



UNIVERSIDADE DE
vassouras

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Mestrado Profissional em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina
Veterinária

WALDEMAR TAVARES MACHADO NETO

**RELATÓRIO TÉCNICO/CIENTÍFICO:
PADRONIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE
FLUXO PARA ANÁLISE DO ESTRESSE
OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS EM
FELINOS SADIOS**

Vassouras
2019

WALDEMAR TAVARES MACHADO NETO

**RELATÓRIO TÉCNICO/CIENTÍFICO:
PADRONIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE
FLUXO PARA ANÁLISE DO ESTRESSE
OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS EM
FELINOS SADIOS**

Relatório técnico/científico apresentado a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação e Pesquisa / Coordenação do Mestrado Profissional em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária.

Orientadora:

Prof. Dr. Renata Fernandes Ferreira, Universidade de Vassouras
Doutora pela Universidade Federal Fluminense

Co-Orientadora:

Dr. Sheila de Oliveira Medeiros, UFRJ
Doutora pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Vassouras
2019

WALDEMAR TAVARES MACHADO NETO

**RELATÓRIO TÉCNICO/CIENTÍFICO:
PADRONIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE
FLUXO PARA ANÁLISE DO ESTRESSE
OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS EM
FELINOS SADIOS**

Relatório técnico/científico apresentado a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação e Pesquisa / Coordenação do Mestrado Profissional em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária.

Banca:

Orientadora:

Prof. Dr. Renata Fernandes Ferreira, Universidade de Vassouras
Doutora pela Universidade Federal Fluminense – RJ, Brasil.

Prof. Dr. Bruna de Azevedo Baêta, Universidade de Vassouras
Doutora pela Universidade Rural do Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Prof. Dr. Larissa Alexandra da S. Neto Trajano, Universidade de Vassouras
Doutora pela (Universidade do Estado do Rio de Janeiro– RJ, Brasil)

Prof. Dr. Gracy Canto Gomes Marcello, UCB
Doutora pela Universidade Federal Fluminense – RJ, Brasil.

Vassouras

2019

Dedico esse trabalho aos pacientes felinos, que despertaram em mim o verdadeiro dom da medicina veterinária, do estudo e da pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS

Ao longo da minha vida e da realização deste trabalho pessoas especiais estiveram ao meu lado:

Primeiramente aos meus pais e minha irmã que me ensinaram o carinho pelos animais. Por estarem ao meu lado, e pelo exemplo de vida que sempre foram para mim.

Ao meu companheiro João Vichthor por estar ao meu lado em todos os momentos sempre com carinho, amor e paciência.

Ao meu amigo Marcos Cruz que sempre me incentivou desde a graduação, e principalmente no desenvolvimento deste mestrado.

Ao meu eterno amigo Luiz Carlos Rocha, que mesmo enquanto eu não acreditava, sempre teve muita certeza do meu potencial profissional e acadêmico.

Aos meus amigos e sócios, Bianca Couto e Carlos Gabriel que sempre me apoiaram, me incentivaram e lutaram junto comigo, me proporcionando a possibilidade de estar presente nas aulas e no laboratório, para que toda pesquisa fosse realizada.

A Professora Maria Fernanda que me abriu as portas do mestrado na Universidade de Vassouras/RJ, e me orientou durante boa parte deste projeto.

A Professora e amiga Márcia Torres por todo carinho, contribuição e incentivo durante os dois anos de mestrado.

A Professora e orientadora Renata Ferreira que desde o início se colocou totalmente a disposição para qualquer ajuda na execução técnica deste projeto. Sua orientação e seu incentivo foram de fundamental importância para que eu tivesse forças para concluir e acreditar na importância da minha pesquisa.

Ao pesquisador Zilton Vasconcelos do Laboratório de Alta Complexidade do Instituto Fernandes Figueira/ FIOCRUZ/RJ, sua inteligência e suas ideias foram importantíssimas para a execução técnica dessa pesquisa.

Ao pesquisador Rodrigo Delvecchio do Laboratório de Biologia Molecular da UFRJ, pela sua indispensável contribuição, paciência e colaboração na execução dos ensaios e leituras no citômetro de fluxo, sem ele os ensaios não seriam possíveis.

A querida amiga e professora Gracy Canto, junto com todos seus colaboradores do Especilab/RJ, que sempre se mostraram disponíveis durante este experimento.

Por fim, gostaria de agradecer a uma pessoa doce e incrível e a mais importante na realização deste trabalho. Uma pessoa que me ensina desde a graduação. Além de orientadora é uma grande amiga, Doutora Sheila Medeiros, sou muito grato pelas suas ideias e por sempre estar ao meu lado desde a primeira conversa, até a última orientação a respeito do tema.

*“Amados gatos, somos gratos por compartilhar a sua vida conosco, por nos
devotar cuidados. É uma honra ajuda-los, orientá-los e ampará-los com as nossas
energias e talentos para a cura. Que sempre encontremos tempo para dividir com vocês
uma poltrona para ronronar de prazer” ...**Kate Solisti***

RESUMO

O aumento dos felinos pelo mundo tem aproximado as doenças infecciosas e suas manifestações imunossupressoras dos consultórios veterinários. Algumas importantes doenças infecciosas em felinos tem como principais manifestações os distúrbios leucocitários, mais especificamente na linhagem dos neutrófilos. Para tal, foi determinada a concentração ideal dos reagentes dihidrorodamina 123 (DHR 123) e Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a partir de uma metodologia já utilizada no diagnóstico de doenças na medicina humana. Por meio de citometria de fluxo, o Índice de Estimulação de Fluorescência (IE) dos neutrófilos dos felinos foi determinado a partir da leitura da sonda de fluorescência da amostra estimulada com DHR e PMA, dividido pela leitura da sonda de fluorescência da amostra estimulada com DHR. Conclui-se que os resultados foram condizentes para a funcionalidade do exame e a possibilidade da sua utilização em novas pesquisas ou na rotina clínica como apoio diagnóstico aos distúrbios dos neutrófilos dos pacientes felinos.

Palavras-chave: estresse oxidativo, citometria de fluxo, neutrófilos, imunossupressão

ABSTRACT

The increase of felines around the world nears veterinary medicine to dangerous immunologic diseases of this species. Important infectious diseases in felines have the most manifestations are leukocyte disturbances, more specifically in neutrophils lineage. This study aims to standardize the burst oxidative exam of feline neutrophils. For this purpose, was determined the proper concentration of reagents dihidrorodamina 123 (DHR 123) e Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). The trials was based on a human medicine protocol. Using flow cytometry, the feline neutrophils mean fluorescence intensity was determined by the fluorescence measurement of the sample stimulated with DHR and PMA divided by the fluorescence measurement of the sample stimulated with DHR. It was concluded that the results were consistent for confidence in the exam and be possible its use in new research or as diagnostic support in the feline medicine routine for the neutrophil disorders.

Key-words: burst oxidative, flow cytometry, neutrophils, immunosuppression

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVOS.....	11
3	RELATÓRIO E DESCRIÇÃO TÉCNICA DO PRODUTO.....	12
4	POSSÍVEIS APLICABILIDADES DO PRODUTO.....	19
5	CONCLUSÃO.....	20
6	REFERÊNCIAS.....	21
7	ANEXOS.....	22

1. INTRODUÇÃO

A medicina felina está em franca evolução no Brasil e no mundo, isso se dá pela necessidade atual da sociedade em interagir com um *pet* mais sofisticado, original e menos subserviente a domesticação humana. Essa preferência pelos felinos vem gerando um grande aumento domiciliar dos gatos e conseqüentemente a aproximação das doenças mais comuns dessa espécie (GLEICH et al., 2009 E LITTLE, 2012). A prevalência de doenças infecciosas dos felinos está diretamente ligada ao tipo de habitat em que o animal vive. Normalmente países desenvolvidos possuem uma taxa maior em prevalência de doenças de caráter agudo ou crônico e compatível com a idade do paciente, por outro lado os países menos desenvolvidos, que mantêm os gatos em ambientes superpopulosos, aglomerados, em vida livre e até semi domiciliados, são as regiões que mais sofrem com a altas taxas de prevalência das doenças infecciosas fatais para os felinos (GLEICH et al.,2009).

Algumas importantes doenças dos felinos têm como consequência à imunossupressão que muitas vezes pode estar associada às desordens leucocitárias. Os pacientes infectados pelo FeLV (Vírus da Leucemia Felina) tem alta taxa de morbidade e mortalidade em decorrência de doenças secundárias a imunossupressão que o vírus causa. O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) tem patogenia imunossupressora bastante similar ao HIV (Human Immunodeficiency Virus), dessa maneira é uma doença de importância veterinária que sob vários aspectos pode servir de modelo para os distúrbios imunológicos humanos (LEVY et al., 2008).

Os neutrófilos correspondem à primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Após um desafio (infecção/trauma) são as primeiras células a chegar no local da inflamação, executando uma tentativa essencial de destruição de possíveis micro-organismos (BRINKMANN E ZYCHLISKY, 2007). Eles constituem aproximadamente de 60 a 75% dos leucócitos na maioria dos carnívoros, dessa forma deficiências na função dos neutrófilos podem ocasionar infecções severas e fatais caso não sejam descobertas e tratadas (TIZARD, 2002). A ativação de um neutrófilo e sua capacidade oxidativa, aqui chamado de estresse/burst, é uma das principais funções que essa linhagem desempenha contra os patógenos. Dessa maneira, frente a um desafio infeccioso, receptores específicos de membrana são capazes de ativar o sistema enzimático (NADPH) oxidase, iniciando um processo de redução de O₂, com formação de ânions superóxidos e espécies reativas de oxigênio

(EROs). O estresse oxidativo com formação das EROs da linhagem neutrofílica tem um papel essencial na imunidade inata contra patógenos invasores (CHEN E JUNGER, 2012).

Em humanos os distúrbios na capacidade oxidativa dos neutrófilos são relatados na doença granulomatosa crônica (DGC) (ARNOLD E HEIMALL, 2017) e em infecções causadas por vírus RNA, como por exemplo, Hepatite viral, Influenza, HIV e Betanovírus (RESHI et al.,2014).

Na medicina veterinária são escassos os trabalhos que avaliam especificamente o estresse oxidativo dos neutrófilos dos felinos com estimulação através dos reagentes dihydrorodamina 123 (DHR 123) e Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Em cães sabe-se que o estresse oxidativo se torna aumentado em pacientes com doença renal crônica (DRC), acelerando a apoptose e induzindo a diminuição nas taxas dos neutrófilos (SILVA et al., 2013). Existem alguns estudos que avaliam o estresse oxidativo dos neutrófilos em gatos ambos realizados no Colorado/EUA, com estimulação dos neutrófilos “in vitro” através de conjugado liofilizado de *Escherichia coli*. No primeiro foram realizados exames em 20 gatos já diagnosticados com DRC, e assim como nos cães foi observada uma taxa maior de produção de EROs pelos neutrófilos dos gatos com DRC, mas sem alteração em seu desempenho funcional (estresse oxidativo). (KEEGAN E WEBB, 2010). O segundo estudo compara o estresse oxidativo entre um grupo de gatos portadores de Diabetes mellitus (DM) tipo 2 e um grupo controle, com o resultado de menor produção de EROs pelos felinos portadores de DM tipo 2 (WEBB E FALKOWSKI, 2008). Segundo outro estudo que avalia a capacidade oxidativa de gatos infectados agudamente pelo vírus da FIV, a infecção aguda aumenta o estresse oxidativo prejudicando os neutrófilos, mas logo após essa viremia aguda, a função dos neutrófilos retorna ao normal, como antes da infecção aguda pelo vírus e conclui o trabalho pontuando a necessidade de uma investigação maior com resultados mais profundos, sugerindo que o estresse oxidativo pode se alterar em outras condições patológicas dos pacientes felinos (WEBB, et al. 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo foi padronizar a metodologia do exame funcional de estresse oxidativo em neutrófilos de felinos utilizando citometria de fluxo, a partir de um protocolo já utilizado na rotina de diagnóstico laboratorial em medicina humana.

2.2. Objetivos específicos

Padronizar o exame de estresse oxidativo em neutrófilos de felinos através da citometria de fluxo.

Observar cada etapa da metodologia, para analisar e identificar possíveis alterações provenientes da utilização de uma amostra diferente da utilizada na rotina de exames em humanos (sangue de felinos).

Realizar testes e ensaios capazes de mensurar a quantidade correta de cada solução e reagentes utilizados durante o passo a passo do protocolo para o exame com amostra de sangue de felinos.

Após ensaio e preparo da amostra de sangue de felinos e leitura no citômetro de fluxo, o objetivo é obter gráficos de fluorescência adequados para a leitura e mensuração possibilitando a análise dos resultados provenientes do exame funcional do estresse oxidativo dos neutrófilos de felinos.

3. RELATÓRIO E DESCRIÇÃO TÉCNICA DO PRODUTO

3.1. Modelo de ensaio realizado em humanos

Para o exame em humanos é utilizado 25µL de sangue em três microtubos de análise (Tubo branco, Tubo DHR e Tubo DHR+PMA). Inicialmente as hemácias do sangue foram lisadas com a solução de lise de hemácias. Para a lise foram adicionados 750µL de solução de lise de hemácias nos 25µL de sangue, agitado com auxílio de um vórtex e deixado reagir por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período o material foi centrifugado por 7 minutos a 450G para que se forme o agregado leucocitário no fundo do microtubo. O sobrenadante deve ser descartado sendo realizadas duas lavagens com 1000µL de PBS, repetindo-se a centrifugação anterior para remoção dos resíduos provenientes da etapa de lise das hemácias. Com as amostras livres de hemácias são adicionados 5µL de DHR na concentração 10µL/ml ao tubo DHR e ao tubo DRH+PMA e em seguida 10µL de PMA na concentração de 20µL/ml somente ao tubo DRH+PMA e incubado durante 15 minutos em banho Maria a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 400µL de PBS em cada microtubo e em seguida pelo menos 5000 eventos celulares na população de neutrófilos devem ser adquiridos e analisados no Citômetro de Fluxo Attune (Thermo Scientific). Para mensuração do índice de estimulação de fluorescência (IE) dos neutrófilos, é feito um cálculo a partir da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI). O resultado de IE é obtido pela divisão da MFI da amostra de DHR+PMA, dividido pela MFI da amostra tratada somente com DHR. ($IE = MFI_{DHR+PMA} / MFI_{DHR}$).

3.2. Ensaio com sangue de felinos sadios

3.3. Coleta

3.3.1. Para coleta é necessário que o sangue seja acondicionado em tubo com heparina, coletado por veno punção.

3.4. Soluções

3.4.1. Solução tampão fosfato (PBS): É uma solução isotônica com finalidade de diluente, não tem capacidade de alterar as células.

A preparação da solução tampão fosfato é feita utilizando 85g de cloreto de sódio, 15,5g de Fosfato de sódio dibásico, 2,3g de Fosfato de sódio monobásico diluídos em 1000mL de água destilada.

3.4.2. Solução de lise das hemácias: A destruição da linhagem eritrocitária é essencial para não atrapalhar a leitura das linhagens leucocitárias.

A preparação da solução de lise é feita utilizando 40,1g de cloreto de amônia, 4,2g de bicarbonato de sódio e 1,95g sw EDTA diluídos em 500mL de água destilada.

3.5. Reagentes

3.5.1. PMA – Phorbol 12-Myristate 13-Acetate: É um potente ativador da linhagem neutrofílica.

É um reagente que estimula o complexo enzimático NADPH oxigenase presente nos neutrófilos, desencadeando a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs).

3.5.2. DHR – Dihydrorodamina 123: É um indicador fluoróforo na presença espécies reativas de oxigênio (EROs).

Após o PMA estimular a formação das EROs, estas são capazes de converter dihydrorodamina em rodamina 123 promovendo fluorescência ideal para leitura e mensuração no citômetro de fluxo.

Inicialmente foi realizada uma reação com amostra proveniente de um felino saudável, a fim de validar a metodologia para o exame nesta espécie.

Durante o primeiro ensaio, após as primeiras etapas observamos pellets avermelhados e os resultados apresentados pelo citômetro indicava uma alta presença de resíduo que parecia debris celulares, provavelmente proveniente de linhagem eritrocitária de uma etapa de lise pouco eficaz (750µL de solução de lise de hemácias adicionadas em 25µL de sangue em cada microtubo). Então um novo ensaio foi realizado com uma mudança na etapa de lise das hemácias da amostra de felinos, foi

instituído um aumento da solução de lise de 750 μ L para 1000 μ L adicionado em 25 μ L de sangue em cada microtubo e os resultados, visuais e após leitura em citômetro foi mais satisfatório sem a presença de debris e celularidade atrapalhando a leitura, ficando determinado então a utilização de 1000 μ L de solução de lise para os próximos ensaios.

Um novo ensaio foi realizado e os resultados apresentados pelo citômetro podem ser demonstrados em dois tipos de gráficos: “Dot Plot” (representado na figura 1A e 1B) e histograma (representado na figura 1C).

O “Dot plot” é um gráfico onde dois parâmetros são analisados simultaneamente a complexidade celular (eixo Y) e o tamanho celular (eixo X). No caso do resultado apresentado na figura 1A e 1B, podemos observar a localização dos neutrófilos no gráfico e observar os parâmetros de tamanho e complexidade. Como os neutrófilos portam uma grande quantidade de grânulos, eles apresentam uma maior complexidade quando comparados com outras linhagens do sangue como linfócitos e monócitos. Sendo assim observa-se a região que na figura foi identificada como gate P3 que apresenta uma grande quantidade de eventos celulares com maior complexidade e tamanho celular intermediário entre linfócitos (P2) e monócitos (P4).

É possível notar nas figuras 1A e 1B, que os neutrófilos (P3), após ativação pelo PMA (1B), diminuem consideravelmente sua complexidade celular quando comparados a figura 1A. Provavelmente, essa diminuição acontece devido à liberação do conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos.

O gráfico de histograma (1C) apresenta como parâmetros o número de células (eixo Y) e a fluorescência no comprimento de onda no eixo X. Dessa forma, quanto maior o número de células em determinada fluorescência maior será o pico do gráfico e quanto maior a fluorescência do evento celular, mais para a direita se localizará esse evento. De acordo com a figura 1C, percebe-se que o tubo branco, o qual não recebeu nenhum dos reativos apresenta uma média de fluorescência baixa, comparável ao tubo que recebeu apenas DHR. No entanto o tubo que recebe os reativos DHR e PMA, ocorre uma conversão de sonda em

rodamina 123 exacerbada (acima de 10^7), com pico de fluorescência (62,2%) fora dos limites de leitura do gráfico não sendo possível mensurar o IE.

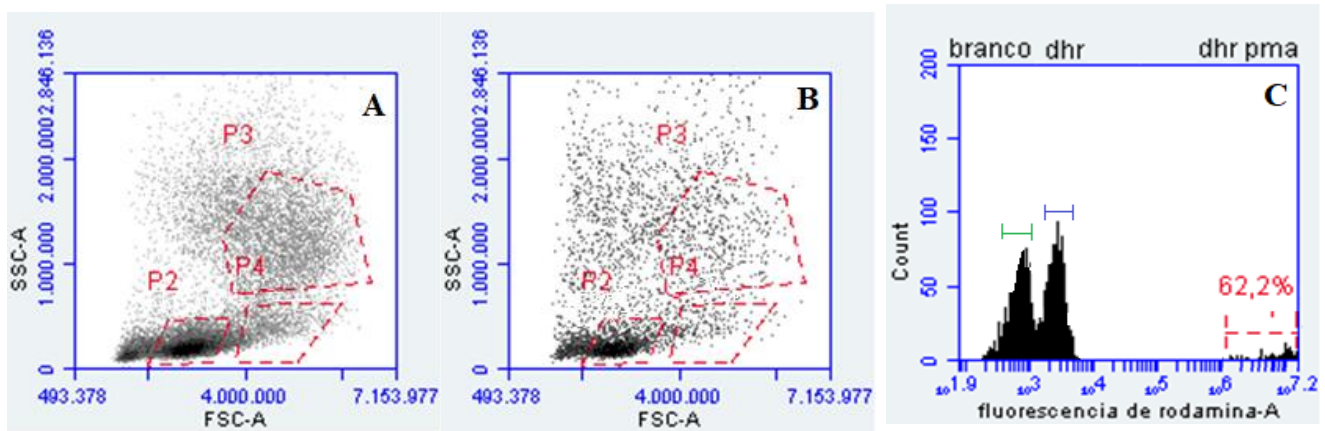


Figura 1: A: Dot Plot referente à aquisição de células de sangue periférico, o gate P3 é referente à região dos neutrófilos tratados apenas com dihydrorodamina 123 (DHR 123). B: Dot Plot referente à aquisição de células de sangue periférico, o gate P3 é referente à região dos neutrófilos tratados com DHR123 e estimulados com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) pode-se observar que há uma diminuição da complexidade interna dos neutrófilos em comparação com ao gráfico A (tratado apenas com DHR123). C: Histograma referente à fluorescência presente nas células do gate P3, sendo a curva verde referente ao tubo branco (sem reagentes), azul do tubo tratado com DHR123 e o vermelho tratado com DHR123 e estimulado com PMA.

Para definir a melhor concentração dos reagentes e evitar essa fluorescência exacerbada (figura 1C) que compromete a interpretação dos dados, foi necessário ensaios com diluições para padronização da concentração de DHR123 e de PMA.

Para os ensaios de padronização de DHR123 foram usadas quatro diferentes diluições a partir da alíquota de 10 μ g/ml (1x, 1:5, 1:10, 1:20). De acordo com a figura 2 ficou claro que ao aumentar a concentração de DHR123, ocorre um aumento significativo do índice de estimulação de fluorescência (IE) após leitura no citômetro de fluxo. A amostra tratada com diluição 1:20 de DHR123 (2D) apresentou um valor do IE de 34, a amostra tratada com diluição 1:10 de DHR (2C) apresentou um valor de IE de 94, a amostra tratada com diluição 1:5 de DHR (2B) apresentou um valor de IE de 206 e a amostra tratada com diluição 1x apresentou IE de 452 (2A). Com isso, fica evidente que diluições menores de DHR123 (2

C e 2D) não geram a formação adequada de espécies reativas de oxigênio e que, conseqüentemente, diminuem o índice de estimulação de fluorescência. Por outro lado, diluições maiores de DHR123 (2A) podem provocar IE muito alto. Dessa forma a amostra mais adequada foi a tratada com diluição de 1:5 (2B) de DHR123 que apresentou um valor de IE de 206.

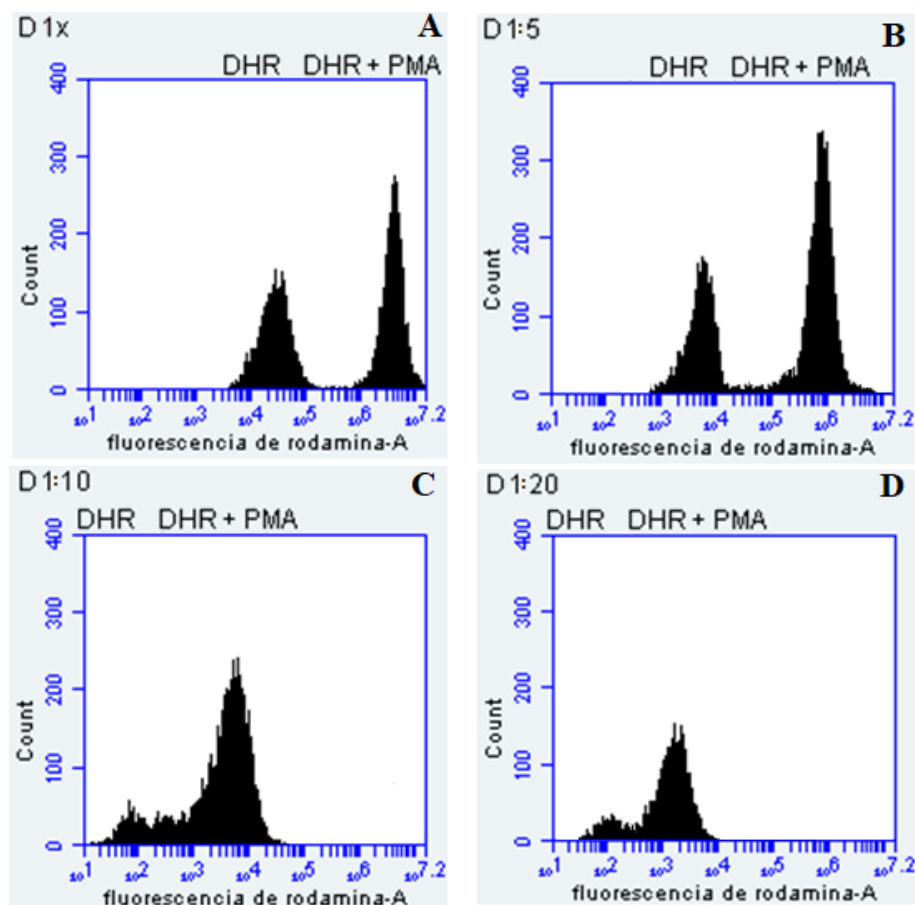


Figura 2: Os gráficos demonstram a fluorescência das amostras utilizadas para a padronização da concentração de dihidrorodamina 123 (DHR), o primeiro pico é referente a fluorescência da amostra tratada com DHR e o segundo pico é referente a fluorescência da amostra tratada com DHR e estimulada com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). A: ensaio realizado na diluição 1x de DHR123. B: ensaio realizado na diluição 1:5 de DHR123. C: ensaio realizado na diluição 1:10 de DHR123. D: ensaio realizado na diluição 1:20 de DHR123.

O objetivo dos ensaios para padronizar o PMA foi verificar qual a concentração é suficiente para estimular o complexo NADPH oxigenase a produzir EROs para conversão de dihidrorodamina em rodamina 123. Para os ensaios de padronização de PMA foram utilizadas duas diferentes concentrações (40ng/ml e 40 µg/ml). De acordo com a figura 3 ficou claro que ao diminuir a concentração de PMA, ocorreu uma reação mínima (5,2%) na sonda de fluorescência (A), diferentemente no ensaio com a concentração maior (40µg/ml) que revelou um percentual de fluorescência adequada (B).

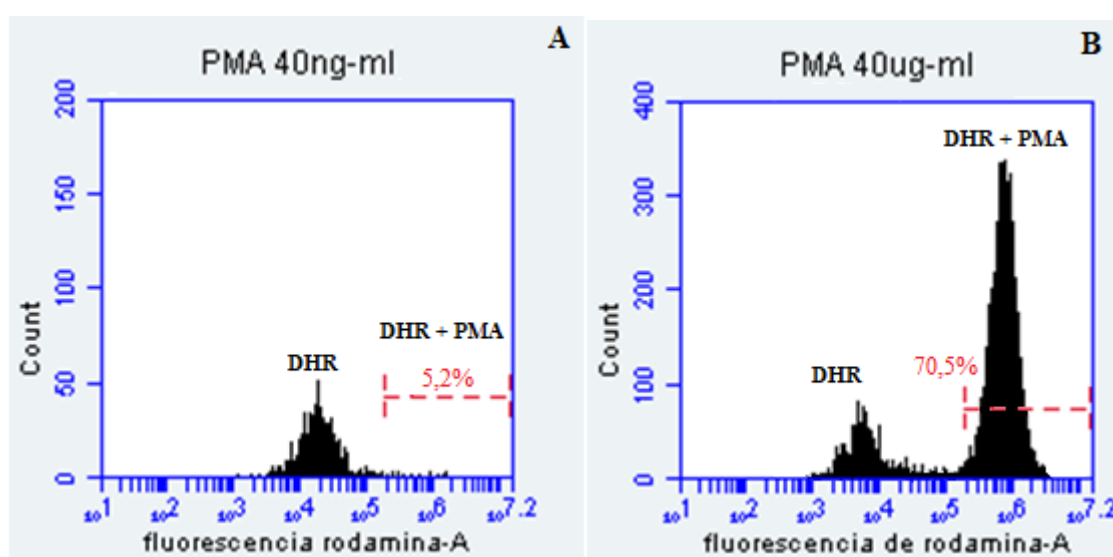


Figura 3: Os gráficos demonstram a fluorescência das amostras utilizadas nos ensaios para a padronização da concentração de Phorbol 12-myristate 13-acetate PMA. O primeiro pico de ambos os gráficos refere se à fluorescência da amostra tratada somente com dihidrorodamina 123 DHR e a marcação vermelha corresponde ao percentual de estimulação da sonda de fluorescência da amostra tratada com DHR e PMA. A: ensaio realizado com a concentração de 40ng/ml de PMA. B: ensaio realizado com a concentração de 40µg/ml de PMA

Com o ajuste da solução de lise de hemácias, e os reagentes DHR123 e PMA apresentando índices de estimulação de fluorescência compatíveis para a análise em citometria de fluxo para o estresse oxidativo dos neutrófilos dos felinos (KEEGAN E WEBB, 2010), é possível a elaboração do produto técnico desenvolvido nesta pesquisa: Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na avaliação do estresse oxidativo dos neutrófilos em felinos.

3.6. PRODUTO TÉCNICO:

ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS EM FELINOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

3.6.1. Indicação do Exame

A determinação da capacidade oxidativa (estresse) dos neutrófilos é útil para avaliação da função dessas células no organismo.

3.6.2. Princípio

O Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) é um reagente que estimula o complexo enzimático NADPH oxigenase presente nos neutrófilos, desencadeando a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Após o PMA estimular a formação das EROs, estas são capazes de converter dihydrorodamina (DHR) em rodamina 123 promovendo fluorescência ideal para leitura e mensuração no citômetro de fluxo.

3.6.3. Amostra

Tipos de amostra

Usar sangue total de felinos acondicionados em heparina.

Armazenamento e estabilidade da amostra

O analito é estável no sangue por no máximo 24 horas em temperatura de refrigeração.

Volume mínimo e ideal

25µL mínimo, 50µL ideal

3.6.4. Identificação

Para cada paciente são identificados 3 microtubos

01: (Branco/controle);

02: DHR;

03: DHR + PMA.

Adicionar 25µL de sangue aos microtubos.

3.6.5. Lise das hemácias

Adicionar 1000µL de solução de lise de hemácias;

Homogeneizar no vórtex os microtubos;

Em temperatura ambiente, aguarde 15 minutos.

3.6.6. Lavagem

Centrifugar a 300G por 5 minutos;

Desprezar o sobrenadante;

Ressuspender os Pellets;

Adicionar 1ml de PBS nos microtubos;

Homogeneizar no vórtex os microtubos;

Centrifugar a 300G por 5 minutos;

Desprezar o sobrenadante.

3.6.7. Adição dos reagentes

Adicionar 1,7µg/ml de DHR ao tubo DHR e ao tubo DHR+PMA;
Adicionar 40µg/ml de PMA ao tubo DHR+PMA.

3.6.8. Leitura e mensuração em citometria de fluxo

Antes da leitura no citômetro, adicionar em cada microtubo 50µL de PBS;

Para mensuração do índice de estimulação de fluorescência (IE) dos neutrófilos, é feito um cálculo a partir da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI). O resultado de IEF é obtido pela divisão do MFI da amostra de DHR+PMA, dividido pelo MFI da amostra tratada somente com DHR.

$$\text{IE} = \text{MFI DHR+PMA} / \text{MFI DHR}$$

4. POSSÍVEIS APLICABILIDADES DO PRODUTO

O produto técnico tem aplicabilidade no setor de patologia clínica, que terá a possibilidade de fornecer ao clínico veterinário um apoio diagnóstico mais amplo, que vai além da contagem dos leucócitos (avaliação quantitativa) realizado diariamente na rotina das clínicas veterinárias. Sendo assim, nosso produto permite a aplicação da metodologia para mensurar a capacidade oxidativa dos neutrófilos, possibilitando a análise funcional de uma importante linhagem celular do sistema imunológico dos felinos.

A aplicação do exame dos neutrófilos através do nosso produto técnico pela avaliação qualitativa pode ser considerada como índice prognóstico nos distúrbios neutrofílicos dos felinos, possibilitando a execução de procedimentos cirúrgicos, procedimentos farmacológicos (ex: uso de corticoterapia em pacientes imunossuprimidos), vacinação e outros desafios imunológicos que o paciente necessite ser submetido.

Por fim, outra possível aplicação do nosso produto técnico é diretamente sobre as pesquisas. Cada vez mais as doenças que desencadeiam distúrbios relacionados ao sistema imunológico são temas de descobertas em pesquisas ao redor do mundo e nossa metodologia abre portas para todos os interessados em aplicar nosso protocolo de estudo dos neutrófilos, sendo um produto técnico desenvolvido especificamente para a espécie felina.

5. CONCLUSÃO

A utilização de uma metodologia para um exame já executado na rotina no diagnóstico de importantes doenças na medicina humana foi fundamental para o desenvolvimento do produto técnico desta pesquisa. Com todos os ensaios realizados neste trabalho podemos concluir que a metodologia funcional utilizando o PMA para a reação de estímulo ao estresse oxidativo dos neutrófilos dos felinos pela conversão da fluorescência a partir do DHR 123, apresentaram leitura, gráficos e resultados condizentes com a literatura, demonstrando a funcionalidade do exame para a espécie felina e a possibilidade da sua utilização em novas pesquisas ou até na rotina clínica auxiliando na detecção de distúrbios imunológicos na linhagem neutrofílica dos felinos.

6. REFERÊNCIAS

- ARNOLD, D., HEIMALL, J. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Advances in Therapy Journal* (2017) 34 pp. 2543–2557.
- BRINKMANN, V., ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature, England*, v.5, p.577-582, Ago. 2007.
- CHEN, Y., JUNGER, W.G. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods in Molecular Biology*. 2012, 844, 115–124.
- GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 11, n. 12, p. 985–992, 2009.
- GREENE. *Doenças infecciosas em cães e gatos*. 4. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015
- KEEGAN, R., WEBB, C. Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24:514-519. 2010
- LEVY, J., CRAWFORD, C., HARTMANN, K. ; HOFMANN-LEHMANN, R. ; LITTLE, S. ; SUNDAHL, E. ; THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 10, n. 3, p. 300–316, 2008. doi: 10.1016/j.jms.2008.03.002.
- LITTLE, S. E. *The Cat Clinical Medicine & Management*. 1. ed. Missouri: Elsevier, 2012
- RESHI, M., SU, Y., HONG, J., RNA viruses:ROS-mediated cell death. *International Journal of Cell Biology*. p. 1-16. vol. 2014.
- SILVA, C., ALMEIDA, B., SOEIRO C., FERREIRA W., LIMA V., CIARLINI P. Oxidative stress, superoxide production and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 77 (2013), pp. 136-141.
- SILVA, C., ALMEIDA, B., SOEIRO C., FERREIRA W., LIMA V., CIARLINI P. Estresse oxidativo e aumento da apoptose em neutrófilos de cães com azotemia pré-renal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.65, n.1, p.163-170, 2013.
- TIZARD, I.A. *Imunologia Veterinária. Uma Introdução*. 6.ed. São Paulo: Roc, 2002. p. 154-167.
- WEBB, CB, FALKOWSKI, L. Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2008;11:271–276
- WEBB C, LEHMAN T, MCCORD K, AVERY P, DOW S: Oxidative stress during acute FIV infection in cats. *Veterinary Immunology and immunopathology* 2008, 122: 16-24.

7. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL

1. **NOME:**
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:** **SEXO:** M F
- DATA DE NASCIMENTO**/...../.....
- ENDEREÇO:**..... N° APT.....
- BAIRRO:** **CIDADE:**
- CEP:** **TELEFONE:** (.....).....
-

DADOS SOBRE A PESQUISA

2. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**
- PADRONIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS EM FELINOS SADIOS**
- PESQUISADORES:** Waldemar Tavares Machado Neto, Sheila de Oliveira Medeiros e Renata Fernandes Ferreira.
- CARGO/FUNÇÃO:** Aluno de Mestrado da Universidade de Vassouras/Pesquisadora da UFRJ/Orientadora e professora da Universidade de Vassouras.
3. **Departamento:** Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Medicina Veterinária
4. **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**
- RISCO MÍNIMO** **RISCO MÉDIO**
- RISCO BAIXO** **RISCO MAIOR**
- DURAÇÃO DA PESQUISA :** 2 anos.
5. **INFORMAÇÕES SOBRE O PROTOCOLO**

Essas informações são fornecidas para a participação voluntária de um animal da sua propriedade ou sob sua direta responsabilidade neste assunto, que visa identificar o comportamento dos neutrófilos dos felinos.

Seu animal será examinado durante a consulta como de costume. Todos os exames aqui realizados são realizados rotineiramente como parte dos exames laboratoriais de rotina de pacientes felinos. Como parte anexo da pesquisa solicitamos a autorização para coleta de uma alíquota de sangue para que seja avaliada com fins de identificação da atividade dos neutrófilos. Este procedimento não envolve a participação do animal ou do proprietário, uma vez que a coleta tenha sido autorizada.

Os procedimentos de coleta de sangue serão realizados pelo Médico Veterinário Waldemar Tavares Machado Neto, clínico exclusivo de felinos e mestrando neste projeto.

O desconforto produzido pela coleta de sangue é reconhecido como mínimo e o procedimento faz parte da rotina veterinária dos animais de companhia, sendo bem tolerado.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Médico Veterinário Waldemar Tavares Machado Neto, que pode ser contatado pelo telefone: 021 988602200.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo ao acesso às informações obtidas pela pesquisa.

Direito de confidencialidade: As informações obtidas (relativas tanto ao proprietário quanto ao animal) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum animal ou proprietário.

Comprometemos-nos a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa ou após a aprovação da CEUA.

“Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Metodologia e aplicação da citometria de fluxo para avaliação do estresse oxidativo dos neutrófilos em felinos”.

Eu discuti com o Médico Veterinário Waldemar Tavares Machado Neto sobre a minha decisão em incluir meu(s) animal(is) nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados em meu(s) animal(is), seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente que meu(s) animal(is) participe(m) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu ou meu(s) animal(is) possa(m) ter adquirido.

Assinatura do proprietário ou responsável

Nome legível do proprietário ou responsável:.....

Caso seja responsável, descrever o vínculo :

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste proprietário para a participação de seu(s) animal(is) neste estudo.

Assinatura do Pesquisador: Waldemar Tavares Machado Neto

Rio de Janeiro/...../.....