

Francisco Sobreira Guedes Jr

**Histologia e imuno-histoquímica renais após hemorragia aguda em
rato sob a ação do sevoflurano e cetoprofeno**

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

Prof^a Titular Yara Marcondes Machado Castiglia
Orientadora

Botucatu – SP

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado ao meu lado as pessoas certas para tomar parte na construção desta obra.

À minha família

Aos meus pais, Valdinete de Vasconcelos Guedes e Francisco Sobreira Guedes, e meus irmãos, Leonardo de Vasconcelos Sobreira Guedes e Bruno de Vasconcelos Sobreira Guedes, pelo apoio e incentivo em todas as circunstâncias.

À minha companheira, Tatiane Garcia Teixeira da Silva, por me transmitir tranquilidade e confiança.

À minha filha, Maria Clara Teixeira Guedes, fonte de minha inspiração, meu grande amor.

À minha orientadora,

Professora Titular Yara Marcondes Machado
Castiglia

Agradeço, em primeiro lugar, por acreditar na minha capacidade. Pela sua paciência, perseverança e presença constante e laboriosa em cada etapa, fundamental para o bom desenvolvimento desse trabalho.

Sábida, habilidosa, objetiva e com inteligência fora dos padrões, exerceu com preciosidade sua função de me orientar, sendo uma das grandes responsáveis pela minha aquisição dos valiosos conhecimentos na área científica.

E meu muito obrigado, principalmente, pelo carinho, amizade e cumplicidade, que fizeram parte dessa nossa caminhada.

De uma forma especial, agradeço a todos os que participaram, direta ou indiretamente, na execução desse trabalho e, em particular,

a todos os docentes do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp;

ao Professor Titular José Reinaldo Cerqueira Braz, do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo incentivo à pesquisa e à realização da Pós-Graduação;

à Profª Dra Rosa Beatriz Amorim, do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelas considerações pertinentes durante a qualificação para a dissertação;

ao Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu da Unesp, na pessoa da Profª Adjunta Renée Laufer Amorim, e aos seus funcionários, pelo auxílio inestimável;

à patologista, Dra Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu da Unesp, pela realização dos laudos de análise histológica e da técnica de imuno-histoquímica;

ao Dr Leopoldo Muniz da Silva, ex-Residente do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo apoio com o estudo estatístico;

ao Dr Deyvid Santos da Cruz, ex-Residente do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pela ajuda na execução da parte prática;

aos Srs Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, do Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo auxílio com os animais no laboratório experimental;

à Sra Joana Jacirene Costa Texeira, à Sra Sônia Martins da Silva e ao Sr André Renato Passaroni, do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, pelo trabalho de diagramação e apoio na Secretaria do Departamento de Anestesiologia;

à Sra Raquel Romão da Silva Lemos, pelo apoio na elaboração das tabelas da pesquisa;

à Sra Neli Aparecida Pavan, do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, por todo o auxílio provido no transcorrer do meu curso no Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso (g). Média e desvio padrão do peso dos animais utilizados nos experimentos de ambos os grupos, G1, cetoprofeno, G2, controle.....	29
Tabela 2	Temperatura retal (°C). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais, G1, cetoprofeno, G2, controle.....	30
Tabela 3	Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais, G1, cetoprofeno, G2, controle.....	31
Tabela 4	Distribuição da mediana e percentis 25-75 da marcação de IL-1 nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	32
Tabela 5	Distribuição da mediana e percentis 25-75 da marcação de TNF- α nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	33
Tabela 6	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de ectasia vascular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	34
Tabela 7	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de congestão vascular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	35
Tabela 8	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de dilatação tubular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	36
Tabela 9	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de degeneração tubular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	37
Tabela 10	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de necrose nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	38
Tabela 11	Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de células inflamatórias nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	39

Tabela 12	Valores de peso (g), temperatura (°C) (temp) e pressão arterial média (mmHg) (PAM) dos ratos dos grupos Sevo+Ceto e Sevo. Os dois últimos atributos são apresentados nos momentos M1, M2 e M3.....	66
Tabela 13	Escores das alterações histológicas dos rins direitos e esquerdos dos animais dos grupos Sevo+Ceto (G1) e Sevo (G2): ectasia e congestão vascular, dilatação, degeneração e necrose tubulares e presença de células inflamatórias. Ausência de lesão = escore zero, lesão leve = 1, lesão moderada = 2 e lesão intensa = 3.....	67
Tabela 14	Escores da marcação renal da citocina TNF- α nos ratos dos grupos Sevo+Ceto e Sevo. Marcação leve = 1, marcação moderada = 2 e marcação intensa = 3.....	68
Tabela 15	Escores da marcação renal da citocina IL-1 nos ratos dos grupos Sevo+Ceto e Sevo. Marcação leve = 1, marcação moderada = 2 e marcação intensa = 3.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráfico de caixa. Média e desvio padrão do peso (g) dos animais dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.....	29
Figura 2	Gráfico de caixa. Média e desvio padrão da temperatura retal (°C) nos três momentos do estudo por grupo, G1, cetoprofeno, G2, controle.....	30
Figura 3	Gráfico de caixa. Média e desvio padrão da pressão arterial média (mmHg) nos três momentos do estudo por grupo, G1, cetoprofeno, G2, controle.....	31
Figura 4	(A) Degeneração tubular. HE, barra=20µm. (B) Necrose tubular. HE, barra=20µm. (C) Dilatação tubular e necrose tubular. HE, barra=20µm. (D) Infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal. HE, barra=20µm.....	40
Figura 5	Intensa (3+) imunomarcção em células tubulares. Barra=20µm. Imuno-histoquímica, interleucina-1, ABC, DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris.....	41

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Objetivo	20
3 Material e Método	22
3.1 Análise Histológica dos Rins.....	24
3.2 Técnica Imuno-histoquímica.....	25
3.3 Tamanho Amostral.....	26
3.4 Análise Estatística.....	27
4 Resultados	29
4.1 Peso.....	29
4.2 Temperatura Retal.....	30
4.3 Pressão Arterial Média.....	31
4.4 Citocinas.....	32
4.4.1 Interleucinas 1.....	32
4.4.2 TNF- α	33
4.5 Análise Histológica.....	34
4.5.1 Ectasia Vascular.....	34
4.5.2 Congestão Vascular.....	35
4.5.3 Dilatação Tubular.....	36
4.5.4 Degeneração Tubular.....	37
4.5.5 Necrose.....	38
4.5.6 Células Inflamatórias.....	39
5 Discussão	43
6 Considerações Finais	54
7 Conclusão	56
8 Referências	57
Anexos	65

Guedes Júnior FS. Histologia e imuno-histoquímica renais após hemorragia aguda em rato sob a ação do sevoflurano e cetoprofeno. Botucatu 2011. 69p. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Objetivo: Este estudo investigou a influência do inibidor não-seletivo da ciclooxigenase, cetoprofeno (ceto) intravenoso, em alterações histológicas e dos níveis das citocinas renais - fator α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) - após hemorragia de 30% da volemia (10%, três vezes, em intervalos de 10 min) em ratos.

Métodos: Sob anestesia com sevoflurano (sevo), os grupos sevo e sevo+ceto (10 ratos cada) foram preparados cirurgicamente para leitura de pressão arterial média (PAM) e administração de solução de Ringer (5 mL.kg⁻¹.h) e de cetoprofeno (1,5 mg.kg⁻¹), no início da anestesia, no grupo sevo+ceto. Mediu-se temperatura retal continuamente. Os valores de temperatura e PAM foram observados antes da primeira hemorragia (T1), após a terceira hemorragia (T2) e 30 min após T2 (T3). Realizada nefrectomia bilateral nos dois grupos para análise histológica e imuno-histoquímica. **Resultados:** Nos dois grupos, temperatura e PAM diminuíram com relação aos valores normais do rato. Hipotermia foi mais acentuada no grupo sevo (p=0,0002). Necrose tubular foi mais frequente no grupo sevo (p=0,02). As citocinas estiveram igualmente presentes nos rins dos dois grupos. **Conclusão:** Cetoprofeno foi mais protetor no rim de rato durante anestesia com sevoflurano e hipovolemia, porém parece que TNF- α e IL-1 não estão envolvidas nessa proteção.

Palavras-chave: Cetoprofeno. Hemorragia. Rim. Citocinas. Necrose. Ratos.

Guedes Jr FS. Renal histology and immunohistochemistry after acute hemorrhage in rats under sevoflurane and ketoprofen effect. Botucatu 2011. 69p. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Purpose: This study investigated the influence of intravenous nonselective cyclooxygenase inhibitor, ketoprofen (keto), on kidney histological changes and kidney cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1), levels after hemorrhage of 30% of volemia (three times 10%, intervals of 10 min) in rats. **Methods:** Under sevoflurane (sevo) anesthesia, sevo and sevo+keto groups (10 rats each) were instrumented for Ringer solution ($5\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) administration and mean arterial pressure (MAP) evaluation, plus keto (1.5mg.kg^{-1}) administration in sevo+keto group in the beginning of anesthesia. Rectal temperature was continuously measured. The baseline data of temperature and MAP were collected at the first hemorrhage (T1), the third hemorrhage (T2) and 30min after T2 (T3). Bilateral nephrectomy was achieved for histology and immunohistochemistry. **Results:** In both groups, temperature and MAP diminished from normal values of these animals. Hypothermia was greater in sevo group ($p=0.0002$). Tubular necrosis was more frequent in sevo group ($p=0.02$). The studied cytokines were equally present in the kidneys of both groups. **Conclusion:** Ketoprofen was more protective to the rat kidney in condition of anesthesia with sevoflurane and hypovolemia, but it seems that TNF- α and IL-1 were not involved in that protection.

Key words: Ketoprofen. Hemorrhage. Kidney. Cytokines. Necrosis. Rats.

1 Introdução

Durante um procedimento cirúrgico envolvendo hemorragia moderada ou grave, ocorrerá vasoconstrição renal como resposta compensatória. O rim apresentará atividade aumentada do sistema renina-angiotensina ou de seus nervos simpáticos para manter a pressão e o fluxo sanguíneos para órgãos mais vitais, como o coração e cérebro (Erni et al., 1995).

As prostaglandinas (PGs) renais vasodilatadoras têm importante papel na preservação da função deste órgão. Sua ação mantém o ritmo de filtração glomerular (RFG) e o fluxo sanguíneo renal (FSR), porque na vasculatura renal elas modulam os efeitos vasoconstritores de substâncias como a angiotensina II e norepinefrina (Dunn & Zambraski, 1980), efeitos que estariam aumentados em condições de hipotensão, por exemplo. Tais condições são denominadas de estado renal dependente de PGs (ERDPG) (Colletti et al., 1999).

Alguns autores (de Souza Silva et al., 2006) realizaram estudo sobre o efeito do cetoprofeno, AINE inibidor da ciclooxygenase 1 (COX 1), administrado no intra-operatório, em rins de ratos anestesiados com pentobarbital sódico e que sofreram hemorragia correspondente a 30% de sua volemia. Eles verificaram que os ratos que receberam o AINE apresentaram aumento da resistência vascular renal, provavelmente pela ausência da ação das PGs vasodilatadoras. O estudo histológico desses rins, que sofreram isquemia pela hemorragia, revelou que houve dilatação tubular, degeneração e necrose, tanto no grupo de ratos que recebeu apenas anestesia, como no grupo que recebeu anestesia e cetoprofeno. Entretanto, o grupo que recebeu cetoprofeno apresentou menos degeneração (5% contra 55% do grupo que não recebeu o antiinflamatório), de modo estatisticamente significativo.

Um grande número de fármacos parece que mimetiza o pré-condicionamento isquêmico (PCI). Este fenômeno, de proteção endógena, fundamental contra lesão tecidual (Wartier et al., 2002) e observado em muitas espécies animais, tem sido bastante estudado no coração e foi bem caracterizado neste órgão, sendo válido para outros tecidos. Pelo PCI, breves episódios de isquemia no coração, por exemplo, ocorrendo antes da interrupção mais longa da circulação, conferem proteção contra disfunção e necrose do órgão (Murry et al., 1986). Os responsáveis primários pela ocorrência do PCI seriam múltiplos ligantes e receptores acoplados à proteína G, que ativam vias de transdução de sinais intracelulares as quais envolvem a cinase da proteína C, cinases de proteínas ativadas por mitógenos, cinases da tirosina, espécies reativas de oxigênio e sintases do óxido nítrico. Em tal processo, é central o papel do canal de potássio, na mitocôndria, sensível à adenosina trifosfato, o K_{ATP} . A abertura deste canal é crítica para os efeitos benéficos cardioprotetores no PCI.

Desde que os componentes envolvidos na via de transdução do sinal intracelular do PCI foram definidos, agonistas e antagonistas farmacológicos de vários mediadores foram testados para se desenvolverem novos agentes terapêuticos que também pré-condicionassem o miocárdio. Desse modo, foram estudados os efeitos benéficos dos anestésicos voláteis contra lesão isquêmica. Portanto, o PCI provê forte estímulo para avaliar mecanismos de pré-condicionamento anestésico. Do ponto de vista de anestesia, é importante salientar que vários fármacos mimetizam o fenômeno de PCI, o qual passa a se chamar “Pré-condicionamento Farmacológico” (PCF). Entre outros, os agonistas dos receptores opióides e os anestésicos voláteis estão nesta categoria (Kersten et al., 1996).

Pesquisa de Zaugg et al., 2002, demonstrou que os anestésicos voláteis mimetizam o pré-condicionamento cardíaco por iniciar a ativação dos canais mitocondriais K_{ATP} por meio de múltiplas vias de sinalização. Estes autores agruparam os anestésicos de acordo com seu efeito de potencialização ou de inibição da atividade protetora sobre miócitos cardíacos isolados de ratos adultos. Desse modo, aumentariam a proteção, o sevoflurano, isoflurano, fentanil, tricloroetanol e uretano. O efeito inibitório, diminuindo a proteção, seria exercido pelo tiopental sódico, pentobarbital sódico e *R(-)*cetamina. Não foi observado efeito na atividade do canal com etomidato, propofol, *S(+)*cetamina, midazolam e xilazina, um α_2 -agonista.

Agentes farmacológicos que abrem esses canais parecem possuir efeitos protetores similares ao do PC isquêmico. De outro modo, substâncias como as sulfoniluréias, que determinam seu fechamento, se oporiam ao benefício do PC. Há autores (da Silva-Santos et al., 2002) que demonstraram possível relação entre a ação da glibenclamida nos canais K_{ATP} e os efeitos inflamatórios, mas, posteriormente, Pompermayer et al., 2005, relataram a melhora da disfunção renal após a utilização da glibenclamida em ratos. Rahgozar et al., 2003, entretanto, em preparação de rim isolado de rato, utilizando diazóxido e glibenclamida, constataram lesão renal de alça ascendente e diminuição da resistência vascular renal após a isquemia.

Há evidências de que o PCI existe para o rim (Lee & Emala, 2000; Marangoni et al., 2007; Diego et al., 2007). E a isquemia em si e mesmo a hipovolemia com hipotensão (de Souza Silva et al., 2006) podem determinar lesão renal.

Avaliando os efeitos da glibenclamida na função e histologia renais de ratos sob anestesia com sevoflurano em cenário de choque hemorrágico, Diego et al., 2007, estudaram uma amostra de 20 ratos Wistar submetidos a hemorragia de 30% da volemia

e com conseqüente hipotermia, quantificando atributos de função renal, como ritmo de filtração glomerular, fluxo plasmático efetivo renal, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal e análise das alterações histológicas. Houve dois grupos de animais, G1 e G2, sendo que apenas G2 foi submetido a tratamento com glibenclamida venosa ($1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 60 min antes do início da sangria. Os animais de ambos os grupos foram anestesiados com sevoflurano. Houve diminuição significativa do fluxo plasmático efetivo renal em G1 quando comparado a G2. Quanto à resistência vascular renal, foram observados maiores valores em G2. O exame histopatológico mostrou maior vulnerabilidade dos rins expostos apenas ao sevoflurano (G1), de modo que, na análise final, concluiu-se que o tratamento prévio com a glibenclamida, nas condições metodológicas do experimento, pode atenuar agudamente a agressão renal.

As citocinas são liberadas pelo organismo danificado e estimulam moléculas de adesão, como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e quimiocinas, tais como proteína inflamatória macrofágica (MIP-2) e proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1). Sabe-se que, no rim, estas moléculas promovem infiltração tubulointersticial de células inflamatórias e determinam pior lesão (Lien et al., 2003). Destaca-se a participação do Fator de Necrose Tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e da Interleucina-1 (IL-1) na expressão das moléculas de adesão, as quais promovem íntima interação entre os polimorfonucleares e as células endoteliais. As moléculas de adesão constituem um grupo de moléculas especializadas na regulação das interações celulares (Quintaes & Noronha, 1998).

As citocinas IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$ compartilham a função de essencialidade no início da resposta inflamatória, fase aguda, embora também atuem na fase crônica. Contudo, não atuam isoladamente, sendo que outras citocinas, tais como interleucinas 8, 10, 11,

12, 18 e interferon γ , também participam do processo inflamatório (Sheldon & Riches, 1999).

O TNF- α tem sido envolvido na patogenia de muitas doenças inflamatórias no rim, incluindo nefrite lúpica auto-imune, glomerulonefrite, insuficiência renal aguda séptica e lesão renal por isquemia e reperfusão (Donnahoo et al, 1999). O TNF- α é sintetizado não somente pela infiltração macrofágica, mas também por células glomerulares renais em resposta à endotoxina e lesão isquêmica (Tesch et al., 1997). Embora alguns estudos tenham relatado a expressão seqüencial das citocinas nos processos inflamatórios, o impacto de uma única citocina na cascata é incerto (Haq et al., 1998; Furuichi et al., 2002; Lien et al., 2003).

Fármacos antiinflamatórios inibidores das ciclooxigenases e, portanto, da síntese de prostaglandinas, são muitas vezes administrados imediatamente antes da cirurgia, ou durante a mesma, para tratamento de dor pós-operatória. Nestas circunstâncias, estaria comprometida a ação protetora das prostaglandinas se ocorresse ERDPG, como, por exemplo, hemorragia (Marret & Bonnet, 2007).

JUSTIFICATIVA PARA A PESQUISA

Durante anestesia para cirurgia em que se prevê pouca perda sangüínea, pode ocorrer sangramento abrupto, de grande monta, e nesses casos a reposição do volume perdido, seja com sangue, seja com líquidos cristalóides ou colóides, nem sempre é imediata. Enquanto não se consegue aumento da administração líquida para esses pacientes, como ficariam seus sistemas? Como ficariam os rins, agora sob efeito de

prostaglandinas e com fármacos anestésicos e, em alguns casos, antiinflamatório na corrente circulatória?

Essas questões já postuladas e nem sempre respondidas suscitam pesquisas para melhor conhecimento das respostas do rim em situações de agressão ao órgão e sob a ação de anestésico inalatório, pressupostamente protetor, e de fármaco antiinflamatório, pressupostamente agressor, mas com resultados às vezes promissores.

2 Objetivo

O objetivo deste trabalho de pesquisa é verificar as possíveis alterações que o cetoprofeno desencadeia na histologia e imuno-histoquímica renais, após hemorragia aguda, sem reposição adequada do volume sanguíneo perdido, no rato anestesiado com sevoflurano.

3 Material e Método

Esta pesquisa recebeu o aval da Comissão de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

Vinte ratos Wistar adultos, machos, foram induzidos com sevoflurano a 4%, em câmpula apropriada, e mantidos anestesiados com este anestésico volátil em concentração necessária para tal. Dois grupos foram estudados após a indução anestésica:

Grupo cetoprofeno (G1) (n=10) – submetidos à hemorragia arterial, infusão venosa contínua de solução de Ringer lactato, em volume necessário apenas para manutenção da linha venosa, e administração venosa de solução de cetoprofeno (1,5 mg. kg⁻¹);

Grupo controle (G2) (n=10) – submetidos à hemorragia arterial, infusão venosa contínua de solução de Ringer lactato (RL), em volume necessário apenas para manutenção da linha venosa, e administração de igual quantidade de solução fisiológica necessária para diluição de dose de cetoprofeno.

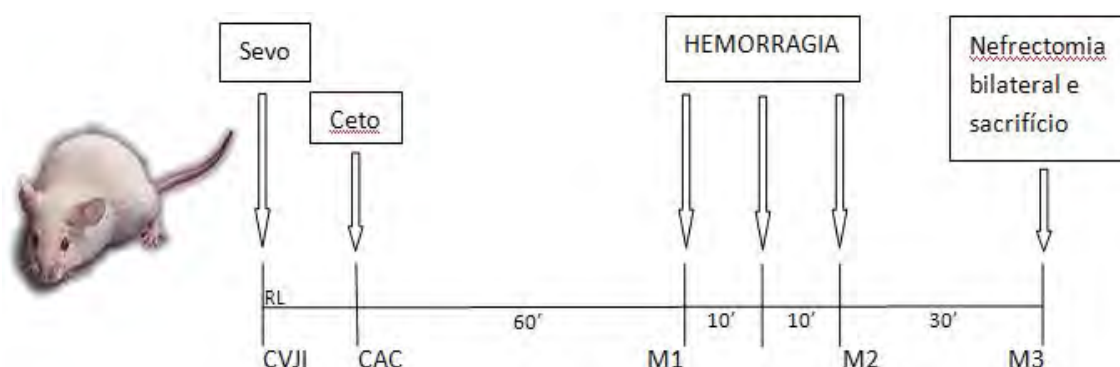
Os ratos foram mantidos em respiração espontânea com sevoflurano e oxigênio suplementar, 1 L.min⁻¹ (Ohmeda, EEUU), através de máscara acoplada ao seu focinho. O animal foi colocado sobre, e coberto com, uma bolsa térmica pré-aquecida, com o objetivo de manter a temperatura corporal entre 35°C e 38°C. A temperatura retal (T) foi monitorizada com termômetro de álcool. Realizada cirurgia imediatamente após a instalação da anestesia que compreendeu incisão longitudinal no pescoço, com dissecação para exposição e canulação, com venocath 24 GA, de: 1) veia jugular interna direita para manutenção da infusão de RL, 5 mL.kg⁻¹. h⁻¹ (Bomba Anne, Abbott, EEUU), para reposição de perdas mínimas de fluidos (Cheng et al., 2003; de Souza Silva et al., 2006) e para administração de cetoprofeno ou solução fisiológica em igual

volume; 2) artéria carótida esquerda para monitorização da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) através de transdutor (Datex Engstron, Finlândia) e para sangria dos animais.

Sessenta minutos após a administração do cetoprofeno em G1 e o tempo correspondente em G2, foi coletado, através da artéria carótida, o total de sangue correspondente a 30% da volemia, nos animais dos dois grupos, em três momentos de hemorragia com 10 minutos de intervalo entre um e outro. A volemia de cada animal foi calculada como sendo igual a 6% do peso corporal (Erni et al., 1995). Em cada momento de hemorragia, a PAM, a FC e a T foram registradas.

Após cada momento de hemorragia, em caso de PAM abaixo de 60 mmHg, a perda sangüínea foi repostada com solução de RL, $1,6 \text{ mL.kg}^{-1}$. Quando cessaram os períodos de perda sangüínea, os ratos permaneceram anestesiados por mais 30 min, sendo então sacrificados com cloreto de potássio, 19,1%. Em cada animal foram retirados ambos os rins antes do sacrifício, sendo os mesmos armazenados em frascos separados para análise histológica, em solução de Duboscq Brasil (6 mL de formol 40%, 30 mL de ácido acético e 2 g de ácido pícrico), na qual permaneceram por no mínimo 12 horas e no máximo 36 horas, e, em seguida em solução de álcool 70°.

Os atributos estudados foram PAM e T nos seguintes tempos: **M1** – obtido imediatamente antes da 1ª hemorragia, **M2** – obtido imediatamente após a 3ª e última hemorragia e **M3** – obtido durante a laparotomia, realizada 30 minutos após a última hemorragia e antes da nefrectomia bilateral e sacrifício de cada animal. Ainda foram realizadas a análise histológica do rim e as imunomarcações teciduais renais das citocinas TNF- α e IL-1.



Esquema da seqüência experimental

CVJI = cateterização da veia jugular interna; CAC = cateterização da artéria carótida; Sevo = sevoflurano; Ceto = cetoprofeno

3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS RINS

O preparo das lâminas contendo fragmentos de ambos os rins constou, inicialmente, de fixação em parafina e posterior coloração com hematoxilina/eosina. A avaliação histológica, toda ela realizada pela mesma patologista, foi baseada na observação e análise de evidências dos seguintes critérios: ectasia vascular, congestão vascular, dilatação tubular, degeneração tubular, necrose celular e presença de células inflamatórias. Para o diagnóstico de necrose tubular foi necessária a identificação de necrose nuclear e *debris* citoplasmático.

Aos achados, foram atribuídos valores correspondentes ao grau de importância de cada uma das possíveis lesões, sendo o valor zero (0) para ausência de lesões, um (1) para lesões leves, dois (2) para lesões moderadas e três (3) para lesões intensas.

3.2 TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA

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

Os cortes do material incluído em parafina, com 4µm de espessura, foram colocados sobre lâmina histológica, previamente tratada com organolisano (Sigma A 3648). Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol por 30 minutos e 20 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente, desidratados em álcool por cinco minutos e lavados com água destilada. Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria a 96°C, com solução pré-aquecida de TRIS EDTA pH 9,0 por 30 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em água destilada, sendo, a seguir, tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10 volumes por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados em água destilada em dois banhos de TRIS pH 7,4 de cinco minutos e incubados com soro normal de coelho por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados com anticorpo primário antígeno específico *goat anti-rat* TNF-α (R&D Systems AF 510-NA) e *goat anti-rat* IL-1 (R&D Systems AF 501-NA), diluídos a 1:100 em diluente específico para os anticorpos, com redutor de fundo (DAKO Cytomation – S 3022), durante 18 horas a 4° C. As lâminas foram lavadas em solução tampão, dois banhos de cinco minutos cada. Após este período, foram incubadas com anticorpo secundário biotilado coelho anticabra (Southern Biotech 6160-08), diluído a 1:200, por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, e lavadas em dois banhos de TRIS pH 7,4 por cinco minutos. As lâminas foram incubadas com complexo streptoavidina

peroxidase (Dako Cytomation K 0377), diluído a 1:200, à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida e lavadas em TRIS (dois banhos) por cinco minutos. Para visibilização da reação, os cortes foram tratados com cromógeno DAB (DAB Dako cytomation K 3468) durante cinco minutos e, em seguida, lavados em TRIS e água destilada. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por três minutos e lavados em água corrente por 10 minutos com posterior hidratação em álcool, clareados em xilol e montados sobre lâminas com resina sintética Permount. A análise foi realizada em todo o corte, em aumento de 20 e 40 vezes, estabelecendo-se uma média para a intensidade de marcação observada nas lâminas dos rins de todos os animais. A intensidade da reação, observada sobre as lâminas, foi representada por meio de escores classificando-se como:

- + (1) marcação de fraca intensidade,
- ++ (2) marcação de moderada intensidade,
- +++ (3) marcação de forte intensidade.

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

3.3 TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho da amostra foi determinado baseando-se em dados de literatura (de Souza Silva et al., 2006). Considerando-se uma diferença entre proporções de degeneração dos rins de ratos, entre os grupos da referida pesquisa, em torno de 50%,

nível de 5% de significância e poder do teste de 80%, determinou-se em 10 animais por grupo o número da amostra.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a verificação da homogeneidade do peso dos animais de ambos os grupos, foi utilizado o teste t de Student. Na comparação das aferições de temperatura retal e pressão arterial média entre grupos em um mesmo momento foi utilizado o Teste t de Student e entre momentos de um mesmo grupo, o Teste de Friedman. Na comparação dos valores das citocinas IL-1 e TNF- α e de cada achado histológico dos rins esquerdos e direitos entre grupos foi utilizado o Teste de Mann-Whitney e entre rins de um mesmo grupo, o Teste de Wilcoxon. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 PESO

Tabela 1 - Peso (g). Média e desvio padrão do peso dos animais utilizados nos experimentos de ambos os grupos, G1, cetoprofeno, G2, controle

Grupo	Peso
G1	459 ± 40,12
G2	421 ± 104,5
Estatística	Teste t de Student p = 0,29

Comentário: G1 = G2

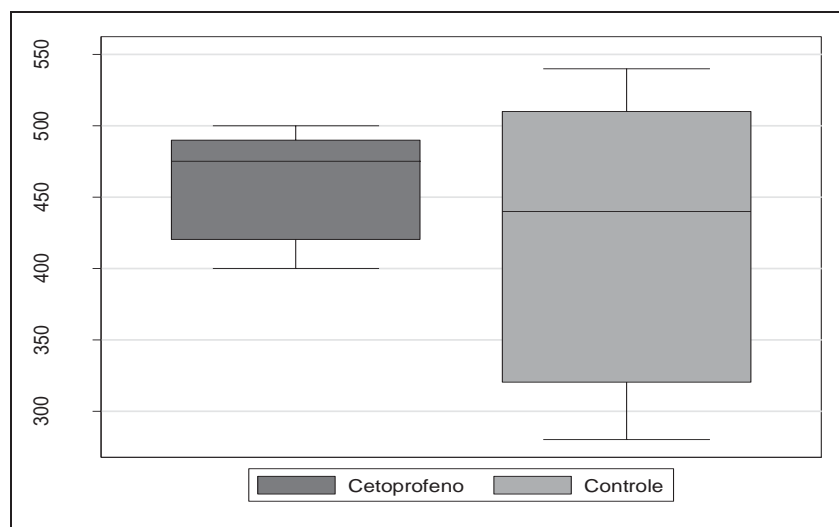


Figura 1 - Gráfico de caixa. Média e desvio padrão do peso (g) dos animais dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle.

4.2 TEMPERATURA RETAL

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

Grupos / Momentos	M1	M2	M3
G1	37,1 ± 0,95	37,9 ± 1,05	37,5 ± 0,97
G2	35,7 ± 0,88	35,7 ± 1,03	35,7 ± 0,73

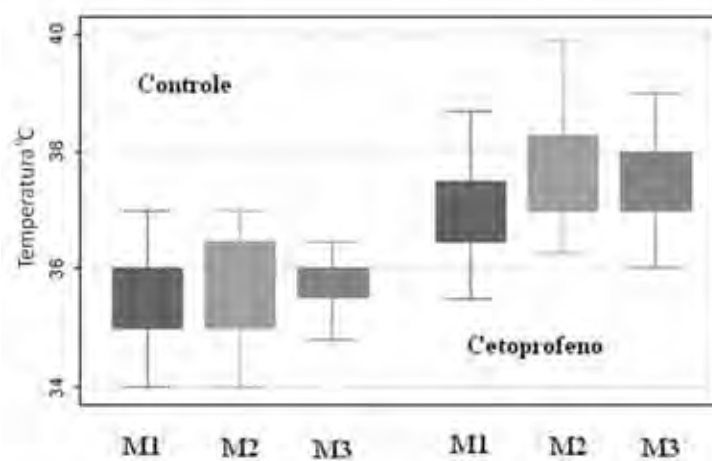


Figura 2 - Gráfico de caixa. Média e desvio padrão da temperatura retal (°C) nos três momentos do estudo por grupo, G1, cetoprofeno, G2, controle.

Quadro 1 – Temperatura retal. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Friedman para comparação de momentos de um mesmo grupo. Teste t de Student para comparação dos grupos em cada momento

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	M1=M2=M3	p=0,21
Em G2	M1=M2=M3	p=0,90
Em M1	G1>G2	p=0,003
Em M2	G1>G2	p=0,0002
Em M3	G1>G2	p=0,0002

RESULTADOS

4.3 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Tabela 3 - Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais, G1, cetoprofeno, G2, controle

Grupos /Momentos	M1	M2	M3
G1	95,7 ± 12,06	50,6 ± 20,89	58,8 ± 18,71
G2	99,0 ± 14,95	55,4 ± 21,03	67,3 ± 22,73

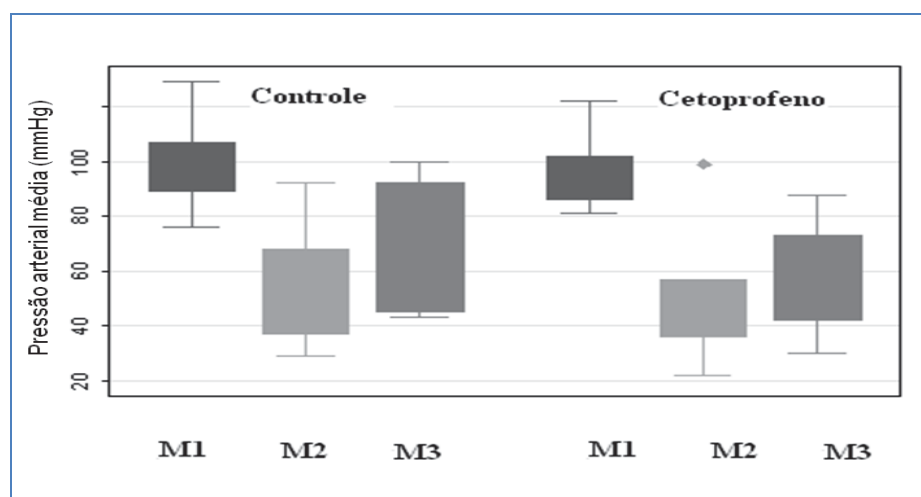


Figura 3 - Gráfico de caixa. Média e desvio padrão da pressão arterial média (mmHg) nos três momentos do estudo por grupo, G1, cetoprofeno, G2, controle.

Quadro 2 – Pressão Arterial Média. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Friedman para comparação de momentos de um mesmo grupo. Teste t de Student para comparação dos grupos em cada momento

Estatísticas (Comparações) e Comentários			
Em G1	M1>M2	M1>M3	p=0,001
Em G2	M1>M2	M1>M3	p=0,002
Em M1	G1=G2		p=0,59
Em M2	G1=G2		p=0,61
Em M3	G1=G2		p=0,37

4.4 CITOCINAS

4.4.1 Interleucina 1

Tabela 4 – Distribuição da mediana e percentis 25-75 da marcação de IL-1 nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	3	3	2	2
Percentil 25-75	3; 3	3; 3	2; 3	2; 3

Quadro 3 – Interleucina 1. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=1,00
Em G2	D=E	p=1,00
Rim D	G1=G2	p=0,11
Rim E	G1=G2	p=0,11

4.4.2 TNF- α

Tabela 5 – Distribuição da mediana e percentis 25-75 da marcação de TNF- α nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	3	2,5	3	2
Percentil 25-75	2,25; 3	2; 3	2; 3	2; 3

Quadro 4 - TNF α . Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=0,36
Em G2	D=E	p=0,37
Rim D	G1=G2	p=0,62
Rim E	G1=G2	p=0,57

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.5.1 Ectasia Vascular

Tabela 6 – Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de ectasia vascular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	1	2	1	1
Percentil 25-75	1;1	1;2	1;1	1;2

Quadro 5 – Ectasia Vascular. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=1,00
Em G2	D=E	p=0,22
Rim D	G1=G2	p=0,17
Rim E	G1>G2	p=0,01

4.5.2 Congestão Vascular

Tabela 7 - Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de congestão vascular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	0	0,5	0	0
Percentil 25-75	0; 0,75	0; 1	0; 0,75	0; 0,75

Quadro 6 – Congestão Vascular. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=1,00
Em G2	D=E	p=0,10
Rim D	G1=G2	p=0,42
Rim E	G1=G2	p=1,00

4.5.3 Dilatação Tubular

Tabela 8 - Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de dilatação tubular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	1	2	1	2
Percentil 25-75	1; 1	1; 2	1; 2	1; 2

Quadro 7 – Dilatação Tubular. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=0,17
Em G2	D=E	p=0,50
Rim D	G1=G2	p=0,13
Rim E	G1=G2	p=0,65

4.5.4 Degeneração Tubular

Tabela 9 - Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de degeneração tubular nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	1	1	1	1
Percentil 25-75	0,25; 1	1; 1	0; 1	1; 1

Quadro 8 – Degeneração Tubular. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=0,59
Em G2	D=E	p=0,59
Rim D	G1=G2	p=0,09
Rim E	G1=G2	p=0,11

4.5.5 Necrose

Tabela 10 - Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de necrose nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	0,5	1	1	1
Percentil 25-75	0; 1	1; 1	0; 1	1; 1

Quadro 9 – Necrose. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos.

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=0,06
Em G2	D=E	p=0,17
Rim D	G1<G2	p=0,02
Rim E	G1=G2	p=0,70

4.5.6 Células Inflamatórias

Tabela 11 - Distribuição da mediana e dos percentis 25-75 dos escores de células inflamatórias nos rins direitos (D) e esquerdos (E) dos ratos dos grupos G1, cetoprofeno, e G2, controle

	G1		G2	
	Rim D	Rim E	Rim D	Rim E
Mediana	0	0,5	0	0
Percentil 25-75	0; 0	0; 1,75	0; 0	0; 0

Quadro 10 – Células Inflamatórias. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação de rins de um mesmo grupo. Teste de Mann-Whitney para comparação dos rins direitos (D) e esquerdos (E) entre os grupos

Estatísticas (Comparações) e Comentários		
Em G1	D=E	p=0,06
Em G2	D=E	p=0,59
Rim D	G1=G2	p=0,44
Rim E	G1=G2	p=0,17

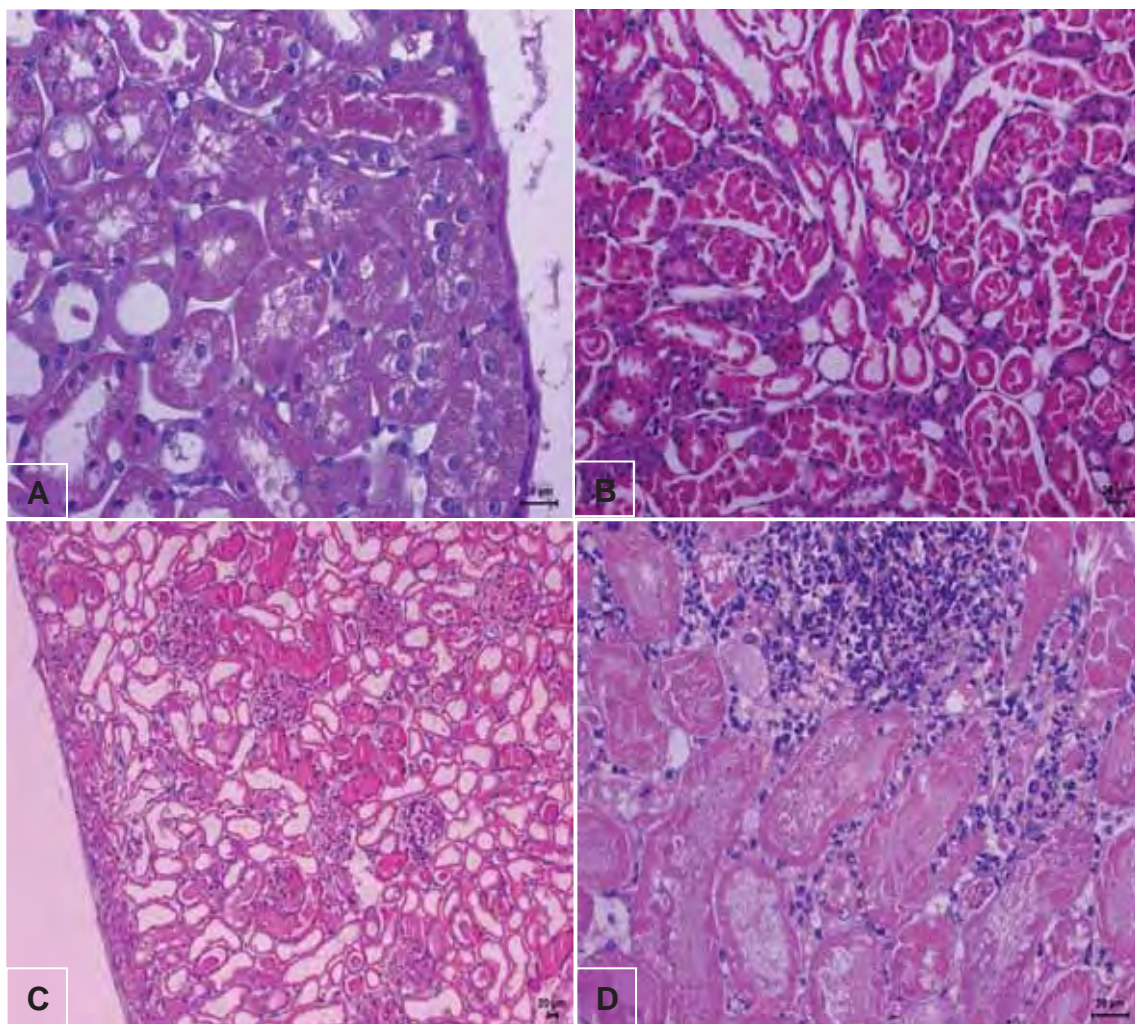


Figura 3 - (A) Degeneração tubular. HE, barra=20 μ m. (B) Necrose tubular. HE, barra=20 μ m. (C) Dilatação tubular e necrose tubular. HE, barra=20 μ m. (D) Infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal. HE, barra=20 μ m.

RESULTADOS

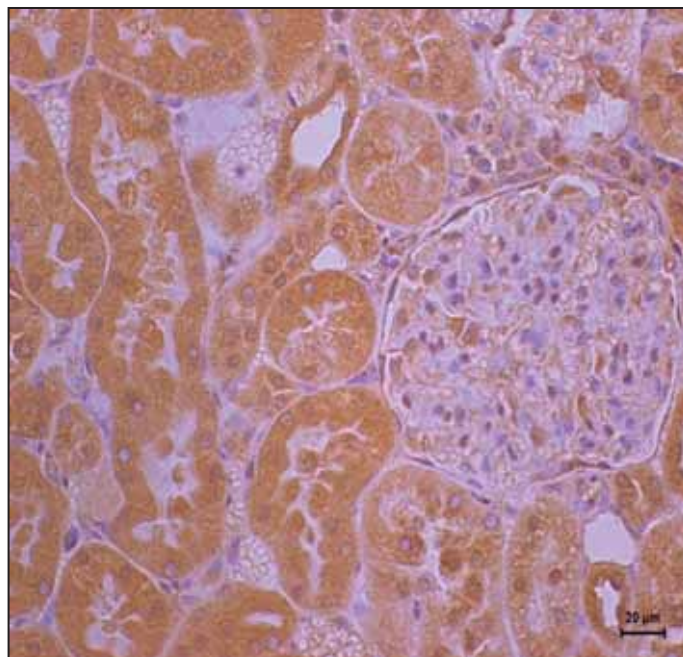


Figura 4 - Intensa (3+) imunomarcção em células tubulares. Barra=20 μ m. Imuno-histoquímica, interleucina-1, ABC, DAB, contra-coloração hematoxilina de Harris.

5 Discussão

Em roedores, a temperatura normal varia em uma faixa que vai de aproximadamente 37,8° até quase 40°C (Massone, 2008). Os valores médios da temperatura retal dos animais dos grupos cetoprofeno (G1) e controle (G2) demonstram que houve hipotermia leve em G1 (37,1°C a 37,9°C) e em G2 (35,7°C), mas o grupo controle, G2, mostrou resultados significativamente menores. Estes resultados estão de acordo com o que ocorre na prática clínica - o paciente anestesiado e que sofre hemorragia tem motivos para apresentar esses patamares de temperatura, na melhor das hipóteses. Hipotermia profunda seria fator protetor para a isquemia sofrida pelos rins após hemorragia, e hipertermia ajudaria a piorar a lesão renal, alterando a disponibilidade de ATP e promovendo aumento nos radicais livres de oxigênio (Zager & Altschuld, 1986). Sendo assim, em G2 esperava-se maior proteção renal, porém melhores resultados histológicos foram obtidos em G1. Portanto, se houve alguma proteção da temperatura, esta não foi completa porque ocorreu precisamente no grupo em que se observaram piores resultados na análise histológica dos rins. Pode-se inferir, assim, que os resultados de necrose encontrados neste grupo G2 poderiam ter sido muito mais intensos não fosse a temperatura mais baixa encontrada.

Por sua vez, Wu et al., 2003, estudando ratos que sofreram choque hemorrágico e que permaneceram com temperaturas retais entre 33°C e 34°C, concluíram que a peroxidação lipídica e as respostas inflamatórias sistêmicas ao choque hemorrágico foram minimamente influenciadas por esta hipotermia, mas a sobrevivência dos ratos foi melhor que a do grupo de temperatura normal (38±0,5°C).

Em relação à pressão arterial média estudada nesta presente pesquisa, a hipotensão encontrada nos animais dos dois grupos no final do experimento foi conseqüente à hemorragia de 30% da volemia. Além de esta hipotensão ter sido

D I S C U S S Ã O

significativa em relação aos valores iniciais de pressão arterial média, seus valores foram compatíveis com diminuição de moderada a grave, com relevância estatística. Contudo, houve discreta melhora dos níveis pressóricos de M3 em relação aos de M2. O que pode ter ocorrido foi uma sequência de respostas compensatórias, locais e sistêmicas, induzidas pela perda sanguínea de moderada a grave, com o objetivo de manter a perfusão em órgãos nobres. O choque hemorrágico estimula a secreção de catecolaminas e hormônio antidiurético, ativando o sistema renina-angiotensina-aldosterona e promovendo vasoconstrição periférica, aumento do volume circulante e do débito cardíaco. O resultado final é melhora da pressão arterial e da pressão de perfusão (Garrioch, 2004; Gutierrez, 2004).

Rushing & Britt, 2008, em revisão de literatura postularam que o choque é uma das causas primárias de morbidade e mortalidade em unidades de cuidados intensivos nos hospitais da atualidade. A resposta inflamatória do organismo é profunda e, se não se lhe der atenção, pode ocasionar múltiplas falências orgânicas e morte. Embora sepse seja a fonte mais provável de resposta inflamatória em pacientes graves que se tornaram hipotensos e taquicárdicos, o choque hipovolêmico associa-se, também, com processos inflamatórios sistêmicos graves baseados nos componentes imunológicos inatos. A etiologia mais comum do choque hipovolêmico é a hemorragia, porém há outros processos fisiopatológicos que resultam nesse tipo de situação. O conceito de choque progrediu consideravelmente nos tempos atuais, mas em termos simples define-se choque como estado fisiopatológico no qual o oxigênio liberado não alcança a demanda metabólica (Gutierrez, 2004). Perda sanguínea traumática é muitas vezes de fácil reconhecimento, mas o volume e o local do sangramento podem ser extremamente difíceis de discernir.

O choque hemorrágico e a depressão imunológica subsequente podem contribuir para maior suscetibilidade a sepse ou a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Ayala et al., 1996). A resposta imunológica que ocorre após choque hemorrágico e sepse caracteriza-se por liberação precoce de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6, interleucina-1 ou fator- α de necrose tumoral, as quais, portanto, aparecem imediatamente após a agressão. Esta liberação é seguida por resposta de citocinas antiinflamatórias, como IL-4 e IL-10, que também podem levar a depressão imunológica e sepse subsequente (Oberholzer et al., 2000).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, também conhecida como caquetina ou caquexina, que se encontra elevada durante os episódios de isquemia e reperfusão relacionados com a hemorragia (Coty et al., 1990; Takada et al., 1997; Donahoo et al., 1999). É a primeira citocina a surgir nos tecidos de ratos após choque hemorrágico, como ficou bem demonstrado no estudo de Jiang et al., 1997. Além disso, ela induz a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , e a ativação de neutrófilos (Dinarello, 1987; Sutters et al., 1994; Suzuki et al., 2001). Sua presença em órgãos vitais está associada à lesão dos mesmos, sendo um importante mediador fisiopatológico das alterações cardiovasculares, da falência de múltiplos órgãos e da letalidade em ratos (Bahrami et al., 1997). Abbas et al., 2007, demonstraram que grandes quantidades de TNF- α inibem a contratilidade do miocárdio e o tônus da musculatura lisa dos vasos, resultando em queda da pressão sanguínea, podendo levar ao choque.

No rim não é diferente. O TNF- α também induz a produção de outros mediadores e espécies reativas de oxigênio, recrutando neutrófilos e monócitos devido à indução da expressão da molécula de adesão intercelular nas células mesangiais e da

expressão superficial de ligantes para selectina-L nas células endoteliais glomerulares. Os mediadores provocam disfunção celular e orgânica. As espécies reativas de oxigênio ativam os fatores de transcrição envolvidos na expressão de gene da inflamação. Os superóxidos também rompem a função de barreira do glomérulo e ocorrerá permeabilidade à albumina. Além disso, o TNF- α reduz o fluxo sanguíneo e a filtração glomerulares por estimular as células mesangiais a produzirem vasoconstritores (fator de ativação plaquetária, endotelina-1, prostaglandinas) e vasodilatadores (adenosina, óxido nítrico, prostaglandinas). Dessa forma, o TNF- α promove disfunção renal por citotoxicidade direta, vasoconstrição, diminuição do fluxo sanguíneo renal e recrutamento de neutrófilos e monócitos (Donnahoo et al., 1999).

O cetoprofeno é um fármaco derivado do ácido propiônico que pertence à classe dos antiinflamatório não-esteróides (AINEs), com ação antiinflamatória e analgésica. Ele é uma mistura racêmica de suas formas enantioméricas R e S, em razão da presença de um átomo de carbono assimétrico na posição α da função carbonil. Atua inibindo a síntese de prostaglandinas, através do bloqueio da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), e a agregação plaquetária. Apesar de ser comumente aceito que seu efeito antiinflamatório está principalmente associado à sua capacidade de inibir a COX, diversos estudos indicam que a ação analgésica desse fármaco pode ser independente de sua eficácia em bloquear a síntese de prostaglandinas (McCormack & Brune, 1991; Ghezzi et al., 1998; Bertini & Caselli, 1999; Mascagni et al., 2000).

Ghezzi et al., 1998, compararam o efeito antiinflamatório de R- e S-cetoprofeno *in vitro* e *in vivo*. Demonstraram que o enantiômero S é o principal responsável pela inibição da síntese de prostaglandinas e dos eventos inflamatórios. Paradoxalmente, ele poderia também aumentar a produção das citocinas TNF- α e IL-1 e

D I S C U S S Ã O

ainda inibir, segundo Mascagni et al., 2000, a produção de IL-10. Isso poderia mascarar parcialmente o efeito analgésico dessa forma enantiomérica e ao mesmo tempo desencadear os efeitos colaterais do cetoprofeno. Por outro lado, o R-enantiômero seria, essencialmente, o encarregado de promover a analgesia cetoprofeno-induzida. Diferentemente do S-, o R-isômero não induziu aumento significativo da produção de citocinas ou da inibição da ciclooxigenase. Concluíram que o isômero R contribui, diretamente, para o efeito antiinflamatório do cetoprofeno pelo fato de ser mais analgésico e ao mesmo tempo não estimular o aumento da produção de citocinas inflamatórias.

Embora o papel de cada enantiômero ainda seja bastante discutido, sabe-se que o isômero S é 100 a 1000 vezes mais potente inibidor da COX do que o isômero R, *in vitro* (Brune et al.,1992). Ademais, este último é conhecido por sofrer inversão quiral para enantiômero S, *in vivo*, em várias espécies de animais, exceto no homem e na cobaia (Abas & Meffin,1987; Brune et al., 1992; Aberg et al., 1995). Então, se o bloqueio da COX fosse o principal mecanismo de ação dos AINEs, o seu isômero R seria isento de ação farmacológica relevante, o que não é verdade. O seu real mecanismo de promoção de analgesia ainda não é totalmente esclarecido, porém acredita-se realmente que a regulação das citocinas exerça papel fundamental no efeito dos AINEs não dependente da COX. E, ainda, o S-cetoprofeno seria o principal responsável pela *up regulation* de citocinas mediadas pelo cetoprofeno, como o TNF- α , por exemplo, tanto *in vitro* como *in vivo*, contribuindo para reduzir o seu poder analgésico e exacerbar seus efeitos colaterais (Bertini & Caselli, 1999).

Dessa forma, pode-se inferir que o mecanismo pelo qual o cetoprofeno leva ao aumento da produção de citocinas ainda é incerto e alvo de muitas pesquisas. Endres et

D I S C U S S Ã O

al., 1989, quantificaram a produção de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β pelas células mononucleares do sangue periférico, no homem. Encontraram que a quantidade de citocinas sintetizadas por essas células é regulada de maneira independente para IL-1 e TNF- α , mas apresenta correlação quando se fala de IL-1 α e IL-1 β , aumentando a produção desta última com o uso de inibidores da ciclooxigenase.

Kunkel et al., 1988, observaram, em seu experimento, que o platô nos níveis de TNF- α foi concomitante com aumento acelerado da produção de prostaglandina E2. A administração exógena de PGE2 determinou redução, dependente da dose, da ação da TNF- α em nível celular, e da transcrição de seu RNA. Demonstraram, portanto, que a PGE2 pode regular a expressão genética de TNF- α derivado do macrófago.

A maior produção de TNF- α seria então devida à inibição da síntese de PGE2, porque normalmente as prostaglandinas inibem a produção *in vitro* de TNF- α e IL-1. Este fato poderia, inclusive, estar relacionado com exacerbação do processo inflamatório e conseqüente aumento da mortalidade quando se utilizou antiinflamatório previamente à indução de choque em animais (Pettipher & Wimberly, 1994). Contudo, não foi o que certamente aconteceu neste presente estudo. Apesar da inibição das prostaglandinas, concedida pelo cetoprofeno, e da moderada a alta imunomarcagem renal de TNF- α e IL-1, ocorreu pouco dano ao órgão, principalmente no grupo em que o fármaco foi utilizado, provavelmente porque existem outros mecanismos modulatórios envolvendo AINEs, prostaglandinas ou citocinas, que não foram estudados nesta pesquisa.

Desde que se sabe que o TNF- α estimula a produção endógena de PGE2 em culturas de macrófagos peritoneais, este pode ser mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativo que limita a produção de citocinas (Lehmann et al., 1988). Sironi

et al., 1992, também observaram em seu experimento em camundongos que as prostaglandinas podem prover, fisiologicamente, regulação de *feedback* negativo de IL-6 e TNF- α . Além disso, Strassmann et al., 1994, demonstraram que esse efeito inibitório sobre ambas as citocinas envolve a IL-10. A diminuição nos níveis de IL-6 e TNF- α era inversamente proporcional ao aumento da imunorreatividade de IL-10. Observaram que utilizando anticorpos para neutralizar seletivamente IL-10, mas não outros produtos de secreção dos macrófagos, reverteram, significativamente, o potencial inibitório da PGE2. *In vivo*, a administração prévia de PGE2 provocou redução significativa de TNF- α e IL-6 circulantes, enquanto que, em camundongos, o uso de anticorpos anti-IL-10 aumentou substancialmente os níveis de TNF- α e IL-6. Finalmente, sugeriram que o efeito antiinflamatório da PGE2 seria, em parte, mediado por mecanismo de *feedback* autócrino envolvendo IL-10.

A interleucina-1 é uma citocina que também tem sido bastante estudada como importante mediadora da imunidade natural, envolvida em muitos processos inflamatórios agudos e, inclusive, no choque hemorrágico, durante os quais se encontra elevada no plasma. A IL-1 é produzida após a estimulação de monócitos e atua regulando a maturação das células T e B e promovendo a síntese de outras citocinas. É também conhecida como fator pirogênico, pois induz o aumento da temperatura por ação hipotalâmica. Ela aumenta consideravelmente os metabólitos do ácido aracdônico, dentre eles a prostaglandina E2, uma das grandes responsáveis por suas propriedades inflamatórias.

A IL-1, biologicamente, tem ação sinérgica ao TNF- α e estas duas citocinas provocam respostas muito correlacionadas quando de infecção, lesão ou estímulo imunológico, resultando em resposta inflamatória exacerbada devido a esse efeito

D I S C U S S Ã O

combinado de ambas. Contudo, suas estruturas e receptores são diferentes e, ao contrário do TNF- α , a IL-1 não causa lise ou dano celular, não provoca necrose hemorrágica de células tumorais, não é letal e ainda tem ação mais potencializadora do que supressora da medula óssea (Dinarello, 1996; 1997). No presente estudo, ocorreu marcação de TNF- α e IL-1 de moderada a alta em ambos os rins de ambos os grupos, porém houve pouca necrose, sendo esta necrose mais significativa em rins de G2 (sevoflurano) que de G1 (cetoprofeno e sevoflurano).

Devido a todo esse estresse inflamatório conseqüente ao choque hemorrágico e à isquemia, a escolha do anestésico utilizado neste experimento foi dirigida - tais eventos são potencialmente deletérios a órgãos vitais e ao rim, que é o órgão alvo de análise dessa pesquisa. Sendo assim, o sevoflurano é anestésico inalatório que ainda apresenta resultados conflitantes na literatura quanto ao seu potencial protetor de órgãos em situação de hipotensão/hipóxia (Obal et al., 2006; Curtis, 2008).

Com relação ao sevoflurano, como agente protetor contra lesões isquêmicas, há estudos demonstrando que este anestésico tem efeitos protetores no miocárdio (Kowalski et al., 1997), enquanto que, no rim, os estudos são controversos, provavelmente porque ainda não houve uniformidade de modelos apresentados na literatura (Obal et al., 2006; Curtis, 2008). Nader et al., 2004, observaram que o sevoflurano reduziu a resposta inflamatória após o emprego de circulação extracorpórea, diminuindo a liberação de IL-6 e TNF- α , mas não determinaram de que maneira o sevoflurano agiria. El Azab et al., 2003, já haviam observado que o sevoflurano reduz a produção de TNF- α durante cirurgia cardíaca mais do que a anestesia venosa com midazolam-sufentanil. Portanto, o sevoflurano participaria da imunomodulação do organismo.

D I S C U S S Ã O

Kawamura et al., 2006, formularam a hipótese de que o sevoflurano decrescia a lesão de isquemia e reperfusão por suprimir as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-8, mas não a IL-10. Assim, alterações no equilíbrio entre citocinas pró- e antiinflamatórias podem ser um dos mais importantes mecanismos de proteção miocárdica determinados pelo sevoflurano.

Se o sevoflurano não inibe a produção de IL-10 e esta citocina, sabe-se, inibe a inflamação e a produção de TNF- α (Abbas et al., 2007), então, em G1 e G2, o anestésico inalatório pode ter influenciado o resultado encontrado de TNF- α . A hemorragia teria aumentado a produção desta citocina, mas não tanto quanto esperado, uma vez que o sevoflurano estava presente. O que foi observado nos rins dos ratos de G1 e G2, portanto, poderia ter sido pior não fosse a ação protetora desse anestésico.

É interessante que sejam feitas algumas considerações sobre o experimento de Obal et al., 2006, autores que não encontraram proteção renal em ratos anestesiados com sevoflurano. Nesse estudo, nefrectomia direita foi realizada 14 dias antes do experimento com isquemia renal esquerda e reperfusão (para prevenir compensação pelo rim contralateral). Entretanto, após a retirada de um rim, no rim remanescente ocorrem múltiplas respostas que nada mais são do que adaptações fisiológicas. Entre as respostas mais precoces estão as alterações bioquímicas que precedem o crescimento celular do rim remanescente. Estas alterações já começam a acontecer em questão de minutos, como é o caso do aumento da incorporação da colina, precursora do fosfolípídeo da membrana celular (Lowenstein & Toback, 1978; Toback et al., 1974). Em 14 dias, tempo utilizado por Obal et al., 2006, para realizar isquemia e reperfusão após nefrectomia, existe crescimento compensatório de quase 40% do rim remanescente (Dicker & Shirley, 1972). Estes autores, portanto, administraram sevoflurano para

animais com rins diferentes dos normais e, além disso, por apenas 15 minutos, aguardando, então, 10 minutos para realizar a isquemia renal. Durante a oclusão da artéria renal esquerda, os animais foram mantidos anestesiados com administração de S(+)-cetamina. No experimento de Curtis, 2008, - isquemia e reperfusão de rim esquerdo de rato, após nefrectomia direita, sob efeito de S(+)-cetamina e de sevoflurano -, o grupo que foi anestesiado apenas com S(+)-cetamina teve o pior resultado de histologia do órgão e aquele no qual se empregou o sevoflurano, o melhor resultado.

Assim, acredita-se que o sevoflurano pode ter tido efeito na expressão renal dos grupos deste presente estudo e, frente ao exposto, efeito positivo.

6 Considerações Finais

O cetoprofeno pode ter protegido, contra a hipoperfusão, os rins dos animais do grupo que o recebeu. Quando a hipovolemia ocorre, a norepinefrina, a angiotensina II e o hormônio antidiurético agem para manter a pressão sanguínea e preservar a perfusão em leitos vasculares importantes. Essas substâncias induzem vasoconstrição em leitos vasculares relativamente menos importantes, como a circulação esplâncnica (Thadhani et al., 1996). Necrose tubular aguda é parte de um espectro de manifestações da hipoperfusão renal, sendo o resultado de hipoperfusão grave e prolongada (Mehta et al., 2004). Neste presente estudo, ambos os grupos apresentaram necrose tubular, mas G1 mostrou escores menores desta alteração. Sabendo que a hipotermia protege contra lesões isquêmicas e que o grupo G2, que não recebeu este AINE, apresentou mais hipotermia, porém mais necrose, pode-se inferir que o cetoprofeno conferiu proteção ao rim de ratos. Por outro lado, o mecanismo que determinou essa proteção não está ligado à marcação desses rins pelas citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 estudadas nesta pesquisa, uma vez que não houve diferenças quanto às suas expressões renais em ambos os grupos.

7 Conclusão

Concluindo, o cetoprofeno ofereceu proteção à histologia renal de ratos sob anestesia com sevoflurano e hipovolêmicos por hemorragia aguda, embora pareça que a expressão de TNF- α e IL-1 não esteja envolvida nessa proteção. Outros experimentos são necessários para elucidar o envolvimento do cetoprofeno nas alterações histológicas do rim de rato após hemorragia aguda.

8 Referências

Abas A, Meffin PJ. Enantioselective disposition of 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drug. IV. Ketoprofen disposition. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;240:637–641.

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

Aberg G, Ciofalo VB, Pendleton GR, Ray G, Weddle D. Inversion of (R)- to (S)-ketoprofen in eight animal species. *Chirality*. 1995;7:383–387.

Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock*. 1996;5:79.

Bahrami S, Yao YM, Leichtfried G, Redl H, Marzi I, Schlag G. Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 2):H2219-H2226.

Bertini R, Caselli G. Analgesic effect of ketoprofen is mainly associated to its R-enantiomer: role of cytokine modulation. *Analgesia*. 1999;4:181-186

Brune K, Geisslinger G, Menzen-Soglowek S. Pure enantiomers of 2-arylpropionic acids: Tools in pain research and improved drugs in rheumatology. *J Clin Pharmacol*. 1992;32:944–952.

Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg*. 1990;212:694-700.

Cheng YJ, Chien CT, Wang YP, Fu TC, Chen TL, Chen CF. Fluid administration prevents renal dysfunction during hypotension under spinal anesthesia in a rat model. *Acta Anaesthesiol Sin*. 2003;41:7-12.

Colletti AE, Vogl HW, Rahe T, Zambraski EJ. Effects of acetaminophen and ibuprofen on renal function in anesthetized normal and sodium-depleted dogs. *J Appl Physiol.* 1999;86:592-597.

Curtis FG. Sevoflurano e dexmedetomidina em isquemia e reperfusão renais no rato. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2008.

da Silva-Santos JE, Santos-Silva MA, Cunha FQ, Assreuy J. The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300:946-51.

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

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

Diego LAS, Marques CD’O, Vianna PTGV, Viero RM, Braz JRC, Castiglia YMM. Glibenclamide effects on renal function and histology after acute hemorrhage in rats under sevoflurane anesthesia. *Ren Fail.* 2007;29:1039-1045.

Dinarello CA. The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett.* 1987;16:227-231.

Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:133-165.

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.* 1997;112:321S-329S.

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

Dragun D, Lukitsch I, Tullius SG, Qun Y, Park JK, Schneider W, Luft FC, Haller H. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 with antisense deoxynucleotides prolongs renal isograft survival in the rat. *Kidney Int.* 1998;54:2113-2122.

Dunn MJ, Zambraski EJ. Renal effects of drugs that inhibit prostaglandin synthesis. *Kidney Int.* 1980;18:609-622.

El Azab SR, Rosseel PM, De Lange JJ, Groeneveld AB, Van Strik R, Van Wijk EM, Scheffer GJ. Effect of sevoflurane on the ex vivo secretion of TNF-alpha during and after coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol.* 2003;20:380-384.

Endres S, Cannon JG, Ghorbani R, Dempsey RA, Sisson SD, Lonnemann G, Van der Meer JW, Wolff SM, Dinarello CA. In vitro production of IL 1 beta, IL 1 alpha, TNF and IL 2 in healthy subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independent gene regulation. *Eur J Immunol.* 1989;19:2327-2333.

Erni D, Banic A, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Haemorrhage during anaesthesia and surgery: continuous measurement of microcirculatory blood flow in the kidney, liver, skin and skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol.* 1995;12:423-429.

Furuichi K, Wada T, Yokoyama H, Kobayashi KI. Role of cytokines and chemokines in renal ischemia-reperfusion injury. *Drug News Perspect.* 2002;15:477-482.

Garrioch MA. The body's response to blood loss. *Vox Sang.* 2004;87(Suppl 1):574-576.

Ghezzi P, Melillo G, Meazza C, Sacco S, Pellegrini L, Asti C, Porzio S, Marullo A, Sabbatini V, Caselli G, Bertini R. Differential contribution of R and S isomers in ketoprofen anti-inflammatory activity: role of cytokine modulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287:969-974.

Gutierrez G. Clinical review: hemorrhagic shock. *Crit Care.* 2004;8:373-381.

Haq M, Norman J, Saba SR, Ramirez G, Rabb H. Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:614-619.

Jiang J, Tian K, Diao Y, Chen H, Zhu P, Wang Z. Expression of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6 mRNA, release of TNF-alpha in vital organs and their relationship with endotoxin translocation following hemorrhagic shock. *Chin Med Sci J.* 1997;12:41-46.

Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, Kaise A, Suzuki H, Endo S, Wei J, Inada K. Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006;20:503-508.

Kersten JR, Schmeling TJ, Hettrick DA, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. *Anesthesiology.* 1996;85:794-807.

Kowalski C, Zahler S, Becker BF, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E, Peter K. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology.* 1997;86:188-195.

Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem.* 1988;263:5380-5384.

Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278:F380-F387.

Lehmann V, Benninghoff B, Droge W. Tumor necrosis factor-induced activation of peritoneal macrophages is regulated by prostaglandin E2 and cAMP. *J Immunol.* 1988;141:587-591.

Lowenstein LM, Toback FG. Metabolic response to renal compensatory growth. *Yale J Biol Med.* 1978;51:395-401.

Lien Y-HH, Lai L-W, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci.* 2003;74:543-552.

Marangoni MA, Hausch A, Vianna PTG, Braz JRC, Viero RM, Castiglia YMM. Renal function and histology after acute hemorrhage in rats under dexmedetomidine action. *Acta Cir Bras.* 2007;22:290-297.

Marret E, Bonnet F. Perioperative anti-inflammatory drug use: which evidences for their utility and safety? *Ann Fr Anesth Reanim.* 2007;26:535-539.

Mascagni P, Sabbatini V, Biordi L, Martinotti S, Allegretti M, Marullo A, Caselli G, Bertini R. R and S isomers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11:185-192.

Massone F. *Anestesiologia Veterinária. Farmacologia e Técnicas.* 5^a ed. Rio de Janeiro: GEN/Guanabara Koogan; 2008. p548.

McCormack K, Brune K. Dissociation between the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs.* 1991;41:533-547.

Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Iqbal Z, Paganini EP, Chertow GM; Program to Improve Care in Acute Renal Disease. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int.* 2004;66:1613-1621.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.

Nader ND, Li CM, Khadra WZ, Reedy R, Panos AL. Anesthetic myocardial protection with sevoflurane. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2004;18:269-274.

Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Rascher K, Preckel B, Schlack W. Effect of sevoflurane preconditioning on ischemia/reperfusion injury in the rat kidney *in vivo*. *Eur J Anaesthesiol.* 2006;23:319-326.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling: Regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 2000;28:N3.

- Pettipher ER, Wimberly DJ. Cyclooxygenase inhibitors enhance tumor necrosis factor production and mortality in murine endotoxic shock. *Cytokine*. 1994;6:500–503.
- Pompermayer K, Souza DG, Lara GG, Silveira KD, Cassali GD, Andrade AA, Bonjardim CA, Passaglio KT, Assreuy J, Cunha FQ, Vieira MA, Teixeira MM. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int*. 2005;67:1785-1796.
- Quintaes OS, Noronha IL. Revisão/Atualização em insuficiência renal aguda: Papel dos neutrófilos e moléculas de adesão na fisiopatologia da insuficiência renal aguda isquêmica. *J Bras Nefrol*. 1998;20:74-77.
- Rahgozar M, Willgoss DA, Gobé GC, Endre ZH. ATP-dependent K⁺ channels in renal ischemia -reperfusion injury. *Ren Fail*. 2003;25:885-896.
- Rushing GD, Britt LD. Reperfusion injury after hemorrhage. A Collective Review. *Ann Surg*. 2008;247:929-937.
- Sheldon J, Riches P. Citocinas inflamatórias. *Rev Chil Infectol*. 1999;8:165-176.
- Sironi M, Gadina M, Kankova M, Riganti F, Mantovani A, Zandalasini M, Ghezzi P. Differential sensitivity of in vivo TNF and IL-6 production to modulation by anti-inflammatory drugs in mice. *Int J Immunopharmacol*. 1992;14:1045-1050.
- Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med*. 1994;180:2365–2370.
- Suitters AJ, Foulkes R, Opal SM, Palardy JE, Emtage JS, Rolfe M, Stephens S, Morgan A, Holt AR, Chaplin LC et al. Differential effect of isotype on efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha chimeric antibodies in experimental septic shock. *J Exp Med*. 1994;179:849-856.

Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Kitagawa Hato F, Sakamoto C, Takahashi T, Tatsumi N. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1beta. *J Immunol.* 2001;167:5940-5947.

Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med.* 1996;334:1448-1460.

Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest.* 1997;99:2682-2690.

Tesch GH, Yang N, Yu H, Lan HY, Foti R, Chadban SJ, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Intrinsic renal cells are the major source of interleukin-1 β synthesis in normal and diseased rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12:1109-1115.

Toback FG, Smith PD, Lowenstein LM. Phospholipid metabolism in the initiation of renal compensatory growth after acute reduction of renal mass. *J Clin Invest.* 1974;54:91-97.

Wartier DC, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ. Editorial view: anesthetic preconditioning: serendipity and science. *Anesthesiology.* 2002;97:1-3.

Wu X, Stezoski J, Safar P, Bauer A, Tuerler A, Schwarz N, Kentner R, Behringer W, Kochanek PM, Tisherman SA. Mild hypothermia during hemorrhagic shock in rats improves survival without significant effects on inflammatory responses. *Crit Care Med.* 2003;31:195-202.

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

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

Anexos

Tabela 12 – Valores de peso (g), temperatura (°C) (temp) e pressão arterial média (mmHg) (PAM) dos ratos dos grupos Sevo+Ceto e Sevo. Os dois últimos atributos são apresentados nos momentos M1, M2 e M3

Grupos	Rato	Peso(g)	M1		M2		M3	
			Temp	PAM	Temp	PAM	Temp	PAM
1 Sevo+Ceto	1	460	37,0	122	39,9	99	38,0	39
	2	490	37,5	103	36,3	36	36,0	47
	3	490	37,0	98	37,0	52	37,0	60
	4	490	35,7	84	39,0	29	39,0	30
	5	500	37,5	81	36,8	50	39,0	63
	6	500	35,5	86	38,3	51	38,0	73
	7	420	38,7	94	38,0	53	37,0	77
	8	430	37,7	102	37,8	57	37,0	88
	9	410	37,5	99	37,9	22	37,0	42
	10	400	36,5	88	37,8	57	37,0	69
2 Sevo	1	530	36,0	99	37,0	37	35,5	45
	2	510	35,0	107	35,0	80	36,0	93
	3	540	35,0	92	34,0	64	34,0	43
	4	510	34,0	129	36,0	29	34,8	60
	5	490	35,0	89	34,5	59	36,0	82
	6	330	37,0	76	37,0	31	36,5	44
	7	320	36,0	113	36,0	50	36,0	92
	8	310	36,0	103	35,0	92	36,0	100
	9	280	36,5	87	36,5	68	36,0	67
	10	390	36,0	95	36,0	44	36,0	47

Tabela 13 – Escores das alterações histológicas dos rins direitos e esquerdos dos animais dos grupos Sevo+Ceto (G1) e Sevo (G2): ectasia e congestão vascular, dilatação, degeneração e necrose tubulares e presença de células inflamatórias. Ausência de lesão = escore zero, lesão leve = 1, lesão moderada = 2 e lesão intensa = 3

Grupos	Alterações histológicas renais											
	Ectasia		Congestão		Dilatação		Degeneração		Necrose		Células	
	Vascular		Vascular		Tubular		Tubular		Tubular		Inflamatórias	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Rato 1-D	2	1	2	0	2	1	1	1	1	0	0	0
Rato 1-E	3	1	2	0	3	2	0	1	1	0	0	0
Rato 2-D	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	0
Rato 2-E	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	0
Rato 3-D	1	1	1	0	1	2	1	0	1	1	1	0
Rato 3-E	1	1	0	0	0	2	1	1	1	1	0	0
Rato 4-D	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Rato 4-E	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3	0	1
Rato 5-D	2	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
Rato 5-E	2	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
Rato 6-D	1	0	0	0	2	1	1	1	1	0	1	0
Rato 6-E	0	0	0	1	2	1	1	0	1	0	0	0
Rato 7-D	2	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
Rato 7-E	1	1	0	0	2	1	1	0	1	3	0	3
Rato 8-D	1	1	0	2	3	2	2	1	1	1	0	0
Rato 8-E	1	1	0	2	1	2	2	1	1	1	0	0
Rato 9-D	3	1	2	1	3	1	2	0	2	0	0	0
Rato 9-E	2	1	1	1	2	1	1	0	1	3	0	2
Rato 10-D	2	1	1	0	2	0	1	1	2	1	0	0
Rato 10-E	1	1	0	0	2	2	2	0	1	3	0	2

Tabela 14 – Escores da marcação renal da citocina TNF- α nos ratos dos grupos Sevo+Ceto e Sevo. Marcação leve = 1, marcação moderada = 2 e marcação intensa = 3

Grupo	Rato	IHQ_TNF-α	Intensidade
Cetoprofeno	1	820 - Rim D	3
		821 - Rim E	2
	2	822 - Rim D	3
		823 - Rim E	2
	3	825 - Rim D	3
		825 - Rim E	3
	4	826 - Rim D	2
		826 - Rim E	2
	5	828 - Rim D	2
		829 - Rim E	3
6	831 - Rim D	3	
	831 - Rim E	3	
7	833 - Rim D	3	
	833 - Rim E	3	
8	834 - Rim D	3	
	835 - Rim E	2	
9	836 - Rim D	2	
	837 - Rim E	2	
10	838 - Rim D	3	
	839 - Rim E	3	
Controle	1	840 - Rim D	2
		841 - Rim E	3
	2	842 - Rim D	1
		842 - Rim E	1
	3	844 - Rim D	3
		845 - Rim E	3
	4	847 - Rim D	2
		847 - Rim E	2
	5	848 - Rim D	3
		849 - Rim E	2
6	850 - Rim D	3	
	851 - Rim E	3	
7	852 - Rim D	3	
	853 - Rim E	3	
8	854 - Rim D	3	
	855 - Rim E	2	
9	1874 - Rim D	3	
	1875 - Rim E	2	
10	1876 - Rim D	2	
	1877 - Rim E	2	

Tabela 15 – Escores da marcação renal da citocina IL-1 nos ratos dos grupos Sevo+Ceto e Sevo. Marcação leve = 1, marcação moderada = 2 e marcação intensa = 3.

Grupos	Rato	IL-1	Intensidade
Cetoprofeno	1	820 - Rim D	3
		821 - Rim E	3
	2	822 - Rim D	3
		823 - Rim E	3
	3	825 - Rim D	3
		825 - Rim E	3
	4	826 - Rim D	3
		826 - Rim E	3
	5	828 - Rim D	3
		829 - Rim E	2
	6	831 - Rim D	3
		831 - Rim E	3
	7	833 - Rim D	3
		833 - Rim E	3
	8	834 - Rim D	2
		835 - Rim E	3
	9	837 - Rim D	2
		837 - Rim E	2
	10	838 - Rim D	3
		839 - Rim E	3
Controle	1	840 - Rim D	2
		841 - Rim E	3
	2	842 - Rim D	2
		842 - Rim E	2
	3	844 - Rim D	1
		845 - Rim E	1
	4	847 - Rim D	2
		847 - Rim E	2
	5	848 - Rim D	3
		849 - Rim E	2
	6	850 - Rim D	3
		851 - Rim E	3
	7	852 - Rim D	3
		853 - Rim E	3
	8	854 - Rim D	3
		855 - Rim E	3
	9	1874 - Rim D	2
		1875 - Rim E	3
	10	1876 - Rim D	2
		1877 - Rim E	2