

Erick Freitas Curi

Efeitos da lidocaína na proteção renal por meio da
dosagem plasmática da NGAL e interleucinas:
estudo em modelo experimental de lesão de isquemia
e reperfusão em ratos

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

Orientadora: Profa. Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu

2012

Dedicatória

À Ana Clara Marques Curi,
minha querida filha, minha fonte de energia e consciência.
Apesar da juventude encarou com bravura as minhas ausências e a cada
retorno me alimentou com seus carinhos e ternura.

À minha Esposa Virgínia Caetano Marques Curi,
por me garantir a segurança e tranquilidade para a realização de mais
este importante marco em nossas vidas.
Imperiosa nos cuidados com a nossa filha e com o nosso lar.

Agradecimento Especial

*À Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo,
pela dedicação e competência com que conduziu esta orientação.
E, principalmente, pela sua convivência, deixando marcado em mim os
mais puros ensinamentos científicos e humanos.*

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista, por cumprir brilhantemente as funções de ensino, pesquisa e extensão. Por ter me acolhido e dado condições para que este trabalho fosse realizado.

Ao Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e a todo seu quadro de notáveis professores pelos ensinamentos a mim conferidos.

A cada funcionário da Faculdade de Medicina de Botucatu que diante das minhas dúvidas e necessidades me acolheram com carinho, dedicação e presteza.

Aos meus queridos pais e irmãos que não fizeram da distância geográfica uma barreira capaz de impedir os valiosos incentivos aos meus ideais.

Ao Dr. Antônio Roberto Carraretto, pelos ensinamentos e incentivos na vida acadêmica e pessoal.

Ao Dr. André Carnevali Silva, pela amizade e parceria em nossas inúmeras viagens a Botucatu.

Ao Cristiano Correa de Oliveira, pela incansável dedicação e presteza no auxílio das atividades experimentais desta pesquisa somados a uma considerável dose de amizade e carinho dispensados a mim e à minha família.

À Dra. Juliana Gadum de Lalla, por sua dedicação no tratamento estatístico dos nossos dados da pesquisa.

A cada um dos meus colegas anestesiólogistas do HUCAM/UFES que compreenderam minha ausência e me apoiaram.

Por fim, a Deus, que me concedeu a força, a proteção e os discernimentos necessários na condução deste projeto.

Epígrafe

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o
que era antes”*

(Martin Luther King)

Curi EF. Efeitos da lidocaína na proteção renal por meio da dosagem plasmática da NGAL e interleucinas: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos. Botucatu 2012. 100p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

RESUMO

Justificativa e Objetivo: A lesão renal aguda isquêmica é um fenômeno comum em cirurgias de grande porte e em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo. O restabelecimento do fluxo sanguíneo pode acarretar agravamento da lesão pelo mecanismo de isquemia e reperfusão (I/R). O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos protetores do emprego de doses diferenciadas de lidocaína em modelo experimental de I/R. **Método:** Foram selecionados 40 ratos Wistar e divididos em quatro grupos aleatoriamente, sendo 10 animais por grupo. Grupo Lidocaína Dose Antiarrítmica - LDAA (equivalente à dose antiarrítmica em seres humanos), grupo Lidocaína Subdose – LSD (metade da dose do grupo anterior), grupo Controle - C (solução fisiológica) e grupo Sham - S. Com exceção do grupo Sham, os outros grupos foram submetidos à manobras de I/R no rim esquerdo. A nefrectomia direita foi realizada em um primeiro momento, antes das manobras no rim esquerdo. Os animais foram anestesiados com isoflurano. Avaliou-se os parâmetros: peso, frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e temperatura no intraoperatório (T), dosagens plasmáticas de lidocaína, NGAL, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , GM-CSF e TNF- α , nos momentos M0 (antes das manobras de I/R), M1 (após manobras de I/R) e M2 (24 horas após as manobras de I/R). Os rins direitos e esquerdos foram avaliados histologicamente. **Resultados:** Os grupos foram uniformes quanto ao peso, temperatura e FC (> 250 bpm). Nos primeiros minutos do experimento a análise da PAS, PAD e PAM mostrou valores estatisticamente inferiores para os grupos LDAA e LSD. Detectou-se lidocaína no plasma dos animais, dos grupos LDAA e LSD, no M1 (2,9276 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Na análise da NGAL os valores foram estatisticamente maiores em M2 para todos os grupos, sendo que os valores do grupo Sham foram

estatisticamente inferiores quando comparados aos demais grupos. As análises das dosagens das interleucinas foram: 1) IL-1 α , entre grupos (M0: LDAA = LSD = C < Sham; idem para M1 e M2), entre momentos (Sham: M0 = M1 < M2); 2) IL-1 β entre grupos (M2: LDAA < S), entre momentos (LDAA: M0 = M2 < M1; S: M2 > M0); 3) IL-2 entre grupos (M0, M1 e M2: S > LDAA = LSD = C), entre momentos (S: M0 < M1 = M2); 4) IL-4 entre momentos (LDAA: M2 < M1; S: M0 < M1); 5) IL-6 entre grupos (M0 e M1: S < LDAA = LSD = C; M2: S = LDAA = LSD), entre momentos (LDAA: M1 > M2 = M0); 6) IL-10 entre momentos (LDAA: M0 = M2 < M1 = M0; LSD e C: M2 < M1; S: M1 > M0); 7) IFN- γ entre grupos (M0, M1 e M2: S > LDAA = LSD = C), entre momentos (LDAA: M2 > M1). GM-CSF entre momentos (M1: LDAA < S); 8) TNF- α entre grupos (M1: S > LDAA = LSD = C) entre momentos (LDAA: M0 = M2 < M1; M0 = M2 < M1). Histologicamente o grupo LDAA apresentou, significativamente, menores escores para extensão de necrose tubular aguda quando comparado aos grupos LSD e C. O mesmo aconteceu com o grupo LSD quando comparado ao grupo C. **Conclusão:** A lidocaína, de forma dose dependente, após injeção em *bolus*, acarreta queda dos níveis pressóricos com rápido restabelecimento a níveis basais. A dosagem plasmática do NGAL não evidenciou proteção ou lesão renal com a administração das duas doses de lidocaína. É possível que tenha ocorrido um efeito modulador da lidocaína na dose antiarrítmica com relação às interleucinas IL-6, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α . A análise histológica para necrose tubular aguda demonstrou que a lidocaína na dose antiarrítmica protegeu parcialmente os rins nas manobras de isquemia e reperfusão.

Palavras chave: Proteção renal; Isquemia; Reperfusão; Lidocaína; NGAL; Interleucinas; Rato.

Curi EF. Efeitos da lidocaína na proteção renal por meio da dosagem plasmática da NGAL e interleucinas: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos. Botucatu 2012. 100p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

ABSTRACT

Background and Objectives: Ischemic acute kidney injury is a common phenomenon in large surgeries patients hospitalized in intensive care units. The restoration of blood flow can lead to the worsening of the injury by mechanism of ischemia and reperfusion (IR). The goal in this study was to evaluate possible protective effects in the use of lidocaine in an IR experimental model.

Methodology: 40 Wistar rats were selected and divided into 4 groups randomly, being it 10 rats per group. Lidocaine Arrhythmic Dose group – LDAA (equivalent to arrhythmic dose in humans), Lidocaine Subdose group – LSD (half of the previous group dose), Control group – C (saline solution) and Sham group – S. Except for the Sham group, the other groups experienced IR maneuver in the left kidney. The right nephrectomy was performed first, before the maneuver in the left kidney. The animals were anaesthetized with isoflurane. The following criteria were studied: weight, heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and mean arterial pressure (MAP) and intra operative temperature. Plasma levels of lidocaine and: NGAL, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , GM-CSF and TNF- α , in moments M0 (before IR maneuvers), M1 (after IR maneuvers) and M2 (24 hours after maneuvers). Right kidneys were histologically evaluated. **Results:** The groups were uniform concerning weight, temperature and heart rate (> 250bpm). At the first minutes, the analysis of SBP, DBP and MAP displayed scores statistically lower for LDAA and LSD groups. Lidocaine was detected in animals plasma, in the LDAA and LSD groups, at M1 (2,9276 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ and 1,44 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). In NGAL analysis the scores were statistically higher in M2 for all groups, and the Sham scores were statistically lower when compared to the other groups. IL-1 α , among groups (M0: LDAA = LSD = C < Sham; the same for M1 and M2), among moments (Sham: M0 = M1 < M2). IL-1 β among groups

(M2: LDAA < S), among moments (LDAA: M0 = M2 < M1; S: M2 > M0). IL-2 among groups (M0, M1 and M2: S > LDAA = LSD = C), among moments (S: M0 < M1 = M2). IL-4 among moments (LDAA: M2 < M1; S: M0 < M1). IL-6 among groups (M0 and M1: S < LDAA = LSD = C; M2: S = LDAA = LSD), among moments (LDAA: M1 > M2 = M0). IL-10 among moments (LDAA: M0 = M2 < M1 = M0; LSD and C: M2 < M1; S: M1 > M0). IFN- γ among groups (M0, M1 and M2: S > LDAA = LSD = C), among moments (LDAA: M2 > M1). GM-CSF among moments (M1: LDAA < S). TNF- α among groups (M1: S > LDAA = LSD = C), among moments (LDAA: M0 = M2 < M1; M0 = M2 < M1). Histologically, the LDAA group presented, significantly, lower scores for extent acute tubular necrosis when compared to the LSD and C groups. The same happened with LSD group when compared to C group. **Conclusion:** Lidocaine in a dose dependent manner, after bolus injection, causes drop in blood pressure with rapid return to baseline levels. Through the measurement of plasma NGAL not evident benefits or harm with the use of lidocaine. You may have a modulating effect occurred at a dose of lidocaine antiarrhythmic regarding interleukins IL-6, IFN- γ , IL-1 β and TNF- α . Histological analysis and statistics for acute tubular necrosis suggests that lidocaine in antiarrhythmic doses partially protected the kidneys from ischemia and reperfusion maneuvers.

Key words: Renal protection; Ischemia; Reperfusion; Lidocaine; NGAL; Interleukins; Rat.

Lista de Figuras

Figura 1	Sequência postulada na lesão renal aguda.....	19
Figura 2	Fatores vasculares contribuindo para a patogênese da LRA isquêmica.....	21
Figura 3	Potenciais alvos citoesqueléticos das proteases cisteínas durante hipóxia/isquemia nos túbulos proximais.....	24
Figura 4	Isquemia e reperfusão: mudanças morfológicas nos túbulos proximais.....	25
Figura 5	Vias calpaina/caspase na lesão isquêmica aguda renal.....	26
Figura 6	Representação simplificada do mecanismo de pré condicionamento clássico.....	31
Figura 7	Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento tardio.....	32
Figura 8	Sistema de indução anestésica.....	43
Figura 9	Sistema de administração de anestésico inalatório sob máscara.....	43
Figura 10	Colocação do clipe na artéria renal esquerda.....	45
Figura 11	Rim esquerdo isquêmico.....	45
Figura 12	Progressão da reperfusão.....	46
Figura 13	Controle da temperatura.....	48
Figura 14	Acesso venoso e arterial.....	49
Figura 15	Hemissecção frontal renal.....	50
Figura 16	Punção intracardíaca.....	51
Figura 17	Momentos estudados.....	54
Figura 18	Valores da média e desvio padrão da NGAL (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	60
Figura 19	Valores da média e desvio padrão da IL-1 α (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	61
Figura 20	Valores da média e desvio padrão da IL-1 β (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	62
Figura 21	Valores da média e desvio padrão da IL-2 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	63
Figura 22	Valores da média e desvio padrão da IL-4 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	64
Figura 23	Valores da média e desvio padrão da IL-6 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	65
Figura 24	Valores da média e desvio padrão da IL-10 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	66
Figura 25	Valores da média e desvio padrão do CM-CSF (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	67
Figura 26	Valores da média e desvio padrão do IFN- γ (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	68
Figura 27	Valores da média e desvio padrão da TNF- α (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	69
Figura 28	Classificação histológica da intensidade da dilatação tubular.....	71
Figura 29	Classificação histológica da extensão da dilatação tubular.....	72
Figura 30	Classificação histológica da intensidade da degeneração celular hidrópica.....	73
Figura 31	Classificação histológica de extensão da degeneração celular hidrópica.....	74
Figura 32	Classificação histológica para intensidade de necrose tubular.....	75
Figura 33	Classificação histológica para extensão da necrose tubular.....	77

Lista de Tabelas

Tabela 1	Valores da média e desvio padrão (DP) referentes ao peso (gramas segundo o grupo).....	56
Tabela 2	Valores da média e desvio padrão (DP) da pressão arterial sistólica (PAS) (mm Hg) segundo grupos e momentos.....	57
Tabela 3	Valores da média e desvio padrão (DP) da pressão arterial diastólica (PAD) (mm Hg) segundo grupos e momentos.....	57
Tabela 4	Valores da média e desvio padrão (DP) da pressão arterial média (PAM) (mm Hg) segundo grupos e momentos.....	58
Tabela 5	Valores da média e desvio padrão (DP) da temperatura (T) (°C) segundo grupos e momentos.....	59
Tabela 6	Valores da média e desvio padrão da NGAL (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	60
Tabela 7	Valores da média e desvio padrão da IL-1 α (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	61
Tabela 8	Valores da média e desvio padrão da IL-1 β (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	62
Tabela 9	Valores da média e desvio padrão da IL-2 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	63
Tabela 10	Valores da média e desvio padrão da IL-4 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	64
Tabela 11	Valores da média e desvio padrão da IL-6 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	65
Tabela 12	Valores da média e desvio padrão da IL-10 (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	66
Tabela 13	Valores da média e desvio padrão do CM-CSF (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	67
Tabela 14	Valores da média e desvio padrão do IFN- γ (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	68
Tabela 15	Valores da média e desvio padrão da TNF- α (pg.mL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	69
Tabela 16	Necrose tubular aguda: intensidade.....	75
Tabela 17	Necrose tubular aguda: extensão.....	77

Lista de Quadros

Quadro 1	Classificação das interleucinas.....	36
Quadro 2	Dose equivalente no rato levando-se em consideração a dose antiarrítmica no homem adulto saudável.....	44
Quadro 3	Critérios utilizados para a classificação histológica POR MEIO de análise por microscopia óptica.....	52

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP	- adenosina trifosfato
LRA	- lesão renal aguda
IRA	- insuficiência renal aguda
NTA	- necrose tubular aguda
TFG	- taxa de filtração glomerular
ON	- óxido nítrico
PGI ₂	- prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
KIM-1	- molécula de lesão renal 1
IL-18	- interleucina 18
MAIC	- molécula de adesão intracelular
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
ET	- endotelina
Na ⁺ /K ⁺	- ATPase – Bomba de sódio/potássio dependente de ATP
Ank	- anquirina
CAM	- molécula de adesão celular
I/R	- isquemia e reperfusão
SRIS	- síndrome da resposta inflamatória sistêmica
DMOS	- síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
UTI	- unidade de tratamento intensivo
NO	- óxido nítrico
iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
MAPK	- proteína quinase mitógena
ERK	- quinase regulada por sinais extracelulares
JNK	- quinase c-Jun N-terminal
αMSH	- hormônio estimulante de α-melanócito
TNF-α	- fator de necrose tumoral alfa
PCI	- pré- condicionamento isquêmico
K _{ATP}	- canal de potássio sensível a ATP
mito K _{ATP}	- canal de potássio sensível a ATP mitocondrial
PCF	- pré-condicionamento farmacológico

NGAL	- Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos
SARA	- síndrome da angustia respiratória aguda
IL-6	- interleucina 6
IL-8	- interleucina 8
IFN- γ	- intérferon gama
IL-2	- interleucina 2
IL-10	- interleucina 10
GM-CSF	- fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
MIP-2	- proteína inflamatória de macrófago 2
MCP-1	- proteína quimiotática de monócito
IL-1 β	- interleucina 1 beta
IL-1 α	- interleucina 1 alfa
IC	- infusão contínua
G	- gramas
UNESP	- Universidade Estadual Paulista
mL	- mililitro
SF 0,9%	- solução fisiológica a 0,9%
h	- hora
LDAA	- lidocaína dose antiarrítmica
mg.kg ⁻¹	- miligrama por quilograma
mg.kg ⁻¹ .h ⁻¹	- miligrama por quilograma por hora
LSD	- lidocaína subdose
FDA	- Food and Drug Administration
DEH	- dose equivalente em seres humanos
DH	- dose em ratos
°C	- Grau centígrado
G	- <i>Gauge</i>
M0	- momento zero
M1	- momento um
M2	- momento dois
PAS	- pressão arterial sistólica
PAD	- pressão arterial diastólica

PAM	- pressão arterial média
FC	- frequência cardíaca
IL-4	- interleucina-4
Tr	- temperatura retal
Bpm	- batimentos por minuto
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	- micrograma por mililitro
%	- porcentagem
>	- maior
<	- menor
=	- igual

Sumário

1 - Introdução	17
2 - Revisão da literatura.....	18
3 - Objetivo	40
4 - Material e método	41
5 - Resultados.....	56
6 - Discussão	79
7 - Conclusão	89
8 - Referências	90
Apêndice A – Relação dose/volume de lidocaína relacionado ao peso do animal para o grupo LDAA.....	99
Apêndice B - Relação dose/volume de lidocaína relacionado ao peso do animal para o grupo LSD	100

1 INTRODUÇÃO

Rins isquêmicos perdem adenosina trifosfato (ATP), devido à reduzida disponibilidade de oxigênio e nutrientes, causando inibição da fosforilação oxidativa bem como a glicólise anaeróbica. Algumas células morrem durante a isquemia, muitas pela forma precoce de morte celular (necrose) e outras por danos em suas membranas que levam à ativação de múltiplos sistemas degradantes. A necrose é observada predominantemente nos túbulos proximais, que utilizam a respiração mitocondrial como única fonte para suprir as suas necessidades energéticas. Assim este segmento do néfron é mais sensível aos insultos isquêmicos nos estágios iniciais (Silva et al., 2006). Em cirurgias de grande complexidade é comum nos depararmos com quadros de interrupção e restabelecimento de fluxo sanguíneo nos rins. Isto pode desencadear um mecanismo extremamente complexo e lesivo denominado lesão de isquemia e reperfusão. A consequência desta lesão é a destruição tecidual local e remota e até mesmo a morte celular (Grace, 1994). Na lesão renal aguda (LRA) muitas citocinas são liberadas pelos leucócitos e células tubulares renais, que são importantes componentes tanto para a iniciação quanto para a extensão do processo inflamatório. Entendimentos futuros das funções das citocinas na LRA podem resultar em terapêutica apropriada relacionada à inibição de algumas citocinas que podem ter como resultado a redução de lesões renais bem como a lesão em órgãos à distância (Lee et al., 2011). Apesar da lesão isquêmica renal aguda já ter sido muito compreendida, ocorrendo frequentemente em pacientes hospitalizados, a mortalidade devida à ela permanece alta. Futuramente, entretanto, existe a promessa substancial para diagnóstico precoce e intervenções efetivas com capacidade para prevenir ou encurtar o curso da lesão renal aguda (LRA) e melhorar a sobrevida. É nesse sentido que se fundamenta as investigações sobre biomarcadores viáveis e fármacos com capacidade de exercerem um efetivo pré-condicionamento renal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesão renal

Schrier et al. (2004) afirmam que a insuficiência renal aguda (IRA), caracterizada pela perda súbita da capacidade dos rins de excretar resíduos, concentrar urina, conservar eletrólitos e manter o balanço hídrico é um problema clínico comum. Particularmente nas unidades de terapia intensiva, onde é associada com uma alta mortalidade (50%-80%).

A lesão renal aguda (LRA), sinônimo de necrose tubular aguda (NTA) é uma entidade clínico-patológica caracterizada clinicamente por uma diminuição aguda da função renal e frequentemente, mas não invariavelmente, por evidências morfológicas de lesão tubular. Esta é a causa mais comum de IRA.

A IRA pode ser causada por uma variedade de condições, incluindo:

- isquemia (fluxo sanguíneo diminuído ou interrompido), que pode ocorrer pelo envolvimento dos vasos sanguíneos intrarrenais como na poliangite microscópica, hipertensão maligna, microangiopatias e condições sistêmicas associadas à trombose (por exemplo: na síndrome urêmica hemolítica, púrpura trombocitopênica trombótica e coagulação intravascular disseminada) ou volume sanguíneo diminuído;
- lesão tóxica direta aos túbulos;
- nefrite túbulo-interticial aguda;
- obstruções urinárias.

O foco principal desta revisão serão as causas isquêmicas, associadas ou não às lesões consequentes da reperfusão (Figura 1).

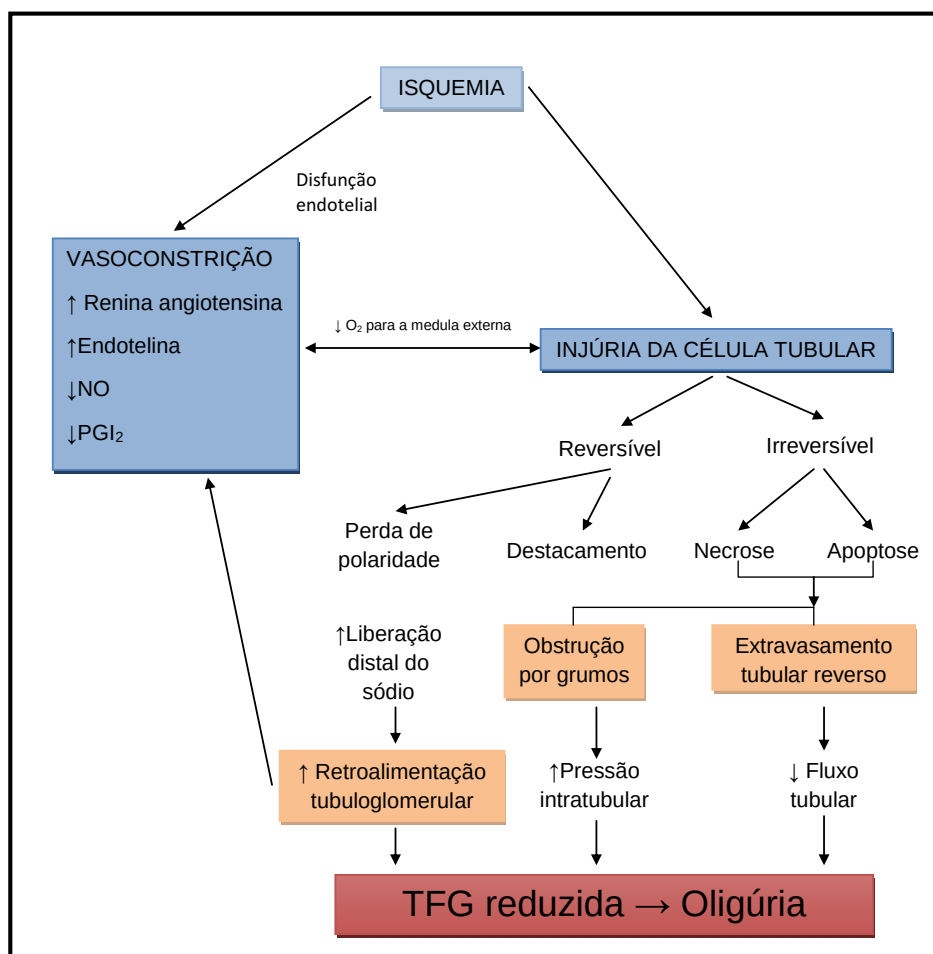


Figura 1 - Sequência postulada na lesão renal aguda (Adaptada de Alpers, 2010).

TFG (Taxa de filtração glomerular); ON (óxido nítrico); PGI₂ (prostaglandina I₂ - prostaciclina).

Estudos experimentais demonstram que a progressão de um estado azotêmico associado com vasoconstrição renal e função tubular intacta (azotemia pré-renal) para uma IRA estabelecida com disfunção tubular ocorrerá se a isquemia renal for prolongada. Salienta-se que a intervenção precoce por meio da ressuscitação volêmica pode prevenir a evolução de um estágio reversível para uma IRA estabelecida (Reineck, 1980). Clinicamente, a diferenciação entre a azotemia pré-renal e a IRA estabelecida tem se mostrado muito difícil. A intensidade e a duração de um processo isquêmico que estabelece IRA em seres humanos não é conhecida. Há um intervalo que operacionalmente define a transição de IRA pré-renal para IRA estabelecida (Silva et al., 2006). Vários biomarcadores tem sido propostos para auxiliarem

no diagnóstico precoce e estão sendo muito estudados atualmente. Entre eles podemos destacar a KIM-1 (Molécula de lesão renal-1), IL-18 (interleucina-18) e enzimas tubulares (Han et al., 2002; Westhuyzen et al., 2003; Parikh et al., 2004).

Schrier et al. (2004) descreveram algumas alterações vasculares, tubulares e inflamatórias que ocorrem nas agressões renais agudas.

2.2 Anormalidades vasculares renais

Lesão renal aguda tem sido demonstrada em estudos experimentais associando-se com a perda da autorregulação vascular renal. Além disso, mais que a vasodilatação renal autorregulatória normal que ocorre durante a diminuição da pressão de perfusão renal, há evidências que uma vasoconstrição renal ocorra nos rins isquêmicos. Um aumento na resposta à estimulação nervosa renal tem sido observado nas agressões isquêmicas agudas. Observa-se também uma resposta vascular acentuada à norepinefrina e endotelina nos rins agudamente isquêmicos. Estas anormalidades vasculares podem ter como causa o aumento do cálcio citosólico observado nas arteríolas aferentes dos glomérulos. Isto pode ser sustentado pela reversibilidade deste processo com o emprego de bloqueadores de canal de cálcio intrarrenal, que também podem reverter o aumento do cálcio mitocondrial.

A congestão da medula renal externa é outra alteração vascular da isquemia renal aguda. Esta congestão tem sido apontada por piorar a hipóxia na porção medular renal externa e assim acarretar uma lesão hipoxêmica no segmento S₃ do túbulo proximal e porção ascendente espessa da Alça de Henle. O aumento da adesividade molecular tem sido implicado nesta congestão da porção externa da medula renal, e anticorpos para MAIC (moléculas de adesão intracelular) e P-selectina tem sido apontado por dispor de uma proteção contra a lesão isquêmica aguda. A isquemia renal aguda tem, também, sido destacada por associar-se com lesão endotelial, talvez em parte por aumento da lesão oxidativa. Algumas evidências dão suporte a esta possibilidade e acontece uma atividade aumentada de leucócitos na lesão

isquêmica renal. Esta observação não pode ser extrapolada para pacientes com doença granulomatosa crônica, onde não há produção de espécies oxidativas de oxigênio. A lesão oxidante pode também levar à diminuição da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e das prostaglandinas vasodilatadoras bem como o aumento da endotelina que, no conjunto, podem levar a aumento dos efeitos vasoconstritores renais dos agentes pressóricos circulantes presentes na IRA (Figura 2).

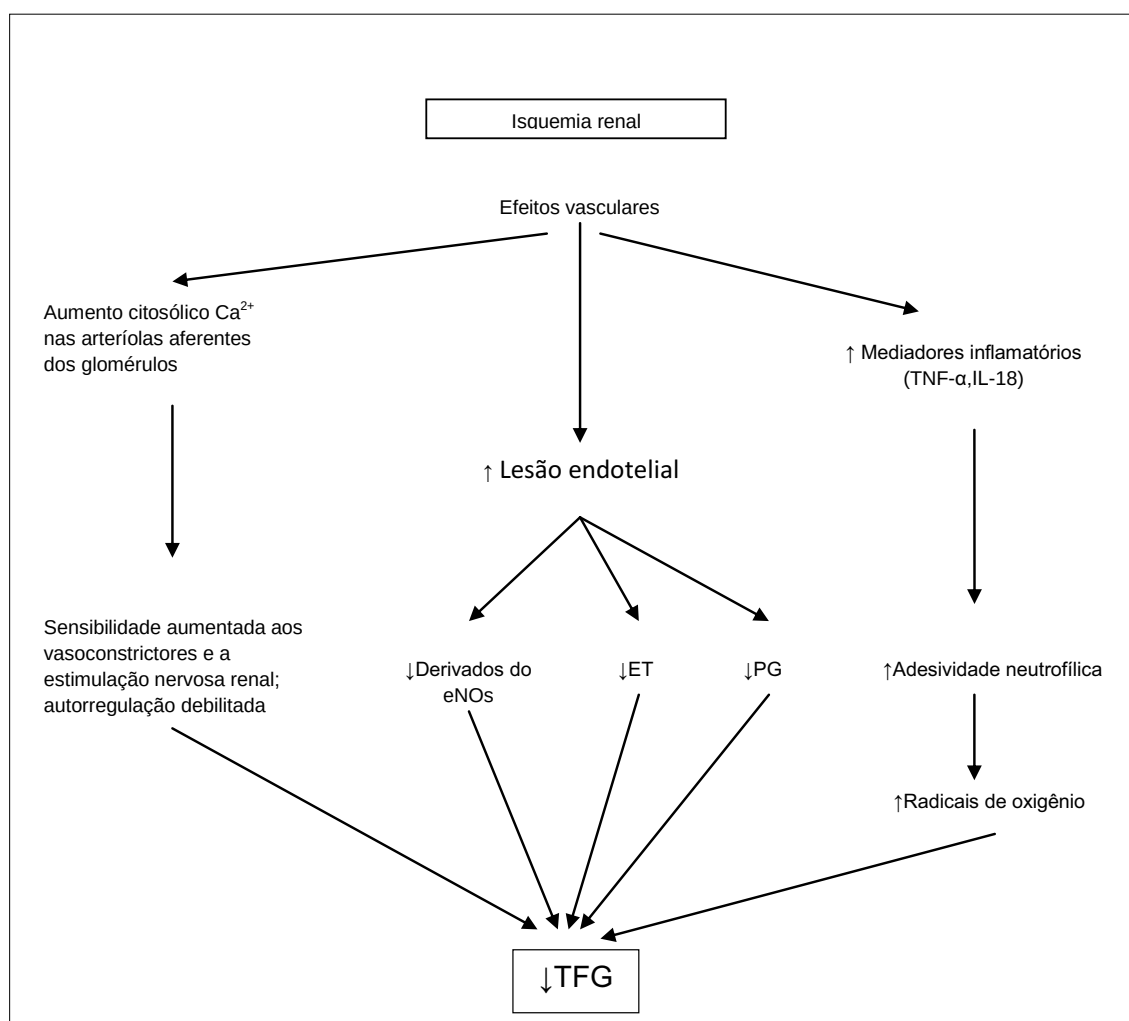


Figura 2 - Fatores vasculares contribuindo para a patogênese da LRA isquêmica (Adaptada de Schrier et al., 2004).

ET (endotelina), PG (prostaglandina).

2.3 Anormalidades tubulares

Está bem estabelecida a disfunção tubular que acontece na insuficiência renal.

A IRA é caracterizada pela disfunção tubular com prejuízo na reabsorção de sódio e água e associa-se com desprendimento e excreção das células epiteliais tubulares e membranas da borda em escova do túbulo proximal para dentro da urina. Estudos recentes utilizando técnicas celulares e moleculares demonstram anormalidades dos túbulos renais lesados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, estudos usando anóxia química têm revelado anormalidades no citoesqueleto do túbulo proximal que estão associadas com a translocação da Na^+/K^+ -ATPase da membrana basolateral para a apical. A translocação da Na^+/K^+ -ATPase da membrana basolateral para o citoplasma explicaria a diminuição na reabsorção do sódio tubular que ocorre na IRA. As proteínas ligantes à actina, espectrina e anquirina servem como substratos para a calpaína (cisteína protease ativada pelo cálcio), favorecendo a migração da Na^+/K^+ -ATPase para o citoplasma. Neste sentido, estudo *in vitro* em túbulos proximais tem mostrado rápido aumento da concentração do cálcio citosólico durante uma hipoxemia aguda, a qual antecede a evidência da lesão tubular avaliada pela liberação da desidrogenase láctica. Há evidências da importância da translocação da Na^+/K^+ -ATPase da membrana basolateral para o citoplasma durante uma isquemia/reperfusão renal (Schrier et al., 2004).

As células epiteliais tubulares são particularmente sensíveis à isquemia e também são vulneráveis às toxinas. Diversos fatores predisõem os túbulos à lesão tóxica:

- vasta carga de superfície para a reabsorção tubular;
- os sistemas de transporte ativo para íons e ácidos orgânicos;
- elevada taxa metabólica;
- grande requerimento de consumo de oxigênio para realizar estas funções de transporte e reabsorção; e
- capacidade para a concentração efetiva.

As mudanças estruturais nas células tubulares incluem aquelas da lesão reversível (dilatação celular, perda da borda em escova e da polaridade, vacuolização e destacamento celular) e aquelas associadas à lesão letal (necrose e apoptose). Bioquimicamente há depleção de ATP; acúmulo de cálcio intracelular; ativação de proteases (p.ex., calpaína) causando ruptura do citoesqueleto (Figura 3); ativação de fosfolipases, danificadoras das membranas; geração de espécies reativas de oxigênio; ativação das caspases, induzindo a morte celular por apoptose. A redistribuição das proteínas de membrana (p.ex., a enzima Na^+/K^+ -ATPase) da superfície basolateral para a luminal das células tubulares caracteriza a perda de polaridade celular. Esta situação é o resultado reversível de um evento isquêmico. Isto resulta em um transporte anormal de íons através das células e à liberação aumentada de sódio nos túbulos distais (Alpers, 2010).

As células tubulares isquêmicas expressam citocinas (p.ex., proteína quimioatrativa de monócitos 1) e moléculas de adesão (p.ex., molécula de adesão intercelular 1) recrutando assim os leucócitos que aparecem para participar na lesão subsequente.

As células lesadas destacam-se das membranas basais e causam obstrução luminal (Figura 4), pressão intratubular aumentada e taxa de filtração glomerular (TFG) diminuída. Além disto, o fluido dos túbulos danificados extravasa para o interstício, resultando em edema intersticial, pressão intersticial aumentada e danos adicionais aos túbulos (Alpers, 2010).

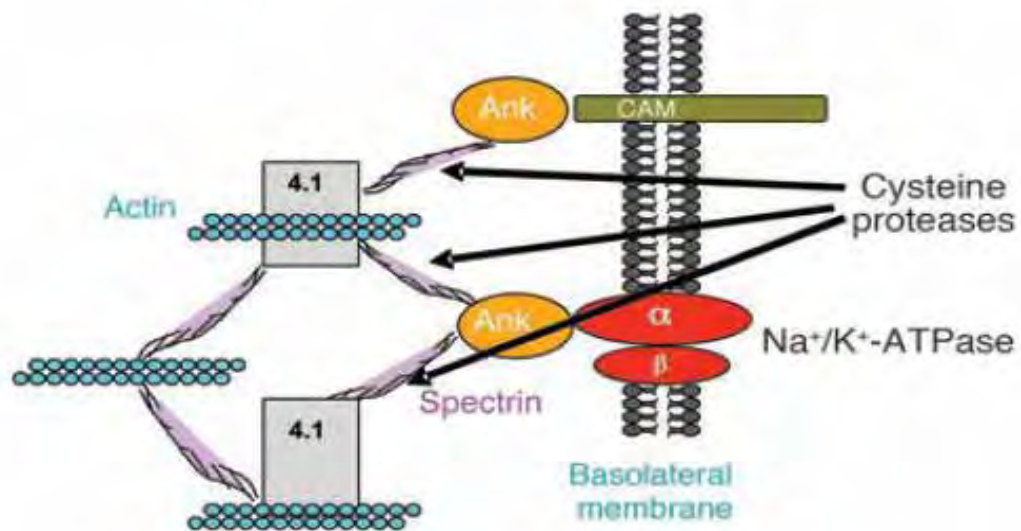


Figura 3 - Potenciais alvos citoesqueléticos das proteases cisteínas durante hipóxia/isquemia nos túbulos proximais (Adaptada de Schrier et al.,2004).

Ank, anquirina; CAM, molécula de adesão celular; 4.1, proteína.

A membrana basolateral dos túbulos proximais contém as subunidades da Na⁺/K⁺-ATPase, as quais são ligadas à actina do citoesqueleto pela anquirina e espectrina. Estas formam um complexo metabolicamente estável. Potenciais alvos citoesqueléticos das proteases cisteínas durante hipóxia/isquemia estão demonstradas na figura 3.

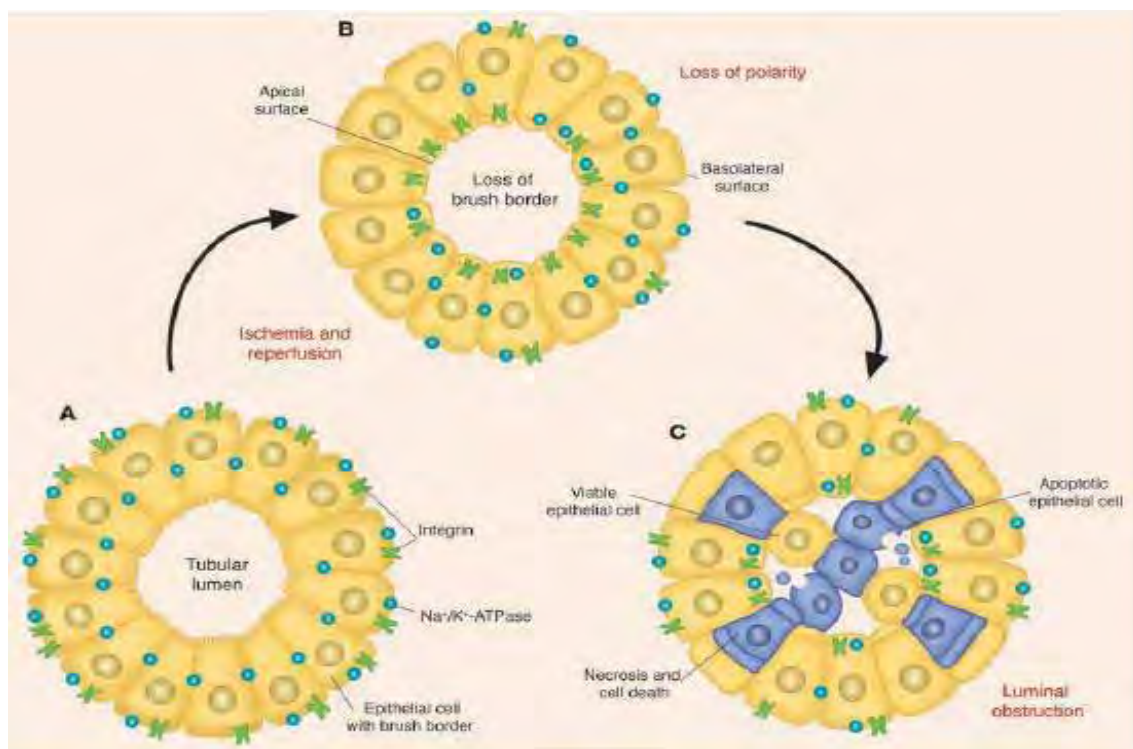


Figura 4 - Isquemia e reperfusão: mudanças morfológicas nos túbulos proximais (Adaptada de Schrier et al., 2004).

Estas mudanças incluem a perda da polaridade, perda da borda em escova e a redistribuição das integrinas e de Na^+/K^+ -ATPase para a superfície apical. Cálcio e espécies reativas de oxigênio podem também possuir uma função nestas perdas morfológicas, somando para uma subsequente morte celular resultado da necrose e apoptose (Figura 4).

Necrose tubular proximal hipóxica/isquêmica resulta na ativação de vias de proteases cisteína envolvendo calpains e tanto a caspase-1 (uma caspase inflamatória) quanto a caspase-3 (uma caspase envolvida na apoptose). A calpaina é ativada tanto pelo aumento do Ca^{2+} citosólico livre quanto pela diminuição da calpastatina. A calpaina então ativa a caspase-1, a qual estimula a citocina inflamatória IL-18. A caspase-3 cliva a calpastatina (Shi et al., 2000). Este mecanismo está ilustrado na figura 5.

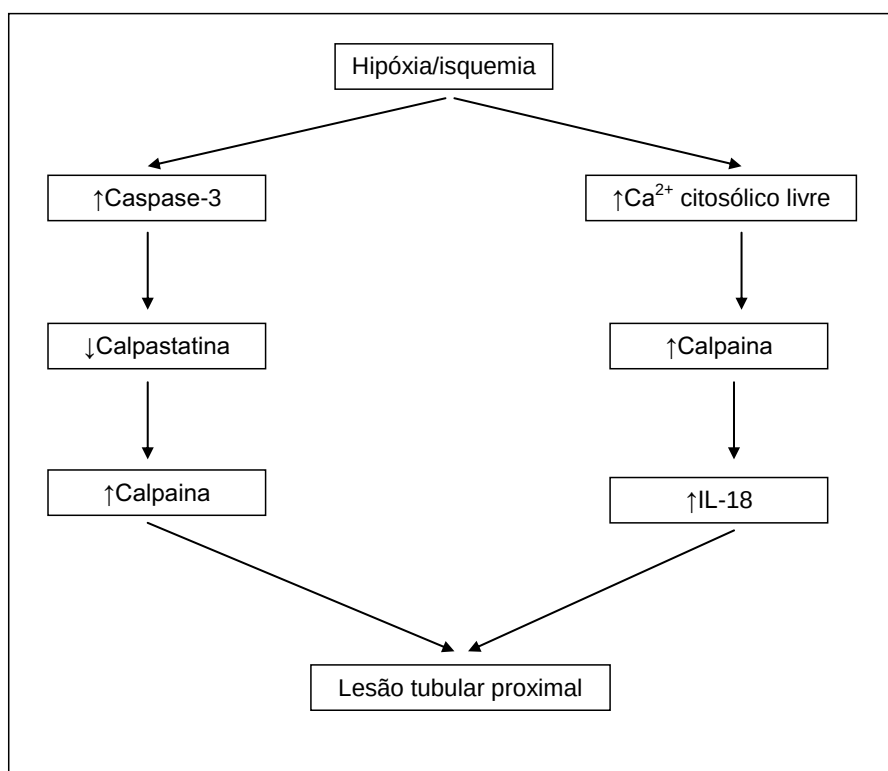


Figura 5 - Vias calpaina/caspase na lesão isquêmica aguda renal.

2.4 O fenômeno da lesão por isquemia e reperfusão

A lesão de isquemia e reperfusão é um fenômeno complexo e frequentemente encontrado na prática cirúrgica. A consequência desta lesão é a destruição tecidual local e remota e, muitas vezes, a morte. A patogênese da lesão determinada pela isquemia e reperfusão é complexa. Os mecanismos incluem a formação de radicais livres derivados do oxigênio, ausência no controle do metabolismo de cálcio na célula, depleção da adenosina trifosfato – ATP, obstrução dos capilares por vários elementos sanguíneos pré-formados e consequente diminuição do fluxo sanguíneo (Grace, 1994).

Apesar de essencial, o restabelecimento de fluxo sanguíneo em um tecido isquêmico pode aumentar a lesão tecidual a um grau maior que a produzida pela própria isquemia (Collard & Gelman, 2001). A lesão tecidual por diminuição transitória ou interrupção do fluxo sanguíneo é proveniente de dois componentes: a isquemia (direto) e a reperfusão (indireto) (Weber & Schlack, 2008).

A interação dos dois eventos, isquemia e reperfusão, ocorre com frequência em muitas situações nos pacientes cirúrgicos como, por exemplo, nos transplantes de órgãos, na angioplastia coronariana, na cirurgia de revascularização do miocárdio, nas cirurgias com o clampeamento da aorta e na terapia trombolítica. Dependendo da gravidade, o fenômeno “isquemia e reperfusão” pode provocar a resposta inflamatória sistêmica ou até a “síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas” (DMOS), responsável por 30 a 40% da mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de hospitais terciários (Neary & Redmond, 1999).

2.5 Inflamação

Há substancial evidência do envolvimento da inflamação na patogênese da diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) associada com a lesão isquêmica renal aguda. Hipoxemia em túbulos proximais isolados tem demonstrado um aumento na liberação de NO e a análise de “Western blot” em

rins isquêmicos homogeneizados tem demonstrado aumento na expressão da proteína óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A queda da iNOS em ratos foi associada a redução da mortalidade durante a isquemia e reperfusão. Há evidência que o carreamento do NO pelos radicais de oxigênio produz peroxinitrito que causa dano ao túbulo durante a isquemia. Corroborando esta teoria, a administração de hormônio estimulante de α -melanócito proporciona proteção contra lesão renal de isquemia e reperfusão pelo bloqueio da indução da iNOS e também evitando a infiltração leucocitária para dentro do rim durante a isquemia. A superóxido dismutase, varredora de radicais de oxigênio, também parece ter um papel protetor na LRA associada à endotoxina. No entanto, há evidências que o efeito da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) nas arteríolas glomerulares aferentes possui uma função protetora na LRA causada por isquemia e reperfusão. Além disto, o efeito protetor da eNOS supera os efeitos deletérios da iNOS. A proteína quinase mitógena (MAPK) também se encontra envolvida na LRA oxidante. Ativação da quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) ou inibição da quinase c-Jun N-terminal (JNK) tem sido apontado como fatores de melhora na necrose induzida por lesão oxidante em células do tubo proximal em ratos *in vitro*. A “up regulation” da ERK pode determinar importante efeito no pré-condicionamento por meio do qual proporciona proteção contra insultos subsequentes de isquemia e reperfusão (Schrier et al., 2004).

As células endoteliais renais iniciam resposta inflamatória precoce nas lesões renais e desenvolvem uma função central no recrutamento e migração de células inflamatórias circulantes. O epitélio tubular renal é o local de maior lesão e morte celular na LRA, sendo que as células desenvolvem uma função pró-inflamatória no estabelecimento da LRA. É possível que agressões iniciais resultem em mudanças morfológicas e/ou funcionais nas células endoteliais vasculares e/ou no epitélio tubular. Assim, os leucócitos, incluindo neutrófilos, macrófagos, células NK (natural killer) e linfócitos infiltram os rins lesados. A lesão induz a geração de mediadores inflamatórios ligados à citocinas e quimiocinas pelas células endoteliais e tubulares, as quais contribuem para o recrutamento de leucócitos para dentro dos rins. Assim, a inflamação

desenvolve uma importante função na iniciação e extensão da LRA (Lee et al., 2011).

2.6 Anti-inflamatórios

Os efeitos dos agentes anti-inflamatórios, incluindo os varredores de espécies reativas de oxigênio, no tratamento da IRA têm sido investigados (Atanasova et al., 1995). O efeito anti-inflamatório da inibição do iNOS pelo α MSH, que tem se mostrado efetivo por mais de oito horas após o insulto, também necessita de mais estudos na tentativa de alterar o curso da IRA (Chiao et al., 1997). Inibidores do TNF- α têm proporcionado proteção renal na IRA endotoxêmica experimental (Knotek et al., 2001). No entanto, a administração de anticorpos para TNF- α em pacientes sépticos não tem melhorado a sobrevida (Abraham et al., 1998).

As prostaglandinas (PGs) renais, vasodilatadoras, preservam a função renal durante aumento da atividade do sistema renina/angiotensina ou simpática renal (estado renal dependente da prostaglandina – RPDG). Elas agem para manter a TFG e o fluxo sanguíneo renal, modulando os efeitos vasoconstritores da angiotensina II e da norepinefrina na vasculatura renal. O cetoprofeno inibe a ciclooxigenase e assim a síntese de prostaglandinas. Em um estudo experimental para choque hipovolêmico em ratos, o uso do cetoprofeno em um dos grupos produziu aumento da resistência vascular renal conforme era esperado. No entanto, os animais que receberam cetoprofeno obtiveram um melhor resultado na avaliação da lesão renal (menor escore para degeneração tubular). A interferência deste fármaco na resposta ao estresse anestésico cirúrgico deve ser a resposta para esta ação protetora (Silva et al., 2006).

2.7 O pré-condicionamento

Pré-condicionamento é o mecanismo (ou técnica) que prepara o órgão ou tecido para melhor suportar o fenômeno de isquemia e reperfusão. A maioria dos estudos foi realizada tendo como objetivo a proteção cardíaca,

entretanto todos os órgãos parecem ser susceptíveis a esse mecanismo de proteção.

O pré-condicionamento isquêmico (PCI) é um mecanismo protetor endógeno fundamental contra lesão tecidual, presente em todas as espécies nas quais foi estudado. Apesar de o PCI ser mais caracterizado e estudado no coração, também é mecanismo importante em outros tecidos. Os mecanismos pelos quais o PCI reduz a extensão da área do infarto do miocárdio foram bastante pesquisados nos últimos anos. Variedades de ligantes e múltiplos receptores acoplados à Proteína G são responsáveis primários pela ativação de vias de transdução de sinais intracelulares que envolvem a cinase da Proteína G, cinases de proteínas ativadas por mitógenos, cinases da proteína tirosina, espécies reativas de oxigênio e sintases de óxido nítrico (NO). Neste processo, é fundamental na mitocôndria o papel do canal de potássio, sensível à adenosina trifosfato, o K_{ATP} , sendo sua abertura crítica para os efeitos benéficos do PCI.

O conhecimento de vários componentes envolvidos com o estabelecimento do PCI, agonistas e antagonistas farmacológicos deste têm sido pesquisados para o desenvolvimento de técnicas ou agentes farmacológicos que possam ser utilizados em situações clínicas onde os tecidos estarão submetidos à isquemia/reperfusão. Os anestésicos voláteis, a utilização de lidocaína e outras substâncias têm sido testados com esta finalidade.

Investigações clínicas e laboratoriais demonstraram que períodos de isquemia únicos ou múltiplos, desde que breves, não seriam necessariamente lesivos e, pelo contrário, poderiam proteger contra a agressão isquêmica prolongada subsequente (Warltier et al., 2002).

O PCI pode ser dividido em duas fases: O PCI clássico ou precoce, que ocorre em uma fase inicial e persiste por uma a duas horas e o PCI tardio que se inicia entre 12 e 24 horas após a agressão isquêmica e dura aproximadamente 72 horas (Riksen et al., 2004). As figuras 6 e 7 representam esquematicamente estas duas fases.

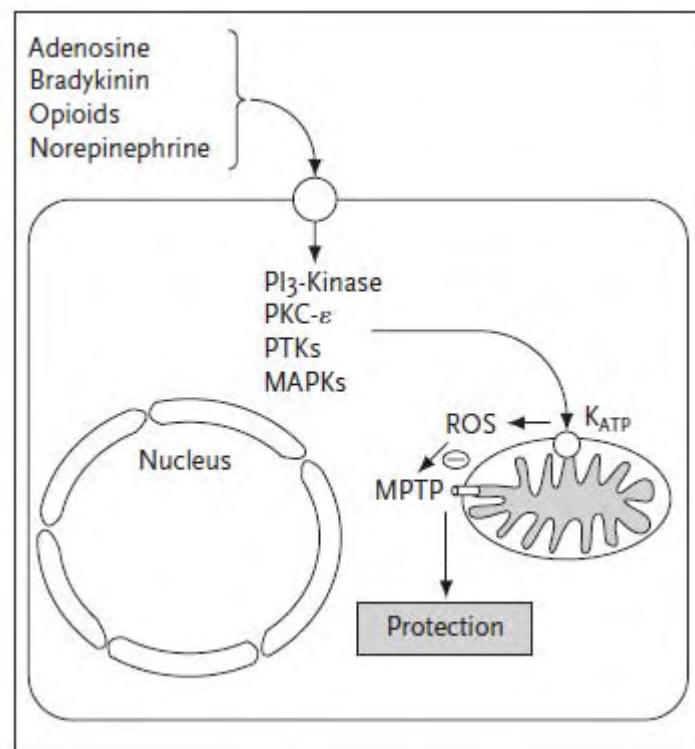


Figura 6 - Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento clássico (Adaptado de Riksen et al., 2004).

KATP= canal de potássio sensível à adenosina trifosfato; MAPKs= proteínas cinases ativadas por mitógenos; MPTP= poro de transição de permeabilidade mitocondrial; PI3K= enzima fosfatidilinositol-3-cinase; PKC= proteína cinase C; PTKs = proteínas tirosina cinases; ROS= espécies reativas de oxigênio.

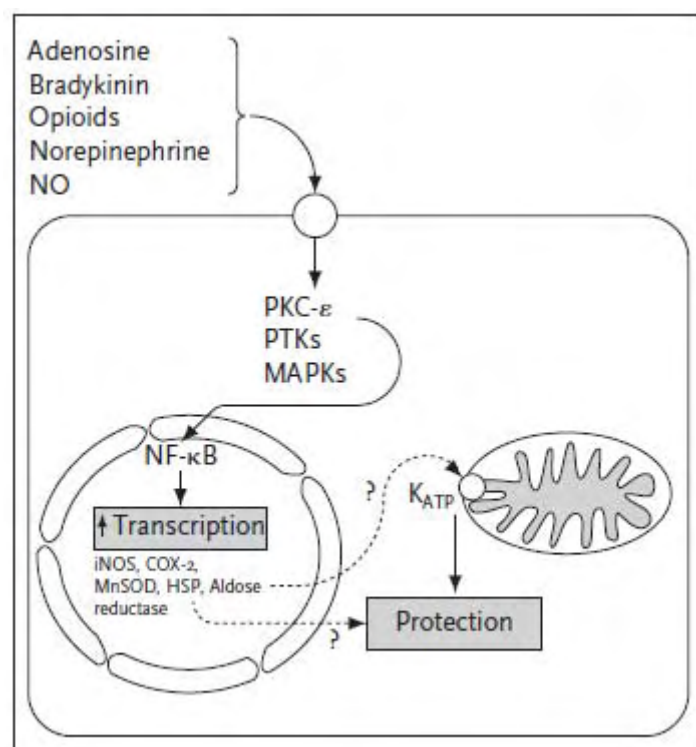


Figura 7 - Representação simplificada do mecanismo e pré-condicionamento tardio (Adaptada de Riksen et al., 2004).

COX-2= ciclo-oxigenase 2; HSP= proteína de choque térmico; iNOS= óxido nítrico sintase induzível; KATP= canal de potássio sensível à adenosina trifosfato; MAPKs= proteínas cinases ativadas por mitógenos; MnSOD= superóxido dismutase manganês; NF-κB= fator de necrose tumoral kappa-Beta; NO= óxido nítrico; PI3K= enzima fosfatidilinositol-3-cinase; PKC-E= proteína cinase C épsilon; PTKs= proteínas tirosina cinases

Devido ao desenvolvimento de vários estudos no campo do PCI, foi possível o melhor entendimento deste fenômeno e a partir deste ponto desenvolver as teorias do pré-condicionamento farmacológico (PCF) e recentemente do pré-condicionamento remoto. O PCF é alvo de inúmeras pesquisas na área da medicina peroperatória e anestesia.

2.8 Biomarcadores

Como em qualquer doença, quanto mais rapidamente intervirmos na lesão isquêmica aguda melhor resultado teremos. Assim, biomarcadores mais sensíveis que o aumento da concentração da creatinina sérica associada com IRA são necessários para alcançarmos uma intervenção precoce (Schrier et al., 2004).

Na última década importante progresso ocorreu no entendimento dos mecanismos moleculares da LRA. No entanto, a tradução destes achados para a prática clínica e terapêutica permanece em constante mudança. A creatinina sérica é um marcador não tão efetivo de LRA precoce. Ela é fortemente influenciada pela massa muscular, secreção tubular e numerosos fatores não renais. Além disto, a creatinina sérica pode levar mais de um dia para elevar, enquanto dosagens urinárias de IL-18 e da lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) levam de 2 a 4 horas para aumentarem. Assim, novos marcadores que sejam facilmente medidos, não sejam afetados por outras variedades biológicas, sejam capazes de serem precocemente detectados e que possibilitem estratificação de riscos, são necessários (Yalavarth & Edelstein, 2008).

A forma ativa da IL-18 entra na urina após ser ativada nos túbulos proximais. É um biomarcador precoce tanto em adultos quanto em crianças com síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), nas unidades de tratamento intensivo (UTI), para avaliação de rins implantados tardiamente e em cirurgias cardíacas. As IL-6 e IL-8 também podem ser consideradas marcadores precoces de LRA. A IL-6 sérica e urinária aumenta precocemente em pacientes com LRA. Prejuízo no metabolismo da IL-6 resulta em aumento dos seus níveis séricos podendo contribuir para efeitos sistêmicos deletérios e para o aumento da mortalidade associada com a LRA (Lee et al., 2011).

A NGAL é uma medida do estresse tubular, com peso molecular de 21 kDa. A maior parte da NGAL é sintetizada nos rins (néfron distal) em resposta à lesão renal sendo secretada na urina. É também sintetizada sistemicamente em resposta à lesão renal, filtrada pelos glomérulos, reabsorvida pelo epitélio do túbulo proximal e pouco secretada na urina. Uma terceira origem da NGAL, ainda em investigação, seria os neutrófilos e macrófagos. Os valores normais da concentração urinária em adultos e crianças são semelhantes (1,0-20,0 ng.mL⁻¹). Os valores normais da concentração plasmática em adultos e crianças diferem um pouco (70-105 ng.mL⁻¹ vs. 30-80 ng.mL⁻¹). Sua concentração aumenta dramaticamente em resposta à ação tubular e precede o aumento da creatinina em 24 horas. A NGAL exerce efeitos protetores

bacteriostáticos e antioxidantes envolvendo o transporte de ferro devido a esta ação age como “varredor” de ferro e fator de crescimento. A NGAL tem sido intensamente investigada, predominantemente na cirurgia cardíaca em adultos. A técnica utilizada para medir suas concentrações tem sido a ELISA. No entanto, pontos de corte e sensibilidade do teste assim como redução de custos têm sido bastante avaliados (Moore et al., 2010).

2.9 Interleucinas

As interleucinas são moléculas proteicas mensageiras extracelulares envolvidas na inflamação, imunidade, diferenciação, divisão celular e reparação por fibrose (Lee et al., 2011). As citocinas são classificadas de acordo com suas ações biológicas (Quadro 1).

Na lesão renal aguda (LRA) muitas citocinas são liberadas pelos leucócitos e células tubulares renais. São importantes componentes tanto para a iniciação quanto para a extensão do processo inflamatório. As citocinas são: 1) produzida pelos rins e mediadoras da LRA; 2) produzidas pelos rins, liberadas no sangue e na urina e servem como biomarcadores LRA; 3) produzida pelos rins e outros órgãos na LRA e mediadoras ou protetoras contra lesões orgânicas à distância (Lee et al., 2011).

As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, interferon (IFN)- γ , IL-2, IL-10, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), TGF- β , CXCL1, IL-6, IL-18, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-2 e proteína quimiotática de monócito (MCP)-1 estão aumentadas nos rins na LRA isquêmica (Safirstein et al., 1991; Goes et al., 1995; Rice et al., 2002; Kielar et al., 2005). IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-18 e TNF- α estão aumentadas nas LRA induzidas pela cisplatina (Faubel et al., 2007).

A IL-18 desenvolve uma importante função de defesa contra infecções e tumores primários desencadeando indução da produção do INF- γ (Nakamura et al., 1989; Okamura et al., 1995). Em modelos animais, a neutralização da IL-18 desenvolve proteção contra condições de inflamação. Lee et al. (2011), juntamente com autores de outros estudos, demonstraram que a inibição da IL-

18, utilizando múltiplos métodos de interrupção da atividade da IL-18, é protetora diante da LRA isquêmica. A inibição da IL-8 também desenvolve proteção na LRA isquêmica em ratos (Miura et al., 2001; Cugini et al., 2005). Um estudo recente demonstrou que ocorre “upregulation” da CXCL1 (Fractalcina) na isquemia renal, especialmente nos vasos sanguíneos. Um anticorpo específico para a CXCR1 é protetor diante da LRA isquêmica e a inibição da CX3CR1 está associada com a redução da infiltração de macrófagos no rim isquêmico (Oh et al., 2008). O TNF- α é uma citocina proteica que ocorre tanto na forma solúvel quanto na transmembranosa. É produzida primariamente pelos macrófagos em resposta a vários estímulos inflamatórios. O TNF- α induz muitas das respostas do hospedeiro às endotoxinas. Em pacientes sépticos graves e com elevados níveis séricos de IL-6, um fragmento de anticorpo monoclonal anti-TNF é bem tolerado e reduz tanto a incidência de mortalidade quanto a gravidade da disfunção orgânica. O RNAm do TNF- α está aumentado tanto na LRA isquêmica quanto naquela causada pela cisplatina (Lee et al., 2011).

Evidências experimentais e clínicas indicam que a IL-33 pode ser um promissor alvo terapêutico para uma variedade de doenças humanas: asma e outras condições alérgicas, aterosclerose, doenças cardiovasculares, fibrose hepática e LRA. Já a IL-6 é uma citocina pleiotrópica que é produzida por muitos tipos diferentes de células e desenvolvem um amplo ângulo de respostas tais como respostas imunes, reações de fase aguda e hematopoiese. Estimulação do TNF- α é conhecida por aumentar a IL-6 nos rins, que tem sido apontada na mediação da LRA isquêmica em muitas, mas não todas, as publicações relacionadas a modelos animais. O mecanismo de ação da IL-6 na LRA pode estar relacionado à transsinalização e à ativação do STAT3 nas células tubulares renais. A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória que inibe vias citotóxicas e inflamatórias e protege os rins nas LRA isquêmicas ou por cisplatina. A IL-10 recombinante humana tem sido testada em ensaios clínicos quanto à sua segurança, tolerância, farmacocinética e efeitos hematológicos em humanos (Lee et al., 2011).

Quadro 1 - Classificação das interleucinas (Adaptado de Lee et al.,2011)

Classificação das citocinas pela sua ação biológica
Imunidade inata
Família IL-1
IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33
Família TNF
TNF- α , LT- α , β , CD40L, CD30L,CD27L, Fas ligante
Família TGF- β
Fator transformador de crescimento, Inibina β 2A, 2B,
Activina 1, 2A, 2B, 4, BMP 2A, 2B, 4
Imunidade adquirida
Citocinas
IL-2, 4, 5, 6, 13
Quimocinas
Família α (CXC)
IL-8, GRO- α , β , γ , NAP-2, ENA78, GCP-2, PF4
Família β (CC)
MCP-1, 2, 3, MIP-1, RANTES
Família CX3C
CX3CL1
Hematopoiéticas
IL-3, 7, 9, 11, 12, EPO, GM-CSF, G-CSF, GH, TPO

2.10 Lidocaína

A lidocaína é um anestésico local do grupo amida. Além de seu uso como anestésico local, ela também pode ser usada como medicação antiarrítmica.

Estudos demonstram que a lidocaína bloqueia os canais K_{ATP} de cardiomiócitos de ratos em concentrações terapêuticas usadas para o tratamento de arritmias, portanto, a lidocaína poderia bloquear os benefícios de um PCI (Olschewski et al., 1996). A hipótese de que a lidocaína, administrada antes do pré-condicionamento isquêmico, bloquearia o poderoso efeito endógeno de defesa do organismo contra lesão miocárdica foi testada em outro estudo. Concluíram que a lidocaína bloqueava a cardioproteção induzida pelo

PCI em corações isolados de ratos somente em concentrações supra terapêuticas, como ficou evidenciado por uma preservada redução na área de infarto e melhor recuperação funcional nos grupos onde se utilizou menores doses de lidocaína, sendo, porém, doses clinicamente relevantes (Barthel et al., 2004).

A lidocaína é um potente bloqueador dos canais de sódio e, nas concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, também exerce efeitos bloqueadores nos canais de K_{ATP} em cardiomiócitos de ratos (Olschewski et al., 1996). Estudo mostra que o bloqueio do canal de sódio, pela lidocaína, pode reduzir o acúmulo de sódio isquêmico e o carregamento de cálcio sódio-dependente (Haigney et al., 1993). Isto resultaria em proteção devido a uma redução no consumo de energia pela atividade Na^+/K^+ - ATPase e reduziria a sobrecarga de cálcio intracelular (Wilson et al., 1993).

Outra importante ação da lidocaína que poderia contribuir para a proteção de órgãos submetidos à isquemia e reperfusão seria a ação anti-inflamatória conferida aos anestésicos locais. Em quadros de septicemia a mortalidade aumenta quando ocorre a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. A disfunção de órgãos, embora não tenha patogenia bem elucidada, parece ser decorrente de processo inflamatório complexo. A resposta séptica é associada à liberação de citocinas anti-inflamatórias e inflamatórias (Van der Poll & Van Deventer, 1999; Garrido et al., 2004; Araujo Filho et al., 2006) com subsequente ativação dos leucócitos, complementos e da cascata de coagulação (Dellinger, 2003) além da produção de anticorpos e da destruição bacteriana por polimorfonucleares (Chalkiadis et al., 1983). Os mediadores, como $\text{TNF-}\alpha$, interleucinas ($\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-8) e óxido nítrico (NO), desempenham papéis fundamentais na sepse e os mediadores anti-inflamatórios estão presentes concomitantemente modulando os efeitos e liberação dos mediadores inflamatórios (Benjamin, 2001).

Os anestésicos locais têm se mostrado eficazes para modular a cascata inflamatória na isquemia e reperfusão de importantes órgãos, entre eles, o coração (Lee et al., 1998; Strohm et al., 2000; Kaczmarek et al., 2009), o

pulmão (Schmid et al., 1996; Das & Misra, 2003), e o fígado (Tomori et al., 1998; Chen et al., 2004).

Os anestésicos locais são capazes de exercer efeitos anti-inflamatórios em vários tipos de células incluindo os monócitos, macrófagos e neutrófilos (Hollmann & Durieux, 2000). Quanto à proteção cerebral após isquemia e reperfusão, muito se tem estudado, avaliando os efeitos da lidocaína. Uma importante pesquisa demonstrou que a administração endovenosa de baixas doses de lidocaína (dose antiarrítmica clínica) reduzia de forma significativa a área de infarto em um modelo experimental de ratos preparados para isquemia focal transitória, quando administrada 30 minutos antes da oclusão da artéria cerebral média. Demonstraram também que o pré-tratamento com lidocaína melhorou os resultados neurológicos e de perda de peso corporal pós-isquemia (Lei et al., 2001).

Alguns outros trabalhos merecem destaque, quando se trata da ação anti-inflamatória dos anestésicos locais. Um deles demonstra que a infusão de lidocaína (5% e 10%) e bupivacaína (1% e 2%), por via subcutânea, em infusão contínua, apresentou diminuição da mortalidade e proteção contra disfunções hepáticas e renais, por atenuar a resposta inflamatória, em um modelo experimental onde foi induzida peritonite (Gallos et al., 2004).

Em estudo em ratos, onde foi efetuado um modelo experimental de peritonite, concluíram que a lavagem peritoneal com solução de bupivacaína diluída em solução fisiológica a 0,9% foi eficaz para evitar o óbito em animais com peritonite fecal autóloga induzida (Brocco et al., 2008).

Em 2002, em um trabalho experimental em cães, demonstrou-se que rins preservados em solução de Euro-Colins contendo lidocaína exibiam melhor função e parâmetros histológicos quando comparados com rins preservados somente na solução de Euro-Colins após um longo período de isquemia. Esses resultados sugeriram um efeito citoprotetor da lidocaína sobre rins submetidos a longo período de isquemia em temperaturas baixas (Erkasap et al., 2002).

Assim, a hipótese deste estudo é a de que a lidocaína em doses antiarrítmicas e subclínicas poderiam exercer efeitos protetores em lesão de isquemia e reperfusão renal avaliados pela NGAL, histologia renal e modulação da resposta inflamatória.

3 OBJETIVO

Avaliar a estabilidade hemodinâmica e os efeitos protetores renais da lidocaína, administrada por via endovenosa, em doses antiarrítmicas e dose subclínica por meio da dosagem plasmática da NGAL, interleucinas e análise histológica em modelo experimental de isquemia e reperfusão em ratos anestesiados com o isoflurano.

4 MATERIAL E MÉTODO

Após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Botucatu, foram incluídos no estudo 40 ratos Wistar, fêmeas, com peso maior que 250g, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 10 (dez) animais, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

4.1 Grupos experimentais

Todos os animais foram anestesiados com o agente anestésico inalatório isoflurano, em concentrações que variaram de 1,5% a 2%.

GRUPO S (*Sham*, n=10) - Os animais deste grupo foram anestesiados com isoflurano a 3% e tiveram a anestesia mantida com o mesmo agente em concentrações que variaram entre 1,5% e 2%. Realização de laparotomia mediana e de nefrectomia direita. Após a sutura da parede abdominal foram despertados. Após 24 (vinte e quatro) horas, foram novamente anestesiados e sofreram nefrectomia esquerda. Estes animais não foram submetidos à sequência experimental de isquemia e reperfusão.

GRUPO C (Controle, n=10) - Os animais deste grupo foram anestesiados com isoflurano a 3% e tiveram a anestesia mantida com o mesmo agente em concentrações que variaram entre 1,5% e 2%. Realização de laparotomia mediana e de nefrectomia direita. Administrou-se 2 mL de solução fisiológica à 0,9% (SF 0.9%) através de um acesso venoso central. Manteve-se uma infusão contínua da mesma solução a uma velocidade de 3 mL.h⁻¹. Estes animais sofreram manobras de isquemia e reperfusão no rim esquerdo.

GRUPO LDAA (Lidocaína Dose Antiarrítmica, n=10) - Os animais deste grupo foram anestesiados com isoflurano a 3% e tiveram a anestesia mantida com o mesmo agente em concentrações que variaram entre 1,5% e 2%. Realização de laparotomia mediana e de nefrectomia direita. Administrou-se lidocaína

(9,375 mg.kg⁻¹), *em bolus*, através de um acesso venoso central. Manteve-se infusão contínua de lidocaína (12,5 mg.kg⁻¹.h⁻¹). Estes animais sofreram manobras de isquemia e reperfusão no rim esquerdo. Neste grupo utilizou-se a dose equivalente à dose antiarrítmica em seres humanos.

GRUPO LSD (Lidocaína Subdose, n=10) - Os animais deste grupo foram anestesiados com isoflurano a 3% e tiveram a anestesia mantida com o mesmo agente em concentrações que variaram entre 1,5% e 2%. Realização de laparotomia mediana e de nefrectomia direita. Administrou-se lidocaína (4,6875 mg.kg⁻¹), *em bolus*, através de acesso venoso central. Manteve-se infusão contínua de lidocaína (6,25 mg.kg⁻¹.h⁻¹). Estes animais sofreram manobras de isquemia e reperfusão no rim esquerdo. Neste grupo utilizou-se a dose equivalente à metade dose antiarrítmica em seres humanos.

4.2 Anestesia

Após a pesagem, os animais eram colocados em um recipiente específico para a indução anestésica. A atmosfera deste recipiente era preenchida com uma mistura de isoflurano (3%) e oxigênio (40%). O recipiente era provido de um sistema de eliminação que não permitiu o acúmulo de dióxido de carbono (Figura 8). O tempo de indução foi de 5 minutos. Estando o animal adormecido e em plano anestésico, colocado em plataforma, sobre uma bolsa térmica a 37°C, e acoplava-se uma máscara facial (Figura 9). A anestesia geral inalatória era mantida com isoflurano (1,5%-2,0%).

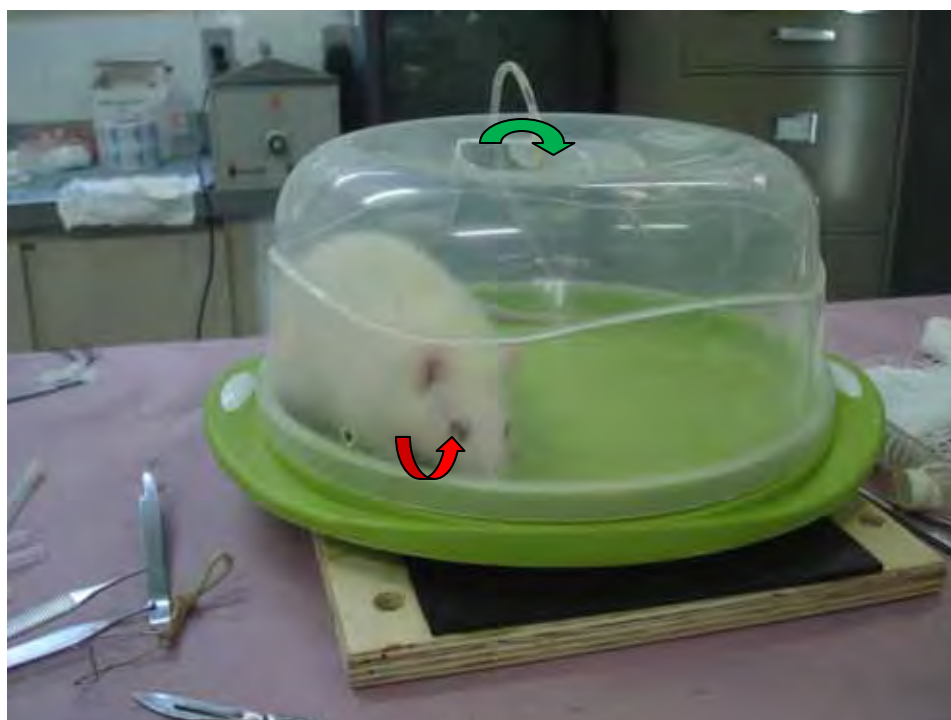


Figura 8 - Sistema de indução anestésica.



Figura 9 - Sistema de administração de anestésico inalatório sob máscara.

4.3 Cálculo da dose de lidocaína

O FDA (2005) produziu um guia de orientação à indústria e revisores. As doses da lidocaína utilizadas nos grupos LDAA e LSD foram obtidas através de fórmula preconizada por esta referência. Assim, foi possível converter a dose antiarrítmica de lidocaína utilizada em seres humanos (DEH - dose

equivalente em seres humanos) na dose que foi utilizada nos ratos (DR - dose em ratos). A fórmula apresentada abaixo pode ser utilizada quando utilizamos a unidade mg.kg^{-1} , assim como $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

FÓRMULA DEH = DR x 0,16
--

Quadro 2 - Dose equivalente no rato levando-se em consideração a dose antiarrítmica no homem adulto saudável

	Doses Equivalentes			
	Lidocaína DAA		Lidocaína SD	
	DEH	DR	DEH	DR
<i>Bolus</i> (mg/kg)	1,5	9,375	0,75	4,6875
<i>Infusão</i> (mg/kg/h)	2	12,5	1	6,25

4.4 Determinação de lidocaína plasmática

As amostras foram armazenadas em freezer de -80°C e enviadas para o Centro de Bioequivalência e Equivalência da Faculdade de Farmácia e Bioquímica/UNESP-Araraquara. Para a determinação de lidocaína nas amostras foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Waters Alliance ® equipado com detector de massas Waters Micromass®, coluna Symmetry ® C18, $3,5\ \mu\text{m}$, $4,6\ \text{mm} \times 75\ \text{mm}$, com injetor automático. A detecção espectrométrica de massas foi realizada em um instrumento triplo quadripolo (MS/MS), utilizando o monitoramento de reações múltiplas (MRM).

4.5 Manobras de isquemia e reperfusão (I/R)

No início do experimento, considerando-se os quatro grupos, foi realizada nefrectomia direita em todos os animais. Estes rins direitos serviram de controle para os rins esquerdos que foram submetidos à manobra de isquemia-reperfusão nos grupos Controle, LDAA e LSD, realizadas da seguinte forma:

4.5.1 Identificação da artéria renal esquerda e colocação de um clipe metálico que efetivava o fechamento da mesma (Figura 10). Este procedimento foi realizado 15 minutos após a nefrectomia direita.

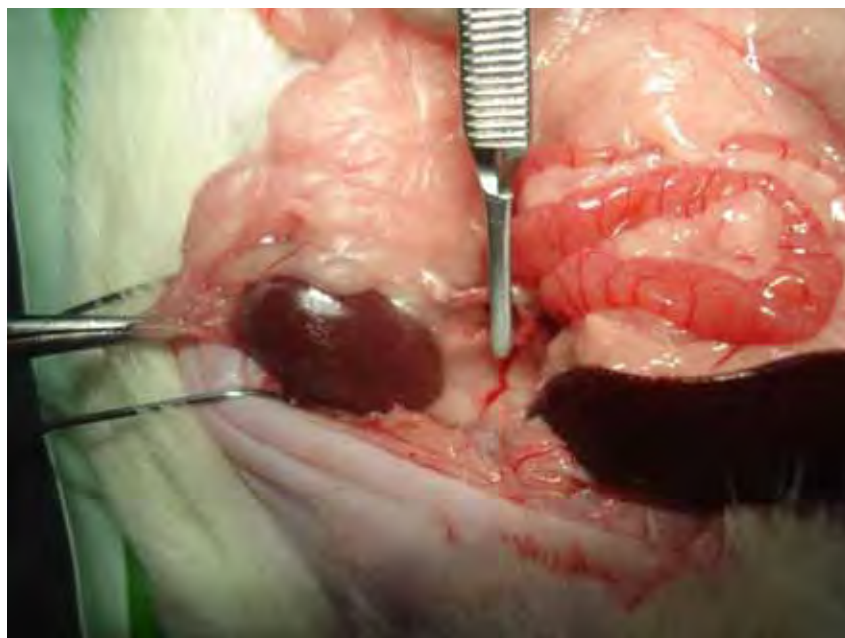


Figura 10 - Colocação do clipe na artéria renal esquerda.

4.5.2 Manteve-se a artéria fechada por 30 minutos (Figura 11).



Figura 11 - Rim esquerdo isquêmico

4.5.3 Retirava-se o clipe metálico da artéria renal esquerda e o animal permanecia anestesiado por mais 30 minutos. Este período foi denominado de fase de reperfusão (Figura 12).

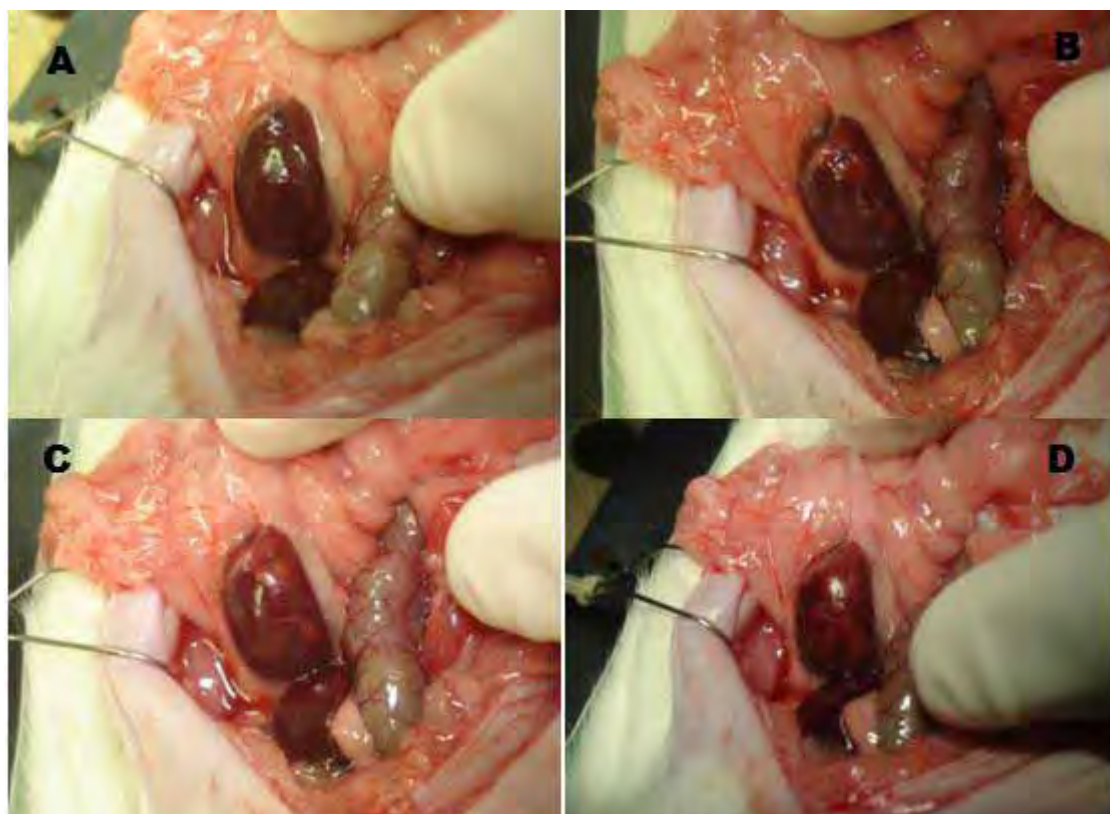


Figura 12 - Progressão da reperfusão.

As fases das manobras de I/R podem ser representadas temporalmente da seguinte maneira:

Início 15 min.	Fase isquêmica 30 min.	Fase de reperfusão 30 min.
-------------------	---------------------------	-------------------------------

4.6 Sequência experimental

4.6.1 Os animais foram acondicionados no biotério, em gaiolas adequadas e tiveram livre acesso à água e alimento até o momento do experimento.

4.6.2 Antes do início do experimento os animais foram pesados em uma balança eletrônica. A mesma era tarada a cada pesagem, utilizando-se o recipiente que acondicionava o animal.

4.6.3 Quando o animal em questão era alocado aleatoriamente no grupo LDAA ou LSD, os cálculos das doses de *bolus* e infusão de lidocaína eram feitos, as soluções preparadas e os volumes a serem infundidos eram definidos através da consulta em tabelas previamente confeccionadas (Apêndices A e B).

4.6.4 Os animais foram anestesiados conforme a descrição no subitem 4.2.

4.6.5 A máscara facial era ajustada e verificava-se a ventilação adequada.

4.6.6 A temperatura corporal dos animais era mantida em aproximadamente 37 °C. Bolsas térmicas eram colocadas sobre e sob o animal. A monitoração e controle desta temperatura se deram por termômetro retal (Figura 13). Quando necessário, as bolsas eram substituídas por outras mais aquecidas.

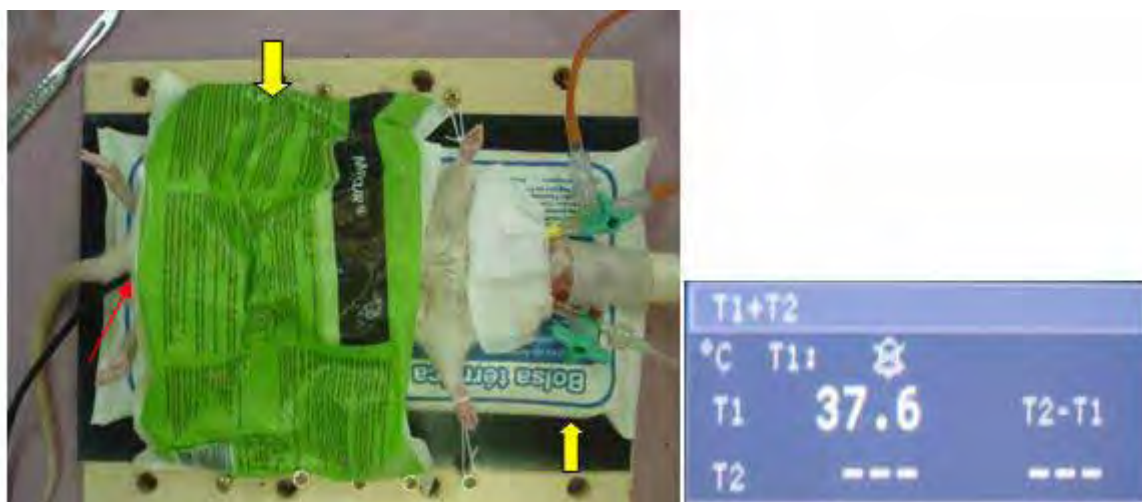


Figura 13 - Controle da temperatura.

4.6.7 Dissecou-se a veia jugular externa direita de todos os animais. Instalou-se na mesma uma cânula endovenosa de calibre 24 G. Por este acesso administrou-se solução de Ringer lactato ($3 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) para reposição basal de fluídos durante todo o procedimento e as soluções específicas de cada grupo (Figura 14).

4.6.8 Dissecou-se a artéria carótida esquerda de todos os animais. Instalou-se na mesma uma cânula endovenosa de calibre 24 G. Por esta via procedemos as coletas de amostra sanguínea e a monitoração das pressões arteriais e da frequência cardíaca (Figura 14).

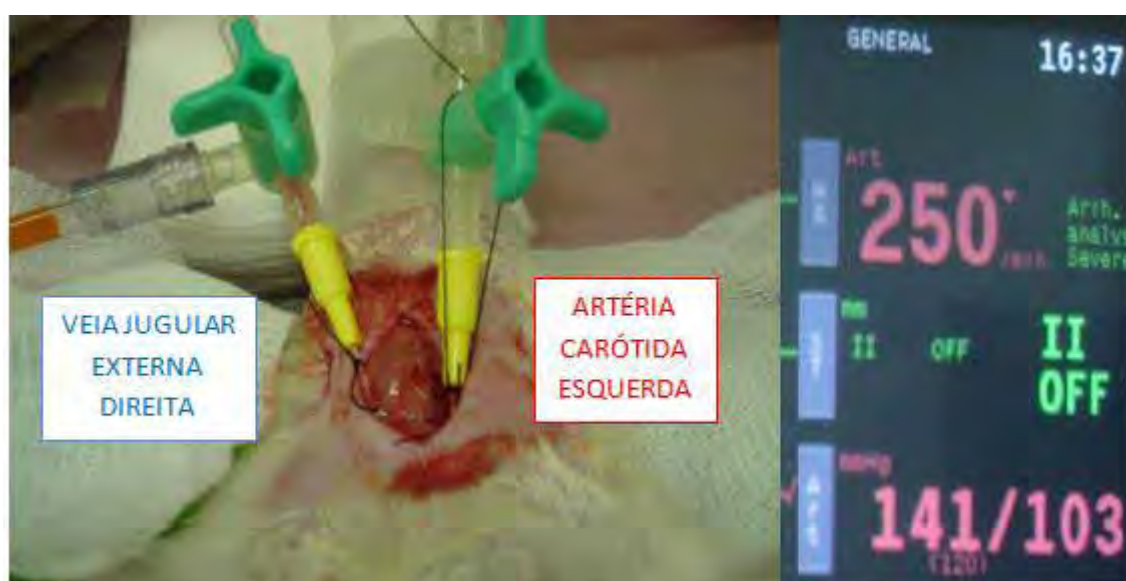


Figura 14 - Acesso venoso e arterial.

4.6.9 Foram registrados os seguintes dados da monitoração: pressão arterial sistólica; pressão arterial diastólica; pressão arterial média; frequência cardíaca e temperatura retal em diversos momentos.

4.6.10 Realizou-se a coleta de 1,5 mL de sangue da carótida para as dosagens das interleucinas e da NGAL. Neste mesmo momento administrou-se 4,5 mL da solução de Ringer lactato. Determinou-se este momento como o zero (M0). Em seguida, avaliava-se a estabilidade hemodinâmica.

4.6.11 Realizou-se laparotomia com nefrectomia direita.

4.6.12 O rim direito era submetido a hemisseção frontal e dividido em duas partes, sendo expostos o córtex, a medula e a pelve renal (Figura 15). As partes eram colocadas em um recipiente apropriado com solução Duboscq-Brasil. Após 24 horas, a solução do recipiente era substituída por álcool a 70%.



Figura 15 - Hemisseção frontal renal.

4.6.13 Realizou-se o *bolus* da solução preconizada para cada grupo e imediatamente iniciou-se a infusão contínua da mesma substância realizada por bomba ANNE® - Abbott Laboratories, EUA.

4.6.14 Após quinze minutos do início da infusão da solução preconizada iniciaram-se as manobras de isquemia-reperfusão (I/R) no rim esquerdo descritas no subtítulo 4.4. Estas manobras tiveram uma duração total de 60 minutos. Em nenhum momento, interrompeu-se a infusão da solução.

4.6.15 Realizou-se o fechamento da parede abdominal.

4.6.16 Realizou-se a coleta de 1,5 mL de sangue da carótida para as dosagens das interleucinas e da NGAL. Neste mesmo momento administrava-se 4,5 mL da solução de Ringer lactato. Determinou-se este momento como o zero (M1). Em seguida, avaliava-se a estabilidade hemodinâmica.

4.6.17 Administrou-se tramadol ($6,25 \text{ mg.kg}^{-1}$) por via intramuscular, objetivando a analgesia pós-operatória.

4.6.18 Realizou-se a retirada dos cateteres venoso e arterial.

4.6.19 Fechou-se a incisão cervical.

4.6.20 Procedeu-se a interrupção do anestésico inalatório.

4.6.21 Após o despertar, o animal era colocado em um recipiente próprio com água e alimento.

4.6.22 Após 24 horas, o animal era novamente anestesiado, conforme descrito no subtítulo 4.2.

4.6.23 Realização de laparotomia e nefrectomia esquerda. O rim esquerdo passou pela mesma sequência descrita para o rim direito no tópico 4.5.12.

4.6.24 Realizou-se punção intracardíaca e a coleta de 1,5 mL de sangue (Figura 16) para as dosagens das interleucinas e da NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin). Determinou-se este momento como o dois (M2).

4.6.25 Em seguida, sacrificavam-se os animais por via de injeção intracardíaca de tiopental a 2,5%.



Figura 16 - Punção intracardíaca.

4.7 Avaliação histológica

Os rins retirados dos animais foram seccionados conforme descrito no item 4.5.12. As partes eram colocadas em um recipiente apropriado com solução Duboscq-Brasil. Após 24 horas, a solução do recipiente era substituída por álcool a 70%. A solução de Duboscq-Brasil foi utilizada para preservar, fixar as estruturas renais e aumentar a fidedignidade da análise histológica. O corante utilizado para a análise histológica foi a hematoxilinaeosina e os cortes foram verificados sob diversos aumentos na microscopia óptica. Após o

preparo das lâminas dos rins, com fixação em parafina, essas foram avaliadas quanto à intensidade e extensão das seguintes características histológicas: dilatação tubular; degeneração celular hidrópica e necrose tubular. A classificação por escore seguiu critérios pré-estabelecidos (Quadro 3). A patologista que analisou as lâminas não tinha conhecimento sobre a origem dos rins em relação aos grupos estudados.

Quadro 3 - Critérios utilizados para a classificação histológica através de análise por microscopia óptica (Adaptado de Park et al. 2008)

CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA		
Análise: Dilatação tubular; Degeneração celular hidrópica; Necrose tubular		
ESCORES	INTENSIDADE	EXTENSÃO
0	Negativo	Negativo
1	Leve	Até 1/3
2	Moderado	De 1/3 a 2/3
3	Intenso	> 2/3

4.8 Atributos estudados

Foram estudados em cada um dos animais, dos quatro grupos os seguintes atributos:

- Peso dos animais
- Pressões arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM).
- Frequência cardíaca (FC)
- Temperatura retal
- Dosagem plasmática de lidocaína
- Dosagem plasmática de NGAL
- Dosagem plasmática das interleucinas:
 - Interleucina-1alfa (IL-1 α)
 - Interleucina-1beta (IL-1 β)
 - Interleucina-2 (IL-2)

Interleucina-4 (IL-4)

Interleucina-6 (IL-6)

Interleucina-10 (IL-10)

Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
(GM-CSF)

Interferon gama (IFN- γ)

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

- Histologia renal (rins direitos e esquerdos)

4.9 Momentos estudados

O esquema a seguir ilustra os momentos estudados nesta pesquisa (Figura 17).

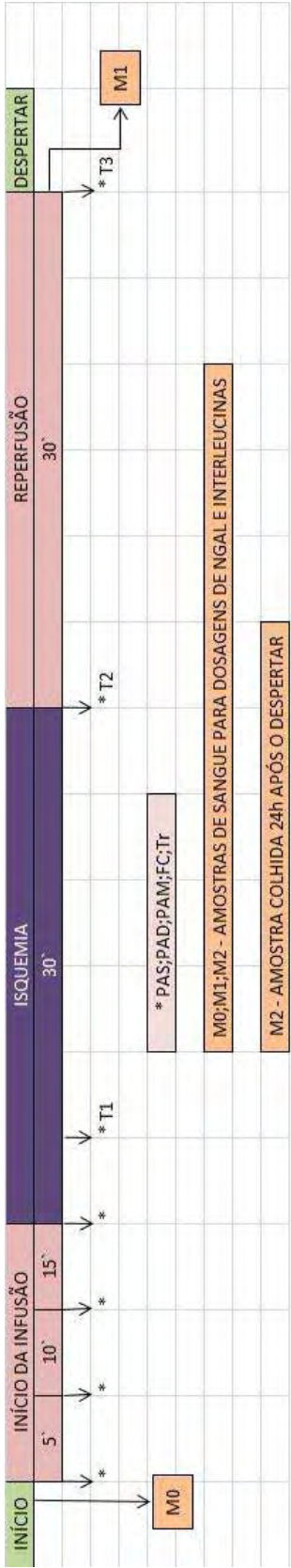


Figura 17 - Momentos estudados.

4.10 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC), avaliando quatro tratamentos (Lidocaína DAA, Lidocaína SD, Controle, Sham) e dez repetições.

Para as variáveis Peso, PAS, PAD, PAM, FC e Temperatura foi realizada análise de variância para comparação dos grupos em cada momento avaliado (*Bolus*, 5', 10', 15', T1, T2 e T3). Quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi realizado o Teste de Tukey para comparação das médias.

Na análise histológica foi utilizada a estatística descritiva, através de gráficos, para demonstrar as variações das porcentagens dos escores de cada grupo. Para Intensidade e Extensão da Necrose Tubular do rim esquerdo também foi feito o Teste Qui-quadrado ($p < 0,05$) para comparação estatística das proporções entre os grupos dentro de cada escore.

Para as demais variáveis estudadas (NGAL, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ e TNF- α), após verificada a normalidade dos dados foi realizada análise de variância para a comparação dos grupos em cada momento separadamente e posteriormente em cada grupo, para a comparação dos momentos (M0, M1 e M2) foi realizada "One Way Repeated Measures Anova". Quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi realizado o Teste de Tukey para a comparação das médias.

5 RESULTADOS

Todos os animais estudados eram do sexo feminino. Para as variáveis peso, PAS, PAD, PAM e temperatura foram realizadas análises de variância para comparação dos grupos. Quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi realizado o Teste de Tukey para comparação das médias.

5.1 Peso

Não houve diferença estatística significativa ($p = 0,20$) entre os grupos avaliados.

Tabela 1 - Valores da média e desvio padrão (DP) referentes ao peso (gramas) segundo o grupo

GRUPO	Peso (g)
Sham	$335,0 \pm 22,7a$
Controle	$331,0 \pm 25,6a$
Lidocaína DAA	$352,0 \pm 30,8a$
Lidocaína SD	$332,0 \pm 16,2a$
p	0,20
CV (%)	7,23

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.2 Pressão arterial

5.2.1 Pressão arterial sistólica (PAS)

Não houve diferença estatística entre os grupos nos momentos 10', 15', T1, T2 e T3. No momento do *bolus* os grupos Sham e Controle não diferiram entre si, porém, apresentaram valores estatisticamente superiores aos dos grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD que não diferiram entre si. No momento 5' o grupo Controle não diferiu para PAS do Sham nem do grupo Lidocaína SD, porém foi estatisticamente superior Lidocaína DAA para PAS (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores da média e desvio padrão da pressão arterial sistólica (PAS) (mm Hg), segundo grupos e momentos

GRUPO	Pressão Arterial Sistólica (mm Hg)						
	Bolus	5'	10'	15'	T1	T2	T3
Sham	112,7 ± 16,9a	106,5 ± 18,8ab	107,2 ± 16,8a	111,7 ± 18,1a	138,8 ± 16,6a	115,5 ± 12,5a	105,0 ± 17,0a
Controle	109,3 ± 10,9a	107,0 ± 11,6a	114,0 ± 10,4a	117,0 ± 10,7a	142,2 ± 17,4a	93,8 ± 27,7a	105,1 ± 17,8a
Lidocaína DAA	76,0 ± 18,9b	85,9 ± 19,0b	96,2 ± 17,8a	108,7 ± 20,1a	139,9 ± 18,4a	99,0 ± 24,9a	109,2 ± 13,3a
Lidocaína SD	88,5 ± 14,4b	96,1a ± 18,9b	103,0 ± 14,2a	102,9 ± 16,6a	135,8 ± 17,4a	106,4 ± 16,4a	98,3 ± 8,1a
p	<0,01	0,03	0,08	0,31	0,87	0,14	0,42
CV (%)	16,10	17,54	14,33	15,22	12,54	20,55	13,98

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

5.2.2 Pressão arterial diastólica (PAD)

Não houve diferença estatística significativa para PAD entre os grupos nos momentos T1, T2 e T3. Em *bolus* o grupo Sham e Controle não diferiram entre si, porém apresentaram valores estatisticamente superiores aos grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD, que também não diferiram entre si. Nos momentos 5' e 10' o grupo Controle não diferiu do Sham nem do grupo Lidocaína SD, porém apresentou valores superiores aos da Lidocaína DAA. No tempo 15' o grupo Controle diferiu estatisticamente apenas do grupo Lidocaína SD, porém não diferiu dos demais (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores da média e desvio padrão da pressão arterial diastólica (PAD) (mm Hg), segundo grupos e momentos

GRUPO	Pressão Arterial Diastólica (mmHg)						
	Bolus	5'	10'	15'	T1	T2	T3
Sham	85,0 ± 15,2a	81,3 ± 19,5a	85,0 ± 16,5a	87,1 ± 19,1ab	106,3 ± 11,1a	83,1 ± 11,9a	66,0 ± 17,2a
Controle	83,1 ± 7,9a	83,3 ± 11,5a	89,6 ± 7,3a	91,3 ± 5,1a	107,4 ± 18,5a	62,4 ± 28,1a	67,8 ± 19,7a
Lidocaína DAA	47,1 ± 13,7b	57,0 ± 15,3b	67,8 ± 17,3b	76,8 ± 12,6ab	108,4 ± 12,7a	62,8 ± 22,4a	70,4 ± 12,2a
Lidocaína SD	58,3 ± 14,8b	68,5 ± 17,7ab	73,4 ± 12,9ab	73,5 ± 13,5b	104,7 ± 18,7	71,6 ± 15,1a	62,2 ± 13,5a
p	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	0,96	0,10	0,71
CV (%)	19,35	22,42	17,82	16,48	14,63	29,12	23,93

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

5.2.3 Pressão arterial média (PAM)

Não houve diferença estatística significativa para PAM entre os grupos nos momentos 15', T1, T2 e T3. Em *bolus* e 5' o grupo Sham e Controle não diferiram entre si, porém apresentaram valores estatisticamente superiores aos grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD, que também não diferiram entre si. No momento 10' o grupo Controle diferiu estatisticamente apenas do grupo Lidocaína DAA, porém não diferiu dos demais (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores da média e desvio padrão da pressão arterial média (PAM) (mm Hg), segundo grupos e momentos

GRUPO	Pressão Arterial Média (mm Hg)						
	Bolus	5'	10'	15'	T1	T2	T3
Sham	97,1 ± 15,4a	92,6 ± 17,8a	95,3 ± 16,7ab	98,1 ± 19,3a	122,5 ± 12,1a	98,8 ± 12,8a	84,0 ± 19,1a
Controle	94,2 ± 7,4a	95,0 ± 10,9a	101,7 ± 8,0a	102,4 ± 8,5a	125,0 ± 14,2a	77,4 ± 28,9a	86,5 ± 21,0a
Lidocaína DAA	59,0 ± 18,9b	69,2 ± 17,0b	79,3 ± 17,6b	88,7 ± 14,1a	121,5 ± 14,5a	76,5 ± 26,8a	86,0 ± 13,5a
Lidocaína SD	71,1 ± 16,1b	81,2 ± 18,9ab	86,9 ± 15,4ab	86,7 ± 15,5a	118,1 ± 15,7a	85,9 ± 14,2a	78,0 ± 12,2a
p	<0,01	<0,01	0,01	0,07	0,75	0,10	0,66
CV (%)	18,75	19,47	16,40	15,81	11,65	25,87	20,19

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.2.4 Temperatura (T)

Não houve diferença estatística significativa para T entre os grupos nos momentos *bolus*, 5', T2 e T3. No momento 10' o grupo Lidocaína SD apresentou temperatura superior ao grupo Sham, porém ambos não diferiram estatisticamente dos demais. No momento 15' o grupo Lidocaína DAA apresentou temperatura estatisticamente superior ao grupo Sham e ambos não diferiram dos demais. No momento T1 os grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD apresentaram temperatura estatisticamente superior ao grupo Sham, porém não diferindo do grupo Controle (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores da média e desvio padrão da temperatura (T) (°C), segundo grupos e momentos

GRUPO	Temperatura (°C)						
	Bolus	5'	10'	15'	T1	T2	T3
Sham	37,01 ± 0,3a	36,83 ± 0,3a	36,69 ± 0,4b	36,52 ± 0,5b	36,29 ± 0,7b	37,65 ± 0,9a	37,14 ± 1,0a
Controle	36,91 ± 0,5a	36,89 ± 0,6a	36,98 ± 0,7ab	36,82 ± 0,6ab	36,67 ± 0,9ab	37,25 ± 0,7a	37,29 ± 0,7a
Lidocaína DAA	37,24 ± 0,4a	37,24 ± 0,4a	37,18 ± 0,4ab	37,29 ± 0,4a	37,28 ± 0,6a	37,76 ± 0,9a	37,61 ± 0,8a
Lidocaína SD	37,20 ± 0,3a	37,23 ± 0,3a	37,28 ± 0,4a	37,03 ± 0,5ab	37,18 ± 0,6a	37,19 ± 0,7a	37,21 ± 0,7a
p	0,23	0,06	0,05	0,02	0,01	0,31	0,58
CV (%)	1,08	1,14	1,30	1,40	1,86	2,16	2,18

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.3 Frequência cardíaca (FC)

Independente do grupo e momento analisado, a FC manteve-se em valores superiores a 250 batimentos por minuto (bpm).

5.4 Concentração plasmática de lidocaína

Realizou-se dosagem plasmática de lidocaína nos animais alocados nos grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD. A presença de lidocaína plasmática foi evidenciada somente nos momentos M1 de ambos os grupos. No grupo Lidocaína DAA a concentração plasmática média foi de $2,9276 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o grupo Lidocaína SD foi de $1,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.5 NGAL e interleucinas

Para variáveis NGAL, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ e TNF- α , após verificada a normalidade dos dados foi realizada análise de variância para a comparação dos grupos em cada momento separadamente. Posteriormente, em cada grupo, para a comparação dos momentos (M0, M1 e M2) foi realizada “One Way Repeated Measures Anova”. Quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi realizado o Teste de Tukey para a comparação das médias.

5.5.1 Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL)

Na análise entre os grupos para cada momento, no M0 os valores do grupo Sham foram maiores estatisticamente que nos demais grupos. No M1 não houve diferença entre os grupos. Já no M2, os valores do grupo Sham foram estatisticamente menores que os demais grupos, que não diferenciaram entre si. Na análise entre os momentos para cada grupo houve diferença estatística para todos os grupos, sendo os valores em M2 estatisticamente maiores que nos momentos M1 e M2 (Tabela 6 e Figura 18).

Tabela 6 - Valores da média e desvio padrão da NGAL (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	$1,08 \pm 0,66\text{bA}$	$10,17 \pm 13,36\text{aA}$	$325,63 \pm 35,34\text{aB}$	<0,001
Lidocaína SD	$1,82 \pm 2,19\text{bA}$	$7,30 \pm 5,66\text{aA}$	$344,08 \pm 29,67\text{aB}$	<0,001
Controle	$4,99 \pm 3,91\text{bA}$	$17,16 \pm 10,10\text{aA}$	$347,90 \pm 46,56\text{aB}$	<0,001
Sham	$9,42 \pm 3,47\text{aA}$	$9,67 \pm 3,23\text{aA}$	$115,85 \pm 83,37\text{bB}$	<0,001
p	<0,001	0,193	<0,001	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

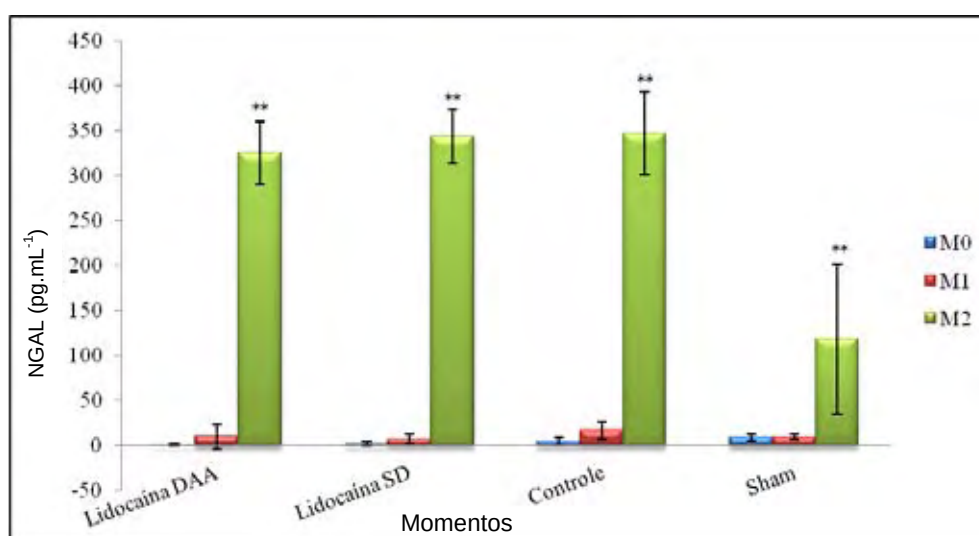


Figura 18 - Valores da média e desvio padrão da NGAL (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos

5.5.2 Interleucina 1-alfa (IL-1 α)

Na análise realizada entre os grupos, houve diferença estatisticamente significativa nos três momentos, sendo, os valores da IL-1 α estatisticamente maiores que os demais grupos, que não se diferenciaram entre si. Na análise entre momentos para um mesmo grupo, ocorreu diferença estatística somente para o grupo Sham, sendo, os valores do momento M2 superiores aos valores dos momentos M0 e M1 que não diferiram entre si (Tabela 7 e Figura 19).

Tabela 7 - Valores da média e desvio padrão da IL-1 α (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	68,95 $\pm$ 46,00bA	79,98 $\pm$ 23,27bA	50,61 $\pm$ 25,82bA	0,211
Lidocaína SD	60,61 $\pm$ 21,93bA	102,22 $\pm$ 38,21bA	75,92 $\pm$ 70,77bA	0,285
Controle	73,28 $\pm$ 22,16bA	123,04 $\pm$ 51,67bA	85,74 $\pm$ 46,81bA	0,123
Sham	210,19 $\pm$ 87,46aB	277,56 $\pm$ 134,54aB	597,69 $\pm$ 222,80aA	<0,001
p	<0,001	<0,001	<0,001	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

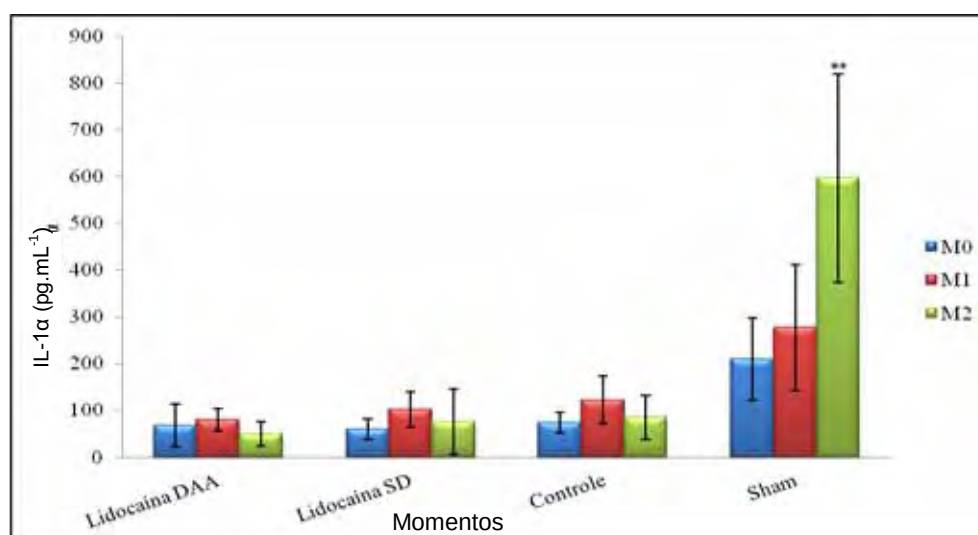


Figura 19 - Valores da média e desvio padrão da IL-1 α (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos

5.5.3 Interleucina 1-beta (IL-1 β)

Na análise entre os grupos nos três momentos, houve diferença estatística somente no momento M2, onde o grupo Lidocaína DAA apresentou valores estatisticamente menores que os valores do grupo Sham. Individualmente os valores dos grupos Lidocaína DAA e Sham não diferenciaram dos valores dos grupos Controle e Lidocaína SD. Na análise entre os momentos para cada grupo, os valores do grupo Lidocaína DAA no momento M1 foram estatisticamente maiores que os valores nos momentos M0 e M2. No grupo Sham os valores do momento M2 foram estatisticamente maiores que no momento M0 (Tabela 8 e Figura 20).

Tabela 8 – Valores da média e desvio padrão da IL-1 β (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	120,85 $\pm$ 64,08aB	248,15 $\pm$ 33,49aA	109,51 $\pm$ 44,60bB	<0,001
Lidocaína SD	111,32 $\pm$ 47,92aB	280,46 $\pm$ 116,46aA	225,24 $\pm$ 150,11abAB	0,041
Controle	171,86 $\pm$ 74,20aA	283,76 $\pm$ 116,79aA	197,57 $\pm$ 118,53abA	0,152
Sham	131,45 $\pm$ 47,00aB	255,25 $\pm$ 106,13aAB	361,69 $\pm$ 206,61aA	0,005
p	0,210	0,855	0,013	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

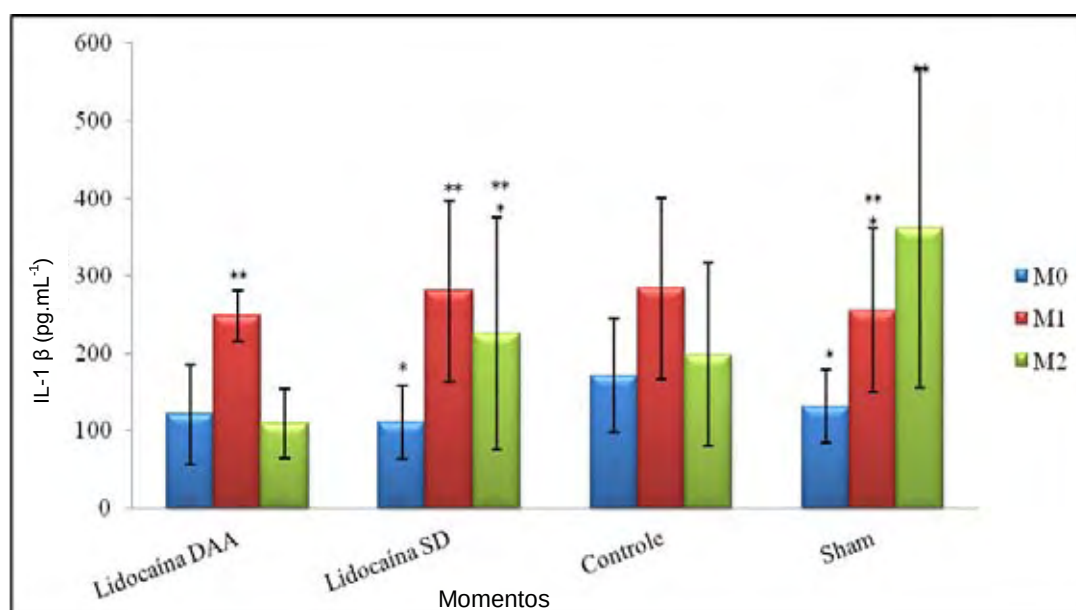


Figura 20 - Valores da média e desvio padrão da IL-1 β (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos.

5.5.4 Interleucina 2 (IL-2)

Na análise entre os grupos, no momento M0 o grupo Sham apresentou valores estatisticamente superiores aos valores dos demais grupos que não diferiram entre si. Este mesmo padrão foi mantido nos momentos M1 e M2. Na análise entre os momentos em um mesmo grupo, no grupo Sham os valores nos momentos M1 e M2 foram semelhantes entre si e estatisticamente superiores aos valores do momento M0 (Tabela 9 e Figura 21).

Tabela 9 - Valores da média e desvio padrão da IL-2 (pg.mL^{-1}) segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	136,84 $\pm$ 106,90bA	171,89 $\pm$ 50,16bA	127,93 $\pm$ 78,08bA	0,562
Lidocaína SD	152,11 $\pm$ 67,93bA	228,81 $\pm$ 112,70bA	169,20 $\pm$ 115,10bA	0,157
Controle	152,89 $\pm$ 86,95bA	214,50 $\pm$ 125,63bA	129,06 $\pm$ 81,76bA	0,265
Sham	261,94 $\pm$ 113,25aB	476,25 $\pm$ 125,99aA	446,69 $\pm$ 283,04aA	0,047
p	0,050	<0,001	0,001	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

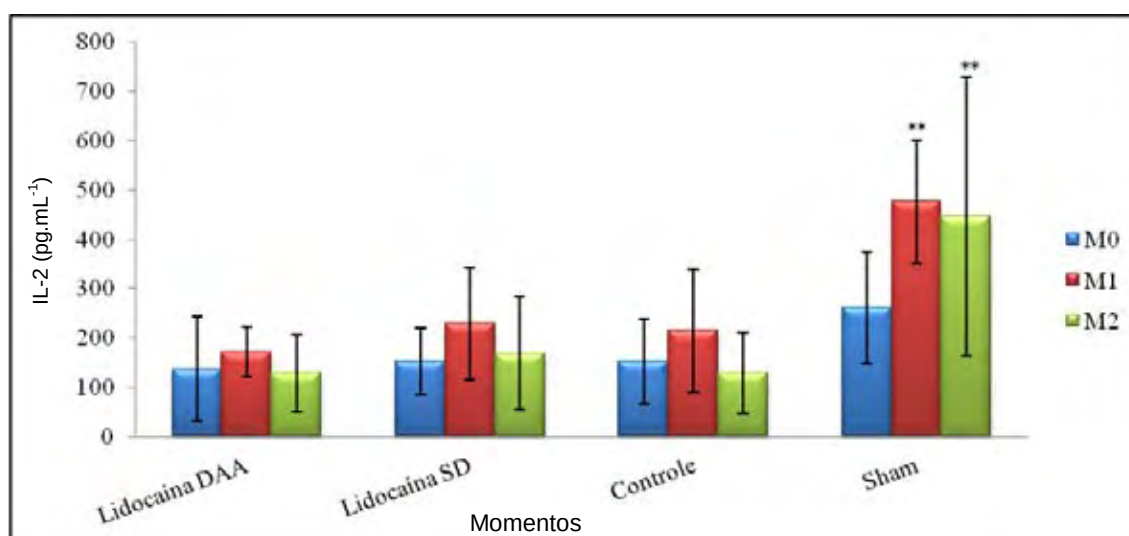


Figura 21- Valores da média e desvio padrão da IL-2 (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos.

5.5.5 Interleucina 4 (IL-4)

Na análise entre os grupos, em nenhum momento estudado, houve diferença estatisticamente significativa. Na análise entre os momentos para um mesmo grupo, no grupo Lidocaína DAA os valores no momento M2 foram estatisticamente menores que os valores no momento M1, sendo que os valores nos momentos M1 e M2 foram semelhantes aos valores do momento M0. Para o grupo Lidocaína SD não houve diferença de valores entre os momentos. O grupo Controle seguiu o mesmo padrão do grupo Lidocaína DAA. No grupo Sham, os valores no momento M1 foram estatisticamente maiores que os valores no momento M0, sendo que os valores nos momentos M0 e M1 foram individualmente semelhantes aos valores no momento M2 (Tabela 10 e Figura 22).

Tabela 10 - Valores da média e desvio padrão da IL-4 (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	231,15 $\pm$ 136,76aAB	330,58 $\pm$ 71,95aA	181,65 $\pm$ 71,32aB	0,031
Lidocaína SD	192,72 $\pm$ 69,87aA	265,21 $\pm$ 143,41aA	187,20 $\pm$ 177,33aA	0,330
Controle	242,73 $\pm$ 95,67aAB	338,89 $\pm$ 89,71aA	179,06 $\pm$ 90,89aB	0,028
Sham	196,79 $\pm$ 74,12aB	403,14 $\pm$ 108,88aA	316,57 $\pm$ 179,61aAB	0,005
p	0,674	0,107	0,158	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

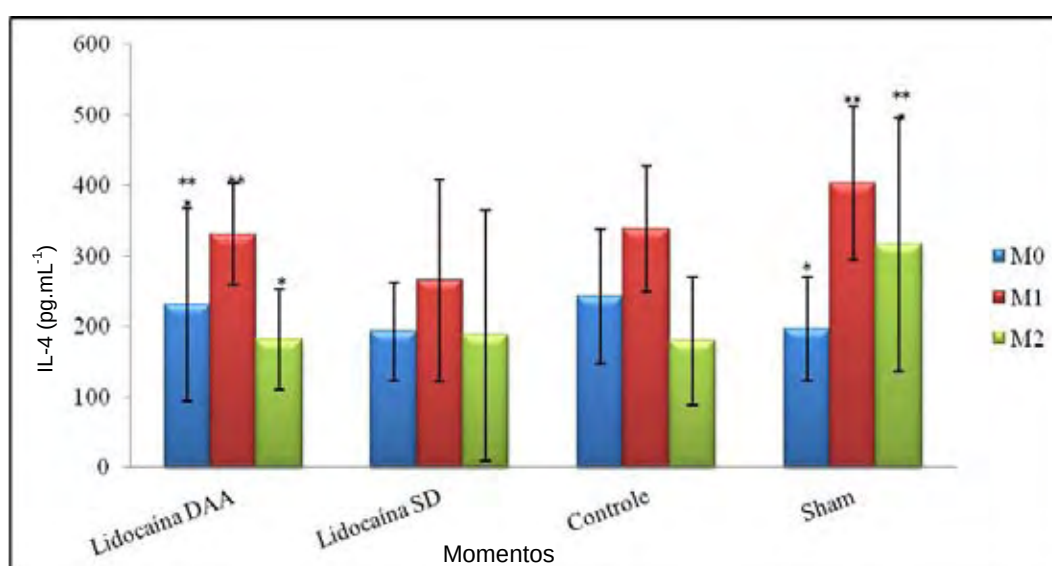


Figura 22 - Valores da média e desvio padrão da IL-4 (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos.

5.5.6 Interleucina 6 (IL-6)

Na análise entre os grupos o grupo Sham apresentou valores menores estatisticamente que os demais grupos, que apresentaram valores semelhantes, nos momentos M0 e M1. No momento M2 o grupo Sham apresentou valores estatisticamente inferiores ao grupo Controle. Tanto o grupo Sham quanto o grupo Controle, individualmente, apresentaram valores estatisticamente semelhantes aos grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD que não diferenciaram entre si. Na análise entre os momentos, o grupo Lidocaína DAA apresentou valores no momento M2 estatisticamente menores quando comparados aos valores no momento M1 e semelhante aos valores no momento M0 (Tabela 11 e Figura 23).

Tabela 11 - Valores da média e desvio padrão da IL-6 (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	1424,6 $\pm$ 709,4aAB	1883,0 $\pm$ 427,8aA	1078,4 $\pm$ 472,8abB	0,028
Lidocaína SD	1080,6 $\pm$ 468,1aA	1915,2 $\pm$ 927,7aA	1112,1 $\pm$ 1000,8abA	0,040
Controle	1526,0 $\pm$ 582,6aA	1998,4 $\pm$ 859,2aA	1509,9 $\pm$ 816,9aA	0,440
Sham	198,8 $\pm$ 80,9bA	362,1 $\pm$ 138,0bA	321,9 $\pm$ 266,1bA	0,199
p	<0,001	<0,001	0,017	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

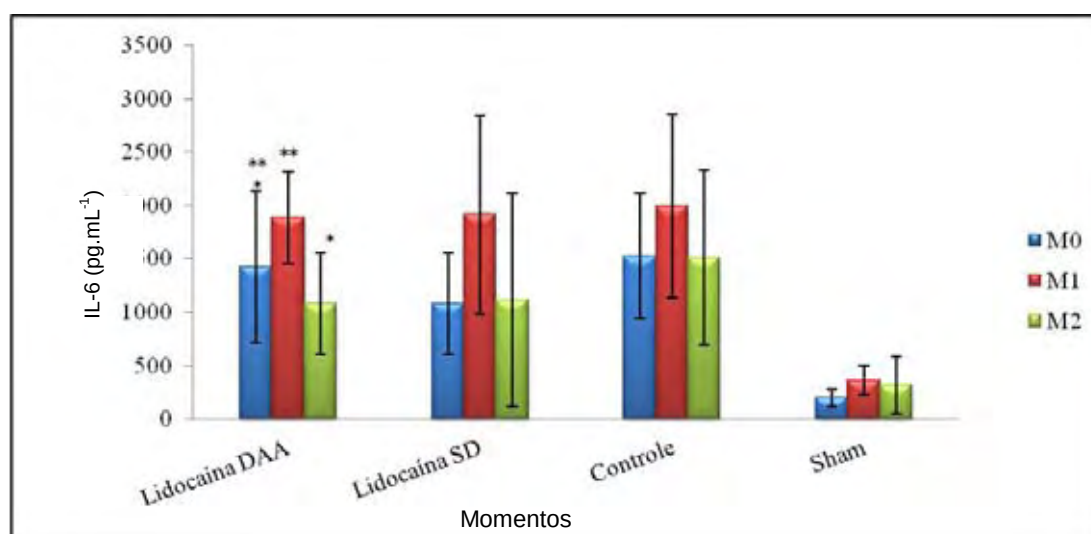


Figura 23 - Valores da média e desvio padrão da IL-6 (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos.

5.5.7 Interleucina 10 (IL-10)

Na análise entre os grupos, não houve diferença estatística significativa em nenhum momento. Na análise de momentos em um mesmo grupo, o grupo Lidocaína DAA apresentou no momento M2 valores estatisticamente menores que no momento M1, valores estes, individualmente, semelhantes aos do momento M0. No grupo Lidocaína SD os valores no momento M1 foram significativamente maiores que nos momentos M0 e M2 sendo estes semelhantes entre si. A análise no grupo Controle obteve resultado semelhante ao grupo Lidocaína SD. No grupo Sham os valores no momento M1 são estatisticamente maiores que no momento M0 e tanto os valores de M0 quanto de M1 são individualmente semelhantes aos valores de M2 (Tabela 12 e Figura 24).

Tabela 12 - Valores da média e desvio padrão da IL-10 (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	313,83 $\pm$ 173,18aAB	518,20 $\pm$ 205,67aA	245,79 $\pm$ 107,34aB	0,022
Lidocaína SD	247,47 $\pm$ 102,32aB	871,40 $\pm$ 409,38aA	298,69 $\pm$ 237,81aB	<0,001
Controle	305,16 $\pm$ 134,17aB	708,49 $\pm$ 323,42aA	334,08 $\pm$ 115,78aB	0,003
Sham	192,06 $\pm$ 64,81aB	520,00 $\pm$ 237,57aA	351,25 $\pm$ 211,74aB	0,014
p	0,203	0,080	0,653	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

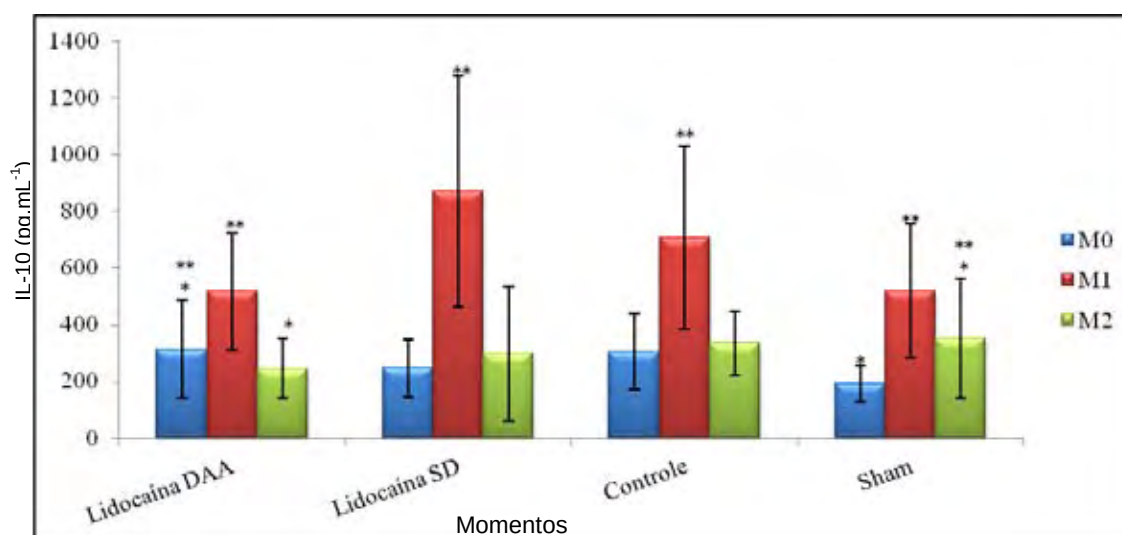


Figura 24 - Valores da média e desvio padrão da IL-10 (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos.

5.5.8 Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)

Na análise entre os grupos, no momento M1 os valores do grupo Sham foram estatisticamente maiores que os valores do grupo Lidocaína DAA, sendo que individualmente, os valores destes dois grupos foram semelhantes aos valores dos grupos Controle e Lidocaína SD. Na análise entre os momentos para um mesmo grupo, os valores do grupo Sham no momento M1 foram estatisticamente maiores que os valores no momento M0, sendo os valores nestes dois momentos individualmente semelhantes aos valores do momento M2 (Tabela 13 e Figura 25).

Tabela 13 - Valores da média e desvio padrão do CM-CSF (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	240,62 $\pm$ 139,68aA	234,93 $\pm$ 51,44bA	158,78 $\pm$ 89,24aA	0,142
Lidocaína SD	160,72 $\pm$ 56,00aA	292,34 $\pm$ 144,93abA	332,28 $\pm$ 288,69aA	0,192
Controle	199,69 $\pm$ 107,94aA	277,55 $\pm$ 158,06abA	204,34 $\pm$ 120,56aA	0,369
Sham	200,12 $\pm$ 91,45aB	425,25 $\pm$ 151,89aA	309,56 $\pm$ 209,74aAB	0,006
p	0,505	0,046	0,243	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

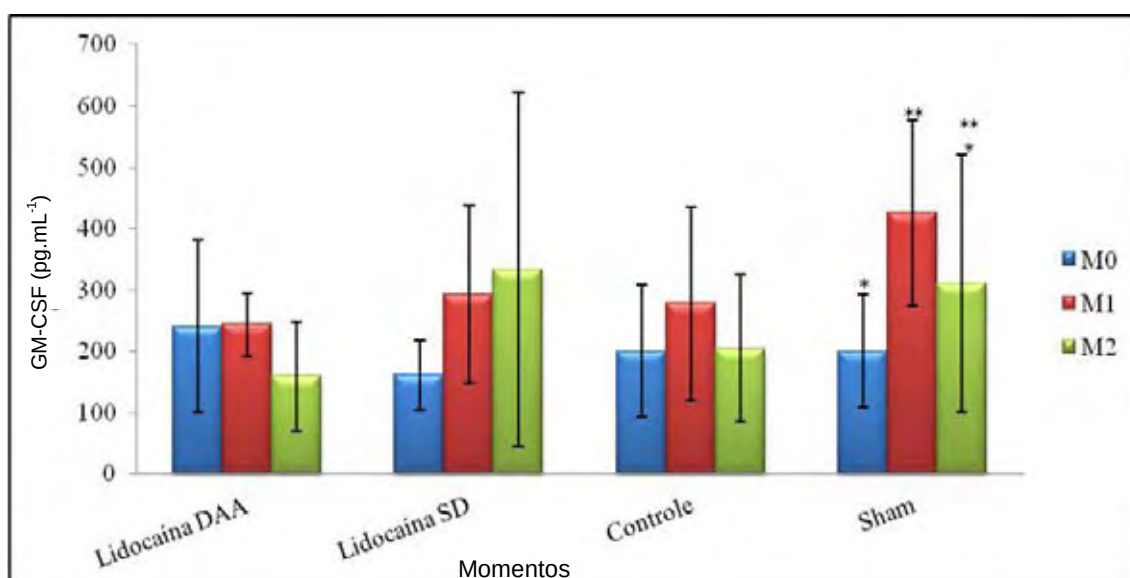


Figura 25 - Valores da média e desvio padrão do CM-CSF (pg.mL^{-1}), segundo grupos e momentos.

5.5.9 Intérferon gama (IFN- γ)

Na análise entre os grupos nos três momentos o grupo Sham apresentou valores estatisticamente superiores aos valores dos demais grupos que não diferenciaram entre si. Na análise entre os momentos para um mesmo grupo, no grupo Lidocaína DAA os valores apresentados no momento M2 eram significativamente menores que os valores do momento M1 e semelhantes aos valores do momento M0. Os valores nos momentos M0 e M1 eram semelhantes entre si (Tabela 14 e Figura 26).

Tabela 14 - Valores da média e desvio padrão do IFN- γ (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	50,94 $\pm$ 25,38bAB	78,13 $\pm$ 12,69bA	46,72 $\pm$ 24,64bB	0,025
Lidocaína SD	41,33 $\pm$ 11,13bA	74,53 $\pm$ 26,27bA	52,77 $\pm$ 40,02bA	0,053
Controle	46,93 $\pm$ 15,30bA	71,63 $\pm$ 25,82bA	61,52 $\pm$ 31,45bA	0,157
Sham	125,56 $\pm$ 73,00aA	205,88 $\pm$ 93,23aA	235,56 $\pm$ 208,42aA	0,216
p	<0,001	<0,001	0,004	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

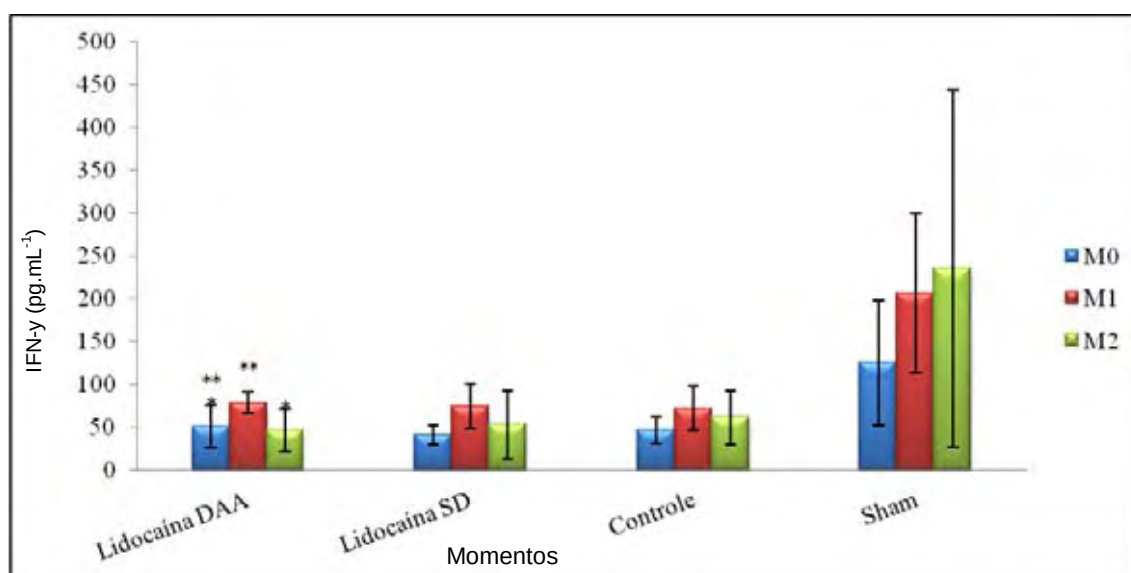


Figura 26 - Valores da média e desvio padrão do IFN- γ (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos.

5.5.10 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Na análise entre os grupos, no momento M1 o grupo Sham apresenta valores estatisticamente maiores que os demais grupos, que não diferenciaram entre si. Na análise entre os momentos para um mesmo grupo, o grupo Lidocaína DAA apresenta no momento M2 valores estatisticamente maiores que os valores do momento M1 e semelhantes aos valores no momento M0. Este mesmo padrão foi apresentado pelo grupo Sham (Tabela 15 e Figura 27).

Tabela 15 - Valores da média e desvio padrão do TNF- α (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos

Grupo	Momento			p
	M0	M1	M2	
Lidocaína DAA	93,94 $\pm$ 48,52aB	162,09 $\pm$ 38,39bA	96,60 $\pm$ 49,73aB	0,024
Lidocaína SD	87,80 $\pm$ 18,01aA	161,64 $\pm$ 51,67bA	112,09 $\pm$ 91,04aA	0,085
Controle	129,05 $\pm$ 48,68aA	153,13 $\pm$ 60,41bA	133,74 $\pm$ 62,65aA	0,764
Sham	118,81 $\pm$ 65,71aB	344,88 $\pm$ 155,39aA	180,50 $\pm$ 119,44aB	<0,001
p	0,286	<0,001	0,243	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

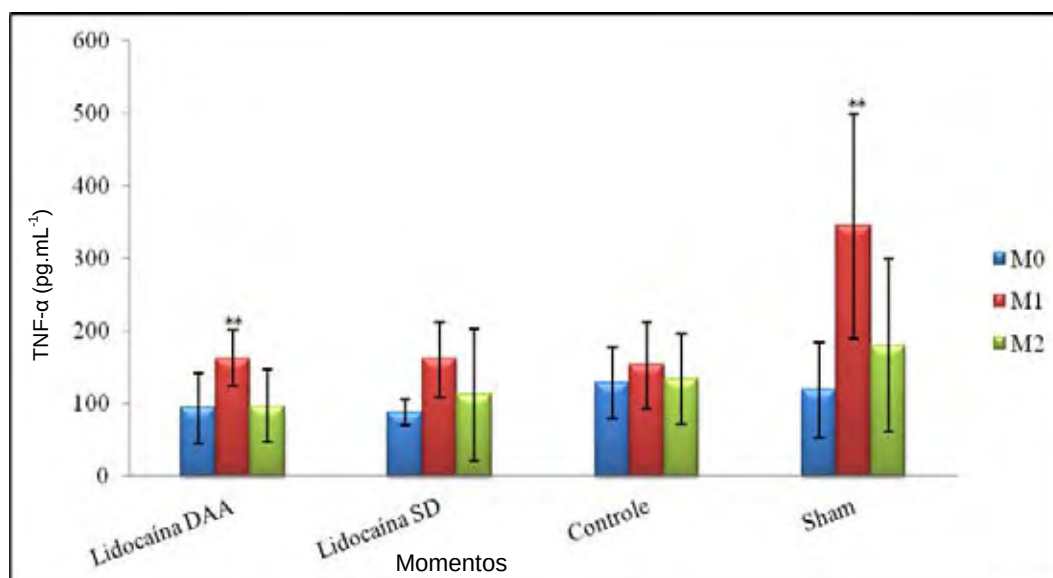


Figura 27 - Valores da média e desvio padrão do TNF- α (pg.mL⁻¹), segundo grupos e momentos.

5.6 Histologia

Na análise histológica foi utilizada a estatística descritiva para demonstrar as variações dos escores de cada grupo, avaliando os escores histológicos para dilatação tubular, degeneração celular hidrópica e necrose tubular aguda. Especificamente para necrose tubular aguda aplicamos o Teste qui-quadrado para avaliarmos as possíveis diferenças estatísticas entre os grupos. As análises descritas são referentes aos exames histológicos realizados nos rins esquerdos.

Todos os rins direitos dos animais de todos os grupos (que não sofreram manobras de isquemia-reperfusão) e os rins esquerdos dos animais do grupo Sham (que também não sofreram manobras de isquemia-reperfusão) passaram por criteriosa avaliação histológica. Todos não apresentaram qualquer sinal de lesão ou necrose celular.

5.6.1 Dilatação tubular

Na avaliação dos escores de intensidade para dilatação tubular (Figura 28), no grupo Sham 10% dos rins esquerdos apresentaram-se com escore 0 (negativo) para este critério. Os 90% restantes foram classificados dentro do escore 1 (leve intensidade). No grupo Lidocaína DAA 20% dos rins esquerdos apresentaram-se com escore 0 (negativo), 20% escore 1 (leve), 50% escore 2 (moderado) e 10% escore 3 (intenso). No grupo Lidocaína SD nenhum rim esquerdo foi classificado no escore 0 (negativo), 30% foram classificados no escore 1 (leve), 40% no escore 2 (moderado) e 30% no escore 3 (intenso). No grupo Controle nenhum rim foi classificado como escore 0 (negativo), 10% foram classificados no escore 1 (leve), 60% no escore 2 (moderado) e 30% no escore 3 (intenso).

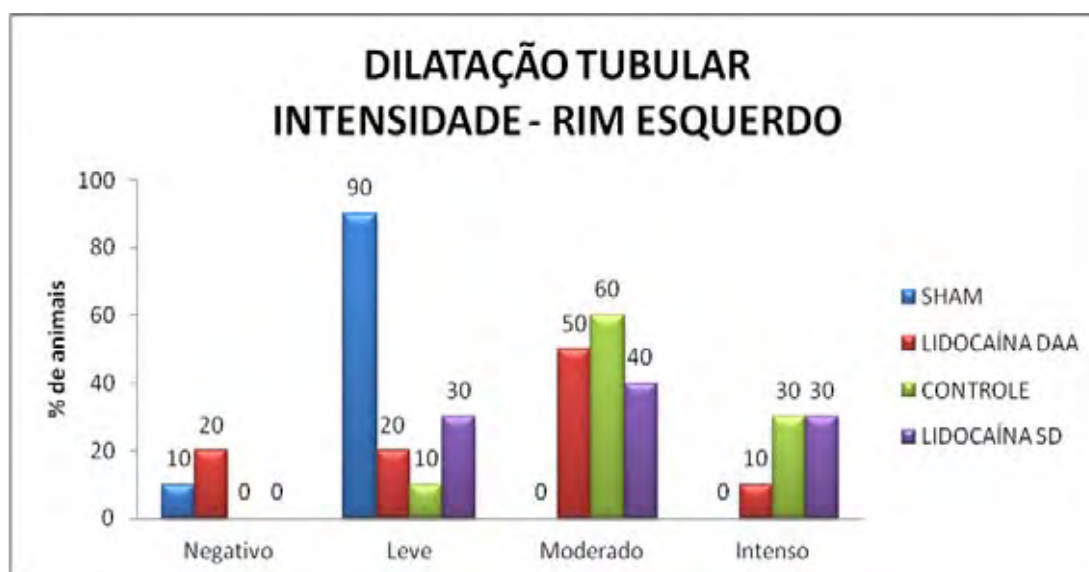


Figura 28 - Classificação histológica da intensidade da dilatação tubular

Na avaliação dos escores de extensão para dilatação tubular (Figura 29), no grupo Sham 10% dos rins esquerdos apresentaram-se com escore 0 (negativo) para este critério. Os 90% restantes foram classificados dentro do escore 1 (até 1/3 de extensão). No grupo Lidocaína DAA 20% dos rins esquerdos apresentaram-se com escore 0 (negativo), 20% escore 1 (até 1/3 de extensão), 40% escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 20% escore 3 (> 2/3 de extensão). No grupo Lidocaína SD nenhum rim esquerdo foi classificado no escore 0 (negativo), 20% foram classificados no escore 1 (até 1/3 de extensão), 40% no escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 40% no escore 3 (> 2/3 de extensão). No grupo Controle nenhum rim esquerdo foi classificado como escore 0 (negativo), o mesmo acontecendo para o escore 1 (até 1/3 de extensão), 30% no escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 70% no escore 3 (> 2/3 de extensão).

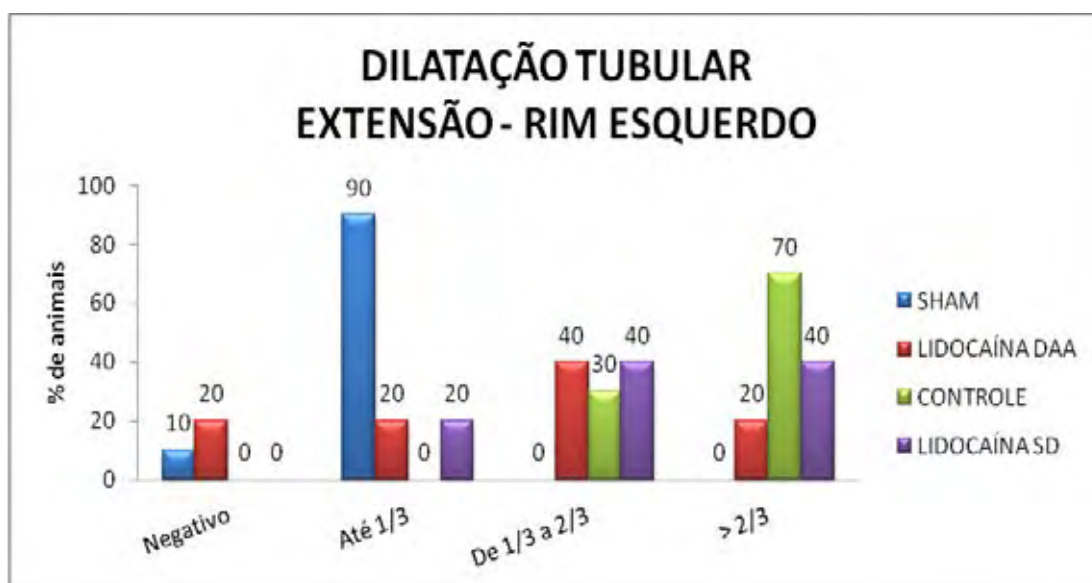


Figura 29 - Classificação histológica da extensão da dilatação tubular.

5.6.2 Degeneração Tubular

Na avaliação dos escores de intensidade para degeneração celular hidrópica (Figura 30), no grupo Sham nenhum rim esquerdo foi classificado no escore 0 (negativo) para este critério, 80% foram classificados dentro do escore 1 (leve intensidade) e 20% foram classificados no escore 2 (moderado). No grupo Lidocaína DAA nenhum rim foi classificado com escore 0 (negativo), 30% escore 1 (leve), 50% escore 2 (moderado) e 20% escore 3 (intenso). No grupo Lidocaína SD nenhum rim foi classificado no escore 0 (negativo), 10% foram classificados no escore 1 (leve), 80% no escore 2 (moderado) e 10% no escore 3 (intenso). No grupo Controle nenhum rim esquerdo foi classificado como escore 0 (negativo), 20% foram classificados no escore 1 (leve), 80% no escore 2 (moderado) e nenhum foi classificado no escore 3 (intenso).

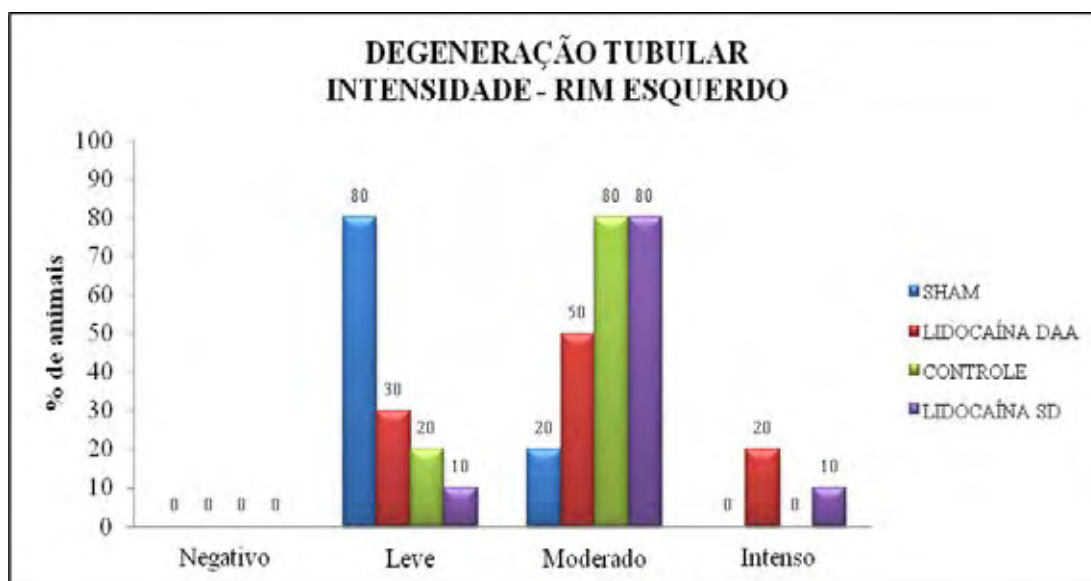


Figura 30 - Classificação histológica da intensidade da degeneração celular hidrópica.

Na avaliação dos escores de extensão para degeneração celular hidrópica (Figura 31), no grupo Sham nenhum rim esquerdo foi classificado no escore 0 (negativo) para este critério, 40% foram classificados dentro do escore 1 (até 1/3 de extensão) e 60% foram classificados no escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão). No grupo Lidocaína DAA nenhum rim esquerdo foi classificado no escore 0 (negativo), 20% escore 1 (até 1/3 de extensão), 50% escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 30% escore 3 (> 2/3 de extensão). No grupo Lidocaína SD nenhum rim esquerdo foi classificado no escore 0 (negativo), 10% foram classificados no escore 1 (até 1/3 de extensão), 70% no escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 20% no escore 3 (> 2/3 de extensão). No grupo Controle nenhum rim esquerdo foi classificado como escore 0 (negativo), 20% foram classificados no escore 1 (até 1/3 de extensão), 60% no escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 20% no escore 3 (> 2/3 de extensão).

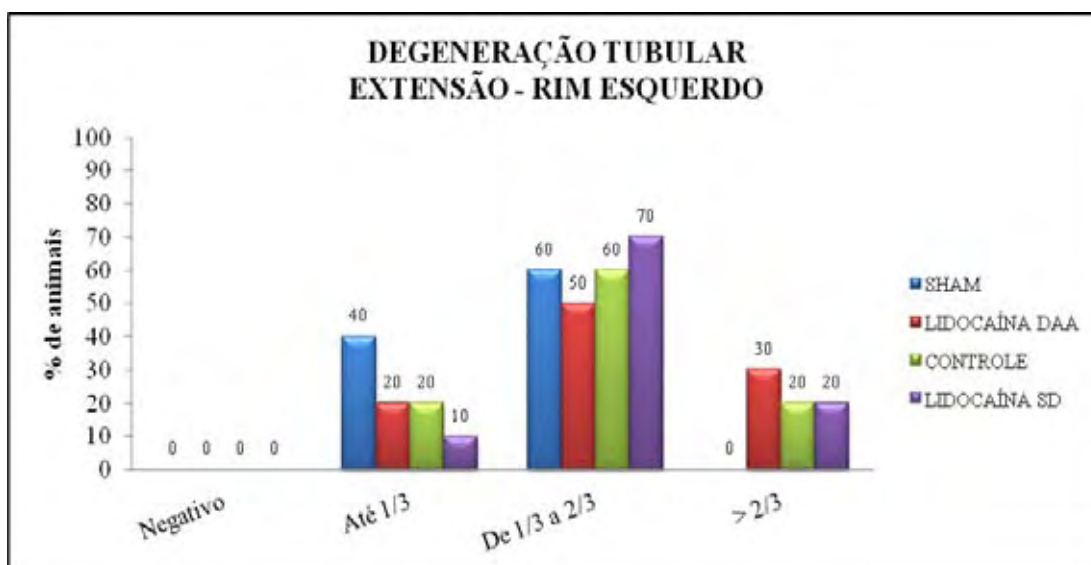


Figura 31 - Classificação histológica de extensão da degeneração celular hidrópica.

5.6.3 Necrose Tubular

Na avaliação dos escores de intensidade para necrose tubular (Tabela 16 e Figura 32), no grupo Sham 100% dos rins esquerdos apresentaram-se com escore 0 (negativo) para este critério. No grupo Lidocaína DAA 20% dos rins esquerdos apresentaram-se com escore 0 (negativo), 10% escore 1 (leve), 50% escore 2 (moderado) e 20% escore 3 (intenso). No grupo Lidocaína SD 10% dos rins esquerdos foram classificados no escore 0 (negativo), 30% foram classificados no escore 1 (leve), 20% no escore 2 (moderado) e 40% no escore 3 (intenso). No grupo Controle nenhum rim foi classificado como escore 0 (negativo), 10% foram classificados no escore 1 (leve), 50% no escore 2 (moderado) e 40% no escore 3 (intenso).

Tabela 16 - Necrose tubular aguda: intensidade

GRUPO	NECROSE TUBULAR AGUDA – INTENSIDADE			
	Negativo	Leve	Moderado	Intenso
SHAM	100a	0b	0b	0b
LIDOCAÍNA DAA	20b	10b	50a	20b
CONTROLE	0b	10b	50a	40a
LIDOCAÍNA SD	10b	30a	20b	40a

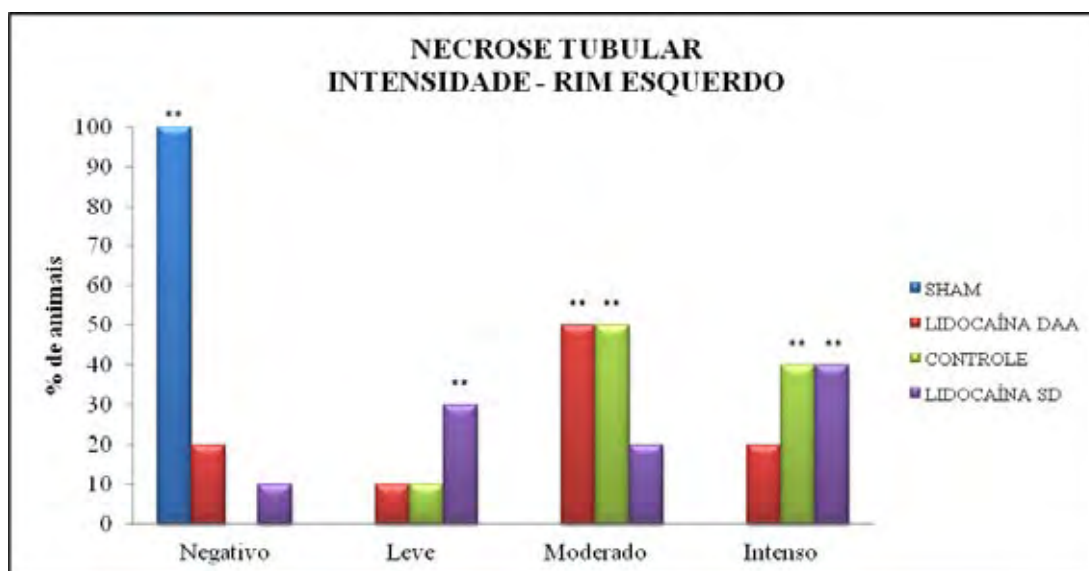


Figura 32 - Classificação histológica para intensidade de necrose tubular.

No Grupo Sham todos os rins esquerdos foram classificados como escore 0 (negativo) para intensidade da necrose tubular aguda, diferente estatisticamente pelo Teste qui-quadrado ($p < 0,01$) dos Grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD, que apresentaram apenas 20 e 10% respectivamente de rins esquerdos com esse escore e não diferiram entre si ($p > 0,05$). O Grupo Controle não apresentou nenhum rim esquerdo nesse escore.

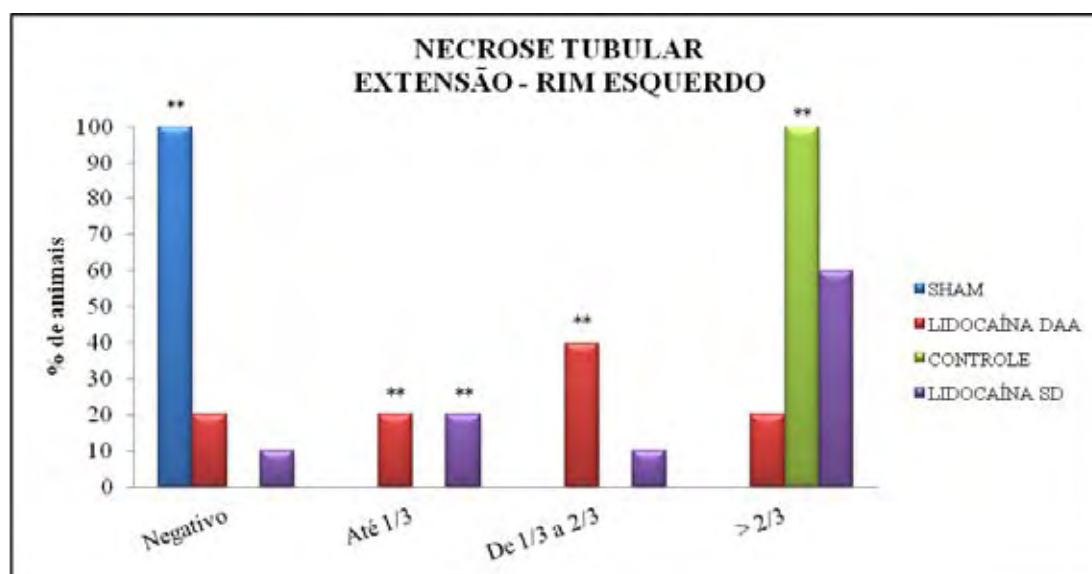
Considerando a intensidade leve e moderada da necrose tubular aguda, os Grupos Lidocaína DAA e Controle não diferiram entre si ($p > 0,05$), apresentando 10 e 50% respectivamente. Ambos foram diferentes do grupo Sham ($p < 0,01$) que não apresentou rins esquerdos classificados para os escores 1 e 2.

Para o escore 3 (intenso) o Grupo Controle e Lidocaína SD não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) com 40% de rins esquerdos classificados neste escore e ambos foram diferentes do Grupo Lidocaína DAA e Sham ($P < 0,01$).

Na avaliação dos escores de extensão para necrose tubular (Tabela 17 e Figura 33), no grupo Sham 100% dos rins esquerdos foram classificados no escore 0 (negativo) para este critério. No grupo Lidocaína DAA 20% dos rins esquerdos foram classificados no escore 0 (negativo), 20% escore 1 (até 1/3 de extensão), 40% escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 20% escore 3 ($> 2/3$ de extensão). No grupo Lidocaína SD 10% dos rins esquerdos foram classificados no escore 0 (negativo), 20% foram classificados no escore 1 (até 1/3 de extensão), 10% no escore 2 (de 1/3 a 2/3 de extensão) e 60% no escore 3 ($> 2/3$ de extensão). No grupo Controle 100% dos rins esquerdos foram classificados no escore 3 ($> 2/3$ de extensão).

Tabela 17 - Necrose tubular aguda: extensão

GRUPO	NECROSE TUBULAR AGUDA – EXTENSÃO			
	Negativo	Até 1/3	De 1/3 a 2/3	> 2/3
SHAM	100a	0b	0b	0d
LIDOCAÍNA DAA	20b	20a	40a	20c
CONTROLE	0b	0b	0b	100a
LIDOCAÍNA SD	10b	20a	10b	60b

**Figura 33** - Classificação histológica para extensão da necrose tubular.

No grupo Sham todos os rins esquerdos foram negativos para extensão da necrose tubular, diferente estatisticamente pelo Teste qui-quadrado ($p < 0,01$) dos grupos Lidocaína DAA, Lidocaína SD e Controle, que apresentaram apenas 20, 0 e 10% respectivamente de rins esquerdos classificados neste escore e não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Considerando rins esquerdos com até 1/3 de extensão de necrose, os grupos Lidocaína DAA e SD não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) com 20% de rins esquerdos e ambos foram diferentes dos grupos Sham e Controle que não apresentaram indivíduos com esse escore.

Rins esquerdos apresentando de 1/3 a 2/3 de extensão de necrose o grupo Lidocaína DAA foi superior estatisticamente que os demais ($p < 0,01$) com 40% dos rins esquerdos nesse escore.

Para extensão de necrose acima de 2/3 todos os grupos foram diferentes estatisticamente ($p < 0,01$) sendo que o grupo Controle apresentou 100% dos seus indivíduos nessa condição e o grupo Sham 0%.

6 DISCUSSÃO

Para este experimento utilizou-se, o modelo de isquemia/reperfusão (I/R) em ratos, desenvolvido pelo Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse interferência do rim contralateral, sendo a isquemia temporária renal executada com *clamp* microvascular atraumático.

Vários autores já relataram atenuação da doença e facilitação da recuperação com a realização da nefrectomia prévia contralateral (Cronin et al., 1978; Fernandez-Repollet & Finn, 1982).

A insuficiência renal aguda oligúrica, que é de pior prognóstico, foi demonstrada em ratos submetidos a clampeamento da artéria renal esquerda sem a realização prévia de nefrectomia contralateral. Nesta mesma pesquisa, nos ratos nos quais houve a realização de nefrectomia contralateral previamente, a insuficiência renal que se instalou foi da forma poliúrica, além desses animais terem apresentado menor dano celular tubular e maior depuração de inulina (Fernandez-Repollet & Finn, 1982).

A produção de fatores humorais, que estimulam o crescimento das células renais, aumenta, seguindo a nefrectomia prévia e acelera o reparo das mesmas. A atividade da renina plasmática e o conteúdo da renina no rim pós-isquêmico aumentam significativamente em ratos não nefrectomizados.

Os fatores responsáveis pela vasoconstrição renal (tromboxane A₂, endotelina, etc) parecem estar em maior concentração nos ratos não nefrectomizados (Kon et al., 1979; Collins et al., 1991; Lüscher et al., 1991).

Entretanto, Islan et al. (1997) não observaram diferenças entre os rins pré-condicionados por isquemia e os que não foram submetidos a esta técnica nos animais que não sofreram nefrectomia unilateral.

De qualquer forma, a nefrectomia prévia foi realizada para que não houvesse interferência com a avaliação do rim esquerdo, que foi submetido à isquemia.

Os grupos estudados apresentaram uniformidade quanto ao sexo dos animais (100% femininos) e quanto ao peso. Quanto à frequência cardíaca, havia uma limitação do monitor utilizado, que não registrava valores superiores acima de 250 batimentos por minuto (bpm). Assim, constatamos que de forma também uniforme, todos os animais se comportaram durante todo o experimento com valores superiores a 250 bpm.

A susceptibilidade renal à lesão isquêmica parece ser influenciada pela temperatura. Na ausência de isquemia renal a hipertermia não tem efeito adverso sobre a função e morfologia renais ou sobre os estoques renais de fosfato de alta energia, mas quando há instalação da mesma isto não acontece segundo Zager & Altschuld, em 1986.

Estes mesmos autores trabalharam com ratos em normo, hipo e hipertermia, submetidos à isquemia renal total de 25-40 minutos. Com 25 minutos de isquemia, a lesão isquêmica nos ratos normotérmicos desapareceu após 24-48 horas da interrupção do fluxo sanguíneo. Em ratos hipertérmicos (temperatura maior que 38°C) 25 minutos de isquemia causaram lesão renal intensa e nos hipotérmicos (32-35°C) a lesão foi branda e de rápida recuperação. Outros autores também comprovaram a interferência da temperatura com a gravidade da lesão isquêmica (Finn, 1982; Delbridge et al, 2007).

Durante o experimento vários fatores podem alterar a temperatura. As soluções administradas são frias, abertura de cavidade, respiração com ventilação controlada sem reinalação e sem aquecimento do ar promovem perda rápida de calor. A manutenção da temperatura foi realizada com a colocação de mantas térmicas sob e sobre os animais e controlou-se a temperatura retal.

Na análise da temperatura dos animais, ocorreu uma diferença estatística significativa nos tempos 10', 15' e T1. No entanto, ao reavaliarmos cuidadosamente os valores das temperaturas desconsideramos tal fato, devido as diferenças apresentadas estarem dentro de uma faixa de normalidade e,

desta forma, se houve repercussão no nosso estudo, esta foi igual em todos os grupos.

Na avaliação dos registros das pressões arteriais, o uso da lidocaína contribuiu para a redução dos valores de forma significativa nos momentos iniciais do experimento. Destacamos que nos grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD os valores das pressões eram estatisticamente menores nos primeiros momentos, no entanto, evidenciou-se que os valores eram mais rapidamente restabelecidos no grupo onde se utilizou menores doses de lidocaína. Confirmamos assim, que a lidocaína, de forma dose dependente, provocava redução nos valores das pressões arteriais logo após a injeção de *bolus* por via intravenosa. Os valores se igualavam aos dos grupos Sham e Controle logo nos primeiros minutos. Durante o restante do experimento não se detectou qualquer diferença entre os grupos.

Portanto, embora inicialmente tenham ocorrido alterações nas pressões arteriais sistólica, diastólica e média estas se normalizaram e não interferiram com os resultados pois permaneceram dentro dos valores considerados para a manutenção da autorregulação renal, que se situa entre 60 e 180 mm Hg.

Estudamos os efeitos protetores renais da lidocaína em doses antiarrítmica e subclínica em ratos submetidos à isquemia-reperfusão. A lesão renal foi determinada pelo exame histológico dos rins e pela determinação plasmática do biomarcador lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) e a resposta inflamatória sistêmica pela dosagem das interleucinas.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são devidos aos vários mecanismos envolvidos no estabelecimento, manutenção e recuperação da lesão renal aguda pela isquemia e perfusão imposta aos rins dos ratos durante a fase experimental. Portanto, são vários os fatores que, possivelmente, interferiram com os resultados: a própria manobra de isquemia/reperfusão, a administração de lidocaína em dose plena e metade da dose antiarrítmica e o anestésico volátil utilizado.

Após a diminuição ou mesmo interrupção do fluxo sanguíneo renal, a subsequente lesão renal resulta do dano direto que ocorre pela isquemia e é exacerbada pela reperfusão posterior que provoca a lesão por reperfusão.

O fenômeno de isquemia e reperfusão (I/R) é complexo e, como na sepse, induz a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS). Haukoos et al. (2007) classificam este tipo de lesão em três estágios. No primeiro estágio ocorre a resposta a uma lesão, evocando uma resposta inflamatória para promover uma reparação celular local pelas células recrutadoras do sistema reticulo-endotelial e imunológico. No segundo estágio, pequenas quantidades de citocinas são liberadas na circulação sistêmica na tentativa de se aumentar a resposta local. Nesta fase ainda existe um equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Quando ocorre o terceiro estágio este equilíbrio deixa de existir e a destruição tecidual pode ser maciça. Ocorre a formação de radicais livres e ativação de leucócitos. Este quadro pode evoluir para falência múltipla de órgãos e morte.

Lee et al. (2011) afirmam que inflamação desenvolve uma importante função na iniciação e extensão da LRA. Complementam relatando que a IL-6 e IL-8 também podem ser consideradas marcadores precoces de LRA. A IL-6, sérica e urinária, aumenta precocemente em pacientes com LRA. Prejuízo no metabolismo da IL-6 resulta em aumento dos seus níveis séricos podendo contribuir para efeitos sistêmicos deletérios e para o aumento da mortalidade associada com a LRA. No nosso estudo o grupo Lidocaína DAA apresentou no momento M2 valores significativamente menores que no momento M1. Tal fato não ocorreu nos demais grupos. No entanto, a análise estatística demonstra que os valores no momento M2 são semelhantes aos valores do momento M0 (momento pré-isquemia) e que o valor médio se apresentou menor que o valor médio do momento M0. Na análise entre os grupos observamos que os valores apresentados para o grupo Sham diferiram estatisticamente somente dos valores do grupo controle. Considerando o efeito anti-inflamatório dos anestésicos locais, é possível tenha ocorrido uma modulação da lidocaína em relação a IL-6.

Safirstein et al. (1991); Goes et al. (1995); Rice et al. (2002); Kielar et al. (2005) definem que algumas interleucinas estão aumentadas na LRA. Fazem parte desta lista IFN- γ , IL-2, IL-10, GM-CSF, TGF- β , CXCL1, IL-6, IL-18, MIP-2 e MCP-1. Realizamos as dosagens de cinco destas. Discutimos anteriormente a IL-6. Quanto ao IFN- γ a análise estatística entre os momentos no grupo Lidocaína DAA demonstra que os valores no momento M2 são estatisticamente menores que os valores do momento M1. Os valores em M2, apesar de semelhantes aos valores de M0, apresentam um valor médio menor que o valor médio de M0. Este comportamento não pode ser evidenciado nos outros grupos. Assim, caracteriza-se uma interferência no esperado crescimento do IFN- γ no grupo Lidocaína DAA. As análises estatísticas dos valores da IL-2, IL-10 e GM-CSF não apresentaram evidências de qualquer ação do fármaco estudado.

Faubel et al. (2007) apresentaram que a IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-18 e TNF- α estão aumentadas nas LRA induzidas pela cisplatina. No nosso estudo observamos que na análise da IL- β entre os momentos, no grupo Lidocaína DAA, os valores do momento M2 são estatisticamente menores que os valores no momento M2 e semelhantes, porém com média menor que os valores do momento pré-isquêmico M0. Merece ainda destaque que na análise entre os grupos, os valores do grupo Lidocaína DAA em M2 são estatisticamente inferiores aos do grupo Sham. Evidencia-se assim um fator atenuante ao aumento das concentrações desta interleucina. Quanto ao TNF- α o somente o grupo da Lidocaína DAA apresentou comportamento semelhante ao do grupo Sham. Ou seja, apresentou no momento M2 valores semelhantes aos valores basais do momento M0 e estatisticamente inferiores aos valores do momento M1. Para esta interleucina é possível que tenha ocorrido uma modulação pela lidocaína na dose do grupo Lidocaína DAA. As análises das interleucinas IL-1 α e IL-4 não acrescentaram informações relevantes ao nosso estudo.

Muitos estudos têm demonstrado que a lesão causada pela isquemia-reperfusão pode ser prevenida ou revertida pela modificação nas condições de perfusão (Lu et al., 2004; Hashigushi et al., 2005; Julier et al., 2003; Yan et al., 2008).

Investigações prévias indicam que os anestésicos inalatórios podem reduzir a lesão resultante da isquemia-reperfusão. O mecanismo proposto – ativação dos canais de potássio e a ativação do fosfatidilinositol-3-cinase – estimularam o óxido nítrico sintetase, aumentando os produtos cardioprotetores, como o óxido nítrico. Inicialmente pensava-se que os canais de potássio mitocondriais dependentes do ATP eram somente efetores finais do pré-condicionamento. A abertura deste canal é crítica para os efeitos benéficos do PCI.

Desde que os componentes envolvidos na via de transdução do sinal intracelular do PCI foram mais bem definidos, agonistas e antagonistas farmacológicos de vários mediadores foram testados para o desenvolvimento de muitos agentes terapêuticos que também pré-condicionassem o miocárdio. Durante este tempo, estudaram-se os efeitos benéficos dos anestésicos voláteis contra a lesão isquêmica. Portanto, o PCI fundamenta estudos dos mecanismos de pré-condicionamento dos anestésicos (Wartier et al., 2002; Tanaka et al., 2004).

Muitos sinalizadores (proteína G, proteína Cinase C e ativação de fosfolipase) e transmissores (bradicinina, endotelina ou acetilcolina) estão envolvidos no mecanismo protetor de pré-condicionamento (Baxter, 1997).

É conhecido que os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) desenvolvem uma função chave no pré-condicionamento (O'Rourke, 2000). Desde então foi considerado que “abridores” dos canais K_{ATP} (como a cromacalina ou bimakalina) mimetizariam proteção e que 5-Hidroxidecanoato (5-HD), um bloqueador de K_{ATP} isquemia seletivo, poderia abolir a proteção (Gross et al., 1996). A corrente para o exterior destes canais poderia levar a um encurtamento do potencial de ação, reduzir o influxo de cálcio, preservar ATP e reduzir o consumo de energia durante a isquemia. Além do sarcolema e

miócitos cardíacos (Noma, 1983), os K_{ATP} estão presentes no interior da membrana mitocondrial (mito K_{ATP}). “Abridores” de K_{ATP} seletivos para mito K_{ATP} possuem fortes propriedades protetoras e a ativação destes canais produz pré-condicionamento cardíaco (Gross & Fryer, 1999).

O anestésico utilizado foi o sevoflurano. Yan et al. (2008) demonstraram que o mesmo, administrado no momento da reperfusão, melhora significativamente a reperfusão funcional pós-isquemia, reduzindo o tamanho do infarto e do marcador de lesão miocárdica lactato desidrogenase (LDH).

A proteção renal com os anestésicos voláteis também já foi demonstrada. Em concentrações utilizadas em clínica todos os agentes inalatórios (sevoflurano, desflurano, isoflurano e halotano) administrados antes e após a isquemia renal protegem o rim, reduzindo a necrose tubular aguda (Lee et al., 2004).

Julier et al., 2003, demonstraram que a administração de 2 MAC por 10 min de sevoflurano antes do “bypass” cardiopulmonar causou melhora da taxa de filtração glomerular, determinada pela cistatina C.

A administração do anestésico inalatório poderia ter causado pré- e pós-condicionamento por mecanismo proposto, abertura dos K_{atp} .

Obal et al. (2005) demonstraram que os K_{atp} estavam envolvidos com o mecanismo de pré e pós-condicionamento do sevoflurano, e que a combinação do pré e pós-condicionamento promoviam cardioproteção aditiva.

A lidocaína, em doses supratrapeuticas, parece bloquear a cardioproteção determinada pelo pré-condicionamento. Yan et al. (2008) propuseram que o bloqueio dos canais de K_{atp} pela lidocaína poderia influenciar a proteção isquêmica pós-condicionamento. Este estudo mostrou que a cardioproteção induzida pelo pós-condicionamento pelo sevoflurano, foi totalmente abolida pela lidocaína em concentrações elevadas (20 mg/mL). Entretanto, em baixas concentrações (2,10 mg/mL) não se observou nenhum efeito no marcador lactato desidrogenase e também no tamanho do infarto.

Em nossa pesquisa, utilizamos duas doses de lidocaína em situação de isquemia-reperfusão. A análise dos valores do biomarcador de lesão renal, NGAL, demonstrou comportamento semelhante dos grupos Controle, Lidocaína DAA e Lidocaína SD. Durante o experimento não se alterou, entretanto, 24 horas após, estes grupos apresentavam valores elevados de NGAL, de forma significativa.

Um biomarcador renal deve possuir características específicas que o aproxime de um marcador ideal. Deve ter sensibilidade, facilmente mensurável e quantificado, ser um método não invasivo, ser específico para LRA, permitir estratificação de risco (LRA, TSR e morte), não sofrer alterações séricas em doenças extrarrenais e ser livremente filtrado e não reabsorvido/secretado pelos túbulos (Mishra et al., 2005). A NGAL tem-se mostrado um promissor biomarcador por preencher satisfatoriamente essas características em diversos cenários relacionados à doença renal aguda, tais como pós-operatório de cirurgia cardíaca, sepse/choque séptico, infecções específicas nefropatia por contraste, nefrotoxicidade por fármacos, vasculites anticorpo anticitoplasma de neutrófilo positivo (ANCA+) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Mishra et al. 2005; Bagshaw et al., 2010; Coca et al., 2008; Haase et al., 2010; Cruz et al., 2010a; Haase et al., 2011; Cruz et al., 2010b)

A NGAL é estável na urina livremente filtrada pelos glomérulos e está relacionada à resposta imune com maior expressão no tecido renal, aumentando 67,9 a 137,4 vezes após 6 e 36 horas da lesão renal (Haase et al., 2011).

No tecido humano saudável a NGAL pode não ser detectada ou se manifestar apenas em traços (Kjeldsen et al., 2000). No rim saudável, quantidade mínima de NGAL está presente no epitélio dos túbulos distais e em ductos coletores medulares. Em contrapartida, em quase 50% das lesões renais isquêmicas e nefrotóxicas nos túbulos corticais os valores da NGAL ficam mais elevados.

Em metanálise envolvendo 2538 pacientes constatou-se que a sensibilidade e especificidade da NGAL para LRA apresentou variação entre

75% e 95% em doentes críticos ou após exposição a contraste. No referido estudo, a NGAL mostrou excelente valor preditivo para LRA (AUC-ROC = 0,8) e para início da TSR (AUC-ROC = 0,78). O ponto de corte da NGAL variou conforme a etiologia da insuficiência renal, mas de maneira geral ficou acima de 150 ng.mL⁻¹ (Haase et al., 2009).

A NGAL é uma medida do estresse tubular. Sua concentração aumenta dramaticamente em resposta à ação tubular e precede o aumento da creatinina em 24 horas (Moore et al., 2010). No nosso experimento as dosagens da NGAL no momento M2 foram estatisticamente superiores às dosagens em M0 e M1. No mesmo momento M2, estabelecendo-se uma comparação entre os grupos, o grupo Sham (que não experimentou manobras de isquemia e reperfusão) apresentou valores estatisticamente menores que os demais. Deste ponto de vista, a lidocaína, administrada nos animais dos grupos Lidocaína DAA e Lidocaína SD, não protegeu os rins que sofreram isquemia e reperfusão. No entanto, os resultados sugerem que nesta concentração a lidocaína não piorou a lesão de isquemia e reperfusão estabelecida. Destacamos que no momento M1 os grupos são semelhantes entre si. Acreditamos que esta semelhança ocorre devido ao fato do NGAL, a exemplo da IL-18, ter significativo aumento na sua concentração entre duas e quatro horas após o início da agressão.

A NTA é a causa mais comum de IRA. Trata-se de uma entidade clínico-patológica caracterizada clinicamente por uma diminuição aguda da função renal e frequentemente, mas não invariavelmente, por evidências morfológicas de injúria tubular (Schrier et al., 2004). Dentro de todo estudo histológico realizado destacamos a análise realizada para a NTA. Quanto a extensão da NTA, 100% dos rins esquerdos do grupo Sham foram negativos para este critério, em confirmação à ausência de manobras de isquemia e reperfusão neste grupo. Por outro lado, 100% dos rins esquerdos do grupo Controle foram classificados como extensão de necrose superior a 2/3 da área. Sessenta por cento dos rins esquerdos do grupo Lidocaína SD também se enquadraram dentro deste mesmo cenário de gravidade de lesão. No entanto, apenas 20% dos rins esquerdos do grupo Lidocaína DAA se enquadraram

neste mesmo cenário. Foi possível comprovar estatisticamente a diferença existente entre os grupos. Sendo a análise bastante favorável ao grupo Lidocaína DAA.

Diante do modelo experimental para estudo de lesões de isquemia e reperfusão apresentado, definimos estudar os possíveis efeitos protetores da lidocaína. Justifica-se tal fato pelo amplo uso deste anestésico local na medicina humana. Além da sua principal utilização nas anestésias condutivas, a lidocaína apresenta-se como um fármaco seguro para o uso intravenoso. Respeitando-se a dose tóxica, este fármaco é utilizado também como um antiarrítmico. Associou-se a este fato a relação existente entre as lesões de isquemia e reperfusão e o desencadeamento de uma complexa reação inflamatória. E é neste cenário que poderíamos esperar uma ação da lidocaína, devido a uma já estabelecida ação moduladora na cascata demonstrar estes efeitos da lidocaína inflamatória dos anestésicos locais. Kaczmarek et al. (2009) conseguiram demonstrar os benefícios da lidocaína a nível cardíaco. Das & Misra (2003) obtiveram resultados semelhantes no pulmão e Chen et al. (2004) estudando proteção hepática. Bons resultados também foram obtidos em estudos de isquemia e reperfusão em cérebros em modelos experimentais (Lei et al., 2001).

No entanto, ao avaliarmos os vários estudos entendemos que ainda existem resultados conflitantes. Olschewski et al. (1996) demonstraram que a lidocaína poderia bloquear canais de K_{ATP} bloqueando os benefícios intrínsecos do pré-condicionamento isquêmico. Barthel et al. (2004) demonstraram que o comprometimento do pré-condicionamento isquêmico só ocorreria em doses supra terapêuticas. A uniformidade nos modelos experimentais, nas doses a serem usadas e na via de administração, poderá tornar estas questões melhor estabelecidas.

7 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados, concluimos que:

- 1) a lidocaína dose dependente, após injeção em *bolus*, acarreta queda dos níveis pressóricos com rápido restabelecimento a níveis basais;
- 2) a dosagem plasmática da NGAL não evidenciou benefícios ou prejuízos com o uso da lidocaína;
- 3) ocorreu possível efeito modulador da lidocaína na dose antiarrítmica com relação às interleucinas IL-6, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α ;
- 4) a análise histológica para necrose tubular aguda sugere que a lidocaína na dose antiarrítmica protegeu os rins durante as manobras de isquemia e reperfusão.

8 REFERÊNCIAS

Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S et al.. Double-blind randomized controlled trial of monoclonal antibody to human tumors necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. Lancet. 1998; 351(9107):929-33.

Alpers CE. O rim. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. Patologia-Bases patológicas das doenças. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. P. 944-46.

Araujo Filho I, Honorato Sobrinho AA, Rego AC et al.. Influence of laparoscopy and laparotomy on gasometry, leukocytes and cytokines in a rat abdominal sepsis model. Acta Cir Bras. 2006; 21: 74-79.

Atasanova I, Burke TJ, McMuttry IF, Schrier RW. Nitric oxide synthase inhibition and acute renal ischemia: effect on systemic hemodynamics and mortality. Ren Fail. 1995; 17:389-403.

Bagshaw SM, Bellomo R, Devarajan P, Johnson C, Karvellas CJ, D Kutsiogiannis DJ, Mehta R, Pannu N, Romanovsky A, Sheinfeld G, Taylor S, Zappitelli M, Gibney RTN. Review article: Acute kidney injury in critical illness. Can J Anesth 2010; 57: 985-98

Barthel H, Ebel D, Müllenheim J, Obal D, Preckel B, Schlack W. Effect of Lidocaine on ischaemic preconditioning in isolated rat heart. British Journal Anaesthesia. 2004; 93(5): 698-704.

Baxter GF. Ischaemic preconditioning of myocardium. Ann Med, 1997; 29: 345-352.

Benjamin CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais na sepse. Medicina (Ribeirão Preto). 2001; 34: 18-26.

Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Carraretto AR, Ferrari TA, Azevedo TCV, Silva AL. Efeito da lavagem peritoneal com bupivacaína na sobrevida de ratos com peritonite fecal. *Rev Bras Anesthesiol*. 2008; 5: 470-79.

Chalkiadis G, Kostakis A, Karayannacos PE et al.. The effect of heparin upon fibrinopurulent peritonitis in rats. *Surg Gynecol Obstet*. 1983; 157: 257-60.

Chen MY, Li CH, Huang ZQ et al. Protective effects of Lidocaine injected on warm ischemia-reperfusion injury to the rat liver. *Chin Med J*. 2004; 117: 275-79.

Chiao H, Kohda Y, McLeroy P, Craig L, Housini I, Star RA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. *J Clin Invest*. 1997; 15:99(6):1165-72.

Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* 2008; 73: 1008-16

Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology*. 2001; 94(6):1133-8.

Collins DM, Coffman TM, Klotman PE. The role of thromboxane in the pathogenesis of acute renal failure. In: Solez K, Racusen LC. eds. *Acute Renal Failure: Diagnosis Treatment and Prevention*. New York: M. Dekker. 1991. p. 13-43.

Cronin RE, de Torrente A, Miller PD, Bulger RE, Burke TJ, Schrier RW. Pathogenic mechanisms in early norepinephrine-induced acute renal failure: functional and histological correlates of protection. *Kidney Int*. 1978 Aug;14(2):115-25.

Cruz DN, Cal M, Garzotto F, Perazella MA, Lentini P, Corradi V, Piccinni P, Ronco C. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population. *Intensive Care Med* 2010a; 36:444–51

Cruz DN, Ronco C, Katz N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A promising biomarker for detecting cardiac surgery-associated acute kidney injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010b; 139: 1101–06.

Cugini D, Azzollini N, Gagliardini E, Cassis P, Bertini R, Colotta F, Noris M, Remuzzi G, Benigni A. Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2005; 67:1753-61.

Das KC, Misra HP. Prevention of reperfusion lung injury by Lidocaine in isolated rat lung ventilated with higher oxygen levels. *J Postgrad Med.* 2003; 49: 17-20.

Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007; 39(10):2983-5.

Dellinger RP. Inflammation and coagulation: Implication for the septic patient. *Clin Infect Dis.* 2003: 1259-65.

Erkasap N, Ates E, Erkasap S, Kaygisiz Z. Lidocaine – containing Euro-Colins Solution prevents renal injury in the isolated perfused canine kidney exposed to prolonged cold ischemia. *Physiol Res.* 2002; 51: 493-99.

Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, Somerset H, Oh DJ, Lu L, Klein CL, Dinarello CA, Edelstein CL. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1 beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 322:8-15.

FDA (Food and Drug Administration) – Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM078932>.

Fernandez-Repollet E, Finn WF. Effect of contralateral nephrectomy on the initial phase postischemic acute renal failure in the rat. In: Eliahou HE. ed. *Acute Renal Failure*. London: J. Libbey. 1982. p.262-82.

Finn WF. Post-ischemic acute renal failure: variation in the initial phase. In: Eliahou HE. ed. *Acute Renal Failure*. London: J. Libbey. 1982. p.267-76.

Gallos G, Jones DR, Nasr SH et al.. Local anesthetics reduces mortality and protect against renal e hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology*. 2004; 101: 902-11.

Garrido AG, Figueiredo LFP, Rocha e Silva M. Modelos experimentais de s pse e choque séptico: Revisão. *Acta Cir Bras*. 2004; 19: 1-14.

Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces as extensive local cytokine response: evidence for induction of interferon- γ , transforming growth factor- β 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation*. 1995; 59:565-72.

Grace PA – Ischaemia-Reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994; 81(5): 637-47.

Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res*. 1999; 84: 973-79.

Gross GJ, Mei DA, Schultz JJ, Mizumura T. Criteria for a mediator or effector of myocardial preconditioning: do K_{ATP} channels meet the requeriments? *Basic Res Cardiol*. 1996; 91: 31-4.

Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A; NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009; 54(6):1012-24.

Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A, Mertens PR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol* 2011; 18: 11–18.

Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Curr Opin Crit Care* 2010; 16: 526-32.

Haigney MC, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Sodium channel blockade reduce hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. *Circulation*. 1994; 90: 391-99.

Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 2002; 62:237-44.

Haukoos J, Korthuis R, Niemann J. Inflammatory and immunologic responses to ischemia and reperfusion. In: Paradis N, Halperin H, Kern K, Wenzel V, Douglas A, editors. *Cardiac Arrest - The Science and Practice of Resuscitation Medicine*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. p. 163-76.

Hollmann MW, Durieux ME. Local Anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication. *Anesthesiology*. 2000; 93: 858-75.

Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol*. 1997 Jun;79(6):842-7.

Julier K, da Silva R, Garcia C. Preconditioning by sevoflurane decreases biomedical markers of myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 2003;98:1315-1327.

Kaczmarek DJ, Herzog C, Larmann J et al.. Lidocaine protects from myocardial damage due to ischemia and reperfusion in mice by its antiapoptotic effects. *Anesthesiology*. 2009; 110: 1041-49.

Kielar ML, John R, Bennett M, Richardson JA, Shelton JM, Chen L, Jeyarojah DR, Zhou XJ, Zhou H, Chiquett B, Nagami GT, Lu CY. Maladaptive role of IL-6 in ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16:3315-25.

Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482:272–83

Knotek M, Rogachev B, Wang W, Ecder T, Melnikov V, Gengaro PE, Esson M, Edelstein CL, Dinarello CA, Schrier RW. Endotoxemic renal failure in mice: role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase. *Kidney int.* 2001; 59(6):2243-9.

Kon V, Yoshioka T, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1762-7;

Lee H T, Ota-Setlik A, Fu Y, Nars S H, Emala C W. Diferencial protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology* 2004; 101:1760-1768.

Lee R, Nitta T, Schmid RA et al.. Retrograde infusion of Lidocaine or L-arginine before reperfusion reduces myocardial infarct size. *Ann Thorac Surg.* 1998; 65: 1353-59.

Lei B, Cottrell JE, Kass Ira S. Neuroprotective effect of low-dose Lidocaine in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Anesthesiology.* 2001; 95: 445-51.

Lüscher TF, Bock HA, Yang ZH, Diederich D. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: perspectives in nephrology. *Kidney Int.* 1991 Apr;39(4):575-90.

Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365: 1231-38.

Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2001; 159:2137-2145.

Moore E, Bellomo R, Nichol A. Biomarkers of acute kidney injury in anesthesia, intensive care and major surgery: from the bench to clinical research to clinical practice. *Minerva Anestesiologica.* 2010; 76(6): 425-40.

Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun*. 1989; 57:590-95.

Neary P, Redmond, HP. Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In: P.A. Grace, Mathie RT, editors. *Ischemia-Reperfusion Injury*. London: Blackwell Science; 1999. p.123-36.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983; 305: 147-48.

O'Rourke B. Myocardial K (ATP) channels in preconditioning. *Circ Res*. 2000; 87: 845-55.

Obal D, Dettwiler S, Favorcia C. The influence of mitochondrial K-ATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg* 2005; 101:1251-1260.

Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, Edelstein CL. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294: 264-71.

Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995; 378:88-91.

Olschewski A, Bräu ME, Olschewski H, Hempelmann G, Vogel W. ATP-dependent potassium channel in rat cardiomyocytes is blocked by lidocaine. Possible impact on the antiarrhythmic action of lidocaine. *Circulation*. 1996; 93(4); 656-59.

Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*. 2004; 43:405-14.

Reineck HJ, O'Connor GJ, Lifschitz MD, Stein JH. Sequential studies on the pathophysiology of glycerol-induced acute renal failure. *J Lab Clin Med*. 1980; 96:356-62.

Rice JC, Spence JS, Yetman DL, Safirstein RL. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney. *Ren Fail.* 2002; 24:703-723.

Riksen NP, Smits P, Rongen GA. Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application--part I. *Neth J Med.* 2004 Nov; 62(10):353-63.

Safirstein R, Megyesi J, Saggi SJ, Price PM, Poon M, Rollins BJ, Taubman MB. Expression of cytokine-like genes JE and KC is increased during renal ischemia. *Am J Physiol.* 1991; 261:1095-1101.

Schmid RA, Yamashita M, Ando K et al.. Lidocaine reduces reperfusion injury and neutrophil migration in canine lung allografts. *Ann Thorac Surg.* 1996; 61: 949-55.

Schrier W, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest.* 2004; 114(1): 5-14.

Shi Y, Melnikov VY, Schrier RW, Edelstein CL. Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279:509-17.

Silva MS, Castiglia YMM, Vianna PTG, Viero RM, Braz JRC, Cassetari ML. Rat model of depending prostaglandin renal state: effect of ketoprofen. *Ren Fail.* 2006; 28:77-84.

StrohmC, Barancik T, Bruhl et al.. Inhibition of the ER-Kinase cascade by PD 98059 and UO 126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 36: 218-29.

Tanaka K, Ludwing LM, Kersten JR, et al.. Mechanism of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology.* 2004; 100: 707-21.

Tomori H, Shiraishi M, Koga H et al.. Protective effects of Lidocaine in hepatic ischemia-reperfusion injury in vitro. *Transplant Proc.* 1998; 30: 3740-42.

Van der Poll T, Van Deventer SHJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am*. 1999; 13:413-28.

Warltier DC, Kersten JR, Pagel OS, Gross GJ. Anesthetic preconditioning: serendipity and science. *Anesthesiology*. 2002; 97: 1-3.

Weber NC, Schlack W. Inhalational anaesthetics and cardioprotection. *Handb Exp Pharmacol*. 2008(182):187-207.

Westhuyzen J. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18:543-51.

Wilson RA, Soei LK, Bezstarosti K, Lamers JM, Verdouw PD. Negative inotropy of Lidocaine: Possible Biochemical Mechanisms. *Eur Heart J*. 1993; 14: 284-89.

Yan M, Chen C, Zhang F, Chen G. Lidocaine abolishes the myocardial protective effect of sevoflurane postconditioning. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52:111-116.

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

Apêndice A – Relação dose/volume de lidocaína relacionado ao peso do animal para o grupo LDAA

GRUPO LDAA																								
solução lidocaína										mg/ml		bolus					manutenção				mg/kg/ml			
										2											12,5			

Apêndice B - Relação dose/volume de lidocaína relacionado ao peso do animal para o grupo LSD

GRUPO LSD																								
solução lido cáina					mg/ml					bolus					manutenção					mg/kg/ml				
					2										4,6875					6,25				
peso (g)		250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268				
bolus (ml)		0,586	0,588	0,591	0,593	0,595	0,598	0,600	0,602	0,605	0,607	0,609	0,612	0,614	0,616	0,619	0,621	0,623	0,626	0,628				
manut (ml/h)		0,781	0,784	0,788	0,791	0,794	0,797	0,800	0,803	0,806	0,809	0,813	0,816	0,819	0,822	0,825	0,828	0,831	0,834	0,838				
269		270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288				
0,630		0,633	0,635	0,638	0,640	0,642	0,645	0,647	0,649	0,652	0,654	0,656	0,659	0,661	0,663	0,666	0,668	0,670	0,673	0,675				
0,841		0,844	0,847	0,850	0,853	0,856	0,859	0,863	0,866	0,869	0,872	0,875	0,878	0,881	0,884	0,888	0,891	0,894	0,897	0,900				
290		291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309				
0,680		0,682	0,684	0,687	0,689	0,691	0,694	0,696	0,698	0,701	0,703	0,705	0,708	0,710	0,713	0,715	0,717	0,720	0,722	0,724				
0,906		0,909	0,913	0,916	0,919	0,922	0,925	0,928	0,931	0,934	0,938	0,941	0,944	0,947	0,950	0,953	0,956	0,959	0,963	0,966				
311		312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330				
0,729		0,731	0,734	0,736	0,738	0,741	0,743	0,745	0,748	0,750	0,752	0,755	0,757	0,759	0,762	0,764	0,766	0,769	0,771	0,773				
0,972		0,975	0,978	0,981	0,984	0,988	0,991	0,994	0,997	1,000	1,003	1,006	1,009	1,013	1,016	1,019	1,022	1,025	1,028	1,031				
332		333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350					
0,778		0,780	0,783	0,785	0,788	0,790	0,792	0,795	0,797	0,799	0,802	0,804	0,806	0,809	0,811	0,813	0,816	0,818	0,820					
1,038		1,041	1,044	1,047	1,050	1,053	1,056	1,059	1,063	1,066	1,069	1,072	1,075	1,078	1,081	1,084	1,088	1,091	1,094					