

Christiane D'Oliveira Marques

**Concentrações séricas e expressão renal de IL-1 e
TNF- após hemorragia em ratos sob efeito de
sevoflurano e glibenclamida**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Anestesiologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Anestesiologia.

Profª Titular Yara Marcondes Machado Castiglia
Orientadora

Botucatu – SP
2010

A Deus, por colocar tantas pessoas especiais no meu
caminho;
à minha mãe, Heliete, por estar sempre presente,
mesmo estando longe.

Agradecimentos

À minha orientadora,

Prof^a. Titular Yara Marcondes Machado Castiglia

Por ser mais que uma orientadora, por ser um exemplo.

Obrigada por fazer parte da minha vida!

Obrigada por me permitir aprender com a senhora sobre anestesia e sobre a vida!

Obrigada por ter sido, durante todos esses anos, minha amiga, minha mãe, minha professora e “minha chefe”! Seus ensinamentos ecoam em mim!

E obrigada especialmente por me ajudar a concluir mais esta etapa da minha vida!

A finalização desta Dissertação só foi possível graças às valiosas contribuições de várias pessoas, sem as quais a tarefa teria sido mais difícil e, certamente, o trabalho menos completo. Gostaria de agradecer a todas elas por sua dedicação e compromisso e, em particular,

à Prof^a. Dr^a. Lidia Raquel de Carvalho, do Departamento de Estatística, do Instituto de Biociências da Unesp, pelo tratamento estatístico aos resultados do trabalho;

à Prof^a. Dr^a. Sueli Aparecida Calvi, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pela dosagem das citocinas séricas e auxílio na análise dos resultados;

à Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu da Unesp, pela realização laboratorial da marcação imuno-histoquímica;

à Prof^a. Adjunta Jussara Marcondes Machado, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pela segura orientação na interpretação dos resultados;

ao Prof^o. Dr. Luis Antonio dos Santos Diego, por me permitir compartilhar de seu trabalho de tese de doutorado;

à Sr^a. Joana Jacirene Costa Teixeira, pelo trabalho gráfico, diagramação e apoio na secretaria do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp;

à Sr^a. Sonia Maria Martins da Silva, pelo apoio na secretaria do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp;

ao Sr. André Renato Passaroni, pelo auxílio no serviço de computação do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp;

à Sr^a. Neli Aparecida Pavan, do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo auxílio durante o desenvolvimento do meu curso de pós-graduação;

aos Srs. Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, do Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo auxílio na realização da parte prática desta pesquisa;

Agradecimentos

ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo apoio para a dosagem das citocinas;

à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de Bolsa de Mestrado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso (g). Média e desvio padrão do peso dos animais utilizados nos experimentos de ambos os grupos.....
Tabela 2	Temperatura (°C). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais, G1 e G2.....
Tabela 3	Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....
Tabela 4	Hematócrito (%). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....
Tabela 5	Valores séricos de TNF- α , em pg/mL, nos grupos G1 e G2. Médias e desvios padrão segundo momentos e grupos.....
Tabela 6	Valores séricos de IL-1, em pg/mL, nos grupos G1 e G2. Médias e desvios padrão segundo momentos e grupos.....
Tabela 7a	Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células tubulares marcadas por TNF- α
Tabela 7b	Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células glomerulares marcadas por TNF- α ...
Tabela 8a	Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células tubulares marcadas por IL-1.....
Tabela 8b	Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células glomerulares marcadas por IL-1.....
Tabela 9	Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células glomerulares marcadas por IL-1.....
Tabela 10	Peso (g), pressão arterial média (mmHg) (PAM) e temperatura retal (°C) (T) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos dois momentos estudados.....
Tabela 11	Valores séricos das citocinas TNF- α e IL-1 (pg/mL) e do hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo controle (G1) nos dois momentos estudados.....
Tabela 12	Valores séricos das citocinas TNF- α e IL-1 (pg/mL) e do hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos dois momentos estudados.....
Tabela 13	Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo controle (G1).....
Tabela 14	Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2).....
Tabela 15	Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo controle (G1)

Tabela 16	Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2).....
Tabela 17	Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo controle (G1.).....
Tabela 18	Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2).....
Tabela 19	Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo controle (G1).....
Tabela 20	Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2)

LISTA DE FIGURAS

SUMÁRIO

Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Sumário
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO.....
2 OBJETIVO.....
3 MATERIAL E MÉTODO.....
4 RESULTADOS.....
4.1 Peso.....
4.2 Temperatura retal.....
4.3 Pressão arterial média.....
4.4 Hematócrito.....
4.5 TN- α sérico.....
4.6 IL-1 sérica.....
4.7 TN- α renal.....
4.8 IL-1 renal.....
5 DISCUSSÃO.....
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....
7 CONCLUSÃO.....
8 REFERÊNCIAS.....
APÊNDICE.....

Marques CD'O. **Concentrações séricas e expressão renal de IL-1 e TNF- α após hemorragia em ratos sob efeito de sevoflurano e glibenclamida.** Botucatu, 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Introdução - Choque hemorrágico reduz o fluxo sanguíneo e a oxigenação teciduais, bem como a remoção de produtos de degradação. A hipóxia tecidual provoca alteração na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias. A glibenclamida, antagonista dos canais K_{ATP} , em rins de ratos anestesiados com sevoflurano e que sofreram hemorragia, preservou mais a histologia e a função renais. O objetivo deste estudo foi verificar se houve alterações da concentração sérica e da expressão renal das citocinas IL-1 e TNF- α em ratos que receberam sevoflurano e glibenclamida e que sofreram hemorragia, sem reposição adequada da volemia. **Método** – Dois grupos de ratos Wistar (n=10) anestesiados com sevoflurano: G1, controle, e G2, com glibenclamida, 1 μ g/g iv, submetidos à hemorragia de 30% da volemia (10% a cada 10 min), com reposição por Ringer lactato, 5mL/kg/h. Estudaram-se as concentrações séricas de IL-1 e TNF- α : na primeira hemorragia (M1) e 50 min após (M2). Em M2, estudou-se a expressão renal dessas citocinas. **Resultados** – Em G1, TNF- α sérico (normal de 143pg/ml): M1=178,6pg/mL $\pm$ 33,5 e M2=509,2pg/mL $\pm$ 118,8 e IL-1 sérica (normal de 158pg/mL): M1=148,8pg/mL $\pm$ 31,3 e M2=322,6pg/mL $\pm$ 115,4. Em G2, TNF- α sérico: M1=486,2pg/mL $\pm$ 83,6 e M2=261,8pg/mL $\pm$ 79,5 e IL-1 sérica: M1=347,0pg/mL $\pm$ 72,0 e M2=327,3pg/mL $\pm$ 90,9. Houve expressão de TNF- α e IL-1 nas células tubulares e glomerulares renais, mais marcantes em G2. **Conclusões** – A hemorragia e glibenclamida aumentaram a concentração sérica e a imunomarcagem renal das citocinas IL-1 e TNF- α , mas G2 enfrentou a hipotensão conseqüente à hemorragia com vasodilatação (provável ação do TNF- α) e melhor perfusão, resultando em alguma proteção.

Palavras-chave: Rim; Hemorragia; Sevoflurano; Glibenclamida

Marques CD'O - Serum concentrations and renal expressions of IL-1 and TNF- α after hemorrhage in rats under the effect of sevoflurane and glibenclamide. Botucatu, 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia) – Botucatu Medical School, São Paulo State University.

ABSTRACT

Introduction – Hemorrhagic shock reduces blood flow and tissue oxygenation, as well as the removal of degradation products. Tissue hypoxia causes changes in the synthesis and release of proinflammatory cytokines. Treatment with the K_{ATP} channel antagonist glibenclamide in sevoflurane-anesthetized rats that suffered from hemorrhaging preserved more renal function and histology. The objective of this study was to verify if there were changes in the serum concentration and renal expression of the IL-1 and TNF- α cytokines in rats that received sevoflurane and glibenclamide and had hemorrhaging with inadequate volemia replacement. **Methods** – Two groups of sevoflurane-anesthetized Wistar rats (n=10): G1 (control) and G2 (with glibenclamide, 1 μ g/g i.v.) were subjected to 30% blood volume hemorrhaging (10% every 10 min), with replacement using Ringer's lactate, 5 ml/kg/h. The IL-1 and TNF- α serum concentrations were studied in the first hemorrhage (M1) and then 50 min later (M2). At M2, the renal expression of these cytokines was also studied. **Results** – In G1, serum TNF- α (normal range around 143 pg/mL) was M1=178.6 $\pm$ 33.5 pg/mL and M2=509.2 $\pm$ 118.8 pg/mL, while serum IL-1 (normal range around 158 pg/mL) was M1=148.8 $\pm$ 31.3 pg/mL and M2=322.6 $\pm$ 115.4 pg/mL. In G2, serum TNF- α was M1=486.2 $\pm$ 83.6 pg/mL and M2=261.8 $\pm$ 79.5 pg/mL, and serum IL-1 was M1=347.0 $\pm$ 72.0 pg/mL and M2=327.3 $\pm$ 90.9 pg/mL. The expression of TNF- α and IL-1 in the renal glomerular and tubular cells was more abundant in the G2 group. **Conclusions** – Hemorrhage and glibenclamide increased the serum concentration and renal immunoreactions of the TNF- α and IL-1 cytokines, but the G2 group experienced hypotension resulting from the hemorrhage with vasodilatation, probably due to TNF- α , and better perfusion, resulting in some protection.

Keywords: Kidney; Haemorrhage; Sevoflurane; Glibenclamide

UM



Introdução

Durante anestesia para cirurgia que rotineiramente não apresenta sangramento, este pode ocorrer subitamente e até que se consiga repor o volume deste sangramento, seja com soluções cristalóides e colóides ou com derivados de sangue, pode transcorrer determinado período de tempo. O conseqüente choque hemorrágico provoca decréscimo no fluxo sanguíneo para os tecidos, reduzindo, assim, a oxigenação e a remoção de produtos de degradação. A hipóxia tecidual conseqüente ao choque hemorrágico tem papel importante na produção de alterações celulares e do metabolismo orgânico (Chaudry et al., 1976).

Ertel et al., 1995, realizaram experimento em camundongos observando que a hipoxemia na ausência de qualquer perda sanguínea ou dano tissular induz liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), no plasma e nas células peritoneais e de Küpffer.

Mauriz et al., 2007, em revisão sobre o choque hemorrágico, postulam que a falência de múltiplos órgãos, processo inflamatório sistêmico que culmina com a disfunção de diferentes órgãos vitais, é complicação freqüente após choque hemorrágico, determinando alta incidência de mortalidade. A patogênese da lesão orgânica secundária à hipovolemia ainda não foi completamente elucidada, mas sabe-se que macrófagos são ativados por translocação de bactérias/endotoxinas e pelo processo de isquemia/reperfusão e que células de Küpffer ativadas liberam, entre outras, substâncias ativas, como as citocinas inflamatórias.

A lesão traumática, que resulta de cirurgia, queimadura e lesão tecidual, também provoca profundas alterações, tanto da resposta imune quanto de

funções orgânicas (Ertel et al., 1995). Síntese alterada e liberação de citocinas pró-inflamatórias, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 , foram implicadas na fisiopatologia e mortalidade de lesão traumática e de queimadura. Choque hemorrágico sem trauma tissular significativo também aumentou a secreção de mediadores pró-inflamatórios. O choque hemorrágico produz múltiplas anormalidades em funções imunológicas, resultando em imunodeficiência e aumento da suscetibilidade a sepse subsequente, segundo Chaudry et al., 1990.

Yao et al., 1998, demonstraram que situações como trauma grave, hemorragia e queimadura podem iniciar a cascata de eventos que determinam complicações sépticas, incluindo a síndrome da disfunção e falência de múltiplos órgãos. A falência de múltiplos órgãos é a maior causa de mortalidade dos pacientes após trauma/choque hemorrágico, sendo que ela ocorre como resultado de excessiva ativação dos mediadores inflamatórios (espécies tóxicas do oxigênio, enzimas proteolíticas, moléculas de aderência, citocinas), o que resulta em aumento da permeabilidade e disfunção celulares.

Boucher et al., 1993, já tinham postulado que $\text{TNF-}\alpha$ não estava presente no rim humano normal, mas era detectado principalmente em macrófagos infiltrados. Células renais parenquimatosas poderiam produzir $\text{TNF-}\alpha$ em várias condições patológicas. Entretanto, os mecanismos que regulavam a produção dessa citocina, bem como seu papel na gênese ou amplificação da lesão tissular, permaneciam sem elucidação.

Em 1996, Dinarello observou que está bem estabelecida a função das citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 na fisiopatologia da sepse, sendo evidenciado aumento dos níveis sanguíneos dessas citocinas em animais e pacientes com esta condição clínica. Além disso, a infusão dessas citocinas em animais ou seres humanos é capaz de induzir a resposta inflamatória, e o uso experimental de bloqueadores de citocinas diminui a lesão orgânica e a mortalidade que ocorrem na sepse. Outros autores (Roumen et al., 1993; Bahrami et al., 1997) já haviam postulado que um dos importantes eventos ocorridos na inflamação após trauma e choque poderia ser a superprodução das citocinas pró-inflamatórias, especialmente $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 .

A glibenclamida, sulfoniluréia de segunda geração utilizada no tratamento de diabetes tipo II, é antagonista dos canais de potássio ATP (K_{ATP}) (Cleveland et al., 1997). Em 1995, Aguilar-Bryan et al. e Philipson & Steiner já haviam publicado que a glibenclamida atuava nos canais K_{ATP} , bloqueando-os. Desde então, inúmeros autores vêm tentando desvendar se a ação deste fármaco, nestes canais, traz benefícios ao organismo, protegendo-o, no caso de agressão, trauma ou hemorragia, ou se, pelo contrário, ajuda a agravar o estado de choque causado por essas condições mórbidas. Por outro lado, alguns trabalhos laboratoriais mostraram possível relação entre sua ação no canal K_{ATP} e efeitos no processo inflamatório (da Silva-Santos et al., 2002; Pompermayer et al., 2005).

Diego et al., 2007, estudaram a ação da glibenclamida em rins de ratos anestesiados com sevoflurano e que sofreram sangria de 30% da volemia, entrando em estado de choque hemorrágico, uma vez que não houve reposição adequada de fluidos. O volume coletado das sangrias foi utilizado para estudo da função renal. Ao final dos experimentos, que tiveram duração de 120 minutos, os animais foram submetidos à nefrectomia bilateral para estudo histológico dos rins. Os autores demonstraram que a histologia e a função renais apresentaram-se com resultados melhores nos animais tratados com glibenclamida, em relação ao controle. O fluxo plasmático efetivo renal, medido pelo *clearance* de para-aminohipurato de sódio, foi maior no grupo tratado com glibenclamida e a resistência vascular renal foi maior no grupo que não recebeu glibenclamida, o grupo controle. Este aumento da resistência possivelmente aconteceu para manter o ritmo de filtração glomerular, que de fato foi igual nos dois grupos. Histologicamente, os resultados demonstraram, no grupo controle, escores mais altos de dilatação tubular e os vasos do parênquima estavam dilatados e congestionados apenas no grupo controle, o que pode ter ocorrido em razão do aumento da resistência vascular a jusante. A vacuolização tubular também ocorreu mais no grupo controle. A necrose foi observada nos rins de oito ratos do grupo controle e de quatro ratos do grupo da glibenclamida. Desse modo, para dar continuidade a este estudo, seria importante pesquisar a possível implicação de citocinas nestes resultados.

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, mensageiras do sistema imunológico, relacionando-o com os outros sistemas do organismo. São produzidas por populações celulares distintas e atuam sobre muitas células. As citocinas não são armazenadas, têm curto período de secreção e são autolimitadas (exaustão ou controle). Mostram múltiplos efeitos sobre uma única célula alvo, sendo seus receptores regulados por sinais específicos, e a resposta celular muitas vezes envolve mecanismo de síntese protéica (transcrição do DNA) ou regulação da divisão celular. Influenciam, ainda, a síntese e a ação de outras citocinas. O TNF- α é uma citocina mediadora da imunidade natural, produzida principalmente por macrófagos. Quando em baixa concentração, regula leucócitos e células endoteliais no sítio da infecção, porém quando em grande concentração, em nível sistêmico, induz febre, ativa outras citocinas (IL-1 e IL-6), as proteínas de fase aguda (inflamação) e os sistemas do complemento e da coagulação (Abbas et al., 2007).

DOIS



Objetivo

O objetivo deste estudo foi verificar se houve alterações da concentração sérica e da expressão renal das citocinas IL-1 e TNF- α de ratos que receberam sevoflurano e glibenclamida e que sofreram hemorragia de 30% da volemia, sem reposição adequada de volume intravascular.



Material e Método

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo nº 504 de 4 de novembro de 2005).

As amostras de rins de ratos e amostras sanguíneas do estudo de Diego et al., 2007, foram utilizadas na presente pesquisa.

A pesquisa foi desenvolvida em vinte ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, com pesos superiores a 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da Unesp. A amostra foi aleatoriamente dividida em dois grupos de 10 ratos cada:

- ♦ **Grupo 1 (G1)** – ratos (1 fêmea, 9 machos) anestesiados com sevoflurano e submetidos à hemorragia de 30% da volemia;
- ♦ **Grupo 2 (G2)** – ratos (5 fêmeas, 5 machos) anestesiados com sevoflurano, tratados com glibenclamida por via venosa e submetidos à hemorragia de 30% da volemia.

Após pesagem, os ratos foram acomodados em campânula de material inerte, transparente e com volume adequado (3,4L), que contava com orifício superior, para entrada da fonte de gases frescos, e orifício inferior para exalação dos gases. A anestesia foi iniciada com sevoflurano a 4% com fluxo total de 1L/min⁻¹ de oxigênio medicinal e 1L/min⁻¹ de ar comprimido medicinal. O vaporizador utilizado era da marca Ohmeda (EEUU), previamente calibrado para o referido anestésico. Assim que o animal apresentava sinais de que se encontrava anestesiado, a campânula era retirada e a concentração do anestésico era diminuída para 2,5%, quando então se acoplava máscara apropriada ao seu

focinho. O rato era mantido em respiração espontânea com a mistura oxigênio/ar/sevoflurano, variando-se a concentração anestésica conforme o comportamento da frequência respiratória. A temperatura retal (T) era monitorizada a intervalos de 5 min com termômetro digital. O animal era coberto até a região cervical com campânula transparente fenestrada em duas posições, uma delas permitindo a passagem do tórax do rato, e a outra, a acomodação da entrada de ar aquecido a 40°C que vinha de um compressor-aquecedor que era desligado conforme a necessidade de se manter a temperatura corporal entre 35,5 °C e 37,5 °C.

Após a estabilização da anestesia, o procedimento cirúrgico era iniciado com incisão transversal no pescoço e dissecação suficiente para exposição e canulação, com venocath 24 GA, de:

- 1) veia jugular interna, com imediatas manutenção da infusão de solução de Ringer com lactato (RL) 5 mL/kg⁻¹/h⁻¹, para reposição de perdas de fluidos (Cheng et al., 2003; de Souza Silva et al., 2006; Diego et al., 2007), e administração de glibenclamida (Glyburide®, Sygma, 0,1%), 1µg/g⁻¹;
- 2) artéria carótida, para monitorização da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC), utilizando-se transdutor do aparelho de registro Datex Engstron (Finlândia).

Sessenta minutos após a administração da glibenclamida em G2 e o tempo correspondente em G1, os animais dos dois grupos sofreram sangria de 30% da volemia, pela artéria carótida, realizada em três momentos com tempo de 10 minutos entre eles. Em cada momento foram retirados 10% da volemia, a qual foi calculada como sendo igual a 6% do peso corporal (Erni et al., 1995). O sangue arterial coletado foi utilizado para análise laboratorial do hematócrito (Ht) e das citocinas TNF- α e IL-1.

Em cada momento de hemorragia, a PAM e a temperatura retal foram registradas. A frequência cardíaca foi monitorizada pela curva da PAM, mas seu registro não foi possível devido às propriedades do monitor em limitar-se a valores inferiores a 250 bpm, o que nem sempre ocorre em ratos. Após cada momento de hemorragia havia reposição com solução de RL, 1,6 mL/kg⁻¹, caso a

PAM alcançasse valores abaixo de 80 mmHg. Após a última hemorragia, os ratos permaneciam anestesiados por mais 30 min, sendo, então, realizada a nefrectomia bilateral e o sacrifício do animal com dose de pentobarbital sódico suficiente para tal. Ambos os rins, retirados, eram imediatamente seccionados em seu maior eixo e armazenados em frascos separados, para análise imuno-histoquímica, em solução de Dubosque Brasil (formol 120 mL, ácido acético 30 mL e ácido pícrico 2g), na qual permaneciam por período mínimo de 12 h e máximo de 36 h. Em seguida os rins eram identificados por número codificado.

Os atributos estudados foram: T, PAM, Ht, as concentrações séricas e as imunomarcações glomerulares e tubulares renais de TNF- α e IL-1.

Os momentos nos quais se estudaram T, PAM, Ht e concentrações de citocinas TNF- α e IL-1 foram:

M1 – controle e coincidente com a primeira hemorragia,

M2 – obtido após 30 minutos da terceira e última hemorragia e imediatamente antes do sacrifício de cada animal.

As imunomarcações das citocinas TNF- α e IL-1 foram estudadas nos rins retirados dos animais.

Para a determinação do hematócrito foi empregado o método do micro-hematócrito, através do aparelho Centremicro da Fanem (Brasil), sendo o resultado expresso em porcentagem.

Para a obtenção dos soros, as amostras de sangue das hemorragias realizadas nos 20 animais foram coletadas em tubo seco e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. As alíquotas de soros obtidas foram estocadas em tubos de plástico a -70°C, até o momento da dosagem das citocinas.

As concentrações de TNF- α e IL-1 no soro dos animais dos dois grupos estudados foram determinadas utilizando-se *kit* para ELISA e de acordo com as especificações do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EEUU). Para a determinação dos valores séricos das citocinas TNF- α e IL-1 considerados normais, estudo piloto com ratos saudáveis foi realizado, anteriormente, utilizando-se a mesma metodologia para a obtenção das citocinas. Estes valores são iguais às médias encontradas mais um desvio padrão: TNF- α = 117 pg/mL $\pm$

26, ou somando-se um desvio padrão, $\text{TNF-}\alpha = 143 \text{ pg/mL}$; $\text{IL-1} = 121 \text{ pg/mL} \pm 37$, ou somando-se um desvio padrão, $\text{IL-1} = 158 \text{ pg/mL}$.

Na determinação das citocinas séricas, inicialmente, microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti $\text{TNF-}\alpha$ ou anti IL-1 de rato. A seguir, foram adicionados 50 μL dos soros testes (diluição 1:2) e dos soros controles positivos e negativos, com posterior incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens com solução detergente contendo 0,05% *tween* 20 em PBS, pH 7,4. Este processo foi repetido até a fase anterior à adição do substrato. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente com anticorpos policlonais anti $\text{TNF-}\alpha$ ou anti IL-1 de rato, marcados com peroxidase. Após o período de incubação, foi adicionado, aos orifícios da placa, o substrato formado por peróxido de hidrogênio (0,02%) e tetrametilbenzina (2,0%). A interrupção da reação foi realizada à temperatura ambiente, utilizando-se ácido hidrocloreto. Os resultados foram avaliados pela leitura da densidade óptica (DO) em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan, EEUU) em comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 presentes no soro foram calculadas a partir dos resultados obtidos na curva padrão realizada com $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 recombinantes de rato. A dose mínima detectada foi de 5 pg/mL^{-1} .

As reações de imuno-histoquímica seguiram o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu.

Os cortes de material incluído em parafina, com 4 μm de espessura, foram colocados sobre lâmina histológica, previamente tratada com organolisano (Sigma A 3648). Os cortes foram desparafinizados em 2 banhos de xilol por 30 minutos e 20 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente, desidratados em álcool por 5 minutos e lavados com água destilada. Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria a 96°C, com solução pré-aquecida de TRIS EDTA pH 9,0 por 30 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em água destilada, sendo, a seguir, tratados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10 volumes por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados em água destilada em 2 banhos

de TRIS pH 7,4 de 5 minutos e incubados com soro normal de coelho por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados com anticorpos primários antígeno-específicos *goat anti-rat* TNF- α (R&D Systems AF 510-NA) e *goat anti-rat* IL-1 (R&D Systems AF 501-NA), diluídos a 1:100 em diluente específico para os anticorpos, com redutor de fundo (Dako Cytomation – S 3022) durante 18 horas a 4°C. As lâminas foram lavadas em solução tampão, 2 banhos de 5 minutos cada. Após esse período, foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado coelho anticabra (Southern Biotech 6160-08), diluído a 1:200, por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, e lavadas em 2 banhos de TRIS pH 7,4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com complexo estreptoavidina peroxidase (Dako Cytomation K 0377), diluído a 1:200, à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida, e lavadas em TRIS (2 banhos) por 5 minutos. Para visibilização da reação, os cortes foram tratados com cromógeno DAB (DAB Dako Cytomation K 3468) durante 5 minutos e, em seguida, lavados em TRIS e água destilada. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris por 3 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos com posterior hidratação em álcool, clareados em xilol e montados sobre lâminas com resina sintética Permount. A análise foi realizada em todo o corte, em aumento de 20 e 40 vezes, estabelecendo-se uma média para a intensidade de marcação observada nas lâminas dos rins de todos os animais. Assim, a porcentagem de células marcadas para cada um dos tipos histológicos estudados foi determinada como:

- sem marcação,
- até 25% do campo,
- de 26 a 50% do campo,
- de 51 a 75% do campo,
- de 76 a 100% do campo.

Para controle negativo, foram omitidos os anticorpos primários. A marcação positiva foi detectada como coloração marrom, de padrão citoplasmático e de membrana celular.

A análise estatística foi realizada com o teste de Goodman para a verificação das frequências de intensidade e porcentagem da marcação das

citocinas estudadas nas células tubulares e glomerulares e o teste exato de Fisher para a distribuição das frequências de intensidade e porcentagem da IL-1 nas células glomerulares. O teste t de Student foi utilizado para a verificação da homogeneidade dos pesos dos animais de ambos os grupos. Para os atributos temperatura retal, pressão arterial média, hematócrito e citocinas séricas, avaliados ao longo do tempo (M1 e M2), foi efetuada Análise de Perfil com os testes de: 1) interação entre grupos e momentos, visando verificar se os perfis médios dos 2 grupos podem ser considerados similares ao longo do tempo; 2) verificação da igualdade dos 2 grupos no conjunto dos momentos (diferença entre os dois perfis), no caso de aceitação da similaridade; 3) verificação da diferença entre momentos no conjunto dos grupos, no caso de aceitação da similaridade; 4) verificação da diferença entre grupos em cada momento; 5) verificação da diferença entre momentos dentro de cada grupo. Em cada hipótese testada, foram calculadas as estatísticas F e p. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.



Resultados

O peso dos animais não apresentou diferença entre grupos e as médias e desvios padrão de G1 e G2 são, respectivamente: $346 \text{ g} \pm 81$ e $338 \text{ g} \pm 62$ (Tabela 1). A temperatura retal não apresentou diferença significativa entre momentos e grupos e para G1 e G2 foi, respectivamente: $35,9^{\circ}\text{C} \pm 1,9$ (M1), $36,0^{\circ}\text{C} \pm 1,8$ (M2) e $37^{\circ}\text{C} \pm 1,4$ (M1), $36,7^{\circ}\text{C} \pm 0,7$ (M2) (Tabela 2, Quadro 1). A pressão arterial média comportou-se de modo igual nos dois momentos dos dois grupos de estudo, tendo diminuído de modo significativo de M1 para M2 e sendo, em G1 e G2, respectivamente: $96 \text{ mmHg} \pm 25$ (M1), $75 \text{ mmHg} \pm 20$ (M2) (representando queda de 22%) e $89 \text{ mmHg} \pm 20$ (M1), $73 \text{ mmHg} \pm 15$ (M2) (representando queda de 18%) (Tabela 3, Quadro 2). O hematócrito comportou-se de modo igual nos dois momentos dos dois grupos de estudo, tendo diminuído de modo significativo de M1 para M2 e sendo, em G1 e G2, respectivamente: $41\% \pm 2$ (M1), $33\% \pm 3$ (M2) e $37\% \pm 5$ (M1), $31\% \pm 3$ (M2) (Tabela 4, Quadro 3).

Com relação ao resultado sérico de $\text{TNF-}\alpha$ em G1, no momento correspondente à primeira hemorragia, M1, os valores já eram maiores que o normal ($178,6 \text{ pg/mL} \pm 33,5$). Em M2, 50 minutos após M1, os valores cresceram para $509,2 \text{ pg/mL} \pm 118,8$. A diferença foi significativa ($p < 0,05$). Em G2, em M1, o resultado foi $486,2 \text{ pg/mL} \pm 83,6$ e, em M2, diminuiu para $261,8 \text{ pg/mL} \pm 79,5$, diferença significativa, o mesmo acontecendo com a diferença entre grupos (Tabela 5).

Com relação ao resultado sérico de IL-1, em G1, no momento correspondente à primeira hemorragia, M1, os valores eram pouco abaixo do normal ($148,8 \text{ pg/mL} \pm 31,3$). Em M2, 50 minutos após M1, os valores cresceram para $322,6 \text{ pg/mL} \pm 115,4$, sendo diferença significativa ($p < 0,05$). Em G2, em M1, o resultado foi $347,0 \text{ pg/mL} \pm 72,0$, e em M2, diminuiu para $327,3$

pg/mL $\pm$ 90,9. A diferença não foi significativa, o mesmo acontecendo com a diferença entre grupos em M2. Em M1 a diferença entre os grupos foi significativa (Tabela 6).

Com relação à expressão renal da citocina TNF- α nas células tubulares, a marcação, em porcentagem, está expressa na Tabela 7a. Verifica-se que dentre os 20 rins estudados em G1, 12 deles tiveram porcentagem de marcação de até 25% ($p=0,03$), o que foi estatisticamente significativo em relação ao restante dos rins. Em G2, sete rins, dentre o total de 20, apresentaram marcação de 76-100% ($p=0,03$), o que foi estatisticamente significativo em relação aos demais. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Com relação à expressão renal da citocina TNF- α nas células glomerulares, a marcação, em porcentagem, está expressa na Tabela 7b. Verifica-se que dentre os 20 rins estudados em G1, 10 deles tiveram porcentagem de marcação de até 25% ($p=0,01$), o que foi estatisticamente significativo em relação ao restante dos rins. Em G2, 10 rins, dentre o total de 20, apresentaram marcação de 76-100% ($p=0,01$), o que foi estatisticamente significativo em relação aos demais. Houve diferença significativa entre os grupos, e, na marcação de até 25%, G1 foi maior que G2, e, na marcação de 76-100%, G1 foi menor que G2.

Com relação à expressão renal da citocina IL-1 nas células tubulares, a marcação, em porcentagem, está expressa na Tabela 8a. Verifica-se que dentre os 20 rins estudados em G1 não houve diferença significativa entre os seis rins que não apresentaram marcação, os cinco rins que apresentaram marcação de até 25%, os quatro rins que apresentaram marcação de 26-50%, e os cinco rins que apresentaram marcação de 51-75%. Nenhum rim apresentou marcação de 76-100%. Em G2, sete rins, dentre o total de 20, apresentaram marcação de 76-100%, seis rins, de 51-75%, e cinco rins de até 25%. Estas marcações foram iguais e significativamente maiores que a marcação de 26-50% dos dois rins restantes. Nenhum rim ficou sem marcação ($p=0,03$). Houve diferença significativa entre G1 e G2 porque seis rins de G1 ficaram sem marcação enquanto que nenhum de G2 ficou sem marcação, além disso, sete rins de G2 apresentaram 76-100% de marcação enquanto que nenhum rim de G1 apresentou marcação.

Com relação à expressão renal da citocina IL-1 nas células glomerulares a marcação, em porcentagem, está expressa na Tabela 8b. Verifica-se que dentre os 20 rins estudados em G1 não houve diferença significativa entre os três rins que não apresentaram marcação, os seis rins que apresentaram marcação de até 25%, os três rins que apresentaram marcação de 26-50%, os dois rins que apresentaram marcação de 51-75% e os seis que apresentaram marcação de 76-100%. Também não houve diferença significativa entre os quatro rins, dentre o total de 20 de G2, que apresentaram marcação de 76-100%, nove rins, de 51-75%, três rins, de 26-50%, e os quatro rins com até 25% de marcação. Não houve diferença significativa entre G1e G2 ($p=0,08$).

4.1 Peso

Tabela 1 - Peso (g). Média e desvio padrão do peso dos animais utilizados nos experimentos de ambos os grupos

Grupo	Peso
G1	346 ± 81
G2	338 ± 62
Estatística	t= 0,25; p>0,50
Comentário	G1=G2

t de Student

4.2 Temperatura retal

Tabela 2 - Temperatura (°C). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais, G1 e G2

Grupos	Momentos	
	M1	M2
G1 (n=10)	35,9 ± 1,9	36,0 ± 1,8
G2 (n=10)	37,0 ± 1,4	36,7 ± 0,7

Quadro 1 - Temperatura retal. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=0,28; p>0,50	Perfis similares
2. Efeito de grupo	F=1,87; p>0,10	Perfis iguais
3. Efeito de momento	F=2,00; p>0,10	Momentos não diferem
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=1,90; p>0,10	G1=G2
	M2: F=1,40; p>0,10	G1=G2
		G1=G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=2,33; p>0,10	M1=M2
	G2: F=3,28; p>0,05	M1=M2
Análise de perfil		

4.3 Pressão arterial média

Tabela 3 - Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Momentos Grupos	M1	M2
G1 (n=10)	96 ± 25	75 ± 20
G2 (n=10)	89 ± 20	73 ± 15

Quadro 2 - Pressão arterial média. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=0,28; p=0,50	Perfis similares
2. Efeito de grupo	F=0,68; p>0,10	Perfis iguais
3. Efeito de momento	F=7,06; p<0,05	Existe efeito de momento M1>M2
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=0,41; p>0,50 M2: F=0,06; p>0,50	G1=G2 G1=G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=9,57; p<0,05 G2: F=5,79; p<0,05	M1>M2 M1>M2

Análise de perfil

4.4 Hematócrito

Tabela 4 - Hematócrito (%). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Momentos Grupos	M1	M2
G1 (n=10)	41 ± 2	33 ± 3
G2 (n=10)	37 ± 5	31 ± 3

Quadro 3 - Hematócrito. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=2,48; p>0,10	Perfis similares
2. Efeito de grupo	F=2,70; p>0,10	Perfis iguais
3. Efeito de momento	F=105,72; p<0,05	M1>M2
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=4,70; p<0,05	G1>G2
	M2: F=1,10; p>0,10	G1=G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=81,87; p<0,05	M1>M2
	G2: F=45,27; p<0,05	M1>M2
Análise de perfil		

4.5 TNF- α sérico

Tabela 5 - Valores séricos de TNF- α , em pg/mL, nos grupos G1 e G2. Médias e desvios padrão segundo momentos e grupos

Grupo	Momento	
	M1	M2
G1 (n=10)	178,6 $\pm$ 33,5b B	509,2 $\pm$ 118,8a A
G2 (n=10)	486,2 $\pm$ 83,6a A	261,8 $\pm$ 79,5b B

Letras minúsculas comparam médias de momentos em cada grupo
 Letras maiúsculas comparam médias de grupos em cada momento
 p<0,05 (análise de perfil)

4.6 IL-1 sérica

Tabela 6 - Valores séricos de IL-1, em pg/mL, nos grupos G1 e G2. Médias e desvios padrão segundo momentos e grupos

Grupo	Momento	
	M1	M2
G1 (n=10)	148,8±31,3b B	322,6±115,4a A
G2 (n=10)	347,0±72,0a A	327,3±90,9a A

Letras minúsculas comparam médias de momentos em cada grupo
 Letras maiúsculas comparam médias de grupos em cada momento
 p<0,05 (análise de perfil)

4.7 TNF- α renal**Tabela 7a** - Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células tubulares marcadas por TNF- α

Intensidade de marcação	G1 (n=10)		G2 (n=10)	
	Nº	%	Nº	%
Sem marcação	2	10,0 B	-	0,0 B
até 25%	12	60,0 A	5	25,0 AB
26 a 50%	2	10,0 B	2	10,0 AB
51 a 75%	3	15,0 AB	6	30,0 AB
76 a 100%	1	5,0 B	7	35,0 A
Total	20	100,0	20	100,0

Não houve diferença entre os grupos em cada categoria dos resultados

Letras maiúsculas comparam as categorias dos resultados em cada grupo

Percentuais seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente

p=0,03 (teste de Goodman)

Tabela 7b - Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células glomerulares marcadas por TNF- α

Intensidade de marcação	G1 (n=10)		G2 (n=10)	
	Nº	%	Nº	%
Sem marcação	2	10,0a AB	-	0,0a B
até 25%	10	50,0a A	5	25,0b AB
26 a 50%	2	10,0a B	1	5,0a B
51 a 75%	5	25,0a AB	4	20,0a AB
76 a 100%	1	5,0b B	10	50,0a A
Total	20	100,0	20	100,0

Letras minúsculas comparam proporções dos grupos em cada categoria do resultado

Letras maiúsculas comparam as categorias dos resultados em cada grupo

Percentuais seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente

p=0,01 (teste de Goodman)

4.8 IL-1 renal

Tabela 8a - Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células tubulares marcadas por IL-1

Intensidade de marcação	G1 (n=10)		G2 (n=10)	
	Nº	%	Nº	%
Sem marcação	6	30,0a A	-	0,0b B
até 25%	5	25,0a A	5	25,0a A
26 a 50%	4	20,0a A	2	10,0a AB
51 a 75%	5	25,0a A	6	30,0a A
76 a 100%	-	0,0b B	7	35,0a A
Total	20	100,0	20	100,0

Letras minúsculas comparam proporções dos grupos em cada categoria do resultado
 Letras maiúsculas comparam as categorias dos resultados em cada grupo
 Percentuais seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente
 $p=0,03$ (teste de Goodman)

Tabela 8b - Distribuição dos rins dos ratos dos dois grupos segundo porcentagem de células glomerulares marcadas por IL-1

Intensidade de marcação	G1 (n=10)		G2 (n=10)	
	Nº	%	Nº	%
Sem marcação	3	15,0	-	0,0
até 25%	6	30,0	4	20,0
26 a 50%	3	15,0	3	15,0
51 a 75%	2	10,0	9	45,0
76 a 100%	6	10,0	4	20,0
Total	20	100,0	20	100,0

Não houve diferença entre os grupos em cada categoria dos resultados
 Não houve diferença entre os resultados dentro de cada grupo
 $p=0,08$ (teste exato de Fisher)

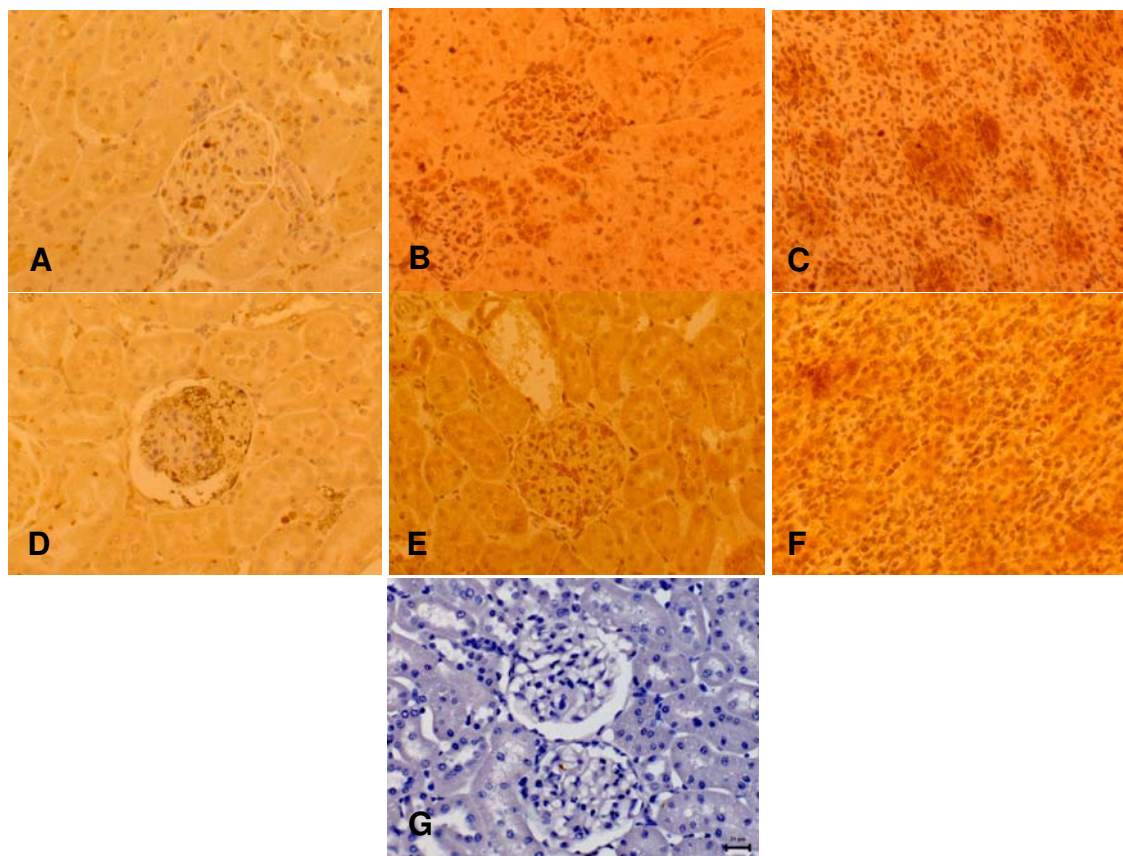


Figura 1 – Imunomarcacão (I) de rins de ratos com anticorpo primário antiIL-1 e antiTNF- α , técnica ABC, DAB e contracoloraçaõ hematoxilina de Harris, 400 $\times$: A - I fraca, de IL-1, em glomérulo e túbulos renais de rato do grupo G1 (sevoflurano); B - I forte, de IL-1, em glomérulos renais de rato do grupo G2 (sevoflurano e glibenclamida); C - I forte, de IL-1, em túbulos renais de rato do grupo G2; D - I fraco, TNF- α , em glomérulo e túbulos renais de rato do grupo G2; E - I forte, de TNF- α , em glomérulo renal de rato do grupo G2; F - I forte, de TNF- α , em túbulos renais de rato do grupo G2; G – controle negativo.



Discussão

A temperatura retal dos animais deste estudo mostra resultados compatíveis com hipotermia leve (35,5°C a 37,5°C). Estes resultados estão de acordo com o que foi buscado no trabalho experimental - mimetizar a prática clínica. Sendo assim, espera-se que paciente anestesiado e que tenha hemorragia apresente estes patamares de temperatura, na melhor das hipóteses. Foi evitada hipotermia importante, que seria fator protetor para a isquemia sofrida pelos rins após hemorragia, e hipertermia, que ajudaria a piorar a lesão renal, alterando a disponibilidade de ATP e promovendo aumento nos radicais livres de oxigênio (Zager & Altschuld, 1986).

Wu et al., 2003, estudaram ratos que sofreram choque hemorrágico e que permaneceram com temperaturas retais entre 33°C e 34°C. Concluíram que a peroxidação lipídica e as respostas inflamatórias sistêmicas ao choque hemorrágico foram minimamente influenciadas por este grau de hipotermia, sendo que a sobrevivência dos ratos foi melhor que a do grupo de temperatura normal ($38 \pm 0,5^\circ\text{C}$).

A redução do hematócrito, observada no final do experimento, pode ter ocorrido pela hidratação basal oferecida aos animais mesmo após a sangria. Em choque hemorrágico, constrição arteriolar em órgãos menos essenciais, como a musculatura esquelética, redistribui sangue para órgãos vitais e há diminuição na pressão capilar, facilitando absorção de fluidos e ocorrendo hemodiluição (Mazzoni et al., 1994).

A hipotensão arterial encontrada nos animais no final do experimento foi conseqüente à hemorragia de 30% da volemia. Embora esta hipotensão tenha sido significativa em relação aos valores iniciais de pressão arterial média, seus valores foram compatíveis com diminuição moderada.

As alterações da microcirculação produzidas pela lesão de isquemia e reperfusão são muito similares às aquelas associadas com o processo inflamatório, isto é, vasodilatação, invasão tissular por células inflamatórias e aumento da permeabilidade microvascular (Duran & Dillon, 1989). A resposta inflamatória tem papel importante na fisiopatologia da lesão por isquemia e reperfusão. Em muitos órgãos, o período de isquemia seguido por reperfusão associa-se a inflamação aguda e liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas a participação exata dessas citocinas na mediação da lesão ainda não está clara (Frangogiannis et al., 1998; Hill, 1998). Entretanto, quando grandes quantidades de TNF- α são produzidas, a contratilidade do miocárdio e o tônus da musculatura lisa dos vasos são inibidos, com vasodilatação, resultando em queda acentuada da pressão sanguínea, ou choque (Abbas et al., 2007).

Neste estudo, a isquemia que pode ter ocorrido no rim é devida à hemorragia e hipotensão e não se constitui em perda total do fluxo sangüíneo a este órgão, como ocorre quando há oclusão de artéria responsável por fornecimento de sangue. Contudo, há um grau de perda de fluxo, com posterior reperfusão, seja por reposição externa de fluidos adequados, seja por mecanismo intrínseco do órgão voltado à sua preservação.

O conceito de pré-condicionamento isquêmico tem sido bastante estudado desde a descoberta de que períodos prévios e curtos de isquemia de um órgão dariam proteção subsequente ao órgão se este sofresse, em seguida, isquemia mais prolongada (Murry et al., 1986). Ou seja, a lesão encontrada, então, seria mais branda. Pesquisas clínicas e experimentais mostraram efeito semelhante quando do uso de anestésicos voláteis durante episódios de isquemia e reperfusão (Zaugg et al., 2002a; 2002b, Xiong et al., 2003). Estudos demonstram que o anestésico volátil sevoflurano tem efeitos protetores contra lesão de isquemia e reperfusão, no miocárdio, por exemplo (Kowalski et al., 1997), enquanto que, no rim, os estudos são controversos, provavelmente porque ainda não houve uniformidade de modelos apresentados na literatura (Obal et al., 2006; Curtis, 2008).

Nader et al., 2004, avaliaram o papel do sevoflurano na proteção miocárdica de pacientes submetidos à revascularização do miocárdio e

concluíram que este anestésico diminui a resposta inflamatória após o emprego de circulação extracorpórea, como medido pela liberação de IL-6 e TNF- α , entre outros fatores. Entretanto, de que maneira o sevoflurano age protegendo o miocárdio ou na resposta inflamatória não pôde ser determinado com este estudo. Igualmente, El Azab et al., 2003, já haviam observado que o sevoflurano reduz a produção de TNF- α durante cirurgia cardíaca mais do que a anestesia venosa com midazolam-sufentanil. Ou seja, o sevoflurano, enquanto anestesia o paciente ou animal, participa da imunomodulação de seu organismo.

Em 2006, Kawamura et al., observando que os efeitos do sevoflurano sobre citocinas pró-inflamatórias relacionadas com lesão de isquemia e reperfusão não eram claras, formularam a hipótese de que este anestésico inalatório decrescia a lesão de isquemia e reperfusão por suprimir as citocinas pró-inflamatórias. Os participantes de seu estudo foram pacientes submetidos ao *bypass* coronariano. Os autores concluíram que o sevoflurano suprime a produção de IL-6 e IL-8, mas não a de IL-10. Alterações no equilíbrio entre citocinas pró- e antiinflamatórias podem ser um dos mais importantes mecanismos de proteção miocárdica determinados pelo sevoflurano.

Se o sevoflurano não inibe a produção de IL-10 e esta citocina, sabe-se, inibe a inflamação e a produção de TNF- α (Abbas et al., 2007), então, em G1, o anestésico inalatório pode ter influenciado o resultado encontrado de TNF- α . A hemorragia teria aumentado a produção desta citocina, mas não tanto quanto esperado, uma vez que o sevoflurano estava presente. O que foi observado nos rins dos ratos de G1, portanto, poderia ter sido pior não fosse a ação protetora desse anestésico inalatório.

No experimento de Obal et al., 2006, autores que não encontraram proteção renal em ratos anestesiados com sevoflurano, nefrectomia direita foi realizada 14 dias antes do experimento com isquemia renal esquerda e reperfusão (para prevenir compensação pelo rim contra-lateral). Entretanto, após a retirada de um rim, no rim remanescente ocorrem múltiplas respostas que são adaptações fisiológicas. Entre as respostas mais precoces estão as alterações bioquímicas que precedem o crescimento celular do rim remanescente. Estas alterações já começam a acontecer em questão de minutos, como é o caso do

aumento da incorporação da colina, precursora do fosfolípídeo da membrana celular (Lowenstein & Toback, 1978; Toback et al., 1974). Em 14 dias, tempo utilizado por Obal et al., 2006, para realizar isquemia e reperfusão após nefrectomia, existe crescimento compensatório do rim remanescente de quase 40% (Dicker & Shirley, 1972). Estes autores, portanto, administraram sevoflurano para animais com rins diferentes de rins normais e, além disso, por apenas 15 minutos, aguardando, então, 10 minutos para realizar a isquemia renal. Durante a oclusão da artéria renal esquerda, os animais foram mantidos anestesiados com administração de S(+)-cetamina. No experimento de Curtis, 2008, - isquemia e reperfusão de rim esquerdo de rato (o rim direito tinha sido retirado imediatamente antes) sob efeito de S(+)-cetamina e de sevoflurano -, o grupo que foi anestesiado apenas com S(+)-cetamina teve o pior resultado de histologia do órgão e aquele no qual se empregou o sevoflurano, o melhor resultado.

Acredita-se que o sevoflurano tenha tido efeito na alteração encontrada das citocinas séricas e na expressão renal no grupo G1 e no grupo G2, da glibenclamida. Com a experiência adquirida com o estudo de Curtis, 2008, com as críticas ao de Obal et al., 2006, e com os relatos positivos a favor do emprego do sevoflurano em cirurgias cardíacas, pode-se posicionar favoravelmente quanto ao efeito, positivo, do sevoflurano nos ratos da presente pesquisa. Assim, a escolha do anestésico a ser utilizado em um procedimento cirúrgico também deve ser feita baseando-se na proteção ou agressão imunológica que o mesmo desencadeia.

A citocina TNF- α no soro dos ratos desta pesquisa já se encontrava aumentada em M1 – muito pouco em relação ao normal, nos ratos de G1, os quais não receberam a sulfoniluréia, e bastante em relação ao normal, nos de G2, que receberam a glibenclamida. Neste momento, os animais estavam anestesiados com sevoflurano e tinham sido operados para o estabelecimento do modelo da pesquisa, o que deve ter suscitado a elevação da citocina. A glibenclamida pode ter sido indutora da liberação desta citocina, o TNF- α .

Kentner et al., 2002, realizaram estudo com ratos nos quais retiraram sangue em quantidade igual a 3 ml para cada 100 g e com amputação da cauda.

Após hemostasia e ressuscitação com solução de Ringer, verificaram que a temperatura de $34^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ induziu resposta importante de citocinas pró-inflamatórias séricas (TNF- α).

No momento M2, já se haviam passado 50 minutos da primeira etapa de hemorragia e 30 minutos da terceira e última etapa. Esta hemorragia estimulou a liberação de TNF- α porque em G1 seus valores séricos estão muito elevados. Em G2, este aumento foi atenuado e a concentração desta citocina é o dobro do valor normal, porém é menor que a concentração observada em G1, levantando a possibilidade de que possa ter ocorrido exaustão na produção de TNF- α , ou modulação imunológica protetora pelas citocinas IL-10 e/ou TGF- β . Por outro lado, com a hemorragia, houve perda de quantidade sangüínea da sulfoniluréia e o estímulo para a produção de TNF- α estaria diminuído, vindo de encontro, portanto, com a redução dos valores da citocina observada em M2.

Logo, por esses resultados séricos pode-se inferir que a glibenclamida induziu a formação de TNF- α (M1) e esta citocina induz a formação de receptores solúveis (Engelmann et al., 1990; Dinarello, 1996). Assim, pode ter ocorrido, também, bloqueio de determinada quantidade, da anteriormente produzida, de TNF- α , sendo a quantidade resultante medida e exibida na Tabela 5, em M2. O aumento de TNF- α ocorreu mais tarde em G1 (entre M1 e M2) e, assim, este mecanismo proposto (protetor, uma vez que há receptores para TNF- α em praticamente todas as células orgânicas) deve ter ocorrido mais tarde e não foi medido nesta pesquisa.

Receptores solúveis de TNF- α estão presentes na circulação sangüínea de seres humanos saudáveis e podem agir como inibidores naturais da atividade do TNF- α . Há dois receptores de superfície celular, o p55 e o p75 (Engelmann et al., 1990; Dinarello, 1996). O próprio TNF- α induz a liberação desses receptores solúveis (Jansen et al., 1995), os quais agiriam como “carregadores” de TNF- α em certos modelos experimentais. Este fenômeno foi observado pela primeira vez adicionando-se quantidades aumentadas de receptores solúveis de TNF a células expostas ao TNF- α . A atividade biológica do TNF- α aumentou frente a baixas concentrações molares de receptor solúvel. Em concentrações molares

altas do receptor solúvel do TNF- α , a atividade desta citocina diminuiu, ocorrendo inibição dose-dependente dessa atividade (Aderka et al., 1992).

Com relação à expressão de TNF- α nos rins, a marcação é mais homogênea em G2 – células tubulares e glomerulares – sendo que todas as células estão marcadas e os rins são encontrados em maior número nas marcações mais intensas. A indução do seu aparecimento foi grande, portanto, mas a metabolização desta citocina não parece ter sido pronta. A distribuição da marcação de TNF- α em G1 não é homogênea e a maior parte dos rins tem marcação fraca, sendo observados rins não marcados.

A dedução que se faz em razão desses resultados é que a glibenclamida, além de induzir a formação de TNF- α sérico, também induz a formação de receptores renais de TNF- α . Portanto, em G2, o que foi produzido de TNF- α foi tomado pelos receptores tubulares e glomerulares, o que vale dizer que a glibenclamida comportou-se como pró-inflamatória, auxiliando a ação de TNF- α .

Entretanto, em pacientes com diabetes mellitus tipo II, Desfaits et al., 1998, demonstraram que a administração de glibenclamida inibia o aumento de adesão de monócitos a células endoteliais, assim reduzindo a produção de TNF- α por essas células. Em camundongos, Fukuzawa et al., 1999, investigaram efeitos de sulfoniluréias hipoglicemiantes, glicazida e glibenclamida, e de uma tiazolidinediona, a troglitazone, medicamentos antidiabéticos, administrados por via oral, na produção de TNF- α induzida por lipopolissacarídeo. Encontraram que a glibenclamida não teve efeito nem na produção e tampouco na ação desta citocina.

Jiang et al., 1997, demonstraram que o TNF- α é a primeira citocina a aparecer nos tecidos de ratos, seguida pela IL-1 β , após choque hemorrágico. Os autores sugerem que a liberação de citocinas em órgãos vitais pode representar papel importante na lesão dos mesmos após choque hemorrágico.

Sato et al., 2004, estudaram, no rato, o papel do TNF- α na disfunção renal após hemorragia de 16,5% da volemia, sem ressuscitação fluídica. Para tanto, utilizaram o composto FR167653 que antagoniza uma via de sinal intracelular com importante papel na expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Após uma hora de hemorragia, a expressão

do mRNA de TNF- α no rim e as concentrações séricas de TNF- α estavam mais altas. O tratamento intraperitoneal prévio com FR167653 inibiu significativamente o aumento de TNF- α . A infiltração de células inflamatórias e a lesão celular tubular, induzidas pela hemorragia, foram suprimidas e a disfunção renal foi dramaticamente reduzida no grupo que recebeu o tratamento com o referido composto. As alterações morfológicas também foram mais leves no grupo tratado, quando se comparou este ao grupo não tratado.

Trauma múltiplo e lesão por isquemia/reperfusão são situações que iniciam cascata de citocinas e resultam em processos inflamatórios sistêmicos e locais. Biologicamente, IL-1 e TNF- α são estreitamente correlacionadas embora suas estruturas e seus receptores sejam distintos. Estas duas citocinas são produzidas durante inflamação, lesão, problema imunológico ou infecção. Assim, as propriedades de IL-1 e TNF- α suscitariam respostas do hospedeiro a essas situações (Dinarelli, 1997).

Bahrami et al., 1997, sugeriram que TNF- α induzido por choque hemorrágico é um importante mediador fisiopatológico das alterações cardiovasculares, do dano a múltiplos órgãos e da letalidade em ratos.

O TNF- α é conhecido como a principal citocina pró-inflamatória que leva a falência de múltiplos órgãos relacionada ao dano renal devido à hemorragia e está relacionado com piora no prognóstico e morte (Sato et al., 2004). Os rins são capazes de produzir TNF- α em resposta a lipopolissacarídeos, ao próprio TNF- α , ou a interleucina-1. Os oxidantes liberados durante a reperfusão de um tecido isquêmico estimulam a transcrição de fatores envolvidos na expressão do TNF- α . Além disso, o próprio TNF- α é capaz de aumentar a sua produção através de um mecanismo de *up-regulation* (Donnahoo et al., 1999).

Os resultados da citocina sérica IL-1 dos animais do grupo controle, G1, deste estudo, estavam normais antes do início das sangrias e dobraram de valor no final do experimento, ou seja, provavelmente a hemorragia foi o estímulo para este aumento. No grupo G2, que recebeu glibenclamida, os valores de IL-1 estavam muito altos já antes da sangria e assim permaneceram até o final do experimento, ou seja, 30 minutos após ter ocorrido a última sangria. Assim, do mesmo modo que em relação ao TNF- α , é possível que a sulfoniluréia tenha sido

estímulo para o aumento de IL-1 sérica. No tecido renal, nas células glomerulares, não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos na marcação pela IL-1, porém todas as células têm marcação e a maioria dos rins tem marcação mais intensa. Nas células tubulares, a marcação da IL-1 é maior no grupo G2. Neste mesmo grupo, G2, todas as células estudadas estão marcadas e a maioria dos rins também tem marcação mais intensa.

Assim como acontece para o TNF- α , há receptores solúveis para IL-1 e estes inibem a ação desta citocina de modo dose-dependente (Dinarello, 1996). Pode ser que a imunomodulação que ocorreu para o TNF- α , por meio dos receptores solúveis, seja maior que para a IL-1, porque o TNF- α tem receptores em variedade maior de células no organismo que a IL-1. Portanto, seu bloqueio seria mais importante somente se estivesse em concentração muito alta.

A citocina IL-1 também é mediadora da imunidade natural. Produzida por macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células do músculo liso, atua regulando a maturação das células T e B e promovendo a síntese de outras citocinas. É também conhecida como fator pirogênico, já que induz o aumento da temperatura. Tem ação redundante junto ao TNF- α , porém, diferentemente deste, não causa dano tecidual por si só, não é letal, mesmo em altas concentrações, não causa lise ou necrose hemorrágica de células tumorais, e é mais potencializadora do que supressora em relação à medula óssea (Seadi, 1998).

A glibenclamida é sulfoniluréia de segunda geração, utilizada por via oral para tratamento do diabetes mellitus tipo II, exerce sua ação induzindo maior produção de insulina pelas células β pancreáticas e diminuindo o *clearance* hepático deste hormônio. Sua meia vida é de 4 ± 1 h, diminuindo a condutância do canal de K, ou seja, bloqueando os canais de K_{ATP} (Aguilar-Bryan et al., 1995; Philipson & Steiner, 1995).

Simard et al., 2009, observaram que a glibenclamida reduziu a inflamação após hemorragia subaracnóidea em ratos. Este fármaco seria potente inibidor farmacológico dos receptores para sulfoniluréia 1 (SUR1) e, assim, teria melhorado muitos efeitos patológicos associados com inflamação conseqüente à hemorragia subaracnóidea. Os dados apresentados pelos autores apontam para

o SUR1 como alvo terapêutico potencialmente importante para influir positivamente no edema vasogênico e morte celular associados à hemorragia subaracnóidea. Embora em outro tipo de tecido, este estudo indica ação positiva da glibenclamida frente aos efeitos de ação de citocinas, como o TNF- α , marcador de inflamação.

As propriedades biológicas de IL-1 e TNF- α mimetizam as respostas do hospedeiro a infecção, inflamação, lesão ou estímulo imunológico. Em modelos animais de inflamação sistêmica, bloqueio específico tanto de uma como da outra citocina reduz a gravidade da inflamação. As duas citocinas agem de modo sinérgico em quase todos os modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamação sistêmica ou local. Quando ambas são bloqueadas especificamente, a gravidade da inflamação se reduz (Dinarello, 1996).



Considerações Finais

Nesta pesquisa, a hemorragia e a glibenclamida mostraram-se indutoras de elevação das citocinas estudadas, IL-1 e TNF- α , e o sevoflurano, fator que atenuou este aumento. Em G1, acredita-se que o resultado de alterações renais poderia ter sido pior se os ratos não tivessem sido anestesiados com o sevoflurano. Em G2, o aumento sérico de TNF- α e IL-1 é inicial, antes da hemorragia e hipotensão, mas ajudou o rim a enfrentar, com vasodilatação (resultante da ação do TNF- α) e melhor perfusão, a isquemia conseqüente à hipotensão.



Conclusão

Os resultados da presente pesquisa em ratos anestesiados com sevoflurano e que sofreram hemorragia aguda sem reposição fluídica adequada mostram que houve alterações das citocinas TNF- α e IL-1. A hemorragia e a glibenclamida aumentaram a concentração sérica e a imunomarcção renal dessas citocinas, enquanto o sevoflurano pode ter diminuído. O sevoflurano e a glibenclamida, por mecanismos diferentes, suscitaram melhores respostas nos rins dos animais, sendo necessários, entretanto, outros estudos para elucidar melhor os achados desta pesquisa.



Referências

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda. 2007. 268-301.

Aderka D, Engelmann H, Maor Y et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*. 1992;175:323-9.

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. 1995;268:423-6.

Bahrami S, Yao YM, Leichtfried G et al. Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 2):H2219-26.

Boucher D, Goquesev J, Droz D. Expression of IL-6 and TNF-alpha in normal and pathological kidney. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1993;187:425-33.

Chaudry IH, Ayala A, Ertel W et al. Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am J Physiol*. 1990;28:R663-78.

Chaudry IH, Sayeed MM, Baue AE. Differences in the altered energy metabolism of hemorrhagic shock and hypoxemia. *Can J Physiol Pharmacol*. 1976;54:750-6.

Cheng YJ, Chien CT, Wang YP et al. Fluid administration prevents renal dysfunction during hypotension under spinal anaesthesia in a rat model. *Acta Anaesthesiol Sin*. 2003;41:7-12.

Cleveland JC Jr, Meldrum DR, Cain BS et al. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation*. 1997;96:29-32.

Curtis FG. Sevoflurano e dexmedetomidina em isquemia e reperfusão renais no rato. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.

da Silva-Santos JE, Santos-Silva MA, Cunha FQ et al. The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300:946-951.

Desfaits A-C, Serri O, Renier G. Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion, and tumor necrosis factor- α production in NIDDM patients after glicazide treatment. *Diabetes Care*. 1998;21:487-93.

de Souza Silva M, Castiglia YMM, Vianna PTG et al. Rat model of depending prostaglandin renal state: effect of ketoprofen. *Ren Fail*. 2006;28:77-84.

Dicker SE, Shirley DG. Compensatory hypertrophy of the contralateral kidney after unilateral ureteral ligation. *J Physiol*. 1972;220:199-210.

Diego LAS, Marques CD'O, Vianna PTG et al. Glibenclamide effects on renal function and histology after acute hemorrhage in rats under sevoflurane anesthesia. *Ren Fail*. 2007;29:1039-45.

Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;216:133-65.

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997;112:321S-9.

Donnahoo KK, Meng X, Ayala A et al. Early kidney TNF- α expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1999;277:R922-9.

Duran WN, Dillon PK. Effects of ischemia-reperfusion injury on microvascular permeability in skeletal muscle. *Microcirc Endothelium Lymphatics*. 1989;5:223-9.

El Azab SR, Rosseel PM, De Lange JJ et al. Effect of sevoflurane on the ex vivo secretion of TNF-alpha during and after coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol*. 2003;20:380-4.

Engelmann H, Holtmann H, Brakebusch C et al. Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J Biol Chem*. 1990;265:14497-504.

Ertel W, Morrison MH, Ayala A et al. Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release. *Am J Physiol*. 1995;269:160-6.

Erni D, Banic A, Wheatley AM et al. Haemorrhage during anaesthesia and surgery: continuous measurement of microcirculatory blood flow in the kidney, liver, skin and skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol*. 1995;12:423-9.

Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:2567-76.

Fukuzawa M, Satoh J, Qiang X et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α with anti-diabetic agents. *Diabetes Res Clin Pract*. 1999;43:147-54.

Hill GE. Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: Is this important? *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1998 (suppl 1);12:21-5.

Jansen J, van der Poll T, Levi M et al. Inhibition of the release of soluble tumor necrosis factor receptors in experimental endotoxemia by anti-tumor necrosis factor antibody. *J Clin Immunol*. 1995;15:45-50.

Jiang J, Tian K, Diao Y et al. Expression of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6 mRNA, release of TNF-alpha in vital organs and their relationship with endotoxin translocation following hemorrhagic shock. *Chin Med Sci J*. 1997;12:41-6.

- Kawamura T, Kadosaki M, Nara N et al. Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2006;20:503-8.
- Kentner R, Rollwagen FM, Prueckner S et al. Effects of mild hypothermia on survival and serum cytokines in uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Shock*. 2002;17:521-6.
- Kowalski C, Zahler S, Becker BF et al. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology*. 1997;86:188-95.
- Lowenstein LM, Toback FG. Metabolic response to renal compensatory growth. *Yale J Biol Med*. 1978;51:395-401.
- Mauriz JL, Martín Renedo J, Barrio JP et al. Experimental models on hemorrhagic shock. *Nutr Hosp*. 2007;22:190-8.
- Mazzoni MC, Warnke KC, Arfors K-E et al. Capillary hemodynamics in hemorrhagic shock and reperfusion: in vivo and model analysis. *Am J Physiol*. 1994;267:H1928-
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.
- Nader ND, Li CM, Khadra WZ et al. Anesthetic myocardial protection with sevoflurane. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004;18:269-74.
- Obal D, Dettwiler S, Favoccia C et al. Effect of sevoflurane preconditioning on ischaemia/reperfusion injury in the rat kidney *in vivo*. *Eur J Anaesthesiol*. 2006;23:319-26.
- Philipson LH, Steiner DF. Pas de deux or more: the sulfonylurea receptor and K⁺ channels. *Science*. 1995;268:372-3.

- Pompermayer K, Souza DG, Lara GG et al. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int.* 2005;67:1785-96.
- Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg.* 1993;218:769-76.
- Sato H, Tanaka T, Kita T et al. The role of tumour necrosis factor- α in renal dysfunction following mild haemorrhage in rats. *Int J Exp Path.* 2004;85:345-53.
- Simard JM, Geng Z, Woo SK et al. Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:317-30.
- Seadi C. *Princípios Básicos de Imunologia*. Canoas, Editora da ULBRA, 1998, 94-104.
- Toback FG, Smith PD, Lowenstein LM. Phospholipid metabolism in the initiation of renal compensatory growth after acute reduction of renal mass. *J Clin Invest.* 1974;54:91-7.
- Wu X, Stezoski J, Safar P et al. Mild hypothermia during hemorrhagic shock in rats improves survival without significant effects on inflammatory responses. *Crit Care Med.* 2003;31:195-202.
- Xiong L, Zheng Y, Wu M et al. Preconditioning with isoflurane produces dose-dependent neuroprotection via activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels after focal cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg.* 2003;96:233-7.
- Yao Y-M, Redl H, Bahrami S et al. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res.* 1998;47:201-10.

Zager RA, Altschuld R. Body temperature an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol.* 1986;251:87-93.

Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn D et al. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K_{ATP} channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology.* 2002a;97:4-14.

Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn D et al. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K_{ATP} channels activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology.* 2002b;97:15-23.

Tabela 9 - Peso (g), pressão arterial média (mmHg) (PAM) e temperatura retal (°C) (T) dos ratos do grupo controle (G1) nos dois momentos estudados

Rato	Peso	PAM		T	
		M1	M2	M1	M2
1	300	55	59	37,1	37,2
2	330	111	57	36,6	35,4
3	300	120	108	37,8	38
4	310	118	55	37,4	38,5
5	280	95	87	37,8	33,5
6	280	114	87	36,6	34,0
7	340	76	53	33,1	34,5
8	330	116	96	34,4	36,0
9	500	55	59	36,1	36,8
10	490	95	87	32,5	36,0

Tabela 10 - Peso (g), pressão arterial média (mmHg) (PAM) e temperatura retal (°C) (T) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos dois momentos estudados

Rato	Peso	PAM		T	
		M1	M2	M1	M2
1	480	58	60	38,6	37,9
2	370	84	72	35,2	36,8
3	310	67	64	36,1	36,4
4	300	122	83	37,4	36,2
5	270	96	41	34,9	36,2
6	360	109	87	37,3	36,0
7	340	86	69	38,9	37,8
8	370	101	87	35,6	36,0
9	280	68	87	38,0	37,1
10	300	98	78	37,9	36,3

Tabela 11– Valores séricos das citocinas TNF- α e IL-1 (pg/mL) e do hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo controle (G1) nos dois momentos estudados

Rato	TNF- α		IL-1		Ht	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2
1	218	686	156	218	39	33
2	204	584	148	188	43	28
3	186	417	155	321	42	35
4	108	676	96	288	37	28
5	146	426	174	512	42	33
6	200	331	181	317	39	32
7	174	562	162	227	39	34
8	208	404	188	297	43	34
9	184	528	106	326	39	33
10	158	478	122	532	42	37

Tabela 12– Valores séricos das citocinas TNF- α e IL-1 (pg/mL) e do hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos dois momentos estudados

Rato	TNF- α		IL-1		Ht	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2
1	527	402	286	288	38	33
2	488	316	512	374	39	34
3	512	288	308	246	37	33
4	617	186	317	488	44	34
5	388	129	361	402	38	33
6	467	208	407	427	41	32
7	502	317	294	265	30	26
8	480	218	286	223	40	33
9	561	308	311	322	33	29
10	320	246	388	238	31	26

Tabela 13 - Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo controle (G1)

Número do rim	% células marcadas
1	1
2	0
3	0
4	1
5	1
6	1
7	1
8	1
9	1
10	1
11	1
12	1
13	1
14	3
15	1
16	2
17	4
18	3
19	3
20	2

Legenda

% células marcadas

0 – sem marcação

1 – até 25% do campo

2 – de 26 a 50%

3 – de 51 a 75%

4 – de 76 a 100%

Tabela 14 - Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2)

Número do rim	% células marcadas
1	4
2	1
3	3
4	1
5	2
6	1
7	4
8	4
9	4
10	1
11	3
12	4
13	3
14	3
15	2
16	3
17	3
18	4
19	4
20	1

Legenda

% células marcadas
 0 – sem marcação
 1 – até 25% do campo
 2 – de 26 a 50%
 3 – de 51 a 75%
 4 – de 76 a 100%

Tabela 15 - Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo controle (G1)

Número do rim	% células marcadas
1	1
2	0
3	0
4	1
5	1
6	1
7	1
8	1
9	1
10	1
11	3
12	1
13	2
14	3
15	1
16	2
17	4
18	3
19	3
20	3

Legenda

% células marcadas
 0 – sem marcação
 1 – até 25% do campo
 2 – de 26 a 50%
 3 – de 51 a 75%
 4 – de 76 a 100%

Tabela 16 - Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina TNF- α nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2)

Número do rim	% células marcadas
1	4
2	1
3	4
4	1
5	3
6	1
7	4
8	4
9	4
10	1
11	3
12	4
13	4
14	4
15	2
16	3
17	3
18	4
19	4
20	1

Legenda

% células marcadas

0 – sem marcação

1 – até 25% do campo

2 – de 26 a 50%

3 – de 51 a 75%

4 – de 76 a 100%

Tabela 17 – Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo controle (G1.)

Número do rim	% células marcadas
1	0
2	2
3	0
4	2
5	1
6	3
7	0
8	0
9	1
19	0
11	2
12	1
13	0
14	1
15	3
16	2
17	3
18	3
19	3
20	1

Legenda

% células marcadas
 0 – sem marcação
 1 – até 25% do campo
 2 – de 26 a 50%
 3 – de 51 a 75%
 4 – de 76 a 100%

Tabela 18 - Porcentagem de células tubulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2)

Número do rim	% células marcadas
1	2
2	1
3	3
4	2
5	2
6	1
7	3
8	4
9	3
10	2
11	2
12	2
13	3
14	3
15	1
16	2
17	3
18	4
19	3
20	4

Legenda

% células marcadas
 0 – sem marcação
 1 – até 25% do campo
 2 – de 26 a 50%
 3 – de 51 a 75%
 4 – de 76 a 100%

Tabela 19 - Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo controle (G1)

Número do rim	% células marcadas
1	1
2	4
3	1
4	3
5	1
6	4
7	0
8	1
9	2
10	1
11	3
12	1
13	0
14	0
15	4
16	2
17	4
18	4
19	4
20	2

Legenda

% células marcadas

0 – sem marcação

1 – até 25% do campo

2 – de 26 a 50%

3 – de 51 a 75%

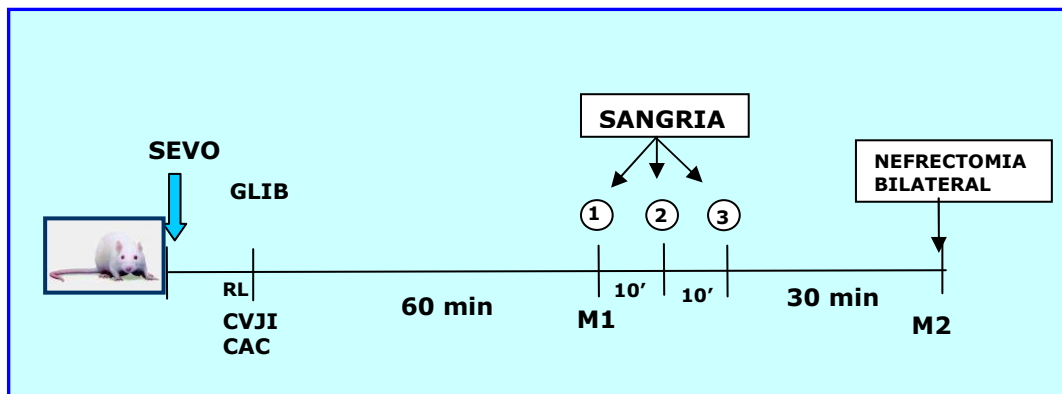
4 – de 76 a 100%

Tabela 20 - Porcentagem de células glomerulares marcadas pela citocina IL-1 nos rins dos ratos do grupo glibenclamida (G2)

Número do rim	% células marcadas
1	1
2	1
3	4
4	3
5	3
6	1
7	3
8	3
9	3
10	3
11	2
12	2
13	2
14	4
15	1
16	3
17	3
18	3
19	4
20	4

Legenda

% células marcadas
 0 – sem marcação
 1 – até 25% do campo
 2 – de 26 a 50%
 3 – de 51 a 75%
 4 – de 76 a 100%



Esquema do Desenvolvimento do Modelo Experimental

CVJI = cateterização da veia jugular interna
CAC = cateterização da artéria carótida
Sevo = sevoflurano
Glib = glibenclamida