

Mariana Cecília Ramirez Zamorano

*Histologia e citocinas renais após ressuscitação fluídica de ratos
submetidos à hemorragia aguda sob efeito do sevoflurano*

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

Prof^a Titular Yara Marcondes Machado Castiglia

Orientadora

Botucatu – SP

2013

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

(Marcel Proust)

Dedicatória

Aos meus pais, Alfonso e Laura, pelo exemplo de vida, dedicação e superação.

Às minhas irmãs, Marcela e Marisol, pela grande amizade e apoio incondicional.

Ao meu companheiro, Carlos, pela ajuda, compreensão e carinho.

Agradecimentos à minha Orientadora

Este agradecimento especial é dedicado para esta grande mulher, a querida Professora Titular Yara Marcondes Machado Castiglia que, além de excelente docente e profissional, mostrou ser, ao longo desses anos, uma pessoa de extrema sabedoria.

Admiro esta pessoa por tudo o que ela representa: ética, profissionalismo, responsabilidade e respeito, legados que com certeza levarei por toda a vida.

Agradeço pela contribuição para a finalização deste projeto, contando com a sua dedicação e experiência. Agradeço pelos conselhos frente às dificuldades e pelas palavras de apoio e confiança frente aos novos desafios.

Serei grata à minha eterna professora...

Agradecimentos

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da FMB-Unesp, Neli Aparecida Pavan, pelo auxílio e apoio durante toda a minha pós-graduação, Joana Jacirene Costa Teixeira, Sônia Maria Martins da Silva e André Renato Passaroni, pela ajuda em todos esses anos;

ao colega de Pós-Graduação, Fabio dos Santos Cosso Martins, pela ajuda na parte experimental desta pesquisa;

ao Dr Leopoldo Muniz da Silva, pelo incentivo e apoio estatístico, assim como pela amizade de longa data;

ao Prof. Dr Viciany Erique Fabris, do Departamento de Patologia da FMB, UNESP, responsável pela análise histológica;

à Profª Drª Lídia Raquel de Carvalho, do Instituto de Biociências, UNESP, pela realização da análise estatística dos resultados desta pesquisa;

à Drª Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da UNESP, pela realização da análise imunoistoquímica;

aos técnicos do Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia, Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, pela ajuda na realização experimental deste trabalho;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES -, pela concessão de Bolsa de Doutorado;

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP -, pela concessão de Auxílio à Pesquisa, Processo 2009/51983-9.

Zamorano MCR. Histologia e citocinas renais após ressuscitação fluídica de ratos submetidos à hemorragia aguda sob efeito do sevoflurano. Botucatu, 2013. 66p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

OBJETIVO: Em ratos anestesiados com sevoflurano, após hemorragia aguda, investigar a influência da ressuscitação fluídica com solução de Ringer ou hidroxietilamido 130/0,4 (HEA) pelas alterações da pressão arterial média (PAM), histologia e expressão de citocinas renais.

MÉTODO: Foram anestesiados 44 ratos com sevoflurano, alocados em 4 grupos (n=12): GSevo - ratos submetidos à hemorragia, sem ressuscitação fluídica, GRinger - hemorragia e ressuscitação com solução de Ringer (proporção de 3:1 de sangue retirado), GHEA – hemorragia e ressuscitação com HEA (proporção de 1:1) e GSham - sem hemorragia. A hemorragia foi de 30% da volemia: três etapas de 10% a cada 10 minutos. Realizada hidratação basal com solução de Ringer, 7 mL/kg/h, em todos os animais. Após o fim da ressuscitação fluídica, realizada nefrectomia bilateral nos 4 grupos para análise histológica e das citocinas fator- α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) renais.

RESULTADOS: No final do experimento todos os grupos apresentaram hipotensão arterial, exceto GHEA. A degeneração tubular foi a lesão mais encontrada, estando presente em todos os grupos, mais intensa em GSham. Apenas em GSham, GRinger e GHEA foi observada necrose tubular - um rim de cada grupo. Houve expressão de IL-1 em todos os rins, porém com significância estatística apenas em GHEA. A expressão de TNF- α ocorreu em todos os grupos, mas sem diferença entre eles.

CONCLUSÃO: A resposta da pressão arterial média foi melhor após ressuscitação com HEA. O sevoflurano e/ou o estresse cirúrgico foram responsáveis pela degeneração tubular e expressão renal de IL-1 e TNF- α e a administração basal de Ringer melhorou a resposta histológica, enquanto que o HEA acentuou a expressão de IL-1.

Palavras-Chave: Anestésicos inalatórios; Fator de necrose tumoral-alfa; Interleucina-1; Ratos; Rim

Zamorano MCR. Renal histology and cytokine expression after fluid resuscitation in rats submitted to acute hemorrhage under sevoflurane effect. Botucatu, 2013. 66p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology) – Botucatu Medical School, São Paulo State University.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To investigate the influence of fluid resuscitation with Ringer solution versus hydroxyethyl starch 130/0.4 (HES) on mean arterial pressure (MAP), and renal histology and cytokine expression in rats submitted to acute hemorrhage under sevoflurane anesthesia

METHOD: Forty-four rats anesthetized with sevoflurane were allocated into 4 groups (n=12): GSevo- hemorrhage with no fluid resuscitation, GRinger- hemorrhage and resuscitation with Ringer solution (3:1 of blood loss), GHES – hemorrhage and resuscitation with HES (1:1), and GSham - without hemorrhage. Hemorrhage was induced by withdrawing 30% blood volume loss over 30 minutes (10% every 10 min). All animals received 7 mL/kg/h of Ringer solution for basal hydration. Bilateral nephrectomy was conducted in all animal groups for the analysis of renal histology and expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1).

RESULTS: All groups, except GHES, showed arterial hypotension by the end of the experiment. Tubular degeneration was the most frequent lesion, which was observed in all groups. Acute tubular necrosis was found in one kidney in GRinger, GHES, and GSham. IL-1 was expressed in all kidneys, but statistical significance was reached only in GHES. TNF- α was expressed in all groups without any difference among groups.

CONCLUSION: MAP response was improved after the use of HES solution. Sevoflurane and/or surgical stress were/was responsible for tubular degeneration and IL-1 and TNF- α renal expression. Basal hydration attenuated the lesions observed on kidney histology, while HES attenuated IL-1 expression.

Key-words: Anesthetics, inhalation; Histology; Interleukin-1; Kidney; Rats; Tumor necrosis factor-alpha.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média $\pm$ desvio padrão referentes ao peso (g) dos ratos segundo grupo.....	29
Tabela 2	Média $\pm$ desvio padrão referentes à temperatura retal (°C) segundo momento e grupo.....	29
Tabela 3	Média $\pm$ desvio padrão referentes à pressão arterial média (mmHg) segundo momento e grupo.....	30
Tabela 4	Média $\pm$ desvio padrão referentes ao hematócrito (%) segundo momento e grupo.....	31
Tabela 5	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 quanto à marcação de TNF- α nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos estudados.....	32
Tabela 6	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 quanto à marcação da IL-1 nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos estudados.....	33
Tabela 7	Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de DV dentro de cada grupo.....	35
Tabela 8	Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de CV dentro de cada grupo.....	36
Tabela 9	Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de DT segundo escore e dentro de cada grupo.....	37
Tabela 10	Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de DGT segundo escore e dentro de cada grupo.....	38
Tabela 11	Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de NT segundo escore e dentro de cada grupo.....	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Rim (rato). (A e B) - Imunomarcção leve em túbulos renais (escore 1), 20x e 40x. (C e D) - Imunomarcção tubular moderada (escore 2), 20x e 40x. (E e F) - Acentuada marcação nos túbulos renais (escore 3), 20x e 40x. Imunoistoquímica, TNF- α , ABC, DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris... 34
- Figura 2** Análise histológica de rins de ratos submetidos à hemorragia de 30% da volemia e que receberam solução de Ringer (esquerda), GRinger, e solução de hidroxietilamido130/0,04 kDa (direita), GHEA. À esquerda, degeneração tubular e à direita, dilatação tubular. Coloração: hematoxilina/eosina – HE 39

SUMÁRIO

1 Introdução.....	11
2 Objetivo.....	19
3 Material e Método.....	21
3.1 Atributos estudados.....	24
3.2 Momentos estudados.....	24
3.3 Tamanho da amostra.....	25
3.4 Análise histológica.....	25
3.5 Análise imunohistoquímica.....	26
3.6 Análise estatística.....	27
4 Resultados.....	28
4.1 Peso dos ratos.....	29
4.2 Temperatura retal.....	29
4.3 Pressão arterial média (PAM).....	30
4.4 Hematócrito.....	31
4.5 Fator alfa de necrose tumoral (TNF- α).....	32
4.6 Interleucina-1 (IL-1).....	33
4.7 Dilatação vascular (DV).....	35
4.8 Congestão vascular (DV).....	36
4.9 Dilatação tubular (DT).....	37
4.10 Degenetação tubular (DGT).....	38
4.11 Necrose tubular (NT).....	39
5 Discussão.....	40
6 Considerações Finais.....	53
7 Conclusão.....	55
8 Referências.....	57

1 INTRODUÇÃO

O choque hemorrágico continua sendo a principal causa de morte evitável, seja pelo sangramento maciço, seja por seu efeito em múltiplos órgãos, atingindo mortalidade de aproximadamente 40% naqueles pacientes que receberam grande quantidade de transfusão sanguínea ou que desenvolveram coagulopatia importante. (Frith et al.,2010). Observa-se diminuição do fluxo sanguíneo com redução da oxigenação dos tecidos. Esta hipóxia tecidual parece ser o principal fator na produção de alterações nas células e no metabolismo orgânico (Ertel et al.,1995). A perda significativa de volume intravascular inicia a resposta neuroendócrina, com produção de mediadores inflamatórios e ativação de substâncias como as interleucinas, espécies reativas de oxigênio e moléculas de adesão, além da ativação da cascata de coagulação e complemento (Yao et al.,1998).

O choque hemorrágico, se persistente e não tratado, desencadeia comprometimento de múltiplos órgãos, provocando alterações na função e histologia. A isquemia renal perioperatória é complicação comum, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes cirúrgicos. A fisiopatologia da isquemia renal não está totalmente estabelecida, porém sabe-se que alterações do endotélio vascular, resposta imunológica, mediadores inflamatórios e morte celular desempenham papel importante. Alterações hemodinâmicas podem determinar vasoconstrição das arteríolas renais, ocasionando lesões isquêmicas do parênquima renal por mecanismo de redistribuição de fluxo sanguíneo. Os fatores reconhecidamente associados a este fenômeno são hipovolemia e alterações hormonais decorrentes da resposta endócrino-metabólica ao estresse cirúrgico, como o aumento da secreção de hormônio antidiurético, catecolaminas, aldosterona e angiotensina, além da redução do fator natriurético atrial e do óxido nítrico (Lema et al.,1998).

Diego et al., 2007, desenvolveram pesquisa com ratos em hipotermia leve, sob anestesia com sevoflurano, tratados com glibenclamida e submetidos à hemorragia de 30% de sua volemia, por vinte minutos, sem reposição adequada do volume perdido. Esses autores estavam interessados em saber, do ponto de vista histológico, quais seriam as influências sobre o rim já após trinta minutos da hemorragia. Observou-se que o hematócrito dos animais que sofreram sangria foi 4% mais baixo que o do grupo

controle e as alterações renais, tais como dilatação e congestão vasculares, vacuolização tubular e, principalmente, dilatação e degeneração tubulares, além de necrose tubular, foram significativamente menores no grupo tratado com glibenclamida.

Rushing & Britt, 2008, em revisão de literatura, enfatizam que, além de se assegurar via aérea estável e ventilação adequada para os pacientes em choque hemorrágico, o tratamento primário tem de se voltar para o sangramento. A reposição da perda sanguínea é necessária para a liberação de oxigênio tecidual, mas ainda resta saber qual seria o tempo durante o qual se deve realizar essa ressuscitação e a extensão da mesma. Diferentes estratégias de ressuscitação são utilizadas para manter a pressão sanguínea no trauma até que o sangramento seja controlado. Contudo, enquanto se mantém a pressão sanguínea, muitas vezes se piora o sangramento. Dentre os diversos estudos realizados para se saber qual a melhor estratégia de ressuscitação quanto ao tempo em que ela deve ocorrer, o de Turner et al., 2000, mostrou que não há diferença na mortalidade entre administração precoce de fluidos (10,4%) e tardia (9,8%) em 1309 pacientes traumatizados. O estudo de Bickel et al., 1994, controlado e randomizado em 598 pacientes traumatizados e hipotensos já havia mostrado o mesmo resultado.

Hirshberg et al., 2006, elaboraram modelo multicompartimental intravascular em paciente de 70 kg, avaliando a influência do tempo de infusão fluídica no tratamento de hemorragia. A administração de dois litros de cristaloides em bolus durante o início da hemorragia aumentou o tempo de sangramento em torno de 4 a 29%, incrementando a perda sanguínea, particularmente quando ela foi lenta. Bolus similar, administrado após o aparecimento da hemostasia intrínseca, desencadeou novo sangramento.

Os cristaloides normalmente empregados na reposição volêmica atravessam o endotélio capilar após a sua administração, sendo que após uma hora, apenas 20-25% do volume administrado permanecem no intravascular, podendo levar à infusão excessiva de volume (Lobo et al., 2006). Essa sobrecarga hídrica produz efeitos deletérios em diversos órgãos, contribuindo para aumento de tempo de ventilação mecânica, prejuízo na cicatrização de feridas com aumento de translocação bacteriana, aumento de tempo de permanência em UTI, síndrome compartimental abdominal, edema cerebral e acidose

metabólica (Hahn, 2010). Na tentativa de minimizar a administração de grandes volumes de cristaloides, foi proposto o uso de soluções coloidais.

Os coloides são classificados de acordo com o tamanho de suas partículas. A albumina humana, por exemplo, apresenta tamanho molecular de aproximadamente 69 kDa, enquanto que os coloides semissintéticos apresentam variações no tamanho de suas moléculas, promovendo diferentes graus de dispersão (Vercueil et al., 2005). A capacidade de expansão plasmática depende do peso molecular da solução, da concentração de moléculas osmoticamente ativas, da expansão intravascular e da integridade do endotélio (Upadhyay et al., 2005).

Os hidroxietilamidos são caracterizados pelas suas diferentes concentrações (3, 6 e 10%), diferentes pesos moleculares médios (70, 130, 200 e 450 kDa) e diferentes graus de substituição. Quanto maior o grau de substituição, maior será a meia-vida da solução. Essas particularidades são determinantes para o efeito expansor plasmático e pressão oncótica, além dos eventos adversos sobre o sistema de coagulação, a função renal e a anafilaxia (Lobo et al., 2006). Anafilaxia e eventos anafilactoides, apesar de raros, têm sido descritos em associação com coloides semissintéticos e albumina. A incidência de reações graves é mais frequente com gelatinas do que com hidroxietilamidos, dextranas ou albumina (Grocott et al., 2005).

Estudo investigou a influência de diferentes tipos de coloides e cristaloides sobre a ocorrência de eventos renais (aumento de duas vezes na concentração de creatinina ou necessidade de diálise), avaliando a mortalidade por meio de análises multivariadas e pontuação de propensão. Evento renal ocorreu em 17% dos pacientes. Após o ajuste de potenciais fatores de confusão, o uso de coloides artificiais hiperoncóticos e albumina hiperoncótica foi significativamente associado à ocorrência de evento renal. A mortalidade na UTI foi de 27,1% e a utilização de albumina hiperoncótica associou-se a maior risco de morte nessa unidade. Este estudo sugere que, com o uso de coloides hiperoncóticos, podem existir efeitos nocivos sobre a função renal. A lesão renal não pode ser descartada, devendo seu emprego ser considerado com precaução (Schortgen et al., 2008).

Estudo de Honore et al., 2008, levantou a hipótese de que o uso de expansores volêmicos hiperoncóticos promoveria lesão renal. A ocorrência de eventos renais adversos sugere que a hiperoncogenicidade é mais relevante do que a natureza do produto em si. O tipo de *hydroxyethylstarch* (HES) utilizado foi o 130 /0.4 kDa a 6%. Surpreendentemente, este HES, moderno, embora seja menos hiperoncótico, não reduziu o risco de eventos renais adversos. Mecanismos de lesão permanecem obscuros, mas a desidratação grave associada à vasoconstrição da artéria renal parecem ser requisitos prévios. Geralmente, a síndrome hiperoncótica é vista quando a pressão oncótica é tão alta que esta compensa a pressão hidráulica de filtração glomerular e, como consequência, suprime a produção de urina. Síndrome hiperoncótica não se associa a alterações histológicas na maioria dos casos e, portanto, pode ser considerada lesão de natureza reversível. Entretanto, lesões histológicas mínimas podem ocorrer em túbulos proximais na síndrome hiperoncótica relacionada a transplante renal.

Metanálise realizada pela Cochrane, 2012, comparou os efeitos dos coloides com os dos cristaloides na reposição fluídica em pacientes graves (trauma, queimadura e pós-operatório) e o seu desfecho. Foram identificados 74 ensaios, sendo 66 com dados de mortalidade. Vinte e quatro ensaios compararam o uso de cristalóide com albumina ou plasma fresco (9920 pacientes), 21 ensaios compararam com o uso de hidroxietilamido (1385 pacientes), 11 ensaios compararam com o uso de gelatina modificada (506 pacientes) e nove ensaios compararam com o uso de dextran (834 pacientes), além de nove ensaios que compararam emprego de dextran e cristalóide hipertônico com o de cristalóide isotônico (1985 pacientes). Concluiu-se que não há evidências de que a ressuscitação com coloides reduza o risco de morte em pacientes com trauma, queimaduras ou em pós-cirurgia. Os coloides não estariam associados a aumento da sobrevida (Perel & Robert, 2012).

James et al., 2011, realizaram estudo controlado, randomizado e duplo-cego que comparou o uso de solução salina a 0,9% com hidroxietilamido 130/0,4 em pacientes com trauma grave, sendo avaliadas a ressuscitação volêmica, a recuperação gastrointestinal, a função renal e a administração de derivados de sangue. Foram estudados 109 pacientes e a sua evolução ao longo da internação. Os pacientes foram

divididos quanto ao mecanismo de trauma, contuso ou penetrante, e quanto ao tipo de fluido administrado, solução salina 0,9% ou HES, sendo formados quatro grupos: B-HES (trauma contuso/HES), B-SAL (trauma contuso/solução salina 0,9%), P-HES (trauma penetrante/HES) e P-SAL (trauma penetrante/solução salina 0,9%). Não houve diferenças em relação ao tempo de recuperação da função intestinal ou à mortalidade entre os grupos. No trauma penetrante, o grupo que recebeu hidroxietilamido mostrou melhor depuração de lactato e menor lesão renal do que o grupo da solução salina (0% x 16%).

Outra pesquisa procurou avaliar a segurança e eficácia de solução coloidal para ressuscitação no trauma, retrospectivamente. Foram estudados dois grupos de pacientes, um ressuscitado de acordo com o atendimento padrão do serviço, denominado grupo SOC (*standard of care*) e um segundo grupo ressuscitado com o mesmo protocolo, porém mais complemento de 500 a 1000 mL de solução HET (*hetastarch* a 6% + SOC) nas primeiras duas horas de atendimento. Foram 1714 admissões, sendo 909 pacientes do grupo SOC e 805 pacientes pertencentes ao grupo SOC + HET. O grupo que recebeu o coloide apresentou redução da mortalidade, sem evidência de coagulopatia. Esse dado, porém, pode ter sido influenciado por viés de seleção, uma vez que o grupo que recebeu complemento de HET foi escolhido para receber esta terapêutica. Sendo assim, um estudo randomizado deve ser realizado para garantir o benefício de um tratamento relativamente ao outro (Ogilvie et al., 2010).

O choque hemorrágico deve ser abordado como etiologia multifatorial, pois recentes estudos sugerem que o desequilíbrio imunológico junta-se ao desequilíbrio circulatório. As pesquisas, na tentativa de encontrar tratamento para o choque hemorrágico, têm como alvo não apenas a restauração do volume, mas também a prevenção e a melhora dos efeitos inflamatórios e imunológicos consequentes à hemorragia. Infelizmente, os estudos laboratoriais repetidamente mostram que a escolha do fluido de ressuscitação pode piorar a disfunção celular induzida pela hemorragia, a modulação imunológica e a inflamação (Santry & Alam, 2010).

O fator de necrose tumoral, TNF, está envolvido na regulação da proliferação celular e da apoptose, apresentando também atividade pró-inflamatória. A família de

receptores de TNF tem quatro domínios extracelulares, que incluem receptores solúveis para TNF- α e TNF- β , bem como CD40 ligado à membrana (importante para células B e ativação de macrófagos) e Fas (sinaliza a célula à apoptose). Desse modo, TNF- α é uma citocina multifuncional que participa da patogênese de várias doenças, incluindo doenças autoimunes, inflamatórias e neurodegenerativas, diabetes *mellitus*, choque séptico e insuficiência cardíaca congestiva. É a principal citocina mediadora da inflamação aguda, ativa as plaquetas e desempenha, também, papel na gênese da febre, anemia e caquexia. Assim como o TNF- α , a interleucina-1 (IL-1) é produzida em resposta a estímulos inflamatórios e entra como mediadora de diversas respostas fisiológicas, incluindo a inflamação e as reações imunológicas. Na homeostase, as ações da IL-1 são mantidas em equilíbrio pelo seu inibidor natural, a IL-1ra (Tayal & Kalra, 2008). Grande variedade de entidades clínicas, incluindo doenças autoimunes, infecções, tumores sólidos, leucemia, doença de Alzheimer, trauma, infarto isquêmico do miocárdio, asma, enxerto *versus* hospedeiro e hemodiálise, associa-se ao aumento da produção de IL-1 (Dinarello, 1996).

A pesquisa está progredindo rapidamente na área das citocinas e ampliando a sua aplicação clínica, sendo a administração de citocinas recombinantes purificadas e a utilização dos seus antagonistas as duas principais modalidades terapêuticas. No choque séptico e na falência múltipla de órgãos, as citocinas já têm papel bem estabelecido através de três fortes evidências: 1. aumento dos níveis circulantes de citocinas em animais e pacientes com choque séptico; 2. indução de resposta inflamatória com a administração desses agentes; 3. prevenção de dano aos órgãos e diminuição de mortalidade pelo bloqueio específico experimental com anticorpos. No choque hemorrágico, porém, o papel das citocinas ainda não está bem estabelecido (Yao et al., 1998).

Justificativa

Técnicas e fármacos anestésicos mostram avanço contínuo, mas o anestesiológista ainda não está livre de complicações perioperatórias. Se há hipovolemia por hemorragia, por exemplo, haverá reações compensatórias, como ativação do sistema

Introdução

renina-angiotensina-aldosterona, interferindo na função do rim, podendo levar a isquemia renal. Na prática clínica, muitas vezes observam-se situações de hemorragia aguda em pacientes submetidos a cirurgias que normalmente não apresentariam grandes perdas sanguíneas. Por isso mesmo, o que se observa é que a reposição dessa perda nunca é imediata, tanto com solução cristaloide como com coloide, ou mesmo com sangue. Até que se consiga repor a perda sanguínea, com uma ou outra solução ou componente sanguíneo, decorre um período de tempo. Quais as reais consequências que essa situação traz para o rim? Os resultados encontrados na literatura são controversos, havendo espaço para muitas pesquisas.

2 OBJETIVO

Em ratos anestesiados com sevoflurano e que foram submetidos à hemorragia aguda, investigou-se a influência da ressuscitação fluídica com solução de Ringer ou hidroxietilamido 130/0,4 na pressão arterial média e na histologia e expressão de citocinas renais.

3 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização desta pesquisa, foi obtida a autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp. Este estudo foi desenvolvido com ratos *Wistars* machos, adultos, com pesos superiores a 250g, fornecidos pelo Biotério Central do campus de Botucatu. Após terem sido anestesiados com sevoflurano a 4% em O₂, em câmpânula apropriada, os animais foram intubados, mantidos anestesiados com sevoflurano e distribuídos, por sorteio, em quatro grupos. A amostra de cada grupo constou de 12 animais.

GSevo - ratos submetidos à hemorragia de 30% da volemia, sem reposição;

GRinger - ratos submetidos à hemorragia de 30% da volemia e à reposição com solução de Ringer;

GHEA - ratos submetidos à hemorragia de 30% da volemia e à reposição com solução de hidroxietilamido 130/0,4;

GSham - ratos que não foram submetidos à hemorragia.

Os ratos receberam sevoflurano em concentração necessária para manipulação cirúrgica (Vaporizador Ohmeda, EEUU), com oxigênio em FIO₂ de 0,3 e ventilação artificial realizada com o aparelho Rodent Ventilator, mod 683 (EEUU), sem reinalação. Após a instalação da anestesia, o animal foi colocado sobre e coberto com bolsa térmica pré-aquecida. Em todos os animais foi:

- 1) utilizado termômetro de álcool para leitura contínua da temperatura retal;
- 2) dissecada a veia jugular interna direita para que se introduzisse *venocath* número 24 G; por esta via foi iniciada a administração de solução de Ringer na velocidade de 7mL/kg/h;
- 3) dissecada a artéria carótida esquerda, a qual foi cateterizada com *venocath* número 24 G para leitura da pressão arterial média; para tanto, o *venocath* foi conectado ao aparelho Datex Engstron (Finlândia) que forneceu a leitura contínua da pressão arterial média.

Após 30 minutos do início do experimento, os animais dos três grupos sofreram sangria correspondente a 30% da volemia, pela artéria carótida, realizada em três momentos com intervalo de 10 minutos entre eles. Em cada momento foram retirados

10% da volemia, que foi calculada como sendo igual a 6% dos pesos corpóreos dos ratos (Erni et al., 1995). Passados 20 minutos da 3ª e última sangria, a reposição do total de sangue retirado (30% da volemia) foi iniciada, com solução de Ringer (GRinger), em proporção de reposição de 3:1 de todo o sangue retirado e com solução de hidroxietilamido 130/0,4 kDa (GHEA), em proporção de 1:1 de todo o sangue retirado (Nascimento et al., 2006). A velocidade de infusão foi aquela que repôs a quantidade em 30 minutos (Ferreira et al., 2005), quando se deu o final do experimento.

Em cada tempo de sangria foram observadas: a pressão arterial média, a temperatura retal e a frequência cardíaca.

O volume de sangue da 1ª sangria foi separado para leitura do hematócrito. Vinte minutos após o 3º tempo de sangria, quando se iniciou a reposição do volume total de sangue retirado, foi coletada amostra de sangue também para leitura do hematócrito, o mesmo acontecendo no final do experimento (momentos M1, M2 e M3, respectivamente). Para essa determinação, foi utilizado o método do micro-hematócrito, com o aparelho Centremicro da Fanem (Brasil), sendo o resultado expresso em porcentagem.

Cessada a reposição com solução de Ringer e HEA, e tendo sido retirada a amostra sanguínea para determinação do hematócrito, foi realizada laparotomia para nefrectomia bilateral. Imediatamente após, os ratos, ainda anestesiados, foram sacrificados com injeção venosa de cloreto de potássio, 19,1%, em dose necessária para que a pressão arterial caísse até zero.

Os rins dos animais foram colocados em solução de Duboscq-Brasil, durante 24 horas, sendo, a seguir, armazenados em álcool 70% para posterior estudo histológico. A solução de Duboscq-Brasil foi utilizada com o intuito de preservar e fixar as estruturas renais, aumentando a fidedignidade da análise histológica. Foi preparada na seguinte proporção: 6mL de formol 40%, 12 mL de álcool absoluto, 1,5 mL de ácido acético e 8 mL de ácido pícrico em solução saturada.

3.1 Atributos estudados

Os atributos estudados em cada um dos animais dos dois grupos de estudo foram:

1. pressão arterial média
2. hematócrito
3. exame histológico dos rins
4. expressão das citocinas TNF- α e IL-1 no tecido renal

O peso e a temperatura retal serão apresentados para demonstrar o perfil dos grupos.

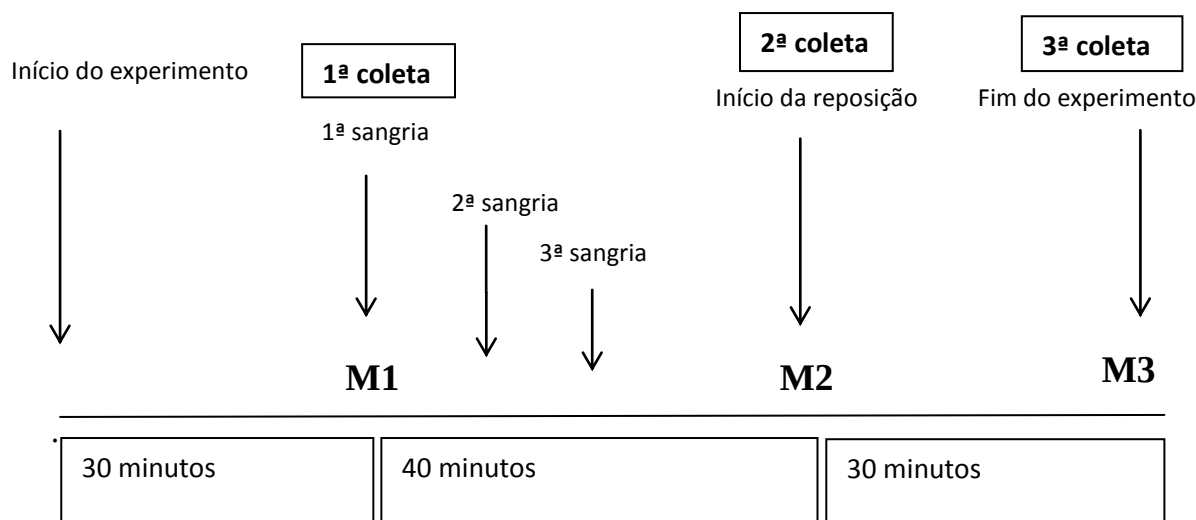
3.2 Momentos estudados

A pressão arterial média e o hematócrito foram estudados em M1, M2 e M3, sendo:

M1 – momento utilizado como controle e obtido 30 minutos após o início do experimento, correspondendo ao tempo em que ocorreu a 1^a sangria;

M2 - momento obtido 40 minutos após a 1^a sangria e 20 minutos após a 3^a sangria;

M3 – momento em que os ratos foram sacrificados e foi realizada a nefrectomia bilateral, tendo sido obtido 50 minutos após a 3^a sangria e 30 minutos após M2.



Esquema da sequência experimental

3.3 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi determinado baseando-se em dados da literatura – Diego et al., 2007. Considerando-se uma diferença em torno de 4% entre médias de hematócrito dos grupos, com desvio padrão de 3,5%, nível de 5% de significância e poder do teste de 80%, o tamanho da amostra ficou determinado em 12 animais em cada grupo.

3.4 Análise histológica

Após o preparo das lâminas dos rins dos animais (fixação em parafina e coloração com hematoxilina/eosina), elas foram avaliadas quanto à presença de dilatação e congestão vasculares, dilatação, degeneração e necrose tubulares. Foram aplicados escores correspondentes ao grau de importância de cada uma das possíveis alterações, sendo atribuído valor zero à ausência de tais alterações, valor um para as alterações leves, dois para as moderadas e três para as intensas. O patologista que observou as alterações não teve conhecimento a qual grupo pertenciam os rins.

3.5 Análise imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica seguiram o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, campus de Botucatu.

Para a análise imunoistoquímica, os cortes de rim incluídos em parafina, com 4µm de espessura, foram colocados sobre lâmina histológica, previamente tratada com organolisano (Sigma A 3648). Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol por 30 min e 20 min, à temperatura ambiente, desidratados em álcool por 5 min 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 min, lavados em água destilada, sendo tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10 volumes por 20 min para bloqueio da peroxidase endógena. Foram então lavados em água destilada em dois banhos de TRIS pH 7,4 de 5 min e incubados com soro normal de coelho por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados com anticorpo primário antígeno-específico *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, dois banhos de 5 min cada. Após esse período, foram incubadas com anticorpo secundário biotilado coelho anticabra (Southern Biotech 6160-08), diluído a 1:200, por 30 min à temperatura ambiente em câmara úmida, e lavadas em dois banhos de TRIS pH 7,4 por 5 min. As lâminas foram incubadas com complexo streptoavidinaperoxidase (Dako Cytomation K 0377), diluído a 1:200, à temperatura ambiente, por 30 min em câmara úmida e lavadas em TRIS (dois banhos) por 5 min. Para visibilização da reação, os cortes foram tratados com cromógeno DAB (DAB Dako cytomation K 3468) durante 5 min e, em seguida, lavados em TRIS e água destilada. Os cortes foram contraincolorados com hematoxilina de Harris por 3 min e lavados em água corrente por 10 min 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 um escore médio para a intensidade de marcação observada nas lâminas dos rins de todos os animais. Assim, os escores de células marcadas para cada um dos tipos histológicos estudados foram determinados como: escore zero = marcação ausente; escore um = marcação leve; escore dois = marcação moderada; escore três = marcação acentuada.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados em planilha no Programa Excell, sendo exportados para o Programa Stata 9.0, com o qual se realizou a análise estatística. Foi utilizada, na comparação entre grupos, análise de variância ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey, se valor de $p < 0,05$. Na comparação entre momentos de um mesmo grupo, foi utilizado o teste de Friedman. Na análise dos escores de histologia, utilizou-se o teste de Wilcoxon na comparação entre rins de um mesmo grupo e o teste de Kruskal Wallis na comparação entre rins de grupos diferentes, seguido do pós-teste de Dunn, se valor de $p < 0,05$. Foi considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Peso dos ratos

Tabela 1 – Média $\pm$ desvio padrão referentes ao peso (g) dos ratos segundo grupo

Grupo	Peso
GSevo	381,7 $\pm$ 55,7
GRinger	368,7 $\pm$ 66,5
GHEA	390,0 $\pm$ 44,3
GSham	390,0 $\pm$ 45,9
p=0,74	

Comentário: a amostra de animais é homogênea quanto ao peso.

4.2 Temperatura retal

Tabela 2 – Média $\pm$ desvio padrão referentes à temperatura retal (°C) segundo momento e grupo

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
GSevo	37,4 $\pm$ 0,6	37,9 $\pm$ 0,7	37,7 $\pm$ 0,5
GRinger	37,7 $\pm$ 0,6	37,7 $\pm$ 0,4	36,6 $\pm$ 2,1
GHEA	37,6 $\pm$ 0,8	37,8 $\pm$ 0,5	37,4 $\pm$ 0,5
GSham	37,7 $\pm$ 0,6	37,8 $\pm$ 0,5	37,5 $\pm$ 0,6

Comentário: em

GSevo: momentos iguais p=0,18

GRinger: (M1>M3) p=0,03

GHEA: momentos iguais p=0,28

GSham: momentos iguais p=0,36

em

M1: grupos iguais p=0,62

M2: grupos iguais p=0,75

M3: grupos iguais p=0,10

4.3 Pressão arterial média (PAM)

Tabela 3 - Média $\pm$ desvio padrão referentes à pressão arterial média (mmHg) segundo momento e grupo

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
GSevo	97,4 $\pm$ 28,5	54,7 $\pm$ 27,0	42,6 $\pm$ 22,6
GRinger	98,9 $\pm$ 27,7	58,4 $\pm$ 19,0	56,8 $\pm$ 19,5
GHEA	95,1 $\pm$ 27,0	61,6 $\pm$ 23,0	92,2 $\pm$ 21,3
GSham	99,6 $\pm$ 18,0	95,4 $\pm$ 14,1	73,3 $\pm$ 19,5

Comentário: em

GSevo: (M1>M2 e M3) $p=0,004$

GRinger: M1>(M2=M3) $p=0,01$

GHEA: (M1=M3)>M2 $p=0,01$

GSham: (M1=M2)>M3 $p=0,005$

em

M1: grupos iguais $p=0,97$

M2: GSham>GSevo, GRinger e GHEA $p=0,02$

M3: GSevo< GHEA e GSham; GRinger<GHEA $p=<0,001$

Em GSevo, com hemorragia e hidratação basal, a PAM caiu continuamente até o fim do experimento. Em GRinger, com reposição por solução de Ringer, a PAM caiu em M2, 20 minutos após o fim da hemorragia, e manteve-se nesses níveis até o fim do experimento. Em GHEA, com reposição por hidroxietilamido130/0,4 a PAM recuperou-se no final do experimento, M3, depois da redução em M2, 20 minutos após o fim da hemorragia. Em GSham, sem hemorragia, a PAM caiu no final do experimento.

O hidroxietilamido130/0,4 foi eficaz em fazer com que a PAM retornasse aos valores basais.

4.4 Hematócrito

Tabela 4 – Média $\pm$ desvio padrão referentes ao hematócrito (%) segundo momento e grupo

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
GSevo	41,8 $\pm$ 5,1	33,2 $\pm$ 4,1	32,5 $\pm$ 4,0
GRinger	42,4 $\pm$ 3,3	35,0 $\pm$ 2,4	26,1 $\pm$ 2,3
GHEA	42,7 $\pm$ 3,0	33,8 $\pm$ 2,4	27,8 $\pm$ 3,1
GSham	38,3 $\pm$ 5,9	33,5 $\pm$ 5,1	33,4 $\pm$ 5,2

Comentário: em

GSevo: M1>(M2=M3) $p<0,001$

GRinger: (M1>M2>M3) $p<0,0001$

GHEA: (M1>M2>M3) $p<0,0001$

GSham: momentos iguais $p=0,10$

em

M1: grupos iguais $p=0,07$

M2: grupos iguais $p=0,64$

M3: (GSevo=GSham) > (GRinger e GHEA) $p=<0,001$

Em GSevo, o hematócrito caiu após 20 minutos da hemorragia e assim permaneceu até o fim do experimento. Em GRinger e GHEA, sob o efeito das soluções empregadas, o hematócrito caiu, inclusive em M3, momento final. Em GSham, sem hemorragia e somente com a hidratação basal, houve pequena queda do hematócrito que a análise estatística não detectou como significativa.

Provavelmente houve efeito de hemodiluição com as duas soluções empregadas.

4.5 Fator alfa de necrose tumoral (TNF- α)

Tabela 5 – Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 quanto à marcação de TNF- α nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos estudados

Grupos	TNF- α	
	Rim D	Rim E
GSevo	2,5(2-3)	3(2-3)
GRinger	3(2,75-3)	2,5(2-3)
GHEA	2(2-3)	2(3-3)
GSham	2(2-3)	3(2-3)

Escore 0=marcação ausente; 1=marcação leve; 2=moderada; 3=acentuada

Comentário:

Rim D: grupos iguais p=0,29

Rim E: grupos iguais p=0,41

em

GSevo: rins iguais p=0,36

GRinger: rins iguais p=0,31

GHEA: rins iguais p=0,99

GSham: rins iguais p=0,36

Houve expressão da citocina TNF- α nos rins de todos os animais. Como os rins de **GSham** já apresentam marcação pela TNF- α , infere-se que o tratamento cirúrgico e/ou o sevoflurano podem ser os responsáveis pela expressão desta citocina. Nenhum tratamento modificou este cenário.

4.6 Interleucina-1 (IL-1)

Tabela 6 – Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 quanto à marcação da IL-1 nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos estudados

Grupos	IL-1	
	Rim D	Rim E
GSevo	2,5(2-3)	3(2,75-3)
GRinger	3(2-3)	2,5(2-3)
GHEA	3(3-3)	3(3-3)
GSham	2,5(2-3)	2,5(2-3)

Escore 0=marcação ausente; 1=marcação leve; 2=moderada; 3=acentuada

Comentário:

Rim D $p=0,03$

Pós teste de Dunn: GHEA difere de GSevo e GSham

Rim E: grupos iguais $p=0,11$

em

GSevo: rins iguais $p=0,34$

GRinger: rins iguais $p=0,42$

GHEA: rins iguais $p=0,31$

GSham: rins iguais $p=0,9$

Houve expressão da citocina IL-1 nos rins de todos os animais com significância estatística entre os rins direitos de GHEA e GSham-GSevo, sendo a expressão maior em GHEA. Se GSham já apresenta marcação pela IL-1, infere-se que o tratamento cirúrgico e o sevoflurano são os prováveis responsáveis pela expressão desta citocina. A administração da solução de Ringer não melhorou o cenário e a de HEA piorou.

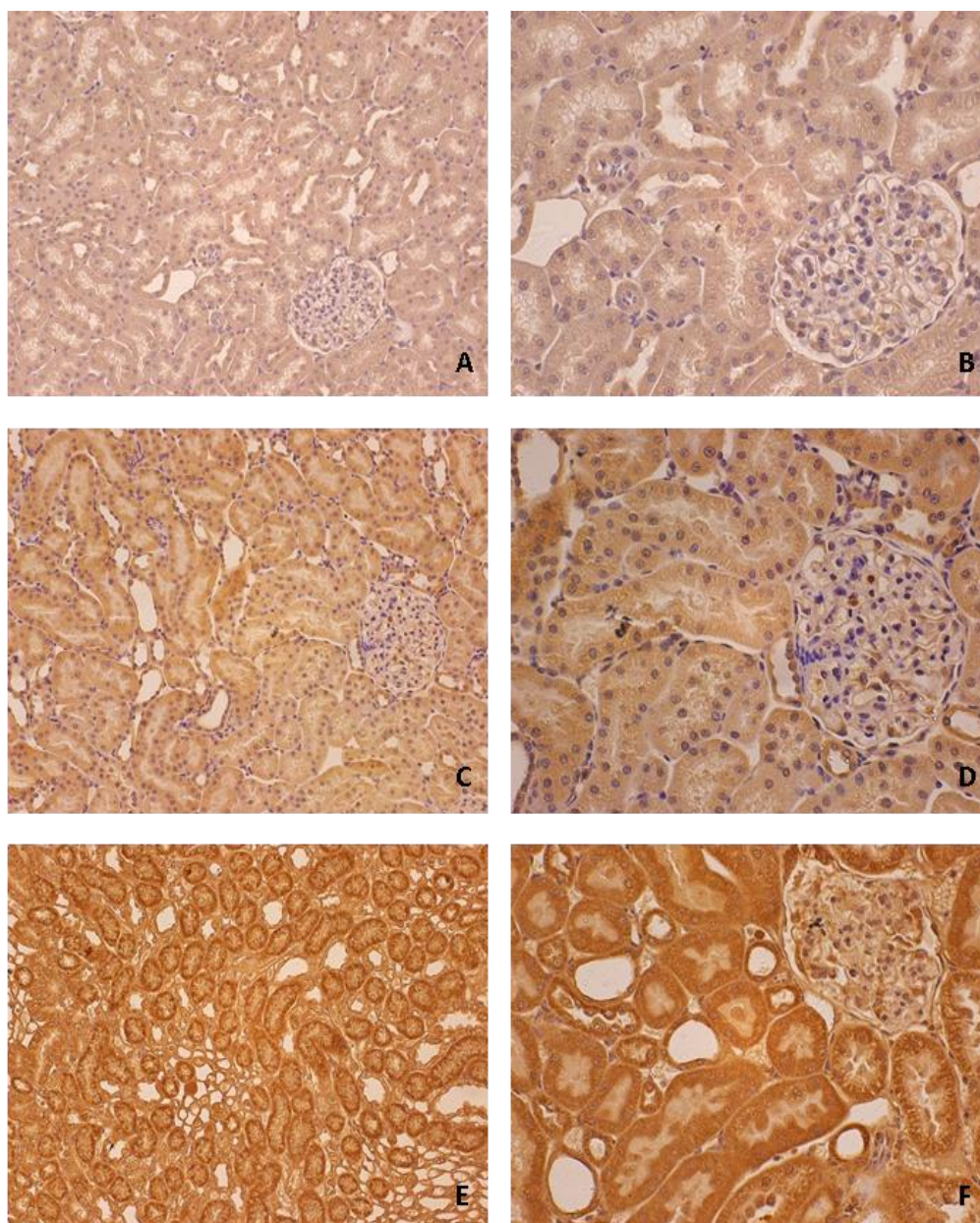


Figura 1 - Rim (rato). (A e B) - Imunomarcção leve em túbulos renais (escore 1), 20x e 40x. (C e D) - Imunomarcção tubular moderada (escore 2), 20x e 40x. (E e F) - Acentuada marcação nos túbulos renais (escore 3), 20x e 40x. Imunoistoquímica, TNF- α , ABC, DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris.

Resultados

4.7 Dilatação vascular (DV)

Tabela 7 – Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de DV dentro de cada grupo

Grupos	DV			
	Não		Sim	
	N ⁰	%	N ⁰	%
GSevo	24	100	-	-
GRinger	23	96	1	4
GHEA	24	100	-	-
GSham	24	100	-	-

Teste de qui-quadrado (p=0,38)

Comentário: grupos iguais

4.8 Congestão vascular (CV)

Tabela 8 – Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de CV dentro de cada grupo

Grupos	CV			
	Não		Sim	
	N ^o	%	N ^o	%
GSevo	24	100	-	-
GRinger	24	100	-	-
GHEA	24	100	-	-
GSham	24	100	-	-

Comentário: grupos iguais.

4.9 Dilatação tubular (DT)

Tabela 9 - Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de DT segundo escore e dentro de cada grupo

Grupos	DT							
	0		1		2		3	
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
GSevo	24	100	-	-	-	-	-	-
GRinger	24	100	-	-	-	-	-	-
GHEA	22	92	2	8	-	-	-	-
GSham	23	96	-	-	-	-	1	4

Escore 0 = ausente; 1 = discreta; 2 = moderada; 3 = intensa; Teste de qui-quadrado (p=0,17)

Comentário: grupos iguais.

4.10 Degeneração tubular (DGT)

Tabela 10 - Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de DGT segundo escore e dentro de cada grupo

Grupos	DGT							
	0		1		2		3	
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
GSevo	9	37	5	21	10	42	-	-
GRinger	6	25	3	13	13	54	2	8
GHEA	1	4	15	63	8	33	-	-
GSham	3	13	7	29	8	33	6	25

Escore 0 = ausente; 1 = discreta; 2 = moderada; 3 = intensa; Teste de qui-quadrado de partição (p=0,002)

Comentário: *GSham* apresentou maior percentual de rins com escore 3 em relação aos demais grupos. *GHEA* apresentou apenas um rim sem degeneração tubular e o maior percentual de rins com escore 1, em relação aos demais grupos.

4.11 Necrose tubular (NT)

Tabela 11 - Distribuição de frequências dos rins de ratos quanto à presença de NT segundo escore e dentro de cada grupo

Grupos	NT							
	0		1		2		3	
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
GSevo	24	100	-	-	-	-	-	-
GRinger	23	96	1	4	-	-	-	-
GHEA	23	96	1	4	-	-	-	-
GSham	23	92	1	4	-	-	-	-

0 = ausente; 1 = discreta; 2 = moderada; 3 = intensa; Teste de qui-quadrado de partição (p=0,55)

Comentário: Grupos iguais.

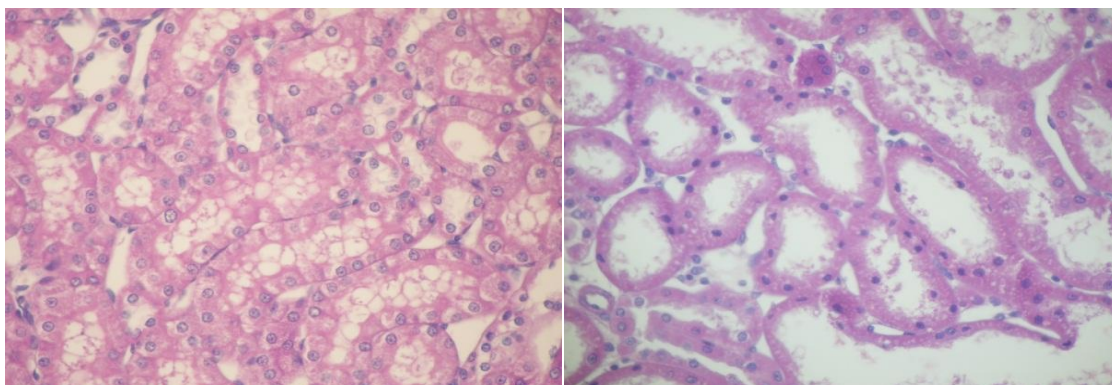


Figura 2 – Análise histológica de rins de ratos submetidos à hemorragia de 30% da volemia e que receberam solução de Ringer (esquerda), GRinger, e solução de hidroxietilamido 130/0,04 kDa (direita), GHEA. À esquerda, degeneração tubular e à direita, dilatação tubular. Coloração: hematoxilina/eosina – HE.

5 DISCUSSÃO

Esta pesquisa mostrou que, em ratos anestesiados com sevoflurano e submetidos à hemorragia de 30 % de sua volemia, com posterior ressuscitação fluídica com solução de Ringer ou de hidroxietilamido 130/0,4, a pressão arterial média diminuiu logo após a hemorragia e no decorrer do tempo, em valores diferentes nos quatro grupos estudados, com exceção daquele ressuscitado com hidroxietilamido, cujos valores retornaram aos iniciais. Ocorreu, no rim, degeneração tubular sem necrose e expressão de citocinas TNF- α e IL-1. A expressão de IL-1 foi mais marcante nos animais que receberam hidroxietilamido.

O volume de solução cristalóide que deve ser repostado em substituição a volume de sangue perdido ainda não foi corretamente calculado e apresentado na literatura porque o cenário de hemorragia varia bastante, o mesmo acontecendo com a reposição dessa hemorragia. No presente estudo, houve hemorragia aguda de 30% da volemia durante vinte minutos, sendo que a reposição do sangue perdido iniciou-se apenas vinte minutos após o término da hemorragia, seja com solução de Ringer, seja com solução de hidroxietilamido 130/0,4.

A temperatura retal foi aferida desde o início do experimento para que os ratos dos quatro grupos (GSevo, GRinger, GHEA e GSham) se mantivessem normotérmicos durante todo o estudo, o que era proposta do modelo. Tentou-se evitar tanto a hipotermia quanto a hipertermia, sendo que a primeira poderia ser fator protetor para isquemia renal após hemorragia e a segunda, por alterar a disponibilidade de ATP e promover aumento de radicais livres de oxigênio, poderia contribuir para agravar a lesão renal (Zager & Altschuld, 1986). Os animais de GRinger, entretanto, em M3, apresentaram hipotermia leve em relação a M2. Como há entre os dois momentos 30 minutos de intervalo, pode ser que tenha ocorrido algum grau de proteção renal para os animais deste grupo.

A redução do hematócrito, observada em M2, ou seja, 20 minutos após a terceira e última hemorragia nos quatro grupos experimentais, pode ter ocorrido pela hidratação basal oferecida aos animais mesmo após a sangria. Este fato pode ser observado no grupo em que não houve hemorragia (GSham), embora em menor proporção que nos demais. Também, em choque hemorrágico, constrição arteriolar em órgãos menos

Discussão

essenciais, como a musculatura esquelética, por exemplo, redistribui sangue para órgãos vitais e há diminuição na pressão capilar, facilitando a absorção de fluidos e ocorrendo hemodiluição (Mazzoni et al., 1994).

No grupo em que não houve reposição (GSevo), o hematócrito não mais diminuiu no momento M3, ocorrido 50 minutos após a última sangria, mostrando que o mecanismo proposto por Mazzoni et al., 1994, foi estanque. Por outro lado, os dois outros grupos que sofreram hemorragia e receberam tanto solução de Ringer (GRinger) quanto solução de hidroxietilamido 130/0,4 (GHEA) continuaram a apresentar redução no valor do hematócrito. Com a reposição da perda sanguínea com as duas soluções, pode ter ocorrido hemodiluição.

Já com relação aos resultados da pressão arterial média (PAM), cada grupo apresentou comportamento próprio. Em GSevo, que sangrou e apenas recebeu hidratação basal, sem reposição adequada, a PAM reduziu-se paulatinamente e, em M3, seus valores foram os mais baixos do experimento. No grupo em que não houve sangria (GSham), a PAM diminuiu significativamente somente em M3 e isto pode ser devido à ação do sevoflurano em um organismo no qual o estímulo cirúrgico está ausente. Com o uso de anestésicos voláteis, como o sevoflurano, a diminuição da PAM é um efeito comum e dose-dependente, cujo mecanismo primário é a diminuição da resistência vascular sistêmica (Pagel et al., 2010).

Nos dois grupos que receberam reposição de volume 20 minutos após o término dos períodos de hemorragia, M2 apresentou-se com hipotensão. Entretanto, em M3, com o hidroxietilamido 130/0,4 a PAM voltou aos valores normais dos animais, enquanto que com a solução de Ringer este atributo conseguiu apenas manter-se igual a M2. Ou seja, para restaurar a PAM, a solução de hidroxietilamido 130/0,4 mostrou-se superior à de Ringer.

Soluções cristaloides, com predominância de íons de sódio e cloro, expandem os compartimentos intravascular e intersticial, uma vez que são livremente permeáveis através da parede endotelial. Com a administração dessas soluções, a expansão do plasma será de apenas 20%. Teoricamente, as soluções coloidais permanecem no compartimento intravascular, provocando expansão plasmática em volume igual ao do

Discussão

volume infundido. A maior persistência intravascular é razão para o uso dos colóides em Anestesiologia. Seu peso molecular e, portanto, sua pressão coloidosmótica, determina o grau de expansão volêmica. Já seu peso molecular e as características de sua carga de superfície determinam o grau de sua perda através da barreira endotelial capilar para o espaço intersticial, bem como o grau de filtração glomerular e a perda para a urina. Para o hidroxietilamido 130/0,4, estima-se que, 30 minutos após sua administração, 75% do volume infundido ainda persistirão na corrente circulatória, assim contribuindo para a manutenção da pressão arterial (Vercueil et al., 2005).

Entretanto, estudos com animais documentaram a exacerbação da perda sanguínea, com consequente aumento da mortalidade, quando a ressuscitação sanguínea leva a pressão arterial para valores normais antes do controle da hemorragia (Kowalenko et al., 1992; Stern et al., 1993; Holmes et al., 2002). A preocupação de que coágulos delicados e precoces possam ser desfeitos pelo retorno rápido à pressão arterial normal tem dado munção para que se pesquisem diferentes condutas para a ressuscitação, denominadas ressuscitação hipotensiva e retardada.

A medida da pressão arterial é tradicionalmente utilizada como avaliação da liberação de oxigênio para os tecidos, mas é um preditor grosseiro da perfusão tecidual e do suprimento de oxigênio em nível circulatório ou celular (Holley et al., 2012). Após hemorragia, há diminuição da perfusão macrovascular que se manifesta como hipotensão sistêmica e decréscimo na perfusão orgânica periférica (vasos maiores) (Nunn & Freeman, 1964). Em última análise, isto resulta em redução da perfusão microvascular (capilares). A hipoperfusão microvascular cria condições hipóxicas que rompem a membrana mitocondrial, determinando a geração de elétrons livres, agentes da lesão tecidual oxidativa (Onem et al., 2003; Abdelrahman et al., 2004, 2005). O choque hemorrágico seguido de ressuscitação provoca estresse oxidativo, que resulta em múltiplos danos a órgãos, sendo o rim um desses alvos de lesão tecidual oxidativa. A heme oxigenase (HO)-1, enzima que limita a taxa de catabolismo do heme, é induzida por estresse oxidativo, sendo essencial para proteger as células epiteliais de lesão pelas propriedades anti-inflamatórias e antiapoptóticas (Arimori et al., 2010).

Discussão

A degeneração tubular foi a lesão mais encontrada nos rins dos animais estudados. No grupo GRinger, no qual se repôs a perda volêmica com solução de Ringer, a lesão mais frequente foi degeneração tubular moderada, enquanto que o grupo que recebeu hidroxietilamido 130/0,4, GHEA, apresentou maior número de rins com escores de degeneração tubular discreta. O grupo GSham, que foi anestesiado com sevoflurano e sofreu a instrumentação cirúrgica do modelo experimental, mas não a hemorragia de 30% da volemia, apresentou alguns rins com degeneração tubular intensa, ocorrência que foi estatisticamente significativa com relação aos demais grupos. Já no grupo que não foi ressuscitado e que recebeu apenas solução de Ringer como hidratação basal (GSevo), houve distribuição homogênea em número de rins sem lesão, com lesão leve e lesão moderada. Uma provável explicação para o aparecimento dessa lesão seria a ação do sevoflurano, que pode não ser totalmente inócuo como agente anestésico. Quando utilizado em circuitos com absorvedores de dióxido de carbono, como cal baritada e sodada, o sevoflurano degrada-se formando um composto com base de éter e vinil, denominado composto A (*fluoromethyl-2,2-difluoro-1-[trifluoromethyl]vinylether*), o qual induz nefrotoxicidade no ser humano. Ele também pode resultar em lesão renal transitória em ratos. O mecanismo da toxicidade é controverso, porém parece estar relacionado à via da *cysteine conjugate lyase*, a qual é 10 a 30 vezes menos ativa no ser humano (Gents & Malan, 2001). Como nesta pesquisa não houve reutilização de gases expirados, esta não é uma via para a explicação do possível papel do sevoflurano nas alterações renais encontradas.

Outra possibilidade que explica a toxicidade renal do sevoflurano é a liberação do íon fluoreto de sua fórmula por meio de metabolismo oxidativo (Nuscheler et al., 1998). Estudo clínico mostra que a concentração sérica de íon fluoreto muitas vezes eleva-se até 50 µmoL/L, mesmo quando o sevoflurano é administrado durante cirurgia de média duração (Kobayashi et al., 1992). Por causa de sua baixa solubilidade sanguínea e rápida eliminação, as concentrações do íon fluoreto caem muito rapidamente após cirurgia e não se espera toxicidade renal pela sua administração. Embora pareça que o potencial para lesão renal ou diminuição da função do órgão em pacientes saudáveis, como resultado da presença do fluoreto inorgânico, não seja problema clínico

importante, há relatos, como o de Artru, 1998, mostrando lesão renal induzida pelo fluoreto após anestesia pelo sevoflurano.

Os animais de *GSham* ficaram sob ação do sevoflurano, com vasodilatação durante a maior parte do experimento. Não foram submetidos à hemorragia e não receberam outra solução além da solução de Ringer em dose de administração basal. Já os ratos de *GSevo*, também sob anestesia pelo sevoflurano e solução de Ringer em dose de administração basal, sofreram hemorragia e seus rins, portanto, permaneceram algum tempo sob ação do sistema nervoso simpático, o que provoca vasoconstricção para desvio de sangue para órgãos mais nobres. Se para que haja toxicidade renal é importante o tempo de exposição ao sevoflurano (Eger et al., 1997; Ebert et al., 1998), os rins dos animais de *GSham*, devido à vasodilatação, tiveram maior exposição a este anestésico volátil, o que poderia explicar a maior quantidade de degeneração tubular intensa que apresentou, assim como a menor quantidade de rins sem este tipo de alteração (apenas um) entre todos os grupos que se estudaram.

Um estudo evidenciou nefrotoxicidade subclínica transitória após anestesia com o sevoflurano. Pacientes foram submetidos a procedimentos ortopédicos periféricos que duraram mais do que cinco horas, ficando expostos a isoflurano e sevoflurano. Os resultados foram relatados para dois grupos com sevoflurano – aqueles com níveis de fluoreto inorgânico menores que 50 $\mu\text{M/L}$ (*sevo_{baixo}*) e aqueles com níveis maiores que 50 $\mu\text{M/L}$ (*sevo_{alto}*). Esta categorização baseou-se em níveis de fluoreto inorgânico determinados em uma hora de pós-operatório: 4,8 $\mu\text{M/L}$ para isoflurano, 36,8 $\mu\text{M/L}$ para o grupo *sevo_{baixo}* e 55,8 $\mu\text{M/L}$ para o grupo *sevo_{alto}*. Uréia, creatinina e *clearance* de creatinina estavam normais em todos os grupos durante o estudo. A osmolalidade urinária máxima mostrou tendência no grupo *sevo_{alto}* para o lado de desenvolvimento de lesão. Níveis de *N*-acetil- β -glucosaminidase (NAG) dos grupos *sevo_{baixo}* e *sevo_{alto}* estavam duas e três vezes mais altos que os do grupo do isoflurano, respectivamente. Além disso, os pacientes do grupo *sevo_{alto}* mostravam evidências de lesão renal subclínica. Clinicamente, ocorreu perda transitória da habilidade de concentração renal em metade dos pacientes do grupo *sevo_{alto}*. A disfunção resolveu-se em seis dias (Bito & Ikeda, 1994).

Discussão

Recente revisão de literatura mostrou que número considerável de estudos sugere que a lesão celular não seja influenciada somente pelo choque, mas também pela estratégia fluídica. Soluções cristaloides, como a de Ringer lactato, por exemplo, podem desencadear respostas inflamatórias, excitação neutrofílica e indução de apoptose e necrose celular (Alam & Rhee, 2007).

O hidroxietilamido 130/0,4 (HEA) utilizado neste presente estudo, Voluven[®], um polissacarídeo com peso molecular de 130 kDa, é um HEA de terceira geração. Suas características farmacológicas condicionam sua eliminação e estocagem tecidual e, como consequência, seus efeitos secundários, como, por exemplo, sobre o funcionamento renal (Wierre et al., 2010). Atualmente, há três mecanismos que explicam o aparecimento de disfunção renal secundária à utilização do HEA. O primeiro está ligado ao aumento da pressão oncótica nos capilares glomerulares. Esta pressão oncótica irá contrabalançar a pressão de filtração glomerular e, assim, diminuir a filtração glomerular (Schortgen et al., 2008). O aumento da viscosidade da urina tubular mais a formação de depósitos coloides no túbulo seriam igualmente a causa do aparecimento de disfunção renal com a utilização de HEA. O terceiro mecanismo seria o aparecimento de lesões nos túbulos proximais descritas em microscopia eletrônica sob o nome de nefrose osmótica (Dickenmann et al., 2008).

Onem et al., 2003, submeteram ratos anestesiados com cetamina intramuscular a hemorragia durante 10 minutos, até que a pressão sistólica caísse para 40-35 mmHg. Os animais permaneceram em choque hemorrágico por 45 minutos, quando foram administradas, nos mesmos volumes retirados de sangue, várias soluções diferentes (sangue total, solução de NaCl a 0,9%, solução de Ringer lactato, amido a 6% e 10%, dextran 40%), exceto no grupo controle, o qual não foi ressuscitado. Neste grupo, após 45 minutos de hipotensão, a microscopia de luz e a microscopia eletrônica dos rins mostraram alargamento glomerular e do espaço de Bowman, sendo que os túbulos proximais se encontravam com extensa vacuolização e edema celular, mitocondrial e de lisossomas. Muitos desses túbulos evidenciaram distorção marcante, com edema de microvilosidades e extenso desaparecimento da borda em escova. Observou-se número aumentado de lisossomas e de vacúolos no citoplasma apical. Degeneração nos

Discussão

capilares glomerulares, picnose em podócito e espessamento da lâmina basal da cápsula glomerular também foram observados. Numerosos capilares peritubulares apresentavam mitocôndrias livres e outros debris celulares. O endotélio desses capilares apresentou muita descontinuidade, o que, ocasionalmente, mostrou ocupação por plaquetas, as quais aderiram à membrana basal adjacente. As ressuscitações com sangue total e solução de dextran 40 foram as terapêuticas que mais preveniram os danos renais estruturais.

Outros autores, anestesiando ratos com cetamina e submetendo-os a hemorragia de 30% da volemia, sem ressuscitação fluídica, também obtiveram alterações na histologia do rim, inclusive necrose tubular, em período de tempo muito curto (30 minutos) após o término da hemorragia (Rusafa et al., 2006). Assim, mais uma vez se observa a importância do anestésico utilizado para anestesia de base dos animais.

Do ponto de vista histológico, a necrose tubular é o clássico estigma de diminuição na função renal e a avaliação das alterações nos túbulos proximais superficiais e na microcirculação peritubular permanece como boa medida de lesão em modelo de insuficiência renal após choque (Haab et al., 1996; Yin et al., 1996).

No presente estudo, observou-se necrose tubular aguda apenas nos grupos que receberam reposição volêmica e no grupo que não foi submetido à hemorragia. Esta necrose, porém, apareceu somente em um rim de cada grupo, o que não foi estatisticamente significativo. Esta necrose pode ser explicada pelo desenvolvimento de obstrução intratubular e perda da integridade tubular com líquido extravasado, sendo características proeminentes na região cortical de rins com lesão séria após isquemia (Gaudio et al., 1983; Yin et al., 1996). A descamação das microvilosidades da borda em escova leva à compactação e obstrução intratubulares com vesículas citoplasmáticas (Gaudio et al., 1983). Assim, acredita-se que possa ter ocorrido necrose tubular nos rins dos ratos com degeneração mais intensa.

As alterações fisiopatológicas após dano renal isquêmico são complexas e em parte relacionadas ao tempo do intervalo isquêmico. Após 25 minutos de choque, as células tubulares proximais caminham para lesão progressiva, com perda da borda em escova, formação de vesículas citoplasmáticas, necrose das células epiteliais e cilindros

Discussão

intratubulares abundantes (Gaudio et al., 1983). Nos túbulos dos rins dos ratos da presente pesquisa, a hemorragia de 30% da volemia determinou perda da integridade tubular 50 minutos após o término da hemorragia, tempo também coincidente com o final da reposição desse sangue perdido com solução cristaloide ou coloide. Os animais dos grupos GRinger e GHEA permaneceram em choque durante 20 minutos, quando se iniciou a reposição. Os animais de GSevo não foram ressuscitados e estiveram apenas com a administração basal de solução de Ringer por 50 minutos. Segundo Mehta et al., 2004, necrose tubular aguda seria o resultado de hipoperfusão prolongada ou mais grave, muitas vezes coexistindo com outras lesões renais. Necrose tubular aguda não foi observada em GSevo, apenas degeneração tubular.

Lesão renal aguda (LRA) pré-renal e necrose tubular aguda (NTA) são partes do espectro de manifestações da hipoperfusão-LRA pré-renal, sendo uma resposta à hipoperfusão de leve a moderada. É notável que perdas do fluido extracelular ou hipoperfusão renal transitória (parada cardíaca ou clampeamento aórtico) não causem NTA na ausência tanto de comprometimento renal pré-existente como de outra lesão nefrotóxica (Domanovits et al., 2001). A lesão tubular é a marca registrada da NTA e é mais grave na parte mais externa da medula renal durante lesão produzida por fluxo sanguíneo reduzido, com consequente isquemia (Olsen & Hansen, 1990).

NTA isquêmica é observada mais frequentemente em pacientes após grandes cirurgias, trauma, hipovolemia grave, sepse e queimadura (Clarkson et al., 2008). A NTA que complicou após trauma é frequentemente multifatorial em sua origem e devida à combinação de efeitos da hipovolemia e da mioglobina ou de outras toxinas liberadas pelo dano tecidual. Nos animais da presente pesquisa pode não ter ocorrido hipovolemia grave uma vez que, antes da reposição da perda de 30% da volemia, estavam sendo administrados, aos ratos, 7mL/kg/h de solução de Ringer.

Cotton et al., 2006, no entanto, publicaram artigo de revisão no qual mostram que estratégias de ressuscitação agressiva baseadas em cristaloides associam-se a complicações cardíacas e pulmonares, alterações de motilidade gastrointestinal, distúrbios de coagulação e disfunção imunológica e inflamatória. Também se observa desequilíbrio da osmolaridade intra e extracelular. Distúrbios no volume celular

Discussão

rompem os numerosos mecanismos responsáveis por manter sob controle a cascata inflamatória. Por outro lado, estratégias que restringem a administração de fluidos associaram-se com menor frequência a síndrome da angústia respiratória aguda e menor tempo para o paciente se recuperar da mesma. Portanto, regimes de ressuscitação que provocam elevações precoces no fluxo sanguíneo e na pressão arterial podem resultar em maiores hemorragias e mortalidade que aqueles regimes que permitem que na ressuscitação o fluxo e a pressão aumentem de modo gradativo e mais tardiamente.

Em relação ao estudo imunoistoquímico, houve expressão renal de IL-1 em todos os animais, porém com significância estatística apenas em GHEA quando comparado a GSevo e GSham. Os rins direitos destes grupos diferiram significativamente, sendo que em GHEA a expressão da citocina foi maior. Se os rins de GSham já apresentam marcação pela IL-1, pode-se dizer que o tratamento cirúrgico e/ou o sevoflurano são os prováveis responsáveis pela expressão desta citocina. A administração da solução de Ringer não melhorou esse cenário e a solução de HEA seria a causa da maior expressão evidenciada em todos os animais. A literatura diz que o uso de hidroxietilamido está associado à diminuição significativa da liberação de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, porém quando se comparou com o uso de soluções isotônicas e de Ringer lactato (Lang et al., 2003).

Também houve expressão de TNF- α nos rins de todos os ratos estudados, contudo sem diferenças significativas entre os grupos. Com relação a esta citocina, pode ser, também, que o sevoflurano e/ou a cirurgia tenham sido gatilhos para a sua expressão. Esperava-se que o grupo GSevo, que sofreu hemorragia sem ressuscitação, apresentasse maior expressão dessa citocina. Como este grupo mostrou-se igual ao GSham, a hidratação basal pode ter contribuído para melhorar a resposta inflamatória ao estresse hemorrágico.

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 representa papel importante na lesão dos mesmos após choque hemorrágico. Os rins são capazes de produzir TNF- α em resposta a lipopolissacarídeos, ao próprio TNF- α (por meio de mecanismo de *up-regulation*), ou

à IL-1. Os oxidantes liberados durante a reperfusão de um tecido isquêmico também estimulam a transcrição de fatores envolvidos na expressão do TNF- α (Donahoo et al., 1999a).

Sato et al., 2004, estudaram, no rato, o papel do TNF- α na disfunção renal após hemorragia de 16,7% da volemia, sem ressuscitação fluídica, utilizando um composto 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 o composto estudado 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.

Barahmi et al., 1997, realizaram pesquisa que investigou o papel do TNF- α na falência múltipla de órgãos e mortalidade causadas pelo choque hemorrágico. Utilizou-se, neste estudo com ratos, um anticorpo monoclonal para TNF- α , o TNF- α Mab. Os ratos foram anestesiados e submetidos a período prolongado de choque hemorrágico (pressão arterial média de 30-35mmHg durante 180 minutos) seguido de ressuscitação por 50 minutos. Os ratos tratados com TNF- α Mab na dose de 20 mg/kg apresentaram diminuição do índice de resistência periférica e mostraram-se superiores quanto à proteção de órgãos. A taxa de sobrevivência nas primeiras 48 horas foi significativamente mais alta no grupo que recebeu TNF- α Mab quando comparada à do grupo controle.

Kong et al., 2010, estudaram os efeitos renais do sevoflurano em modelo experimental de transplante hepático em ratos. Os autores postularam que o sevoflurano poderia interferir na cascata inflamatória e na lesão de isquemia/reperfusão em muitos órgãos, incluindo o rim, e concluíram que ele teria modulado a resposta inflamatória nesses rins. Foram citados dois estudos de Lee et al., 2004, 2006, utilizando sevoflurano. O primeiro baseou-se em modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos, com efeitos protetores do órgão por esse anestésico volátil, e o segundo baseou-se em

estudo *in vitro* com culturas de células de túbulo proximal, no qual ocorreram efeitos antinecróticos e anti-inflamatórios. Para desenvolverem seu estudo nos rins de ratos que sofreram transplante hepático, Kong et al., 2010, pesquisaram duas citocinas no soro desses ratos que foram anestesiados com sevoflurano, TNF- α e IL-6. Entretanto, não houve pesquisa dessas citocinas no tecido renal. E esses autores compararam as dosagens obtidas no grupo anestesiado com o sevoflurano com dosagens no soro de animais anestesiados com hidrato de cloral. Obtiveram resultados melhores no grupo anestesiado com sevoflurano e concluíram o que já foi exposto anteriormente, ou seja, que o sevoflurano modulou a cascata inflamatória, mas quando comparado com o hidrato de cloral. Houve aparecimento de necrose com ambos os anestésicos, mas os autores encontraram grau menor dessa alteração com o sevoflurano.

Em estudo *in vitro* com monócitos humanos, Sato et al., 1996, já haviam investigado se o sevoflurano inibiria as secreções de TNF- α e IL-1 β , quando sob estímulo por lipopolissacarídeo (LPS), de modo dose-dependente. Monócitos estimulados por LPS foram cultivados por três horas na presença de sevoflurano em concentração de 1% e 5%. Outro grupo de monócitos foi cultivado na ausência de sevoflurano. As citocinas estudadas, TNF- α e IL-1 β , aumentaram após estimulação com LPS e este aumento não foi inibido pelo sevoflurano.

Existem estudos que focalizaram a produção de TNF- α em hemorragia grave (50% da volemia) ou prolongada com ressuscitação fluídica (Abraham et al., 1995; Jiang et al., 1997; Tani et al., 2000). Esta citocina pró-inflamatória seria a de maior importância durante os eventos de isquemia e reperfusão relacionados com a hemorragia (Guo et al., 1995; Donnahoo et al., 1999b), tendo papel importante na inflamação excessiva, autodestrutiva, induzindo, no final, falência de múltiplos órgãos pela ativação de neutrófilos (Donnahoo et al., 2000). No homem, após trauma grave, choque hemorrágico e ruptura de aneurisma de aorta abdominal, encontrou-se concentração aumentada de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Roumen et al., 1993). TNF- α também é o gatilho para liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β (Dinarello, 1996; Suitters et al., 1994). No presente experimento, sua imunomarcação está expressa em todos os rins estudados, sem diferença significativa entre os grupos,

Discussão

porém em todos a degeneração tubular é observada. Portanto, pode-se deduzir que o TNF- α teve implicação no comportamento histológico observado, sem que tenha sido a hemorragia o gatilho para seu aparecimento, já que *GSham* também teve sua expressão no tecido renal.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia já foram realizados vários estudos com modelo experimental semelhante ao desta pesquisa. Nesses outros experimentos, sempre com ratos e com a retirada de sangue correspondente a 30% da volemia, nunca houve reposição de volume adequado para a perda sanguínea, sendo a hidratação basal realizada com solução de Ringer em apenas 5,0 ou 5,7mL/kg/h. Nos rins de todos esses animais sempre se encontrou necrose tubular (de Souza Silva et al., 2006; Rusafa Neto et al., 2006; Diego et al., 2007; Eberle, 2007; Marangoni et al., 2007, Guedes et al., 2012). Desse modo, como não foi realizada ressuscitação em GSevo, esperava-se encontrar NTA nos rins de seus animais, mas isto não foi observado. Pode ser que a hidratação basal administrada, com solução de Ringer, 7mL/kg/h, tenha sido suficiente para atenuar a necrose que ocorreria com o choque hemorrágico. Por outro lado, GSham, que não sofreu hemorragia, não deveria ter sido o grupo de animais com as alterações histológicas mais acentuadas nos túbulos, como o foi. Existe a possibilidade de que os íons fluoretos tenham tido participação nesses resultados, uma vez que, com a vasodilatação ocorrida em consequência à ação do sevoflurano, houve maior exposição ao anestésico. Com relação ao estudo imunoistoquímico, parece que as expressões das citocinas IL-1 e TNF- α foram estimuladas pelo sevoflurano e/ou pela instrumentação cirúrgica. A solução de Ringer, como administração basal, pode ter sido responsável pela melhor resposta das citocinas, enquanto que a solução de hidroxietilamido 130/0,4 acentuou a expressão de IL-1. A solução de HEA mostrou-se superior à de Ringer, em qualquer volume administrado, na ressuscitação da pressão arterial média.

7 CONCLUSÃO

A resposta da pressão arterial média foi melhor após ressuscitação com a solução de hidroxietilamido 130/0,4. O sevoflurano e/ou o estresse cirúrgico foram responsáveis pela degeneração tubular observada e pela expressão renal de IL-1 e TNF- α , sendo que a solução de Ringer, mas em administração basal, melhorou a resposta histológica, enquanto que a de hidroxietilamido 130/0,4 acentuou a resposta inflamatória.

Conclusão

8 REFERÊNCIAS

- Abdelrahman M, Collin M, Thiernemann C. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand 15-deoxydelta12, 14 prostaglandin J2 reduces the organ injury in hemorrhagic shock. *Shock* 2004;22:555-61.
- Abdelrahman M, Mazzon E, Bauer M, Bauer I, Delbosc S, Cristol JP, Patel NS, Cuzzocrea S, Thiernemann C. Inhibitors of NADPH oxidase reduce the organ injury in hemorrhagic shock. *Shock* 2005;23:107-14.
- Abraham E, Jesmok G, Tuder R, Allbee J, Chang YH. Contribution of tumor necrosis factor-alpha to pulmonary cytokine expression and lung injury after hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med* 1995;23:1319-26.
- Alam HB, Rhee P. New developments in fluid resuscitation. *Surg Clin North Am* 2007;87:55-72.
- Arimori Y, Takahashi T, Nishie H, Inoue K, Shimizu H, Omori E, Kawanishi S, Toda Y, Morimatsu H, Morita K. Role of heme oxygenase-1 in protection of the kidney after hemorrhagic shock. *Int J Mol Med* 2010;26:27-32.
- Artru AA. Renal effects of sevoflurane during conditions of possible increased risk. *J Clin Anesth* 1998;10:531-8.
- Bahrami S, Yao YM, Leichtfried G, Redl H, Marzi I, Schlag G. Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 2):H2219-26.
- Bickell WH, Wall MJ Jr, Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK, Mattox KL. Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. *N Engl J Med* 1994;331:1105-9.
- Bito H, Ikeda K. Long-duration, low-flow sevoflurane anesthesia using two carbon dioxide absorbents. Quantification of degradation products in the circuit. *Anesthesiology* 1994;81:340-5.
- Clarkson MR, Friedwald JJ, Eustace JA, Rabb H. Acute kidney injury. In: Brenner BM. *Brenner & Rector's The Kidney*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2008. 943-986.

Cotton BA, Guy JS, Morris JA Jr, Abumrad NN. The cellular, metabolic, and systemic consequences of aggressive fluid resuscitation strategies. *Shock* 2006;26:115-21.

de Souza Silva M, Castiglia YM, Vianna PT, Viero RM, Braz JR, Cassetari ML. Rat model of depending prostaglandin renal state: effect of ketoprofen. *Ren Fail* 2006;28:77-84.

Dickenmann M, Oetl L, Mihatsch MJ. Osmotic nephrosis: acute kidney injury with accumulation of proximal tubular lysosomes due to administration of exogenous solutes. *Am J Kidney Dis* 2008;51:491-503.

Diego LA, Marques CD, Vianna PT, Viero RM, Braz JR, Castiglia YM. Glibenclamide effects on renal function and histology after acute hemorrhage in rats under sevoflurane anesthesia. *Ren Fail* 2007;29:1039-45.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-147.

Domanovits H, Schillinger M, Müllner M, Thoennissen J, Sterz F, Zeiner A, Druml W. Acute renal failure after successful cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med* 2001;27:1194-9.

Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999a;277(3 Pt 2):R922-9.

Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 1999b;162:196-203.

Donnahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R, Chung CS, Abraham E, Harken AH. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFκB and increases TNF-α bioactivity in the kidney. *J Urol* 2000;163:1328-32.

Eberle AS. Cetoprofeno e expressão renal de citocinas TNF-α e IL-1 após hemorragia aguda em ratos. Botucatu, 2007. 70f. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em

Anestesiologia - Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho").

Ebert TJ, Frink Jr EJ, Kharasch ED. Absence of biochemical evidence for renal and hepatic dysfunction after 8 hours of 1.25 minimum alveolar concentration sevoflurane anesthesia in volunteers. *Anesthesiology* 1998;88:601-10.

Eger EI 2nd, Koblin DD, Bowland T, Ionescu P, Laster MJ, Fang Z, Gong D, Sonner J, Weiskopf RB. Nephrotoxicity of sevoflurane versus desflurane anesthesia in volunteers. *Anesth Analg* 1997;84:160-8.

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

Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release. *Am J Physiol* 1995;269(1 Pt 2):R160-6.

Ferreira ELA, Terzi RGG, Silva WA, Moraes AC. Early colloid replacement therapy in a near-fatal model of hemorrhagic shock. *Anesth Analg* 2005;101:1785-91.

Frith D, Goslings JC, Gaarder C, Maegele M, Cohen MJ, Allard S, Johansson PI, Stanworth S, Thiemermann C, Brohi K. Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations. *J Thromb Haemost* 2010;8:1919-25.

Gaudio KM, Ardito TA, Reilly HF, Kashgarian M, Siegel NJ. Accelerated cellular recovery after an ischemic renal injury. *Am J Pathol* 1983;112:338-46.

Gentz BA, Malan TP Jr. Renal toxicity with sevoflurane: a storm in a tea cup? *Drugs* 2001;61:2155-62.

Guedes FS Jr, Cruz DS, Rodrigues MM, Silva LM, Amorim RL, Vianna PT, Castiglia YM. Renal histology and immunohistochemistry after acute hemorrhage in rats under sevoflurane and ketoprofen effect. *Acta Cir Bras* 2012;27:37-42.

Guo W, Ding J, Huang Q, Jerrells T, Deitch EA. Alterations in intestinal bacterial flora modulate the systemic cytokine response to hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1995;269(6 Pt 1):G827-32.

Grocott MP, Mythen MG, Gan TJ. Perioperative fluid management and clinical outcomes in adults. *Anesth Analg* 2005;100:1093-106.

Haab F, Julia P, Nochy D, Cambillau M, Fabiani JN, Thibault P. Improvement of postischemic renal function by limitation of initial reperfusion pressure. *J Urol* 1996;155:1089-93.

Hahn RG. Volume kinetics for infusion fluids. *Anesthesiology* 2010;113:470-81.

Hirshberg A, Hoyt DB, Mattox KL. Timing of fluid resuscitation shapes the hemodynamic response to uncontrolled hemorrhage: analysis using dynamic modeling. *J Trauma* 2006;60:1221-7.

Holley A, Lukin W, Paratz J, Hawkins T, Boots R, Lipman J. Review article: Part two: Goal-directed resuscitation – Which goals? Perfusion targets. *EMA* 2012;24:127-35.

Holmes JF, Sakles JC, Lewis G, Wisner DH. Effects of delaying fluid resuscitation on an injury to the systemic arterial vasculature. *Acad Emerg Med* 2002;9:267-74.

Honore PM, Joannes-Boyau O, Boer W. Hyperoncotic colloids in shock and risk of renal injury: enough evidence for a banning order? *Intensive Care Med* 2008;34:2127-9.

James MF, Michell WL, Joubert IA, Nicol AJ, Navsaria PH, Gillespie RS. Resuscitation with hydroxyethyl starch improves renal function and lactate clearance in penetrating trauma in a randomized controlled study: the FIRST trial (Fluids in Resuscitation of Severe Trauma). *Br J Anaesth* 2011;107:693-702.

Jiang J, Tian K, Diao Y, Chen H, Zhu P, Wang Z. 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.

Kobayashi Y, Ochiai R, Takeda J, Sekiguchi H, Fukushima K. Serum and urinary inorganic fluoride concentrations after prolonged inhalation of sevoflurane in humans. *Anesth Analg* 1992;74:753-7.

Kong HY, Zhu SM, Wang LQ, He Y, Xie HY, Zheng SS. Sevoflurane protects against acute kidney injury in a small-size liver transplantation model. *Am J Nephrol* 2010;32:347-55.

Kowalenko T, Stern S, Dronen S, Wang X. Improved outcome with hypotensive resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock in a swine model. *J Trauma* 1992;33:349-53.

Lang K, Suttner S, Boldt J, Kumle B, Nagel D. Volume replacement with HES 130/0,4 may reduce the inflammatory response in patients undergoing major abdominal surgery. *Can J Anaesth* 2003;50:1009-16.

Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology* 2004;101:1313-24.

Lee HT, Kim M, Jan M, Emala CW. Anti-inflammatory and antinecrotic effects of the volatile anesthetic sevoflurane in kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F67-78.

Lema G, Canessa R, Urzua J. Renal preservation in cardiac surgery. *Curr Opin Anaesthesiol* 1998;11:9-13.

Lobo SMA, Rezende E, Mendes CL, Rea-Neto A, David CM, Dias FS, Schettino G. Consenso Brasileiro de monitorização e suporte hemodinâmico – Parte V: suporte hemodinâmico. *RBTI* 2006;18:161-76.

Marangoni MA, Hausch A, Vianna PTG, Braz JR, Viero RM, Castiglia YM. Renal function and histology after acute hemorrhage in rats under dexmedetomidine action. *Acta Cir Bras* 2007;22:291-8.

Mazzoni MC, Warnke KC, Arfors KE, Skalak TC. Capillary hemodynamics in hemorrhagic shock and reperfusion: in vivo and model analysis. *Am J Physiol* 1994;267(5 Pt 2):H1928-35.

Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM. Program to Improve Care in Acute Renal Disease. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int* 2004;66:1613-21.

Nascimento P, Jr, Paiva Filho O, Carvalho LR, Braz JR. Early hemodynamic and renal effects of hemorrhagic shock resuscitation with lactated Ringer's solution, hydroxyethyl starch, and hypertonic saline with or without 6% dextran-70. *J Surg Res* 2006;136:98-105.

Nunn JF, Freeman J. Problems of oxygenation and oxygen transport during haemorrhage. *Anaesthesia* 1964;19:206-16.

Nuscheler M, Conzen P, Peter K. Sevoflurane: Metabolism and toxicity. *Anaesthesist* 1998;47(Suppl 1):S24-32.

Ogilvie MP, Pereira BM, McKenney MG, McMahon PJ, Manning RJ, Namias N, Livingstone AS, Schulman CI, Proctor KG. First report on safety and efficacy of hetastarch solution for initial fluid resuscitation at a level 1 trauma center. *J Am Coll Surg* 2010;210:870-82.

Olsen TS, Hansen HE. Ultrastructure of medullary tubules in ischemic acute tubular necrosis and acute interstitial nephritis in man. *APMIS* 1990;98:1139-1148.

Onem A, Cigdem MK, Deveci E, Kaya S, Turhanoglu S, Yaldiz M. Effects of whole blood, crystalloid and colloid resuscitation of hemorrhagic shock on renal damage in rats: an ultrastructural study. *J Pediatr Surg* 2003;38:1642-9.

Referências

Pagel PS, Farber NE, Pratt PF Jr., Warltier DC. Cardiovascular Pharmacology. In: Miller RD, Eriksson L, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL. Miller's Anesthesia. 7th ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone. Chapter 23. 2010.

Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. Cochrane Database Syst Rev 2012 Jun 13;6:CD000567.

Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, Goris RJ. 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.

Rusafa Neto E, Vianna PT, Viero RM, Módolo NS, Ganem EM, Braz RC, Castiglia YM. Influence of S(+)-ketamine analgesia in renal intraoperative ischemia: histological study in rats. Acta Cir Bras 2006;21:242-6.

Rushing GD, Britt LD. Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review. Ann Surg 2008;247:929-37.

Santry HP, Alam HB. Fluid resuscitation: past, present, and the future. Shock 2010;33:229-41.

Sato W, Enzan K, Mitsuhashi H, Masaki Y, Kayaba M, Suzuki M. Effect of sevoflurane on release of TNF-alpha and IL-1 beta from human monocytes. Masui 1996;45:309-12.

Sato H, Tanaka T, Kita T, Yamaguchi H, Tanaka N. The role of tumour necrosis factor-alpha in renal dysfunction following mild haemorrhage in rats. Int J Exp Pathol 2004;85:345-53.

Schortgen F, Girou E, Deye N, Brochard L; CRYCO Study Group. The risk associated with hyperoncotic colloids in patients with shock. Intensive Care Med 2008;34:2157-68.

Stern SA, Dronen SC, Birrer P, Wang X. Effect of blood pressure on hemorrhage volume and survival in a near-fatal hemorrhage model incorporating a vascular injury. *Ann Emerg Med* 1993;22:155-63.

Suitters AJ, Foulkes R, Opal SM, Palardy JE, Emtage JS, Rolfe M, Stephens S, Morgan A, Holt AR, Chaplin LC, et al. Differential effect of isotype on efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha chimeric antibodies in experimental septic shock. *J Exp Med* 1994;179:849-56.

Tani T, Fujino M, Hanasawa K, Shimizu T, Endo Y, Kodama M. Bacterial translocation and tumor necrosis factor-alpha gene expression in experimental hemorrhage shock. *Crit Care Med* 2000;28:3705-9.

Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics-an update. *Eur J Pharmacol* 2008;579:1-12.

Turner J, Nicholl J, Webber L, Cox H, Dixon S, Yates D. A randomized controlled trial of prehospital intravenous fluid replacement therapy in serious trauma. *Health Technol Assess* 2000;4:1-57.

Upadhyay M, Singhi S, Murlidharan J, Kaur N, Majumdar S. Randomized evaluation of fluid resuscitation with crystalloid (saline) and colloid (polymer from degraded gelatin in saline) in pediatric septic shock. *Indian Pediatr* 2005;42:223-31.

Vercueil A, Grocott MP, Mythen MG. Physiology, pharmacology, and rationale for colloid administration for the maintenance of effective hemodynamic stability in critically ill patients. *Transfus Med Rev* 2005;19:93-109.

Wierre F, Robin E, Barreau O, Vallet B. Hydroxyethyl starch. *Ann Fr Anesth Reanim* 2010;29:543-51.

Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/shock associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 1998;47:201-10.

Yin M, Kurvers HA, Tangelder GJ, Booster MH, Buurman WA, Kootstra G. Ischemia-reperfusion injury of rat kidney relates more to tubular than to microcirculatory disturbances. *Ren Fail* 1996;18:211-23.

Zager RA, Altschuld R. Body temperature an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol* 1986;251(1 Pt 2):F87-93.