbarbosa@gmail.com. \*Autora para correspondência.

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVA, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP. Rua Clóvis Pestana, 793, CEP 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil.

et al., 2000; ANDING et al., 2003), aumento (WARD e McLEISH, 1995; SELA et al., 2005) e diminuição (CENDOROGLO et al., 1999) da produção do superóxido e derivados.

Há evidências de que o excesso de radicais de oxigênio produzidos pelo metabolismo oxidativo acelera a apoptose (JABER et al., 2001), de maneira que estas células possuem funcionamento comprometido, acarretando diminuição de sua capacidade de produção de superóxido (WHYTE et al., 1993)

A insuficiência renal crônica (IRC), dentre outras causas urêmicas, é uma síndrome comum na espécie canina. Os danos do estresse oxidativo sobre os eritrócitos foram verificados em cães com IRC (LUSTOZA, 2005), enquanto que o efeito da uremia sobre o funcionamento dos PMN foi avaliado nas espécies domésticas somente por Krolova et al. (2009) em cães e por Keegan e Webb (2010) em gatos. Recentemente, foi constatado que o plasma de cães saudáveis enriquecido com ureia comercial promove a aceleração da apoptose dos neutrófilos de cães saudáveis e que este efeito é dependente do tempo (TRINCONI et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que ocorre alteração na taxa de apoptose e produção de superóxido dos PMN tratados com soro de cães urêmicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção dos animais

Para constituição dos grupos experimentais, cães adultos, de várias raças, machos e fêmeas, foram submetidos a exame físico geral segundo Feitosa (2008), e a laboratoriais (hemograma completo e determinação da concentração sérica de ureia e creatinina). Foi utilizado como critério de exclusão de cães o histórico de tratamento recente com antibióticos e anti-inflamatórios que poderiam interferir no metabolismo oxidativo dos PMN. De acordo com os resultados obtidos para as características clínico-laboratoriais, acima referidos, os animais foram agrupados em:

Grupo Controle (GC): Onze cães sem evidências

de alterações clínicas e laboratoriais, dos quais dez foram destinados à realização dos ensaios e um utilizado como fonte de soro homólogo sadio. Grupo Urêmico (GU): Dez cães insuficientes renais urêmicos, conforme critérios laboratoriais de Kerr (2003) e clínicos de DiBartola (2004), todos sem sinais clínicos de insuficiência cardíaca, ruptura vesical e obstrução pós-renal.

### Colheita e análises laboratoriais

Utilizando-se agulhas hipodérmicas descartáveis de 25 x 8 mm, colheu-se sangue total em tubos heparinizados à vácuo para a avaliação do metabolismo oxidativo e determinação do índice apoptótico, em tubos com K<sup>2</sup>-EDTA para a realização do hemograma e em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. O soro obtido foi acondicionado a -20 °C e as amostras sanguíneas mantidas refrigeradas até o momento do processamento laboratorial. Utilizando-se contador eletrônico de células sanguíneas previamente calibrado conforme recomendações do fabricante (CELM, Brasil) para realização do hemograma e a contagem diferencial dos leucócitos feita pela análise microscópica em esfregaços sanguíneos corados. A determinação do volume globular foi realizada pelo método de micro-hematócrito (THRALL et al., 2007). As concentrações de ureia e creatinina foram obtidas, em duplicata, pelo método enzimático cinético e colorimétrico, respectivamente, a 37 °C utilizando-se conjunto de reativo comercial (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. - Belo Horizonte, MG) com leitura em espectrofotômetro (E-205, CELM) previamente calibrado, conforme recomendação do fabricante.

### Isolamento, purificação e viabilidade dos PMN

Os PMN foram isolados imediatamente após a colheita, conforme metodologia descrita por Hirayama et al. (2000) com pequenas modificações a fim de evitar a lise eritroide e tentar prevenir ativação artificial dos PMN. Na qual, quatro mililitros de sangue total heparinizado (100 UI mL<sup>-1</sup>) foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno estéreis contendo parte

iguais de Histopaque-1119 e 1077 (Sigma,USA), totalizando seis mililitros de duplo gradiente de separação. Após centrifugação a 340 x g por 30 minutos, a camada de PMN foi aspirada, lavada duas vezes com tampão de lise (cloreto de amônia 0,8%) e uma vez com HBSS (Sigma,USA). Após o descarte do sobrenadante, as células foram diluídas em meio RPMI (Sigma, USA) para obter concentração de PMN final de  $2 \times 10^6$  mL, com pureza e viabilidade mínima de 95%. Conforme recomendações de Metcalf et al. (1986), o grau de viabilidade dos PMN foi determinado pelo método de exclusão do azul tripan, a concentração em câmara de Neubauer e o grau de pureza estimada a partir da contagem diferencial de 100 células das amostras citocentrifugadas e coradas.

### **Delineamento experimental**

Em partes iguais, a suspensão de PMN de cada um dos 10 cães do GC foi incubada por 20 minutos a 37 °C com soro autólogo (ensaio 1), com soro homólogo de cão sadio (ensaio 2) e com soros de cães urêmicos (ensaio 3). A concentração final de ureia dos ensaios 1, 2 e 3 variaram de 3,17 a 8,35 mmol L<sup>-1</sup>, 4,5 a 7,18 mmol L<sup>-1</sup> e de 37,3 a 86,6 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados simultaneamente e imediatamente após o isolamento. Após a incubação, todas as amostras foram submetidas ao teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT), sendo a taxa de PMN redutores e o índice apoptótico calculada para cada reação.

Os ensaios 1, 2 e 3 foram repetidos para estimar a taxa de apoptose após quatro horas de incubação, com e sem estímulo apoptótico (0,3 μmol CAM (Sigma, USA) /  $1 \times 10^6$  PMN).

### **Avaliação do metabolismo oxidativo dos PMN**

A produção de superóxido dos PMN isolados foi determinada indiretamente pelo método citotóxico de redução espontânea de NBT. Resumidamente, 50 μL de solução aquosa a 2% de NBT foram acrescidos a 100 μL da suspensão de PMN de cada ensaio e com auxílio de termociclador automatizado foram incubados a 37 °C sob agitação (600 rpm 60 por segundos,

a cada cinco minutos). Após o final da incubação, todas as amostras foram citocentrifugadas por cinco minutos a 400 x g e posteriormente coradas com reagente hematológico comercial (Newprov – Brasil). A porcentagem de células produtoras de superóxido foi estimada a partir da contagem de 100 neutrófilos, sendo consideradas positivas apenas as redutoras de NBT, ou seja, aquelas com grânulos intracitoplasmáticos de cor azul enegrecida típica de formazan, independente do tamanho.

### **Avaliação do índice apoptótico dos PMN**

Conforme os protocolos de citocentrifugação e coloração supracitados, imediatamente após a incubação, o índice apoptótico de PMN foi calculado a partir da análise morfométrica de 100 células, utilizando-se microscopia óptica (aumento de 1.000X), conforme recomendações e critérios de Campos et al. (2004) e Batista et al. (2005). Foram consideradas apoptóticas células que apresentaram pelo menos três das características morfológicas: condensação do citoplasma, condensação nuclear, fragmentação nuclear ou celular.

### **Análise Estatística**

Após análise das distribuições das variáveis quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, 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.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todas as amostras incubadas com soro autólogo (ensaio 1) reduziram o NBT (Figura 1), comprovando que os PMN obtidos de suspensões isoladas e utilizadas nos três ensaios exibiram metabolismo oxidativo funcional. A taxa mediana de redução neutrófila do NBT foi de 10%, inferior aos de Trevelin et al. (2008) e superior aos de Poli et al. (1973), Ciarlini et al. (2004) e Emanuelli (2007). Em estudos sobre

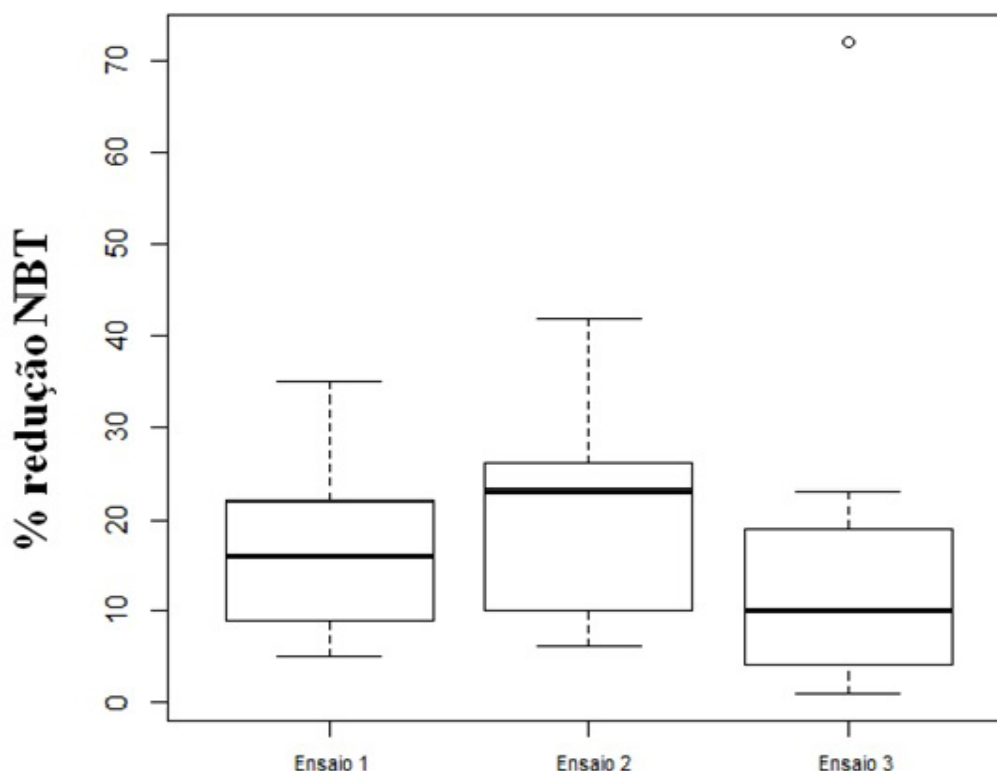


Figura 1 - Porcentagem da taxa neutrofílica de leucócitos polimorfonucleares (PMN) com redução espontânea do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) de dez cães hígidos submetidos a diferentes ensaios: utilização dos PMN isolados e incubados com plasma autólogo (ensaio 1); neutrófilos isolados e incubados com plasma homólogo sadio (ensaio 2) e neutrófilos isolados e incubados com soro homólogo urêmico (ensaio 3).

o metabolismo oxidativo do PMN é comum a divergência entre autores sobre a taxa de produção de superóxido (WARD e McLEISH, 1995; CENDOROGLIO et al., 1999). Acredita-se que tais divergências devem-se às diferenças quanto aos métodos analíticos empregados, assim como dos procedimentos de isolamento celular (SARDENBERG et al., 2006), tempo e temperatura de incubação das amostras (SELA et al., 2005), além do tipo e concentração do anticoagulante utilizado (FREITAS et al., 2008).

A adição do soro homólogo sadio (ensaio 2) às células isoladas não comprometeu a capacidade dos PMN produzirem superóxido, indicando que possíveis diferenças antigênicas existentes não afetaram o metabolismo oxidativo (Figura 1).

O metabolismo oxidativo dos PMN apresentou alta heterogeneidade nos diferentes grupos (Figura 1). Estudos realizados em seres humanos (VUORTER et al., 1996) e cães (WEBB

et al., 2007) igualmente verificaram variações no metabolismo oxidativo de neutrófilos devido à presença de sub-populações de neutrófilos que respondem de diferentes maneiras às diferentes condições. Houve diminuição da taxa de redução neutrofílica do NBT após o acréscimo do soro homólogo urêmico (ensaio 3), 10%, em relação aos demais ensaios 1 e 2, 16% e 23%, respectivamente. Embora o valor da taxa de redução do NBT das amostras incubadas com soro urêmico tenha sido inferior aos do ensaio 1 e 2 tais diferenças não foram significativas. Utilizando protocolo similar em cão, porém com sangue total, Barbosa et al. (2010), diferentemente, evidenciaram uma marcante inibição do metabolismo oxidativo dos PMN incubados com soro urêmico. Segundo Sela et al. (2005), por não haver manipulação das amostras, ensaio com sangue total representa melhor as condições *in vivo*, pois as células não sofrem interferências

pela separação, nem por longas incubações. É provável que o efeito inibidor da uremia sobre a produção de superóxido, neste caso, tenha sido parcial devido ao fato dos PMN isolados terem sido incubados com soro urêmico por tempo inferior, enquanto que no estudo de Barbosa et al. (2010) o sangue total foi incubado por duas horas. É possível também que o processo de isolamento adotado tenha ativado o metabolismo oxidativo dos PMN de modo a aumentar a produção de superóxido antes da incubação com soro urêmico, mascarando o efeito inibidor das toxinas, conforme observado em estudo similar realizado em humanos (CENDOROGLO et al., 1999). A inibição da produção de superóxido em PMN humanos isolados apenas ocorreu após 24 horas de incubação com soro urêmico (CENDOROGLO et al., 1999). Enquanto que Krolova et al. (2009), ao analisarem pelo método de quimiluminescência, não constataram diferença quanto ao índice de fagocitose entre os cães com insuficiência renal crônica e os do grupo controle.

Os índices apoptóticos medianos calculados durante as reações de redução do NBT dos ensaios 1, 2 e 3 variaram em torno de 10%, sendo 10%, 10% e 12%, respectivamente, não diferindo entre si (Figura 2). Tais resultados divergem de estudos que verificaram significativa aceleração da apoptose dos PMN em pacientes urêmicos (MAJEWSKA et al., 2003; SELA et al., 2005; SARDENBERG et al., 2006) e em células sadias incubadas com soro urêmico (CENDOROGLO et al., 1999). Há de se considerar que Cendoroglo et al. (1999) avaliaram a apoptose incubando 24 horas o isolado de PMN com soro urêmico, portanto, um tempo bem superior aos dos ensaios do presente estudo. Trinconi et al. (2011), utilizando protocolo semelhante ao do presente estudo, porém com sangue total, constataram que o plasma enriquecido com ureia comercial promove aceleração da apoptose dos neutrófilos de cães sadios e que este efeito é dependente do tempo.

Ao se avaliar a apoptose dos PMN isolados sem a presença do NBT foi confirmado

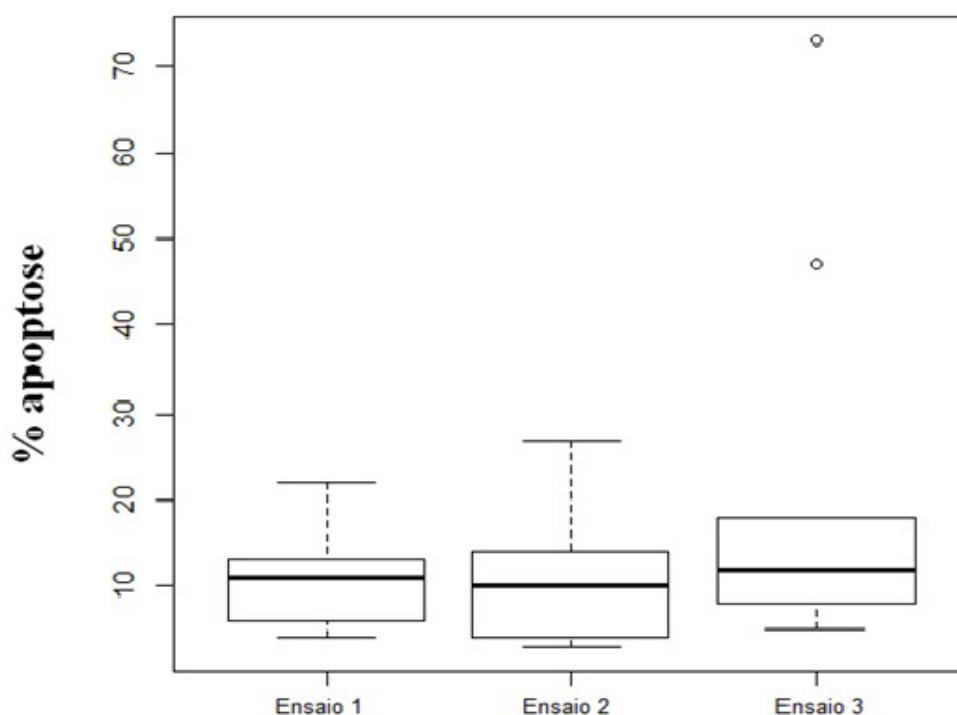


Figura 2 - Porcentagem do índice apoptótico de dez cães hígidos submetido a diferentes ensaios: utilização dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) isolados e incubados com plasma autólogo (ensaio 1); neutrófilos isolados e incubados com plasma homólogo sadio (ensaio 2) e neutrófilos isolados e incubados com soro homólogo urêmico (ensaio 3).

que a mediana do índice apoptótico sofre efeito do tempo de incubação, 36%, 44,5% e 31,5% referente aos ensaios 1, 2 e 3. No entanto, não foi possível observar, após 4 horas de incubação, qualquer aceleração da apoptose no grupo tratado com soro urêmico (Figura 3).

Na presença do CAM as medianas dos índices apoptóticos foram significativamente superiores nos três ensaios, 49%, 57,5% e 42%, comprovando o efeito indutor de apoptose dessa droga sobre o PMN de cães descrito por Nagami et al. (2002). Esse efeito indutor de apoptose do CAM já havia sido descrito em estudos realizados com linfócitos humanos (DOLZHANSKIY e BASCH, 1995), porém não em PMN.

Não foi verificada correlação significativa entre o índice apoptótico e a capacidade dos PMN reduzirem o NBT (Figuras 1 e 2). Este resultado diverge de estudo feito em humanos (SELA et al., 2005), porém coincide com as observações de Cendoroglo et al. (1999) que não constataram correlação entre a apoptose e a produção de superóxido de PMN humano ativado

com PMA. No presente estudo, a metade das amostras incubadas com soro urêmico apresentou decréscimo na produção de superóxido e a totalidade destes teve aumento do índice apoptótico, resultados que sustentam a afirmação de Whyte et al. (1993) de que células em apoptose tem seu funcionamento comprometido, inclusive diminuindo sua capacidade de produção de superóxido. Diferentemente, dentre as amostras incubadas com soro urêmico que apresentaram aumento do metabolismo oxidativo, apenas metade apresentaram aceleração da apoptose. Estes resultados colaboram também com a hipótese de Cendoroglo et al. (1999) de que na fase inicial da uremia ocorra um aumento do metabolismo oxidativo dos PMN, de modo que as substâncias oxidantes produzidas se acumulam e causam, apenas numa fase mais tardia, dano celular que induz a aceleração da apoptose e consequente diminuição da produção de superóxido.

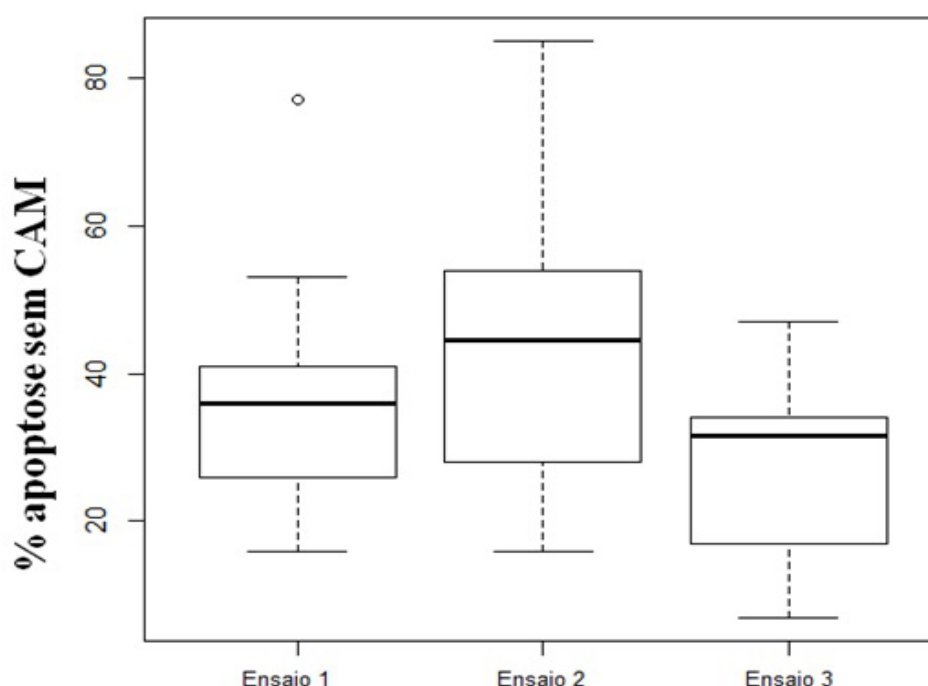


Figura 3 - Porcentagem do índice apoptótico sem CAM, com 4 horas de incubação, de dez cães hígidos submetido a diferentes ensaios (box-plot): Utilização dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) isolados e incubados com plasma autólogo (ensaio 1); PMN isolados e incubados com plasma homólogo sadio (ensaio 2) e PMN isolados e incubados com soro homólogo urêmico (ensaio 3).

## CONCLUSÃO

Conclui-se que devido a grande heterogeneidade funcional dos PMN o efeito *in vitro* das toxinas urêmicas sobre o metabolismo oxidativo e a apoptose é parcial e dependente do tempo de incubação.

## AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo auxílio financeiro (Proc. 2007/06214-1) e bolsa de iniciação científica concedida (Proc. 2010/07719-2).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDING, K. et al. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v.18, p.2067-2073, 2003.
- BARBOSA, T.S. et al. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, p.1352-1358, 2010.
- BATISTA, J.J. et al. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticóide. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, p.457-464, 2005.
- CAMPOS, P.P. et al. Apoptose no placentomo de cabras gestantes intoxicadas experimentalmente com cipó-preto – *Tetraptery multiglandulosa*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, p.19-24, 2004.
- CENDOROGLIO, M. et al. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v.10, p.93-100, 1999.
- CIARLINI, P.C. et al. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, p.323-327, 2004.
- DiBARTOLA S.P. Abordagem clínica e laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.1686-1720.
- DOLZHANSKIY, A.; BASCH R.S. Flow cytometric determination of apoptosis in heterogeneous populations. **Journal Immunological Methods**, Philadelphia, v.180, p.131-140, 1995.
- EMANUELLI, M.P. **Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *Escherichia coli***. 2007. 38p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. 735p.
- FREITAS, M. et al. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**, Philadelphia, v.41, p. 570-575, 2008.
- GASTALDELLO, K. et al. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v.15, p.1638-1646, 2000.
- HIRAYAMA, A. et al. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidine compounds. **Journal of the American Society Nephrology**, Washington, v.11, p.684-689, 2000.
- JABER, B.L. et al. Apoptosis of leukocytes: Basic concepts and implications in uremia. **Kidney International**, St. Louis, v.59, p.197-205, 2001.
- KANNAN, K.; JAIN S.K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, Philadelphia, v.7, p.153-163, 2000.
- KEEGAN, R.F.; WEBB, C.B. Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v.24, p.514-519, 2010.
- KERR, M.G. **Exames laboratoriais em**

- medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia veterinária.** 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.
- KROLOVA, S. et al. Polymorphonuclear function in naturally occurring renal failure in dogs. **Veterinarni Medicina**, Praga, v.54, p.236-243, 2009.
- LUSTOZA, M.D. **Avaliação do estresse oxidativo em cães com insuficiência renal crônica e anemia.** 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MAJEWSKA, E. et al. Effects of uraemia and haemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v.18, p.2582-2588, 2003.
- METCALF, J.A. et al. Preparation of cells and materials for functional assays. In:\_\_\_\_. **Laboratory manual of Neutrophil Function.** Raven Press: New York., 1986. p.87-143.
- NAGAMI, K. et al. *In Vitro* cytotoxicity assay to screen compounds for apoptosis-inducing potential on lymphocytes and neutrophils. **The Journal of Toxicological Sciences**, Sendai, v.27, p.191-203, 2002.
- POLI, G. et al. Nitroblue tetrazolium (N.B.T) test nel cane. **Folia Veterinaria Latina**, Milão, v.3, p.215-219, 1973.
- SARDENBERG, C. et al. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v.21, p.160-165, 2006.
- SARNAK, M.J.; JABER, B.L. Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. **Kidney International**, St. Louis, v.58, p.1758-1764, 2000.
- SELA, S. et al. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. **Journal of the American Society Nephrology**, Washington, v.16, p.2431-2438, 2005.
- THRALL, M.A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária.** São Paulo: Roca, 2007. 582p.
- TREVELIN, S.C. et al. Efeito do plasma rico em uréia sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de cães domésticos. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.15, p.97, 2008.
- TRINCONI, C.M. et al. Efeito do plasma rico em uréia sobre a apoptose de neutrófilos de cães. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.18, p.432-440, 2011.
- VUORTER, J. et al. Standardization of a flow cytometric assay for phagocyte respiratory burst activity. **Scandinavian Journal of Immunology**, Malden, v.43, p.329-334, 1996.
- WARD, R.A.; McLEISH, K.A. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. **Journal of the American Society Nephrology**, Washington, v.5, p.1697-1702, 1995.
- WEBB, C. et al. Neutrophil function in septic dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v.21, p.982-989, 2007.
- WHYTE, M.K.B. et al. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.50, p.5124-5134, 1993.