

Andrea Stolf Eberle

**Cetoprofeno e expressão renal de citocinas
TNF- α e IL-1 após hemorragia aguda em ratos**

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

Orientadora

Prof^a Titular Yara Marcondes Machado Castiglia

Botucatu - SP

2007

Introdução

À minha Família

Dedico este trabalho aos meus pais, autores da minha vida.

Devo tudo à minha família: a vida, o carinho, a possibilidade de ser feliz e de me tornar um ser humano capaz de enfrentar as dificuldades da vida.

Agradeço aos meus pais por toda uma vida de dedicação, incentivando-me em cada etapa, em cada nova conquista.

Ao meu Marido

O Amor Antigo

O amor antigo vive de si mesmo,
não de cultivo alheio ou de presença.
Nada exige nem pede. Nada espera,
mas do destino vão nega a sentença.

O amor antigo tem raízes fundas,
feitas de sofrimento e de beleza.
Por aquelas mergulha no infinito,
e por estas suplanta a natureza.

Se em toda parte o tempo desmorona
aquilo que foi grande e deslumbrante,
o antigo amor, porém, nunca fenece
e a cada dia surge mais amante.

Mais ardente, mais pobre de esperança.
Mais triste? Não. Ele venceu a dor,
e resplandece no seu canto obscuro,
tanto mais velho quanto mais amor.

Carlos Drummond de Andrade

À minha Orientadora

Conheci o meu mestre em circunstâncias excepcionais, como todas as circunstâncias da vida, e sobretudo as que, não sendo nada em si mesmas, hão de vir a ser tudo nos resultados.

Álvaro de Campos

Digo obrigada por acreditar em mim e deixo um agradecimento especial pelo incentivo, paciência e precisão em todos os detalhes.

Agradeço por me permitir compartilhar experiências e especialmente expandir meus conhecimentos.

Agradeço pela coordenação, supervisão e desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada por suas idéias brilhantes, sua habilidosa influência e sabedoria que pode ser encontrada espalhada por este trabalho.

O Valor da Educadora

Ser transmissora de verdades,
Ser cultivadora de amor
De amizades
Ser convicta de acertos
De erros
Ser construtora de seres
De vidas
Ser edificadora
Movida por impulsos, por razão, por emoção
De sentimentos profundos
Que carrega no peito o orgulho de educar
Que armazena o conhecer
Que guarda no coração, o pesar
De valores essenciais
Ser lutadora,
Que enfrenta agruras
Mas prossegue, vai adiante realizando sonhos
Possuidora de potencialidades
Ser de inabalável sabedoria,
Esse é o valor de ser educadora.

Maria Darismor Duarte Henes Cortes

Agradecimentos

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

à Prof^a. Dr^a. Sueli Aparecida Calvi, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, pelas dosagens das citocinas séricas e auxílio na análise dos resultados;

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

à Prof.^a Dr.^a Maria Rita Parise Fortes, pela segura orientação quando do desenvolvimento da marcação imuno-histoquímica;

à Prof.^a Dr.^a Fátima Regina Vilani Moreno, do Instituto Lauro de Souza Lima, de Bauru, pelo apoio à metodologia e análise dos resultados;

ao Dr. Cleverson Teixeira Soares, patologista do Instituto Lauro de Souza Lima, de Bauru, pelo apoio à metodologia;

à Prof.^a Dr.^a Rosa Marlene Viero, do Departamento de Patologia da faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, pelos laudos da análise histológica;

ao Residente do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Dr. Leopoldo Muniz da Silva, pelo apoio no estudo estatístico;

ao Dr. Marcello de Souza Silva, ex-Residente do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela ajuda na execução da parte prática;

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

à Sr.^a Sônia Maria Martins da Silva, pelo apoio na secretaria do Departamento de Anestesiologia;

ao Sr. Danilo Claudio Godoy, pelo auxílio no serviço de computação;

à Sra. Neli Aparecida Pavan, pelo auxílio durante o desenvolvimento do meu curso de pós-graduação;

aos Srs. Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, pelo auxílio com os animais no laboratório experimental;

ao Departamento de Patologia da Unesp e aos seus funcionários, pelo auxílio inestimável;

ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, pelo apoio para a dosagem de citocinas;

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

Sumário

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO..... | 12 |
| OBJETIVO..... | 17 |
| MATERIAL E MÉTODO..... | 19 |
| Grupos estudados..... | 19 |
| Atributos estudados..... | 20 |
| Momentos estudados..... | 20 |
| Determinação do hematócrito..... | 21 |
| Dosagem de citocinas séricas..... | 21 |
| Análise histológica dos rins..... | 22 |
| Técnica imuno-histoquímica..... | 22 |
| Análise estatística..... | 23 |
| RESULTADOS..... | 26 |
| 1 Peso..... | 26 |
| 2 Pressão arterial média..... | 27 |
| 3 Temperatura retal..... | 28 |
| 4 Hematócrito..... | 29 |
| 5 Concentração sérica de citocina TNF- α | 30 |
| 6 Concentração sérica de citocina IL-1..... | 31 |
| 7 Análise histológica..... | 33 |
| 8 Detecção imuno-histoquímica de TNF- α e IL-1 no rim..... | 36 |
| DISCUSSÃO..... | 39 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 52 |
| CONCLUSÃO..... | 54 |
| REFERÊNCIAS..... | 56 |
| ANEXOS..... | 65 |

Eberle AS. Cetoprofeno e expressão renal de citocinas TNF α e IL-1 após hemorragia aguda em ratos. Botucatu, 2007. 70 fls. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina Botucatu, Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Justificativa e objetivos. Fármacos antiinflamatórios, inibidores da síntese de prostaglandinas, são muitas vezes administrados imediatamente antes da cirurgia, ou durante a mesma, para tratamento de dor pós-operatória. Se ocorrer hemorragia intra-operatória, o rim estaria sem a ação protetora das prostaglandinas, com possibilidade de pior lesão isquêmica. Entretanto, estudo mostrou menor lesão com o antiinflamatório cetoprofeno nessa situação. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi pesquisar a expressão renal de citocinas TNF α e IL-1, em ratos que receberam cetoprofeno antes de serem submetidos à hemorragia aguda sem ressuscitação fluídica, relacionando esta expressão com o resultado histológico.

Método. Este trabalho foi desenvolvido com 20 ratos Wistar machos, anestesiados com pentobarbital sódico, 50 mg. kg⁻¹ por via intraperitoneal, e divididos em dois grupos submetidos a sangria de 30% da volemia, realizada em três momentos com tempo de 10 minutos entre eles. No grupo G1, 10 animais permaneceram apenas com infusão venosa contínua de solução de Ringer com lactato para reposição de perdas mínimas. No grupo G2, 10 animais também receberam, por via venosa, cetoprofeno 1,5 mg. kg⁻¹, 60 minutos antes da hemorragia. Os atributos estudados foram: pressão arterial média, temperatura retal, hematócrito, concentrações séricas de TNF- α e IL-1, análise histológica do rim, imunomarcações teciduais renais de TNF- α e IL-1.

Resultados. Os animais foram homogêneos quanto ao peso. Em G1, a redução da pressão arterial média foi intensa e em G2 houve redução, porém não significativa. Ambos os grupos já antes da hemorragia apresentaram animais com hipotermia, a qual foi mais intensa em G2. Em G2, o hematócrito foi significativamente maior que em G1. Os valores séricos de TNF- α já estavam elevados quando da hemorragia, em G1 e G2, porém muito mais neste último, e continuaram a aumentar até o sacrifício dos animais, em G1, mas diminuíram em G2. Os valores séricos de IL-1, em G1, próximos do normal quando da hemorragia, aumentaram no final, enquanto que, em G2, estes valores estavam aumentados no início, mas declinaram no final. Na análise histológica, o grupo do cetoprofeno apresentou menos degeneração e necrose renais que o controle e sua marcação imuno-histoquímica dos rins mostrou maior expressão de TNF- α (intensa) sobre IL-1 (leve), enquanto que em G1 a expressão foi intensa para as duas citocinas.

Conclusão. No rim de rato que recebeu cetoprofeno antes de ocorrer hemorragia aguda sem ressuscitação fluídica, houve intensa expressão de TNF- α e leve de IL-1. Concluiu-se que esta expressão leve poderia explicar o melhor resultado histológico que ocorreu com o cetoprofeno.

Palavras-chave: cetoprofeno, citocinas, hemorragia, ratos, rim

Eberle AS. Ketoprofen and renal expression of cytokines TNF α and IL-1 after acute haemorrhage in rats. Botucatu, 2007. 70 sheets. (Master in Anesthesiology) – Botucatu School of Medicine, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”

ABSTRACT

Background and objective: Anti-inflammatory drugs, inhibitors of prostaglandins synthesis, are several times administered immediately before or during surgery for postoperative pain relief. In case of intraoperative hemorrhage, the kidney would lose the protective action of the prostaglandin, with the possibility of a worse ischemic lesion. In this case, however, study has shown a smaller lesion with the use of the anti-inflammatory drug ketoprofen. The aim of this study was to research the renal expression of cytokines TNF- α and IL-1 in rats which have received ketoprofen before being submitted to acute hemorrhage without fluid resuscitation, connecting this expression with the histological result.

Method: This study was developed with 20 male Wistars rats, anesthetized with 50 mg.kg⁻¹ of sodium pentobarbital intraperitoneal, and divided in two groups submitted to a 30% volemia bleeding, performed in three moments with a 10 minutes lapse between them. In the group G1, 10 animals remained only with continuous venous infusion of lactated Ringer solution to replace the minimum loss. In the group G2, 10 animals received 1,5 mg.kg⁻¹ of ketoprofen intravenously as well, 60 minutes before the hemorrhage. The attributes studied were: medium artery blood pressure, rectal temperature, hematocrit, serum concentration of cytokines TNF- α and IL-1, histological analysis of the kidney, immunostaining of TNF- α and IL-1 in renal tissues.

Results: The animals were homogeneous in weight. The group G1 showed an intense reduction of the medium artery blood pressure while the group G2 showed a non significative reduction. The animals in both groups had already presented hypothermia before the hemorrhage, which was more intense in group G2. Also in this group, the hematocrit was considerably larger than in group G1. The serum values of TNF- α were already high at the time of first hemorrhage in group G1 and G2, however, much higher at the last group, and these values continued to increase until the sacrifice of the animals in G1, but decreased in G2. The serum values of IL-1 in G1, which were close of the normal at the time of first hemorrhage, increased in the end whereas in G2 these values were increased at the beginning, but decreased at the end. In the histological analysis, the ketoprofen group showed less renal degeneration and necrosis than the control and its immune-histological staining of the kidneys showed a higher expression of TNF- α (intense) compared to IL-1 (mild), whereas in G1 the expression was intense for both cytokines.

Conclusion: The kidney of the rat which received ketoprofen before the acute hemorrhage without fluid resuscitation showed intense expression of TNF- α and a mild of IL-1. We can conclude that this mild expression might explain the better histological result which occurred with the ketoprofen.

Key-words: ketoprofen, cytokines, hemorrhage, rats, kidney

Introdução

No rim, um órgão menos vital, como resposta compensatória à hemorragia moderada e grave decorrente de cirurgia, ocorre vasoconstrição pela atividade aumentada do sistema renina-angiotensina ou dos nervos simpáticos renais, para manter a pressão e o fluxo sanguíneos a órgãos mais vitais, como o coração e o cérebro. Este mecanismo compensatório pode manter a vida durante a fase aguda, mas a isquemia reflexa em órgãos menos vitais gerará resultado danoso em longo prazo (1).

Em condições basais e em presença de volemia normal, há, tipicamente, baixa síntese de prostaglandinas. Quando ocorre desestabilização hemodinâmica, a síntese e a liberação de prostaglandinas aumentam muito (2). As prostaglandinas renais são vasodilatadoras e têm importante papel na preservação deste órgão. Sua ação mantém o ritmo de filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal, porque modula os efeitos vasoconstritores de substâncias como a angiotensina II e norepinefrina (3), efeitos que estariam aumentados em condições de hipotensão, por exemplo. Tais condições são denominadas de estado renal dependente de prostaglandinas (ERDPG) (4).

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 (5).

Além de inibirem a produção de prostaglandinas, os antiinflamatórios também inibem proteinases específicas envolvidas na degradação de proteoglicanos e colágenos de cartilagem e a geração de radicais de oxigênio, principalmente superóxido. Estes agentes também interferem na liberação de bradicinina, na resposta linfocitária ao estímulo antigênico, na fagocitose e na quimiotaxia de granulócitos e monócitos (6).

O principal mecanismo de ação do antiinflamatório cetoprofeno é a inibição da ciclooxigenase (COX1), o que conduz ao bloqueio da síntese das prostaglandinas a partir do ácido aracdônico. Numerosos estudos *in vivo* e *in vitro* comprovaram que esta ação é muito intensa e estudo conduzido em ratos demonstrou inibição da síntese de prostaglandinas, inibição esta mais específica e da ordem de 87% (7).

O cetoprofeno é um antiinflamatório não-esteroidal (AINE) de alto poder analgésico, que pode ser utilizado por via oral ou intramuscular no pré-operatório. Sua apresentação intravenosa permite ao anestesiológista o uso intra-operatório como medicação coadjuvante para dor pós-operatória. A associação de cetoprofeno com

outras medicações analgésicas, tais como a dipirona ou o tramadol, potencializa a analgesia pós-operatória. O cetoprofeno pode também ser utilizado para analgesia preemptiva, ou seja, antes de o estímulo doloroso ser desencadeado (8). Entretanto, se ele for empregado antes de cirurgia e se durante a mesma ocorrer hemorragia, como ficaria o rim sem a ação protetora da prostaglandina?

A hipoperfusão associada à hipotensão e hipovolemia é provavelmente a causa mais comum de isquemia não-oclusiva. Quando a perfusão tecidual é restaurada, advém a lesão por reperfusão (9). Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na insuficiência renal aguda isquêmica ainda não estão completamente elucidados, porém reconhece-se, atualmente, que a restauração do fluxo sanguíneo após um evento isquêmico exacerba a lesão previamente instalada (10). Esta lesão por reperfusão apresenta papel significativo na lesão tecidual após acidentes cerebrovasculares, isquemia miocárdica e falência renal aguda isquêmica (11).

Acredita-se que o processo inflamatório seja fator muito implicado na lesão por isquemia e reperfusão, no rim (12). Muitos estudos demonstraram acúmulo peritubular de neutrófilos, tanto no córtex quanto na medula renal, após isquemia e reperfusão (13). A ativação de neutrófilos pode liberar citocinas, espécies reativas de O₂, proteases, mieloperoxidases e outras enzimas que pioram a lesão tecidual (14).

As citocinas, proteínas de baixo peso molecular, exercem suas ações em concentrações extremamente pequenas e interagem com células através de receptores específicos e de alta afinidade. As citocinas podem agir no local onde são produzidas, ou mesmo em sítios diversos do organismo. Uma característica importante das mesmas é o fato de que várias células têm a capacidade de produzir uma mesma citocina, e de que várias citocinas têm ações sobrepostas (15).

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 (16). Destaca-se a participação do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) 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 (17).

O processo de adesão dos leucócitos pode ser dividido em pelo menos três etapas distintas. Em um primeiro momento, a célula circulante aproxima-se da parede vascular e rola sobre o endotélio. Numa segunda fase, o leucócito em contato com o vaso sofre a ação de substâncias solúveis liberadas no local (quimiocinas) e passa a expressar moléculas ativadas que vão determinar ligação firme à superfície endotelial. Somente, então, o leucócito é capaz de migrar através do vaso em direção ao tecido (17).

As citocinas IL-1 e TNF- α compartilham a função de serem essenciais 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 (18).

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 (19). O TNF- α é sintetizado não somente pela infiltração macrófagica, mas também por células glomerulares renais em resposta à endotoxina e lesão isquêmica (20).

Embora alguns estudos tenham relatado a expressão seqüencial das citocinas nos processos inflamatórios, o impacto de uma única citocina na cascata é incerto (16, 21, 22).

Assim, pelo que foi exposto, pode-se inferir que muito deve ser pesquisado para que se conheçam as respostas do rim em situações de agressão ao órgão, quando o mesmo está sob a ação de fármacos antiinflamatórios.

Silva et al. (23) pesquisaram se o cetoprofeno, administrado no intra-operatório, alteraria a integridade do néfron de ratos anestesiados com pentobarbital sódico e submetidos à hemorragia correspondente a 30% de sua volemia, sem ressuscitação fluídica. Foi utilizada combinação de estresse da anestesia e hipotensão após hemorragia como modelo de estado renal dependente de prostaglandinas. Estes autores verificaram que os ratos que receberam o antiinflamatório apresentaram aumento da resistência vascular renal, provavelmente pela ausência da ação das prostaglandinas vasodilatadoras. O estudo histológico dos 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. Estas alterações, provavelmente, foram determinadas pela hemorragia e hipotensão. Contudo, o grupo que recebeu cetoprofeno apresentou, significativamente, menos degeneração, o que pode sugerir interferência do efeito antiinflamatório do cetoprofeno.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi pesquisar a expressão renal de citocinas TNF- α e IL-1, em ratos que receberam cetoprofeno antes de serem submetidos à hemorragia aguda sem ressuscitação fluídica, relacionando esta expressão com o resultado histológico.

Material e Método

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

A pesquisa foi desenvolvida em vinte ratos Wistar adultos, machos, com pesos superiores a 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da Unesp. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, 50mg. kg⁻¹, por via intraperitoneal, e mantidos com 10 mg. kg⁻¹, por via venosa, quando necessário.

Grupos estudados

Dois grupos de dez ratos cada foram estudados após a indução anestésica e a cateterização da veia jugular:

- grupo controle (G1) - dez animais submetidos à hemorragia arterial igual a 30% da volemia e infusão venosa contínua de solução de Ringer com lactato;
- grupo cetoprofeno (G2) - dez animais submetidos à hemorragia arterial igual a 30% da volemia, infusão venosa contínua de solução de Ringer com lactato e administração venosa de cetoprofeno, 1,5 mg. kg⁻¹.

Os ratos foram mantidos em respiração espontânea com oxigênio suplementar, 1 L. min⁻¹, através de máscara acoplada aos focinhos. A temperatura retal foi monitorizada durante o experimento com termômetro de álcool.

Após a instalação da anestesia, em todos os animais foi realizada incisão longitudinal no pescoço para dissecação e cateterização, com *venocath* 24 GA, da: 1) veia jugular interna esquerda para infusão contínua de solução de Ringer com lactato, 5mL. kg⁻¹. h⁻¹ (bomba Anne[®], Laboratório Abbott, EEUU), para reposição de perdas de fluidos (Cheng et al., 2003) e administração, no grupo G2, de cetoprofeno, imediatamente após a cateterização da veia; 2) artéria carótida direita para monitoração da pressão arterial média e da frequência cardíaca através de transdutor do aparelho de registro Datex Engstron (Finlândia) e para realização de hemorragia.

Sessenta minutos após a administração do cetoprofeno em G2 e o tempo correspondente em G1, os animais dos dois grupos sofreram sangria de 30% da volemia, pela artéria carótida, realizada em três momentos com tempo de 10 minutos entre eles. Em cada momento foram retirados 10% da volemia, a qual foi calculada

como sendo igual a 6% do peso corporal (1). O sangue arterial coletado foi utilizado para análise laboratorial do hematócrito e das citocinas TNF- α e IL-1.

Em cada momento de hemorragia foram registradas:

- 1) Pressão arterial média
- 2) Frequência cardíaca
- 3) Temperatura retal

Cessados os momentos de sangria, os ratos permaneceram anestesiados por mais 30 minutos, sendo, então, sacrificados com dose suficiente para tal de pentobarbital sódico. Em cada animal, foi realizada nefrectomia bilateral, sendo os rins armazenados em frascos separados, para análise histológica, em solução de Dubosque Brasil (formol 120 mL, ácido acético 30 mL e ácido pícrico 2 g), na qual permaneceram por no mínimo 12 horas e no máximo 36 horas. Em seguida, os rins foram identificados por número codificado, de modo que o patologista responsável pela análise histológica e aplicação da escala de valores para os critérios estudados não teria como relacionar a peça examinada ao animal do experimento.

Atributos estudados

- Pressão arterial média
- Temperatura retal
- Hematócrito
- Concentrações séricas de TNF- α e IL-1
- Análise histológica do rim
- Imunomarcações teciduais renais de TNF- α e IL-1

Momentos estudados

Os momentos nos quais se estudaram atributos foram:

- M1 – controle e coincidente com a primeira hemorragia,
- M2 – obtido após 20 minutos da primeira hemorragia e 10 minutos da segunda, sendo coincidente com a terceira hemorragia,
- M3 – obtido após 30 minutos da terceira e última hemorragia e imediatamente antes do sacrifício de cada animal.

Os valores de pressão arterial média e de temperatura retal foram estudados nos três momentos. Os valores de hematócrito e concentrações séricas de TNF- α e IL-1 foram estudados em M1 e M3. A análise histológica dos rins e as imunomarcações teciduais renais de TNF- α e IL-1 foram obtidas após o sacrifício dos animais, ou seja, após M3.

Determinação do hematócrito

Na determinação do hematócrito, empregou-se o método do microhematócrito, utilizando-se o aparelho Centremicro da Fanem (Brasil), sendo o resultado expresso em porcentagem.

Dosagem de citocinas séricas

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

As concentrações de TNF- α e IL-1 no soro dos animais dos dois grupos estudados foram determinadas utilizando *kit* para ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EEUU).

Inicialmente, microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal antiTNF- α ou antiIL-1 de rato. A seguir, foram adicionados 50 μL dos soros testes (diluição 1:2) e dos soros controles positivos e negativos, com posterior incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens com solução detergente contendo 0,05% *tween* 20 em PBS, pH 7,4. Este processo foi repetido até a fase anterior à adição do substrato. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente com anticorpos policlonais antiTNF- α ou antiIL-1 de rato, marcados com peroxidase. Após o período de incubação, foi adicionado, aos orifícios da placa, o substrato formado por peróxido de hidrogênio (0,02%) e tetrametilbenzina (2,0%). A interrupção da reação foi realizada à temperatura ambiente, utilizando-se ácido hidrolórico. Os resultados foram avaliados pela leitura da densidade óptica (DO) em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan, EEUU) em comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de TNF- α e IL-1 presentes no soro

foram calculadas a partir dos resultados obtidos na curva padrão realizada com TNF- α e IL-1 recombinantes de rato. A dose mínima detectada foi de 5 pg. mL⁻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, baseou-se na observação e análise de evidências dos seguintes critérios: ectasia vascular, congestão vascular, dilatação tubular, degeneração tubular, necrose celular e evidências de inflamação. Para o diagnóstico de necrose tubular era 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 zero (0) ausência de lesão, valor um (1) para lesões leves, dois (2) para lesões moderadas e três (3) para lesões intensas.

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 de material incluído em parafina, com 4 μ m de espessura, foram colocados sobre lâmina histológica, previamente tratada com organolisano (Sigma A 3648). Os cortes foram desparafinizados em 2 banhos de xilol por 30 minutos e 20 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente, desidratados em álcool por 5 minutos e lavados com água destilada. Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria a 96°C, com solução pré-aquecida de TRIS EDTA pH 9,0 por 30 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em água destilada, sendo, a seguir, tratados com peróxido de hidrogênio (H₂ O₂) a 10 volumes por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados em água destilada em 2 banhos de TRIS pH 7,4 de 5 minutos e incubados com soro normal de coelho por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados com anticorpo primário antígeno específicos *goat anti-rat* TNF- α (R&D Systems AF 510-NA) e *goat anti-rat* IL-1 (R&D Systems AF 501-NA), diluídos a 1:100 em diluente

específico para os anticorpos, com redutor de fundo (DAKO Cytomation – S 3022) durante 18 horas a 4° C. As lâminas foram lavadas em solução tampão, 2 banhos de 5 minutos cada. Após esse período, foram incubadas com anticorpo secundário biotilado coelho anticabra (Southern Biotech 6160-08), diluído a 1:200, por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, e lavadas em 2 banhos de TRIS pH 7,4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com complexo streptoavidina peroxidase (Dako Cytomation K 0377), diluído a 1:200, à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida e lavadas em TRIS (2 banhos) por 5 minutos. Para visibilização da reação, os cortes foram tratados com cromógeno DAB (DAB Dako cytomation K 3468) durante 5 minutos e, em seguida, lavados em TRIS e água destilada. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 3 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos com posterior hidratação em álcool, clareados em xilol e montados sobre lâminas com resina sintética Permount. A análise foi realizada em todo o corte, em aumento de 20 e 40 vezes, estabelecendo-se uma média para a intensidade de marcação observada nas lâminas dos rins de todos os animais. A intensidade da reação, observada sobre as lâminas, foi representada por meio de escores classificando-se como:

- + marcação fraca,
- ++ marcação de intensidade moderada
- +++ marcação intensa.

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

Análise estatística

Para a verificação da homogeneidade do peso dos animais de ambos os grupos, utilizou-se o teste t de Student. Para os atributos pressão arterial média, temperatura retal, hematócrito, utilizaram-se o Teste de Friedman com dois graus de liberdade para a comparação entre momentos de um mesmo grupo e o de Mann-Whitney para a comparação dos dois grupos em cada momento. Para TNF- α e IL-1, utilizaram-se o Teste de Wilcoxon para comparação entre momentos de um mesmo grupo e o de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos em cada momento. Os perfis séricos das

citocinas foram obtidos pela média dos valores obtidos em ratos normais mais um desvio padrão (25). Os resultados histológicos foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

1. PESO

Tabela 1 – Peso (g) dos ratos. Média e desvio padrão dos grupos.

| Grupo | Peso (g) \pm desvio padrão |
|----------------------------|------------------------------|
| G1 | 366 \pm 76 |
| G2 | 350 \pm 58 |
| Estatística (t de Student) | p = 0,34 |
| Comentário | G1 = G2 |

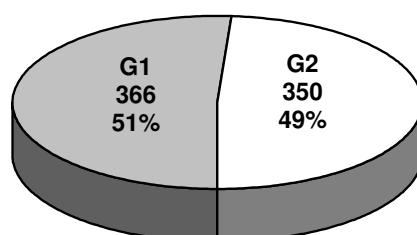


Figura 1 – Média do peso (g) dos animais em cada grupo.

2. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Tabela 2 – Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento. Médias de grupos no conjunto dos momentos e médias de momentos no conjunto dos grupos.

| Momento | M1 | M2 | M3 | Médias de Grupos |
|--------------------|----------------|---------------|---------------|------------------|
| G1 | 113,10 ± 30,68 | 67,20 ± 32,54 | 38,40 ± 15,16 | 72,9 |
| G2 | 110,20 ± 25,64 | 95,00 ± 18,93 | 96,80 ± 26,80 | 100,67 |
| Médias de Momentos | 111,65 | 81,10 | 67,60 | - |

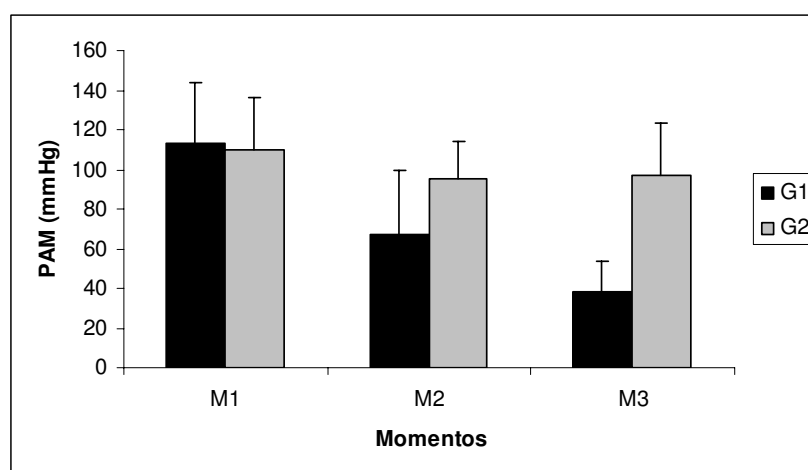


Figura 2 – Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento.

Quadro 2 – Pressão arterial média. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Friedman com dois graus de liberdade para comparação entre momentos de um mesmo grupo e de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos em cada momento.

| Estatística (Comparações) | | Comentário |
|---------------------------|--|----------------------------------|
| (G1) | M1, M2 e M3 p = 0,0001 M1 e M3 p < 0,05 | M1 > M3; M2 é intermediário |
| (G2) | M1, M2 e M3 p = 0,4066 | Não há diferenças entre momentos |
| (M2) | p = 0,0200 | G1 < G2 |
| (M3) | p = 0,0009 | G1 < G2 |

3. TEMPERATURA RETAL

Tabela 3 – Temperatura retal (°C). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento. Médias de grupos no conjunto dos momentos e médias de momentos no conjunto dos grupos.

| Momento | M1 | M2 | M3 | Médias de Grupos |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| G1 | 35,91 ± 1,81 | 35,30 ± 1,24 | 35,03 ± 1,66 | 35,41 |
| G2 | 34,47 ± 1,93 | 33,61 ± 2,03 | 32,96 ± 1,93 | 33,68 |
| Médias de Momentos | 35,19 | 34,46 | 34,00 | - |

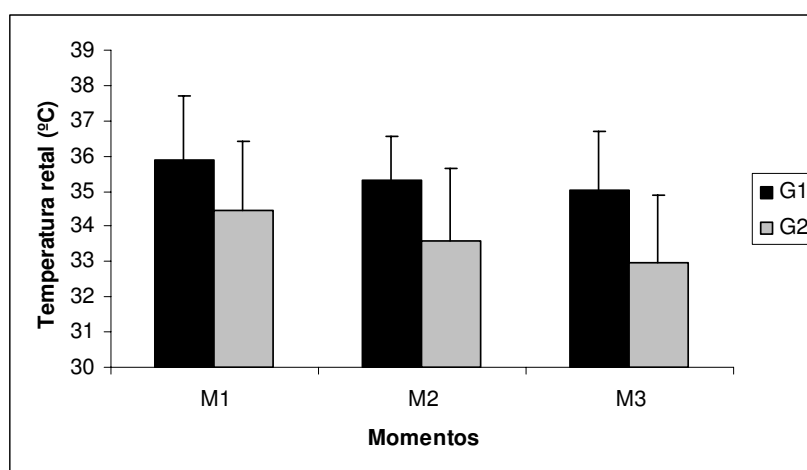


Figura 3 – Temperatura retal (°C). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento.

Quadro 3 – Temperatura retal. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Friedman com dois graus de liberdade para comparação entre momentos de um mesmo grupo e de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos em cada momento.

| Estatística (Comparações) | | | Comentário |
|---------------------------|-------------|------------|---------------------------------|
| (G1) | M1, M2 e M3 | p = 0,2070 | Não há diferença entre momentos |
| (G2) | M1, M2 e M3 | p = 0,0003 | M1 > M3; M2 é intermediário |
| | M1 e M3 | p < 0,05 | |
| (M3) | | p = 0,0100 | G1 > G2 |

4. HEMATÓCRITO

Tabela 4 – Hematócrito (%). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento. Médias de grupos no conjunto dos momentos e médias de momentos no conjunto dos grupos.

| Momento | M1 | M2 | M3 | Médias de Grupos |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| G1 | 43,60 ± 4,65 | 37,40 ± 4,74 | 34,10 ± 3,25 | 38,37 |
| G2 | 50,60 ± 6,67 | 45,70 ± 4,74 | 43,60 ± 5,76 | 46,63 |
| Médias de Momentos | 47,10 | 41,55 | 38,85 | - |

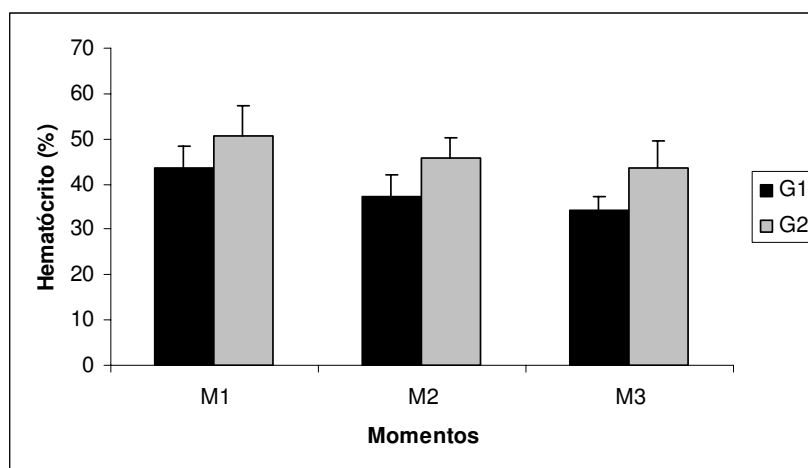


Figura 4 – Hematócrito (%). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento.

Quadro 4 – Hematócrito. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Friedman com dois graus de liberdade para comparação entre momentos de um mesmo grupo e de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos em cada momento.

| Estatística (Comparações) | | | Comentário |
|---------------------------|-------------|------------|-----------------------------|
| (G1) | M1, M2 e M3 | p = 0,0002 | M1 > M3; M2 é intermediário |
| | M1 e M3 | p < 0,05 | |
| (G2) | M1, M2 e M3 | p = 0,0069 | M1 > M3; M2 é intermediário |
| | M1 e M3 | p < 0,05 | |
| (M1) | | p = 0,0100 | G1 < G2 |
| (M2) | | p = 0,0030 | G1 < G2 |
| (M3) | | p = 0,0007 | G1 < G2 |

5. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CITOCINA TNF- α

Tabela 5 – Concentração sérica de citocina TNF- α (pg. mL⁻¹). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento. Médias de grupos no conjunto dos momentos e médias de momentos no conjunto dos grupos

| Grupo | Momento | M1 | M3 | Médias de Grupos |
|--------------------|---------|----------------|-----------------|------------------|
| G1 | | 196,30 ± 51,60 | 512,50 ± 138,26 | 354,40 |
| G2 | | 345,60 ± 73,99 | 240,40 ± 47,02 | 293,00 |
| Médias de Momentos | | 270,95 | 376,45 | - |

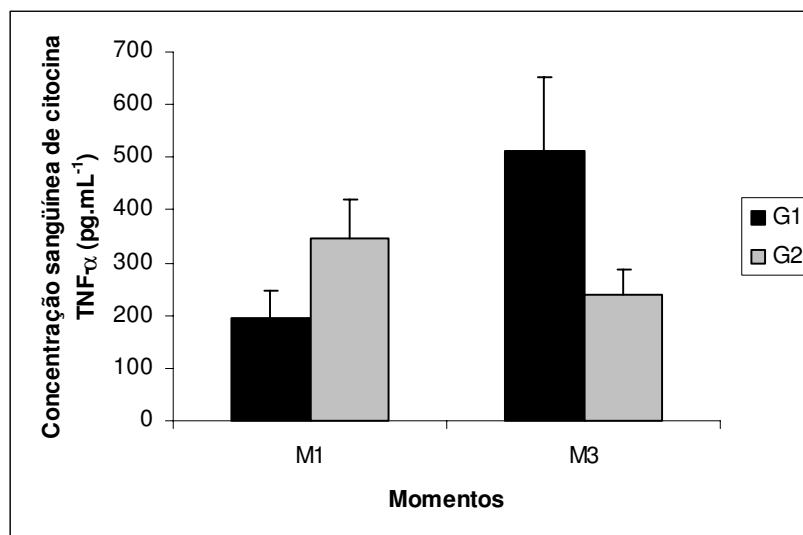


Figura 5 – Concentração sérica de citocina TNF- α (pg. mL⁻¹). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento.

Quadro 5 – Concentração sérica de citocina TNF- α . Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação entre momentos de um mesmo grupo e de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos em cada momento.

| Estatística (Comparações) | | | Comentário |
|---------------------------|---------|------------|------------|
| (G1) | M1 e M3 | p = 0,0069 | M1 < M3 |
| (G2) | M1 e M3 | p = 0,0125 | M1 > M3 |
| (M1) | | p = 0,0030 | G1 < G2 |
| (M3) | | p = 0,0004 | G1 > G2 |

6. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CITOCINA IL-1

Tabela 6 – Concentração sérica de citocina IL-1 (pg. mL⁻¹). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento. Médias de grupos no conjunto dos momentos e médias de momentos no conjunto dos grupos.

| Momento | M1 | M3 | Médias de Grupos |
|---------------------------|----------------|----------------|------------------|
| Grupo | | | |
| G1 | 151,10 ± 39,87 | 316,50 ± 75,78 | 233,80 |
| G2 | 236,30 ± 95,68 | 194,30 ± 59,55 | 215,30 |
| Médias de Momentos | 193,70 | 255,40 | - |

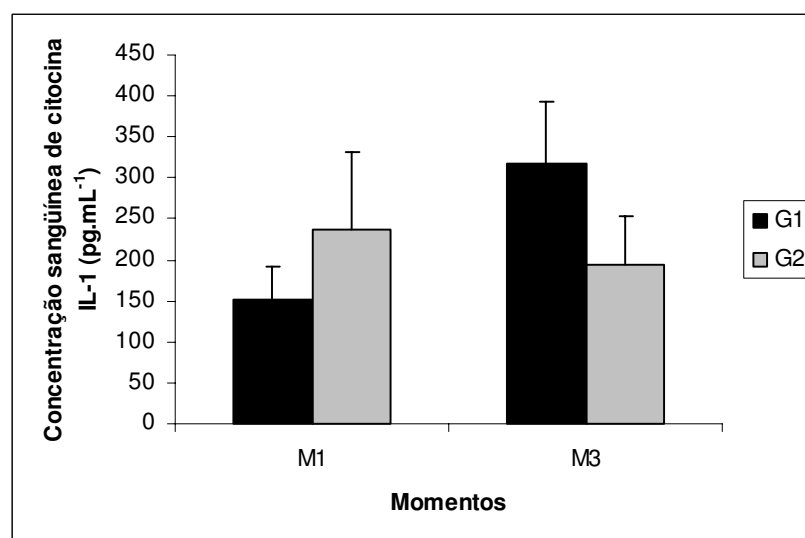


Figura 6 – Concentração sérica de citocina IL-1 (pg. mL⁻¹). Média e desvio padrão dos grupos em cada momento.

Quadro 6 – Concentração sérica de citocina IL-1. Estatísticas calculadas e comentários. Teste de Wilcoxon para comparação entre momentos de um mesmo grupo e de Mann-Whitney para comparação dos dois grupos em cada momento.

| Estatística (Comparações) | | | Comentário |
|---------------------------|---------|------------|------------|
| (G1) | M1 e M3 | p = 0,0069 | M1 < M3 |
| (G2) | M1 e M3 | p = 0,0125 | M1 > M3 |
| (M1) | | p = 0,0490 | G1 < G2 |
| (M3) | | p = 0,0017 | G1 > G2 |

Valores normais das citocinas TNF- α e IL-1

Os valores séricos normais das citocinas TNF- α e IL-1 foram obtidos com ratos normais, utilizando-se a mesma metodologia (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, EEUU) para obtenção de citocinas dos dois grupos estudados. Os valores considerados foram os das médias encontradas mais um desvio padrão. Assim, os resultados finais são:

TNF- α - 117 ± 26 pg. mL⁻¹, ou, somando-se um desvio padrão

$$\mathbf{TNF-\alpha = 143 \text{ pg. mL}^{-1}}$$

IL-1 - 121 ± 37 pg. mL⁻¹, ou, somando-se um desvio padrão

$$\mathbf{IL-1 = 158 \text{ pg. mL}^{-1}}$$

7. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Tabela 7 – Resultados, em escores que quantificam presença de lesão, da análise histológica renal de ambos os rins dos ratos dos grupos G1 e G2.

| G1 | | | | | | | G2 | | | | | | |
|--------------|----|----|----|------|-----------------|----|--------------|----|----|----|------|-----------------|----|
| Rato/ Rim | EV | CV | DT | DGT* | NC [#] | IN | Rato/ Rim | EV | CV | DT | DGT* | NC [#] | IN |
| 1 D | 1+ | 0 | 1+ | 1+ | 0 | 0 | 1 D | 1+ | 0 | 2+ | 1+ | 1+ | 0 |
| E | 2+ | 0 | 1+ | 1+ | 0 | 1+ | E | 2+ | 0 | 2+ | 1+ | 1+ | 0 |
| 2 D | 2+ | 0 | 2+ | 1+ | 1+ | 1+ | 2 D | 1+ | 0 | 2+ | 1+ | 1+ | 0 |
| E | 2+ | 0 | 2+ | 1+ | 1+ | 0 | E | 2+ | 0 | 2+ | 1+ | 1+ | 0 |
| 3 D | 1+ | 0 | 1+ | 1+ | 0 | 0 | 3 D | 0 | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 2+ | 0 | 1+ | 1+ | 0 | 0 | E | 1+ | 2+ | 2+ | 0 | 0 | 0 |
| 4 D | 2+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 4 D | 1+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 0 | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 | E | 1+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 |
| 5 D | 1+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 | 5 D | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 2+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 | E | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |
| 6 D | 1+ | 2+ | 1+ | 1+ | 2+ | 0 | 6 D | 1+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 2+ | 0 | 2+ | 2+ | 3+ | 0 | E | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |
| 7 D | 2+ | 0 | 1+ | 1+ | 1+ | 0 | 7 D | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 2+ | 0 | 2+ | 1+ | 1+ | 1+ | E | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |
| 8 D | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 8 D | 1+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 1+ | 0 | E | 1+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 0 |
| 9 D | 2+ | 0 | 3+ | 1+ | 2+ | 0 | 9 D | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 3+ | 0 | 3+ | 2+ | 3+ | 0 | E | 2+ | 0 | 2+ | 0 | 0 | 1+ |
| 10 D | 1+ | 0 | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 10 D | 1+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |
| E | 1+ | 0 | 1+ | 1+ | 2+ | 1+ | E | 2+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 |

Escores: 0 = lesão ausente; 1+ = lesão leve; 2+ = lesão moderada; 3+ = lesão intensa. EV = ectasia vascular; CV = congestão vascular; DT = dilatação tubular; DGT = degeneração tubular; NC = necrose celular; IN = inflamação. D = rim direito; E = rim esquerdo. * p = 0,0049, G1 > G2 e # p = 0,0149, G1 > G2 (teste de Mann-Whitney).

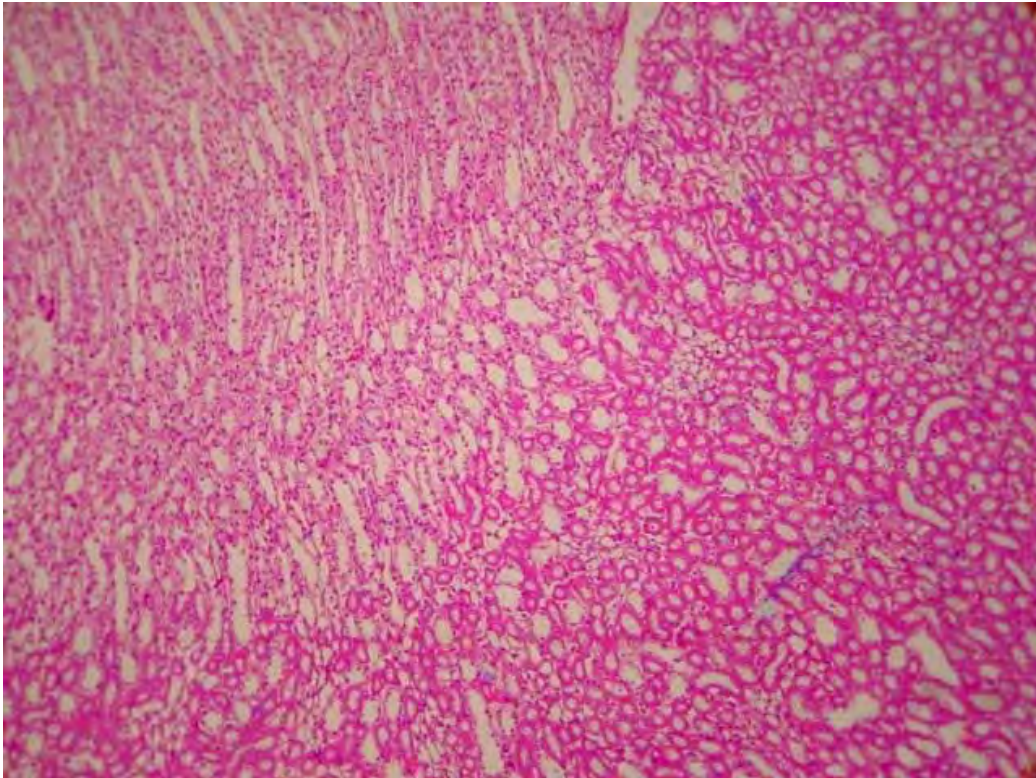


Figura 7a - Hemorragia de 30% da volemia produziu dilatação tubular renal principalmente nos túbulos coletores próximos à junção córtico-medular

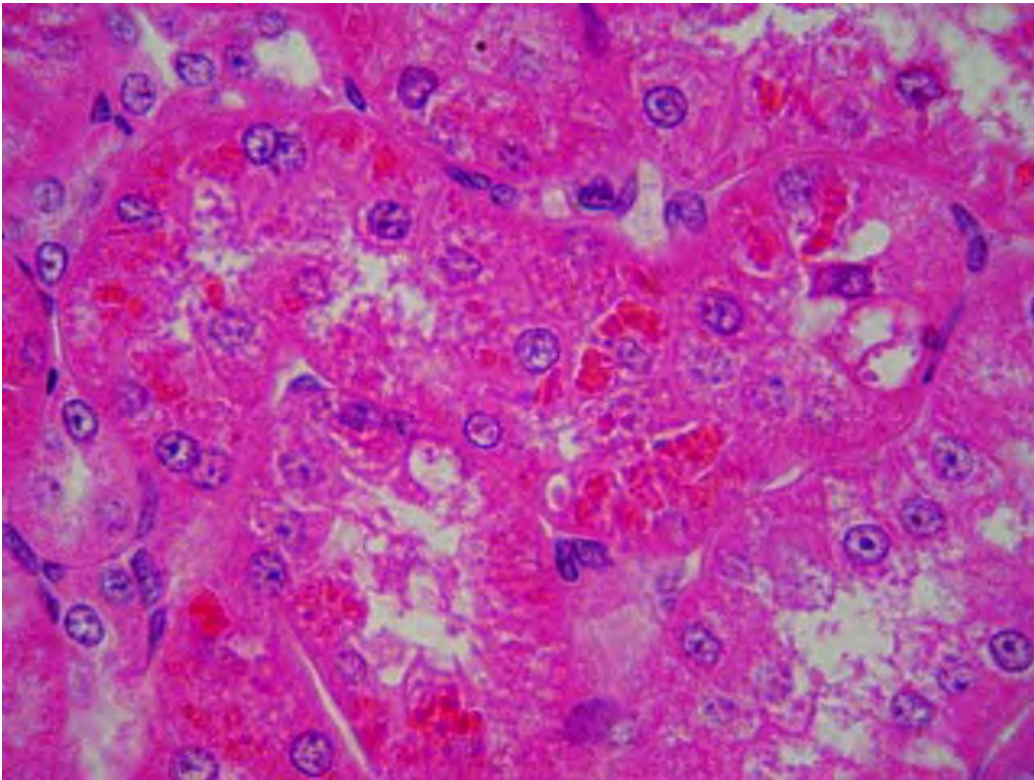


Figura 7b - Hemorragia de 30% da volemia produziu lesão necrótica em túbulos proximais (pouco extensas e de distribuição focal)

8. DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TNF- α E IL-1 NO RIM

A detecção *in situ* de TNF- α e IL-1 nas lesões de rins de ratos dos grupos G1 e G2 pode ser visibilizada nas figuras A, B, C, D e E. Na tabela 8 está representada a intensidade da imunomarcção para citocinas, que foi classificada como: + leve, ++ moderada e +++ intensa marcação das células epiteliais tubulares e mesangiais glomerulares. A marcação positiva foi detectada como coloração marrom acastanhada de padrão citoplasmático granular e de membrana celular.

A imunomarcção de TNF- α no grupo G1 (controle) e G2 (tratado com cetoprofeno) apresentou-se intensa nas células epiteliais tubulares e nas mesangiais glomerulares. No grupo G2, a imunomarcção da IL-1 apresentou acentuada diminuição da expressão tanto nas células tubulares como nas mesangiais glomerulares. No entanto, a imunomarcção da IL-1 no grupo G1 apresentou-se intensa tanto em células epiteliais tubulares como em células mesangiais glomerulares.

Tabela 8 – Escores de intensidade para a imunomarcção de IL-1 e TNF- α nos rins de ratos de G1 (controle) e G2 (cetoprofeno)

| Escore de intensidade da imunomarcção | IL-1 | TNF- α |
|---------------------------------------|------|---------------|
| G2 | + | +++ |
| G1 | +++ | +++ |

+ = leve; ++ = moderada; +++ = intensa

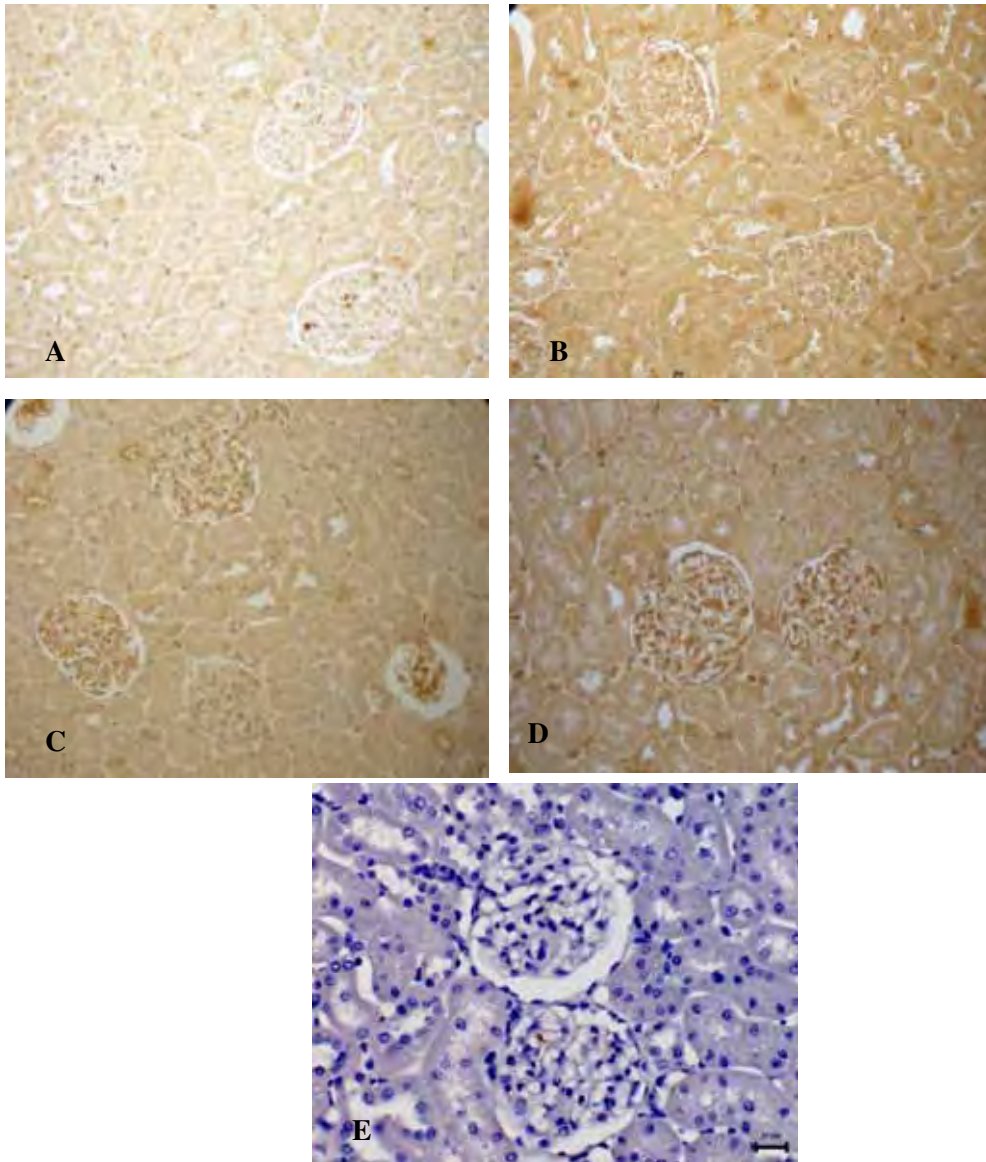


Figura 7 – Imunomarcção de rins de ratos, com anticorpo primário antiIL-1 e antiTNF- α . Técnica ABC, DAB e contracoloração hematoxilina de Harris. 400x. A – IL-1, animais tratados com cetoprofeno (G2). B – IL-1, animais sem tratamento (G1). C – TNF- α , animais tratados com cetoprofeno (G2). D - TNF- α , animais sem tratamento (G1). E – Controle negativo.

Discussão

O desenvolvimento de disfunção renal pós-operatória é causa de morbidade e mortalidade que segue cirurgias de grande porte, principalmente as cardiovasculares. Embora a literatura apresente inúmeras estratégias que podem prevenir este evento renal, nenhuma, ainda, é tão eficaz quanto a manutenção de normovolemia. Neste presente trabalho experimental, foi provocada hemorragia de moderada intensidade, mas com reposição hidroeletrólítica apenas de perdas mínimas. Espera-se, portanto, que não tenha sido preservada a volemia normal.

O ato anestésico-cirúrgico resulta na liberação de hormônios catabólicos e citocinas (26). Outro efeito importante, e que é reforçado pelo jejum pré-operatório, é o aumento da secreção de hormônio antidiurético, com conseqüente retenção de água. Contudo, há sempre perdas intra-operatórias, que compreendem as de sangue ou só de fluidos intravasculares, existindo, por isso, rotina para se reporem ambas e ainda manter o requerimento de água.

Alta porcentagem de sangue irriga a córtex renal (cerca de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), mas a córtex extrai apenas 18% do total de oxigênio que aí aporta. Por outro lado, para a região medular, a quantidade de fluxo sangüíneo que chega é bem menor (cerca de $0,03 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), mas a extração de seu oxigênio é alta – aproximadamente 79% da quantidade desse gás que é disponibilizada (26). Uma série de mecanismos de controle é responsável pelo balanço entre suprimento e consumo de oxigênio medular. A quebra deste controle deixa a região mais externa da medula renal suscetível a episódios agudos de agressão hipóxica, que podem desencadear necrose tubular aguda, especialmente das regiões com alça ascendente fina. Assim, esta necrose tubular aguda já se manifestaria com decréscimo de 40-50% do fluxo sangüíneo renal.

Os mediadores que podem afetar o fluxo sangüíneo medular e alterar a magnitude de qualquer agressão isquêmica são: 1) os vasodilatadores – óxido nítrico, prostaglandina E_2 , adenosina, dopamina, urodilatina (análogo do peptídeo natriurético atrial); 2) vasoconstritores – endotelina, angiotensina II, vasopressina; 3) retroalimentação túbulo-glomerular – quando há reabsorção insuficiente de sódio pelos túbulos renais, este mecanismo reflexo leva a constrição glomerular aferente, assim reduzindo a filtração e a liberação e reabsorção de soluto tubular; 4) fatores de crescimento tubular medular – fator I de crescimento semelhante à insulina, fator de

crescimento epidérmico e fator de necrose tumoral, os quais em diferentes modelos animais mostraram que aceleram a recuperação após insuficiência renal aguda (26).

Como o trabalho associado à reabsorção de sal e água predispõe ao aparecimento de dano medular hipóxico, o rim terá vantagem terapêutica quando há volume circulante e carga de íons adequados, estando reduzida a necessidade de concentração da urina. Desse modo, haverá menor utilização de oxigênio medular. De modo contrário, as agressões associadas à hipóxia serão piores quando estiverem presentes outros fatores, como os AINEs, angiotensina II, alguns antibióticos, hipertrofia renal, íon cálcio, mioglobina, hiperbilirrubinemia e contrastes (26).

Combinação de retroalimentação túbulo-glomerular e excessiva estimulação do sistema renina-angiotensina muitas vezes leva a insuficiência renal aguda prolongada. A produção renal de prostaglandinas, substâncias vasodilatadoras, preserva a função renal durante aumento da atividade do sistema renina-angiotensina ou do sistema simpático renal. As ações vasoconstritoras da norepinefrina e angiotensina II são contrabalançadas pelas ações vasodilatadoras das prostaglandinas e a resistência renal não aumenta drasticamente, uma vez que quando a vasoconstrição é intensa e de longa duração pode ocorrer necrose tubular aguda (27).

Neste presente trabalho experimental, o maior estresse ocorreu durante períodos de hemorragia e hipotensão. No grupo G1, a redução da pressão arterial média foi intensa, havendo diferença estatisticamente significativa entre os momentos M1 e M3. Este perfil era o esperado, já que os animais sofreram sangria de 30% da volemia. Os animais do grupo G2 também apresentaram redução da pressão arterial média entre os momentos M1 e M3, porém não houve diferença significativa.

A isquemia causada por choque hipovolêmico leva o rim à falência como resultado de morte celular. A isquemia é o gatilho para uma série de distúrbios metabólicos que culminam com a morte celular, que ocorre por necrose ou apoptose. A necrose celular é o resultado da combinação de efeitos deletérios precipitados por agressão celular grave (28).

Rins isquêmicos sofrem de perda de adenosina trifosfato (ATP) devido à redução da disponibilidade de oxigênio e nutrientes (29). A gravidade e a duração necessárias de isquemia para gerar insuficiência renal aguda no homem são

desconhecidas, já que existe um intervalo de transição entre o estágio pré-renal e a necrose tubular aguda.

Esta pesquisa mimetizou, em ratos, uma situação real de perda volêmica sem prevenção de hipotermia, sendo observados os efeitos da isquemia renal resultante. Ambos os grupos, já em M1, apresentavam animais hipotérmicos. Nenhum método de aquecimento foi realizado nos animais estudados, e assim se reproduziu a situação de hipotermia que geralmente ocorre durante o ato operatório e que se intensifica em situação de hemorragia aguda.

Segundo Pannen (30), a incidência de hipotermia perioperatória é freqüentemente subestimada já que em 50% dos pacientes ocorre, no mínimo, redução de 2°C na temperatura corporal, caso medidas de aquecimento não sejam realizadas neste período. Hipotermia foi observada em ambos os grupos estudados desde o momento inicial da pesquisa, o que é plausível uma vez que o pentobarbital sódico induz a diminuição da temperatura corporal (31). Assumindo-se que ela protege o rim (32), ou não (33), poderia ter interferido nos resultados observados se ela não tivesse ocorrido nos animais dos dois grupos estudados. Yoshitomi et al. (33) observaram perda de células tubulares, necrose epitelial, edema intersticial e posterior desenvolvimento de insuficiência renal aguda após hipotermia acidental.

O hematócrito é a relação entre o volume de hemácias circulantes e o volume plasmático. Não é um bom indicador das alterações agudas da volemia, uma vez que, durante episódios hemorrágicos com perda de sangue total, a proporcionalidade entre volume plasmático e hemácias mantém-se até que mecanismos renais venham a atuar na preservação de íons sódio (34).

Tracey et al. (35) administraram TNF- α a ratos e observaram que ocorreu hemoconcentração. Com o estresse anestésico-cirúrgico ocorrido nos dois grupos experimentais, era esperado aumento de citocinas inflamatórias e isto pode ser observado nos resultados. O grupo que recebeu cetoprofeno (G2) apresentou resultado maior que o normal de TNF- α e IL-1 em M1 e M3. Os AINEs são agentes que reduzem a formação de prostaglandinas e estas atuam em via de retroalimentação negativa na formação de citocinas. Deste modo, sem a inibição das prostaglandinas, as citocinas estariam com concentração sérica elevada e elas determinam vasodilatação e hemoconcentração. Em G2, o hematócrito é significativamente maior que em G1.

Observando-se e analisando-se os resultados de hematócrito, de M1 para M3, pode-se quantificar a redução como de 23% em G1 e 15% em G2.

O AINE estudado nesta pesquisa, o cetoprofeno, é uma mistura de duas formas enantioméricas, isômeros *R* e *S*, em razão da presença de um átomo de carbono assimétrico na posição α da função carbonil. O enantiômero *R* do cetoprofeno é conhecido por sofrer inversão quiral para enantiômero *S*, *in vivo*, em várias espécies animais, exceto no homem e na cobaia (36, 37). É um antiinflamatório que bloqueia a ciclooxigenase constitutiva COX-1 e aquela que pode ser induzida, a COX-2, inibindo, como consequência, a produção de prostaglandinas (38). A ação antinociceptiva e antiinflamatória dos AINEs estaria relacionada, também, à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pela ação inibitória no fator nuclear NF- κ B (39).

Embora o papel antiinflamatório dos dois enantiômeros não esteja ainda completamente caracterizado, sabe-se que o *R*-cetoprofeno é inibidor fraco da COX, sendo aproximadamente de 100 a 1000 vezes menos potente que o enantiômero *S*, *in vitro* (37). Sendo assim, supõe-se que ele contribuiria pouco com o efeito antiinflamatório, mas estaria principalmente associado ao efeito analgésico. Por outro lado, o *S*-cetoprofeno inibe a produção de PGE₂ de modo eficaz, sendo considerado o maior responsável pela atividade antiinflamatória da forma racêmica e, também, pelos seus efeitos colaterais, como o aumento das citocinas inflamatórias (40).

Muitas citocinas têm papel essencial na determinação do processo inflamatório, especialmente IL-1 e TNF- α (41). As duas são consideradas mediadoras fundamentais das respostas biológicas ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, também chamado endotoxina), por exemplo. A IL-1 compreende dois polipeptídeos distintos, IL-1 α e IL-1 β , que se ligam aos mesmos receptores de membrana e produzem respostas biológicas similares. Em pacientes com inflamação ativa, as concentrações plasmáticas de IL-1 estão elevadas.

O papel dos AINEs na inflamação apresenta múltiplas facetas. Por exemplo, o agente antiinflamatório etodolaco, em outras espécies animais e em diferentes órgãos, apresenta respostas de diferentes nuances. Assim, Inoue et al. (42) demonstraram que ele suprime a biossíntese de PGE₂ estimulada pela IL-1 β em condrócitos de coelhos, mas tem ação menor de supressão da biossíntese espontânea de PGE₂ em células epiteliais gástricas de coelhos e em células de rins de cães.

A IL-1, importante produto da estimulação de monócitos, é responsável por diversos efeitos biológicos e, dentre os sistêmicos de interesse para a presente pesquisa, podem ser aqui destacados a febre (o aumento da temperatura é por ação hipotalâmica, que o TNF- α também apresenta) e a hipotensão. *In vitro*, obtém-se formação de coágulo e congestão vascular. A IL-1 aumenta dramaticamente os metabólitos do ácido aracônico em uma variedade de células e o aumento da síntese da prostaglandina E₂ é responsável por suas propriedades inflamatórias. O TNF- α divide com a IL-1 muitos dos seus efeitos sistêmicos e locais, o que não ocorre com alguns efeitos observados *in vitro*. A combinação de TNF- α e IL-1 freqüentemente provoca resposta inflamatória bastante aumentada e, como as duas citocinas são produzidas em grandes quantidades após estímulo apropriado, o resultado final para o organismo é o efeito combinado de ambas (43).

O TNF- α é uma citocina com papel chave em inflamação, como ficou demonstrado pela eficácia clínica de anticorpos antiTNF- α em artrite reumatóide e doença de Crohn (44, 45). Paradoxalmente, entretanto, os AINEs aparentemente aumentariam, em vez de inibir, a produção de TNF- α . De fato, há relatos de que os AINEs induzem diretamente a liberação de TNF- α *in vitro* e *in vivo* (46, 47, 48).

Endres et al. (49) quantificaram a produção de IL-1 β , IL-1 α e TNF- α 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 β e IL-1 α , a produção de IL-1 β aumenta com o uso, por via oral, de inibidores da ciclooxigenase.

Também, segundo Endres et al. (49), a maior produção de TNF- α seria devida à inibição da síntese de PGE₂, porque normalmente as prostaglandinas inibem a produção *in vitro* de TNF- α e IL-1. Desde que se sabe que as prostaglandinas são produzidas *in vivo* e *in vitro* sob estímulo das citocinas, este pode ser mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativo que limita a produção de citocinas. O AINE ibuprofeno aumentou as concentrações sanguíneas de TNF- α e IL-6 em voluntários humanos após ter-lhes sido injetada a endotoxina LPS (lipopolissacáride) (50). Em camundongos, Sironi et al. (51) também observaram que as prostaglandinas podem, fisiologicamente, prover regulação de *feedback* negativo de IL-6 e TNF- α .

No presente estudo, o grupo que recebeu apenas pentobarbital sódico mostrou elevação sangüínea da citocina pró-inflamatórias TNF- α já no primeiro momento do experimento (controle e coincidente com a primeira hemorragia). Este momento, M1, ocorreu após 60 minutos da administração do AINE cetoprofeno, em G2, e o tempo correspondente, em G1. Deve-se levar em consideração que a anestesia intraperitoneal já é uma agressão capaz de levar à resposta inflamatória, o mesmo acontecendo com a incisão no pescoço dos animais para a dissecação e canulação da veia jugular e artéria carótida. Este resultado de M1 pode ser visto como esperado.

Em M1 de G2, ambas as citocinas, TNF- α e IL-1, estavam com valores significativamente mais altos que os normais e o de TNF- α de G1. Em G2, foi administrado o cetoprofeno e, então, também se esperava este comportamento – a formação de prostaglandinas pelo ácido aracdônico estava bloqueada e estas substâncias inibem a formação de TNF- α e IL-1, o que não ocorria em G1 (23, 49).

Ayala et al. (52) já haviam demonstrado, no camundongo, que a hemorragia, na ausência de trauma tecidual significativo, determinava aumento da liberação de TNF- α sem que este fato fosse resultado de elevação de endotoxina no animal. Em seu experimento, as concentrações desta citocina eram altas com 30 minutos de hemorragia e permaneceram assim mesmo duas horas após ressuscitação, mas não após quatro horas.

Muitos estudos experimentais focalizaram-se na produção de TNF- α em hemorragia grave (perda de 50% da volemia) ou hemorragia prolongada com restituição fluídica (53, 54, 55). Esta citocina pró-inflamatória foi bem identificada como a de maior importância durante os eventos de isquemia e reperfusão relacionados com a hemorragia (56, 57, 19). A TNF- α expressa-se após hemorragia (54, 58), tem papel importante na inflamação excessiva, autodestrutiva, induzindo, no final, falência de múltiplos órgãos através da ativação de neutrófilos (59). Roumen et al. (60) já haviam pesquisado e encontrado, no homem, após trauma grave, choque hemorrágico e ruptura de aneurisma de aorta abdominal, concentração aumentada de TNF- α , IL-1 β e IL-6. A citocina TNF- α é também conhecida como sendo o gatilho para liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β (43, 61). Além disso, a potência da TNF- α na indução da ativação de neutrófilos é muito maior que a de outras citocinas (62). No presente experimento, sua imunomarcção é intensa nos rins dos animais dos dois

grupos experimentais. Contudo, os animais de G2 apresentaram menos degeneração e necrose que os animais de G1. Ou seja, não é provável que o TNF- α seja a citocina implicada nesta diferença de comportamento.

Neste estudo, os valores sanguíneos de TNF- α , que já estavam elevados em M1, em G1 e G2, porém muito mais neste último grupo, continuaram a aumentar até M3 de G1, mas diminuíram em M3 de G2, embora ainda permanecendo elevados em relação ao normal. Os valores de IL-1 estavam aumentados apenas em M1 de G2 porque em M1 de G1 ainda eram normais, mas também se elevaram em seu M3, enquanto que diminuíram em M3 de G2. Ao final do experimento, 110 minutos desde que a dissecação no pescoço dos animais se completara, os resultados das duas citocinas eram altos em ambos os grupos, em relação ao normal, porém eram muito mais altos em G1. A meia-vida do cetoprofeno é de $1,8 \pm 0,4$ h (63), portanto, em M3, a ação deste AINE já teria declinado em algum grau (não se pode esquecer, porém, que, na situação de hemorragia sem ressuscitação, estaria diminuída a depuração plasmática do cetoprofeno) e a produção de prostaglandinas já estaria sendo restaurada no organismo e a inibição de citocinas estaria ocorrendo em G2. Em G1, os acontecimentos seguiram outros caminhos, uma vez que não recebeu antiinflamatório.

Peng et al. (64) pesquisaram as alterações fisiológicas durante choque hemorrágico cumulativo em ratos conscientes, comparando-as com as de ratos anestesiados com pentobarbital sódico administrado por via venosa. Estes sofreram perda volêmica igual à dos animais deste presente estudo, ou seja, 30%. Os autores estudaram as concentrações de TNF- α e IL-1 β quando da hemorragia e não encontraram alterações destas citocinas no plasma dos animais anestesiados, tendo as mesmas se elevado nos ratos conscientes. A pressão arterial neste grupo com anestesia também foi diferente, sendo significativamente mais baixa que a dos grupos que permaneceram conscientes. A inserção de cateteres nos animais para a retirada de sangue foi realizada no dia anterior ao do experimento, de tal modo que, no dia do experimento, nenhuma instrumentação cirúrgica ocorreu, ou seja, não houve estímulo para maior produção de citocinas pró-inflamatórias, além da hemorragia.

Por outro lado, os animais de G1 apresentaram hipotensão significativa, mas este fato não ocorreu com os animais de G2, nos quais foi observada diminuição biológica da pressão arterial média, porém sem significância estatística. A primeira consequência

desta diferença de comportamento entre os grupos seria a suposição de que os melhores resultados histológicos observados em G2 poderiam ser decorrentes deste fato. Ocorre que no estudo de Silva et al. (23), cujo modelo é idêntico ao desta atual pesquisa, não houve diferença significativa entre as hipotensões arteriais observadas em ambos os grupos e, ainda assim, o grupo que recebeu o cetoprofeno também mostrou melhor resultado histológico.

Na detecção imuno-histoquímica renal das citocinas TNF- α e IL-1, verifica-se que nos dois grupos há imunomarcação intensa de TNF- α . Contudo, em G1, a imunomarcação também é intensa para IL-1 que, em G2, é de leve expressão em células tubulares e mesangiais glomerulares.

A IL-1 é o componente central de muitos processos inflamatórios agudos. O bloqueio do receptor IL-1 com um antagonista atenua a lesão por isquemia e reperfusão no cérebro, coração e fígado. Contudo, o papel da IL-1 na lesão renal por isquemia e reperfusão não é totalmente conhecido (22). Sabe-se que a ausência de receptor IL-1 não protege contra lesão renal de isquemia e reperfusão no camundongo KO (22). Neste presente estudo, sua expressão foi de leve intensidade em rins de animais que exibiram menos degeneração e necrose que os de animais controles, após episódios de hemorragia aguda, sugerindo que o cetoprofeno, além de inibir a produção de prostaglandinas, diminuiria a síntese de IL-1 pelas células tubulares e mesangiais glomerulares.

Sato et al. (65) estudaram, no rato, o papel do TNF- α na disfunção renal após hemorragia leve (16,5% da volemia) sem ressuscitação fluídica. Para tanto, utilizaram o composto FR167653. Este antagoniza uma via de sinal intracelular com importante papel na expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Após uma hora de hemorragia, a expressão do mRNA de TNF- α no rim e as concentrações séricas de TNF- α estavam mais altas. O tratamento intraperitoneal prévio com FR167653 inibiu significativamente o aumento de TNF- α . A infiltração de células inflamatórias e a lesão celular tubular, induzidas pela hemorragia, foram suprimidas e a disfunção renal foi dramaticamente reduzida no grupo que recebeu o tratamento com o referido composto. As alterações morfológicas também foram mais leves no grupo tratado, quando se comparou este ao grupo não tratado.

Sato et al. (66) desenvolveram outro estudo em ratos para determinar o papel da proteína cinase ativada pelo mitógeno p38 (MAPK) na disfunção renal após choque hemorrágico. A MAPK é mediadora-chave em doenças que se caracterizam por inflamação e tem papel importante na via de sinalização intracelular, sendo ativada em situações de isquemia. A sua ativação promove respostas de estresse celular, como proliferação, diferenciação e produção de citocinas pró-inflamatórias. Os autores demonstraram que a p38 MAPK renal foi ativada em choque hemorrágico, tendo promovido a expressão de citocinas pró-inflamatórias no rim e, como consequência, desenvolvido disfunção renal. Esta cinase seria, então, essencial para que ocorresse lesão renal após choque hemorrágico.

A linha de células mesangiais dos vasos sanguíneos do glomérulo renal fornece suporte estrutural e regula a ultrafiltração glomerular (67). Estas células mesangiais expressam receptores de TNF- α (68). Elas também apresentam alterações em seu fenótipo durante inflamação glomerular, tornando-se proliferativas, secretando miofibroblastos da matriz antes de serem eliminadas por apoptose (69). A apoptose foi identificada como o mecanismo responsável pelo desaparecimento de miofibroblastos em excesso na conclusão da resposta inflamatória no glomérulo renal (70). No glomérulo de pacientes com glomerulonefrite, foram detectados corpos apoptóticos como resposta compensatória, instigando a contrabalançar a hiper celularidade mesangial e, assim, permitindo que a estrutura e função normais retornassem (70).

Ishaque et al. (68) demonstraram que a inibição seletiva da ciclooxigenase-2 (COX-2) pode aumentar a apoptose pela TNF- α em condições de inflamação crônica.

A citocina TNF- α pode, também, estimular a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β (71). Já ficou demonstrado por vários estudos, que utilizaram culturas primárias de células mesangiais de ratos, que esta interleucina aumenta os níveis de COX-2. O TNF- α sozinho tem pequeno efeito na COX-2, mas a combinação TNF- α e IL-1 β aumenta dramaticamente a expressão desta ciclooxigenase (72).

Pesquisa experimental (73) com ratos anestesiados pelo pentobarbital sódico, nos quais se realizou, após nefrectomia direita, clampeamento de artéria renal esquerda por 90 minutos, mostrou que houve intensificação da expressão de COX-2 e lipooxigenases nas células endoteliais renais já com uma hora e meia de reperfusão. A

expressão dessas duas enzimas é observada apenas nas células endoteliais renais em rins normais. Os autores acreditam que este resultado que obtiveram sugere que há relação entre este aumento da expressão enzimática e a lesão por isquemia e reperfusão.

A marcação imuno-histoquímica dos rins dos ratos de G2, grupo no qual a degeneração tubular e a necrose foram menos acentuadas, mostra maior evidência de TNF- α sobre IL-1. Enquanto alguns autores sugerem que o TNF- α está envolvido na fase tardia da degeneração renal associada à agressão da isquemia e reperfusão, seu papel na fase aguda ainda não é claro (74, 19). Entretanto, esta agressão induz macrófagos renais, e provavelmente células do parênquima renal, a liberar citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1, as quais promovem lesão parenquimatosa por dano direto, via apoptose, e recrutamento de neutrófilos que liberam metabólitos reativos de oxigênio e proteases (19). A ligação do TNF- α ao receptor pode induzir apoptose de células renais, sendo esta a maior causa de morte celular associada à lesão renal por isquemia e reperfusão (19).

TNF- α reduz o fluxo sanguíneo e a filtração glomerulares, induz a síntese de outros mediadores pró-inflamatórios, aumenta a permeabilidade do glomérulo para a albumina e determina deposição de fibrina no mesmo, estimulando a infiltração celular. A redução tanto do fluxo quanto da filtração glomerulares seria pela estimulação das células mesangiais a produzirem vasoconstritores (fator de ativação plaquetária, endotelina-1, prostaglandinas) e vasodilatadores (adenosina, óxido nítrico, prostaglandinas) (19). TNF- α também estimula a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células mesangiais e de outros pirógenos endógenos, incluindo IL-1 (19). Estes mediadores, por sua vez, provocam disfunção celular e orgânica. As espécies reativas de oxigênio e a IL-1 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.

O TNF- α recruta neutrófilos e monócitos para o rim e aumenta sua adesão às células glomerulares. Induz, também, a expressão da molécula de adesão intercelular nas células mesangiais e a expressão superficial de ligantes para selectina-L nas células endoteliais glomerulares. Isto promove rápida adesão de neutrófilos e monócitos às células glomerulares. Além disso, as células mesangiais ativadas atraem leucócitos polimorfonucleares e monócitos. Desse modo, TNF- α promove disfunção renal por

citotoxicidade direta, vasoconstrição, fluxo sanguíneo renal diminuído e recrutamento de neutrófilos e monócitos (19).

Os animais de G2, em M1, momento coincidente com a primeira hemorragia, apresentavam concentrações séricas dramaticamente altas de ambas as citocinas estudadas. O próprio estresse anestésico-cirúrgico já teria induzido maiores níveis de TNF- α e IL-1, mas, além disso, não se pode descartar a inibição, pelo cetoprofeno, da formação das prostaglandinas, substâncias que normalmente são responsáveis pela inibição de citocinas, como o TNF- α . Acredita-se, também, que o efeito inibitório da produção de TNF- α pela prostaglandina seja mediado pela elevação dos níveis de IL-10 (75). Esta citocina possui atividade antiinflamatória pela sua capacidade de inibir a produção de TNF- α (76). Assim, a inibição da IL-10 poderia estar associada à elevação de TNF- α , e vários efeitos terapêuticos causados pelo cetoprofeno poderiam ser parcialmente mascarados, devido a esses efeitos não desejados relacionados à produção dessas citocinas (77). Portanto, este processo provavelmente estivesse ocorrendo neste grupo de animais, ou seja, inibição da prostaglandina, com conseqüente diminuição da IL-10 e aumento dos níveis de TNF- α e IL-1. Em M3 de G2, observa-se diminuição dos valores séricos de TNF- α e IL-1. Isto ocorreu provavelmente porque a ação do cetoprofeno já estivesse diminuindo e a produção da prostaglandina, sendo restaurada, mas ainda em valores baixos, estivesse levando ao aumento na produção de IL-10 e, como conseqüência, diminuição das concentrações de TNF- α e IL-1, quando comparadas às detectadas no mesmo grupo, em M1. Neste estudo, não foi dosada a IL-10, substância antiinflamatória. Contudo, este mecanismo poderia explicar os resultados observados, ou seja, melhores resultados histológicos devido à atuação da IL-10 diminuindo os efeitos deletérios de uma resposta imune exacerbada pelas altas concentrações de TNF- α e IL-1. Assim, este mecanismo teria protegido o organismo, reduzindo a citotoxicidade e a inflamação.

Em G1 ocorreu o oposto no soro dos animais com relação ao comportamento das citocinas. No início, em M1, as concentrações foram próximas das normais, provavelmente devido à ação da prostaglandina, uma vez que o estresse também poderia ser responsável pelo aumento desta substância, ocorrendo aumento dos níveis de IL-10. Este aumento, por sua vez, seria responsável pela inibição dos níveis de TNF- α , embora estes ainda fossem maiores que os dos controles, devido à presença do estresse

anestésico-cirúrgico. Em M3, foram detectadas altas concentrações de TNF- α e IL-1, mas estavam em curso o estresse cirúrgico, que é acompanhado por resposta hipermetabólica, e o tempo de 30 minutos após a retirada de 30% de volemia, sem ressuscitação adequada. Neste caso, as altas concentrações de TNF- α e IL-1 conseqüentes ao elevado processo inflamatório, acompanhadas por prováveis níveis elevados de IL-10, decorrentes das altas concentrações de prostaglandinas, poderiam atuar, em G1, não como antiinflamatórios, mas como elementos que contribuíam para os efeitos deletérios que foram observados, como piora histológica e maior hipotensão.

Young et al. (78) lembraram que TNF- α e IL-1 foram muitas vezes consideradas como citocinas que agem por vias moleculares e celulares comuns. Contudo, trabalhando com camundongos, investigaram a existência de diferenças nos mecanismos pelos quais elas determinam a migração de leucócitos do leito vascular para o tecido extravascular, obtendo resultados que fornecem evidências de que há mecanismos divergentes de ação para essas duas substâncias.

Considerações Finais

O cetoprofeno, apesar de inibir a prostaglandina, que é uma substância vasodilatadora importante em situação de hemorragia, não provocou as alterações histológicas renais mais acentuadas, quando se comparou o grupo que o recebeu com aquele que não o recebeu. Pelo contrário, o grupo com o antiinflamatório apresentou menos degeneração e necrose renais. A ação do cetoprofeno na expressão das citocinas IL-1 e TNF- α pode explicar tal evento. A combinação de TNF- α e IL-1 provoca, no organismo, o efeito combinado de ambas. Os AINEs induzem diretamente ou indiretamente a liberação de TNF- α e esta citocina tem papel conhecido na lesão renal por isquemia após hemorragia. Entretanto, o efeito da IL-1 nessas ocasiões ainda não é plenamente conhecido. A imunomarcção renal revelou diminuição da citocina pró-inflamatória IL-1 em rins do grupo G2, demonstrando que pode ter ocorrido a inibição local da produção de IL-1 após administração de cetoprofeno, fato que poderia ser o responsável pelo melhor resultado histológico. Entretanto, o assunto é complexo e ainda incompletamente elucidado.

Conclusão

Este estudo mostrou que no rim de rato que recebeu cetoprofeno antes de ocorrer hemorragia aguda sem ressuscitação fluídica houve intensa expressão de TNF- α e leve de IL-1. Conclui-se que a expressão leve de IL-1 poderia explicar o melhor resultado histológico que ocorreu no grupo do cetoprofeno em relação ao controle. Entretanto, outros estudos são necessários para melhor elucidar o assunto.

Referências

1. 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.
2. Vander AJ. *Renal Physiology.* New York: McGraw-Hill Inc. Health Professions Division, 1995.
3. Dunn MJ, Zambraski EJ. Renal effects of drugs that inhibit prostaglandin synthesis. *Kidney Int.* 1980;18:609-622.
4. Colletti AE, Vogl HW, Rahe T. Effects of acetaminophen and ibuprofen on renal function in anesthetized normal and sodium-depleted dogs. *J Appl Physiol.* 1999;86:592-597.
5. Marret E, Bonnet F. Perioperative anti-inflammatory drug use: which evidences for their utility and safety ? *Ann Fr Anesth Reanim.* 2007;26:535-539.
6. Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res.* 1995;44:1-10.
7. Yaksh TL, Dirig DM, Malmberg AB. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Invest.* 1998;16:509-527.
8. Whodzimierz W, Renata Z, Jerzy W, et al. Influence of pre-operative Ketoprofen administration (Preemptive analgesia) on analgesic requirement and the level of prostaglandins in the early postoperative period. *Pol J Pharmacol.* 2004;56:547-552.
9. Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE. Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction . *Arch Surg.* 1981;116:1309-1317.
10. Thiagarajan RR, Winn RK, Harlan JM. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia – reperfusion injury. *Thromb Hoemost.* 1997;78:310-314.
11. Grace PA. Ischemic – reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994;81:637-647.

12. Okusa M. The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron*. 2002;90:133-138.
13. Linas S, Whittenburg D, Parsons P, Repine J. Mild renal ischemia activates primed neutrophils to cause acute renal failure. *Kidney Int*. 1992;42:610-616.
14. Lauriat S, Linas SL. The role of neutrophils in acute renal failure. *Semin Nephrol*. 1998;18:498-504.
15. Kraychete DC, Calasans MT, Valente CM. Citocinas pró- inflamatórias e dor. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46:199-206.
16. Lien YH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemic / reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci*. 2003;74:543-552.
17. 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.
18. Sheldon J, Riches P. Citocinas inflamatorias. *Rev Chil Infectol*. 1999;8:165-176.
19. 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.
20. Tesch GH, Yang N, Yu H, et al. 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.
21. 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.
22. Haq M, Norman J, Saba SR, et al. Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:614-619.
23. Silva MS, Castiglia YMM, Vianna PTG, et al. Rat model of depending prostaglandin renal state. Effect of ketoprofen. *Ren Fail*. 2006;28:77-84.

24. Cheng YJ, Chien CT, Wang YP, et al. Fluid administration prevents renal dysfunction during hypotension under spinal anesthesia in a rat model. *Acta Anaesthesiol Sin.* 2003;41:7-12.
25. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 3rd ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc Simon & Schuster/Aviacom Company, 1996.
26. Sear JW. Kidney dysfunction in the postoperative period. *Br J Anaesth.* 2005;95:20-32.
27. Bennett WM, Henrich WL, Stoff IS. The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs:summary and recommendations. *Am J Kidney Dis.* 1996;28:56-62.
28. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol.* 1998;18:505-518.
29. Wirthensohn G, Guder WG. Renal substrate metabolism. *Physiol Rev.* 1986;66:469-497.
30. Pannen BH. Normothermia and hypothermia from an anaesthesiological viewpoint. *Anaesthesist.* 2007;20:234-239.
31. Castiglia YMM, Braz JRC, Vianna PTG et al. Effect of high dose fentanyl on renal function in dogs. *Sao Paulo Med J.* 1997;115:1433-1439.
32. Zager RA, Altschuld B. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol.* 1986;251(1Pt2):F87-93.
33. Yoshitomi Y, Kojima S, Ogi M, Kuramochi M. Acute renal failure in accidental hypothermia of cold water immersion. *Am J Kidney Dis.* 1998;31:856-859.
34. Grocott MP, Mythen MG, Gan TJ. Perioperative fluid management and clinical outcomes in adults. *Anesth Analg.* 2005;100:1093-1106.
35. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science.* 1986;234:470-

36. 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.
37. 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.
38. Likar R, Krumpholz R, Mathiaschitz K et al. The preemptive action of ketoprofen. Randomized, double-blind study with gynecologic operations. *Anaesthesist.* 1997; 46:186-190.
39. Lee J, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol.* 1998;38:981-993.
40. Mauleon D, Artigas R, Garcia ML, Carganico G. Preclinical and clinical development of dexketoprofen. *Drugs.* 1996;52:24-46.
41. Dempsey PW, Doyle SE, He JG, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:193-209.
42. Inoue K, Motonaga A, Dainaka J et al. Effect of etodolac on prostaglandin E2 biosynthesis, active oxygen generation and bradykinin formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1994;51:457-462.
43. Dinarello CA. The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett.* 1987;16:227-231.
44. Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M et al. Randomised double-blinded comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1994;344:1105-1110.
45. Stack WA, Mann SD, Roy AJ et al. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumor necrosis factor- α in Crohn's disease. *Lancet.* 1997;349:521-524.

46. Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M et al. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: Role of tumor necrosis factor- α . *Gut*. 1994;35:909-915.
47. Tsuboi I, Tanaka H, Nakao M et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production in human lymphocytes: Up regulation of TNF, IFN- γ and IL-2, in contrast to down-regulation of IL-6 production. *Cytokine*. 1995;7:372-379.
48. Appleyard CB, McCafferty DM, Tigley AW et al. Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: Role of leukocyte adherence. *Am J Physiol*. 1996;270:42-48.
49. Endres S, Cannon JG, Ghorbani R et al. 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.
50. Spinaz GA, Bloesch D, Keller U et al. Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. *J Infect Dis*. 1991;163:89-95.
51. Sironi M, Gadina M, Kankova M et al. Differential sensitivity of *in vivo* TNF and IL-6 production to modulation by anti-inflammatory drugs in mice. *Int J Immunopharmac*. 1992;14:1045-1050.
52. Ayala A, Perrin MM, Meldrum DR et al.. Hemorrhage induces an increase in serum TNF which is not associated with elevated levels of endotoxin. *Cytokine*. 1990;2:170-174.
53. Abraham E, Jesmok G, Tuder R et al.. Contribution of tumor necrosis factor-alpha to pulmonary cytokine expression and lung injury after hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med*. 1995;23:1319-1326.
54. Jiang J, Tian K, Diao Y, et al. . Expression of TNF alpha, IK-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;12:41-42.

55. Tani T, Fujino M, Hanasawa K et al. Bacterial translocation and tumor necrosis factor-alpha gene expression in experimental hemorrhage shock. *Crit Care Med.* 2000;28:3705-3709.
56. Caty MG, Guice KS, Oldham KT et al. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg.* 1990;212:694-700.
57. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, et al. 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.
58. Guo W, Ding J, Huang Q, et al. Alterations in intestinal bacterial flora modulate the systemic cytokine response to hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1995;269:827-832.
59. Donnahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R, et al. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFκB and increases TNF-α bioactivity in the kidney. *J Urol.* 2000;163:1328-1332
60. Roumen RM, Hendriks T, Van Der Ven-Jongekrijg J et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg.* 1993;218:769-776.
61. Suijters AJ, Foulkes R, Opal SM 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.
62. Suzuki K, Hino M, Kutsuna H et al. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1β. *J Immunol.* 2001;167:5940-5947.
63. Brooks PM, Day RO. Non steroidal anti-inflammatory drugs – Differences and similarities. *N Engl J Med.* 1991;324:1716-1725.

64. Peng TC, Liao KW, Lai HL et al. The physiological changes of cumulative hemorrhagic shock in conscious rats. *J Biomed Sci.* 2006;13:385-394.
65. Sato H, Tanaka T, Kita T et al. The role of tumour necrosis factor- α in renal dysfunction following mild haemorrhage in rats. *Int J Exp Path.* 2004;85:345-353.
66. Sato H, Tanaka T, Kasai K et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on renal dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *Shock.* 2005;24:488-494.
67. Davies M. The mesangial cell: a tissue culture view. *Kidney Int.* 1994;45:320-327.
68. Ishaque A, Dunn MJ, Sorokin A. Cyclooxygenase-2 inhibits tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in renal glomerular mesangial cells. *J Biol Chem.* 2003;278:10629-10640.
69. Johnson RJ, Floege J, Yoshimura A et al. The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"? *J Am Soc Nephrol.* 1992;2:190-197.
70. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, et al. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest.* 1994;94:2105-2116.
71. Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Marx M. Cytokines and mesangial cells. *Kidney Int.* 1993;39:26-31.
72. Coyne DW, Nickols M, Bertrand W, Morrison AR. Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids. *Am J Physiol.* 1992;263:97-102.
73. Matsuyama M, Nakatani T, Hase T et al. The expression of cyclooxygenases and lipoxygenases in renal ischemia-reperfusion injury. *Transpl Proc.* 2004;36:1939-1942.
74. Azuma H, Nadeau K, Takada M et al. Cellular and molecular predictor of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation.* 1997;64:190-197.

75. Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F et al. 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.
76. Howard M, O'Garra A, Ishida H et al. Biological properties of interleukin-10. *J Clin Immunol.* 1992;12:239-247.
77. Mascagni P, Sabbatini V, Biordi L et al. R- and S-isomers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11:185-192.
78. Young RE, Thompson RD, Nourshargh S. Divergent mechanisms of action of the inflammatory cytokines interleukin 1- β and tumour necrosis factor- α in mouse cremasteric venules. *Br J Pharmacol.* 2002;137:1237-1246.

Anexos

Tabela 9 - Pressão arterial média (PAM) em mmHg, com média e desvio padrão, dos ratos de G1 nos três momentos estudados.

| | PAM | | |
|----------------|--------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | 120 | 45 | 27 |
| rato 2 | 115 | 100 | 70 |
| rato 3 | 72 | 79 | 51 |
| rato 4 | 122 | 40 | 34 |
| rato 5 | 46 | 40 | 22 |
| rato 6 | 132 | 35 | 25 |
| rato 7 | 113 | 47 | 25 |
| rato 8 | 142 | 130 | 47 |
| rato 9 | 130 | 97 | 46 |
| rato 10 | 139 | 59 | 37 |
| Média | 113,10 | 67,20 | 38,40 |
| ± DP | 30,68 | 32,54 | 15,16 |

Tabela 10 - Pressão arterial média (PAM) em mmHg, com média e desvio padrão, dos ratos de G2 nos três momentos estudados.

| | PAM | | |
|----------------|--------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | 119 | 92 | 106 |
| rato 2 | 171 | 46 | 33 |
| rato 3 | 92 | 84 | 100 |
| rato 4 | 112 | 110 | 117 |
| rato 5 | 78 | 98 | 125 |
| rato 6 | 122 | 104 | 117 |
| rato 7 | 92 | 102 | 78 |
| rato 8 | 112 | 110 | 101 |
| rato 9 | 93 | 100 | 108 |
| rato 10 | 111 | 104 | 83 |
| Média | 110,20 | 95,00 | 96,80 |
| ± DP | 25,64 | 18,93 | 26,80 |

Tabela 11 - Temperatura retal (T) em °C, com média e desvio padrão, dos ratos de G1 nos três momentos estudados.

| | T | | |
|----------------|-------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | 36,0 | 36,0 | 35,0 |
| rato 2 | 35,0 | 33,0 | 31,0 |
| rato 3 | 33,3 | 34,9 | 35,5 |
| rato 4 | 36,8 | 36,4 | 34,1 |
| rato 5 | 37,9 | 36,6 | 37,2 |
| rato 6 | 34,2 | 33,5 | 36,3 |
| rato 7 | 34,5 | 35,3 | 35,7 |
| rato 8 | 39,1 | 35,9 | 35,6 |
| rato 9 | 37,1 | 36,4 | 35,3 |
| rato 10 | 35,2 | 35,0 | 34,6 |
| Média | 35,91 | 35,30 | 35,03 |
| ± DP | 1,81 | 1,24 | 1,66 |

Tabela 12 - Temperatura retal (T) em °C, com média e desvio padrão, dos ratos de G2 nos três momentos estudados.

| | T | | |
|----------------|-------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | 37,2 | 36,0 | 35,0 |
| rato 2 | 37,6 | 36,6 | 35,4 |
| rato 3 | 35,7 | 35,1 | 34,1 |
| rato 4 | 35,6 | 35,3 | 34,7 |
| rato 5 | 32,5 | 31,0 | 30,0 |
| rato 6 | 34,0 | 33,5 | 33,1 |
| rato 7 | 32,5 | 31,0 | 30,0 |
| rato 8 | 32,9 | 32,5 | 32,9 |
| rato 9 | 32,8 | 32,1 | 31,8 |
| rato 10 | 33,9 | 33,0 | 32,6 |
| Média | 34,47 | 33,61 | 32,96 |
| ± DP | 1,93 | 2,03 | 1,93 |

Tabela 13 - Hematórito (Ht) em %, com média e desvio padrão, dos ratos de G1 nos três momentos estudados.

| | Ht | | |
|----------------|-------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | 37 | 32 | 30 |
| rato 2 | 42 | 35 | 33 |
| rato 3 | 42 | 31 | 34 |
| rato 4 | 43 | 37 | 33 |
| rato 5 | 38 | 33 | 30 |
| rato 6 | 44 | 38 | 36 |
| rato 7 | 43 | 43 | 38 |
| rato 8 | 46 | 38 | 32 |
| rato 9 | 48 | 44 | 40 |
| rato 10 | 53 | 43 | 35 |
| Média | 43,60 | 37,40 | 34,10 |
| ± DP | 4,65 | 4,74 | 3,25 |

Tabela 14 - Hematórito (Ht) em %, com média e desvio padrão, dos ratos de G2 nos três momentos estudados.

| | Ht | | |
|----------------|-------|-------|-------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | 44 | 40 | 43 |
| rato 2 | 45 | 42 | 40 |
| rato 3 | 38 | 40 | 55 |
| rato 4 | 54 | 47 | 47 |
| rato 5 | 56 | 46 | 44 |
| rato 6 | 60 | 50 | 42 |
| rato 7 | 55 | 52 | 40 |
| rato 8 | 53 | 53 | 50 |
| rato 9 | 48 | 44 | 40 |
| rato 10 | 53 | 43 | 35 |
| Média | 50,60 | 45,70 | 43,60 |
| ± DP | 6,67 | 4,74 | 5,76 |

Tabela 15 - Estimativa da frequência cardíaca (FC), batimentos por minuto, dos ratos de G1 nos três momentos estudados.

| | FC | | |
|----------------|------|------|------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | >250 | 117 | 240 |
| rato 2 | >250 | >250 | 240 |
| rato 3 | >250 | >250 | 170 |
| rato 4 | >250 | 222 | 217 |
| rato 5 | >250 | >250 | >250 |
| rato 6 | 214 | 220 | 181 |
| rato 7 | >250 | 206 | 171 |
| rato 8 | >250 | >250 | >250 |
| rato 9 | >250 | >250 | >250 |
| rato 10 | >250 | >250 | 214 |

Tabela 16 - Estimativa da frequência cardíaca (FC), batimentos por minuto, dos ratos de G2 nos três momentos estudados.

| | FC | | |
|----------------|------|------|------|
| | M1 | M2 | M3 |
| rato 1 | >250 | >250 | >250 |
| rato 2 | >250 | >250 | >250 |
| rato 3 | >250 | >250 | >250 |
| rato 4 | >250 | >250 | >250 |
| rato 5 | 240 | 250 | 214 |
| rato 6 | >250 | >250 | >250 |
| rato 7 | >250 | 250 | 206 |
| rato 8 | >250 | 250 | 222 |
| rato 9 | >250 | >250 | >250 |
| rato 10 | >250 | >250 | 240 |

Tabela 17 - Concentração sanguínea de citocina TNF- α em pg. mL⁻¹, com média e desvio padrão, dos ratos de G1 nos momentos M1 e M3.

| | TNF- α | |
|----------------|---------------|--------|
| | M1 | M3 |
| rato 1 | 284 | 278 |
| rato 2 | 218 | 527 |
| rato 3 | 222 | 488 |
| rato 4 | 121 | 784 |
| rato 5 | 105 | 389 |
| rato 6 | 217 | 617 |
| rato 7 | 184 | 481 |
| rato 8 | 189 | 436 |
| rato 9 | 207 | 515 |
| rato 10 | 216 | 610 |
| Média | 196,30 | 512,50 |
| ± DP | 51,60 | 138,26 |

Tabela 18 - Concentração sanguínea de citocina TNF- α em pg. mL⁻¹, com média e desvio padrão, dos ratos de G2 nos momentos M1 e M3.

| | TNF- α | |
|----------------|---------------|--------|
| | M1 | M3 |
| rato 1 | 317 | 288 |
| rato 2 | 231 | 304 |
| rato 3 | 346 | 276 |
| rato 4 | 323 | 217 |
| rato 5 | 381 | 188 |
| rato 6 | 364 | 201 |
| rato 7 | 412 | 294 |
| rato 8 | 321 | 210 |
| rato 9 | 267 | 180 |
| rato 10 | 494 | 246 |
| Média | 345,60 | 240,40 |
| ± DP | 73,99 | 47,02 |

Tabela 19 - Concentração sanguínea de citocina IL-1 em pg. mL⁻¹, com média e desvio padrão, dos ratos de G1 nos momentos M1 e M3.

| | IL-1 | |
|----------------|-------------|-----------|
| | M1 | M3 |
| rato 1 | 188 | 247 |
| rato 2 | 164 | 389 |
| rato 3 | 110 | 214 |
| rato 4 | 191 | 306 |
| rato 5 | 126 | 421 |
| rato 6 | 210 | 426 |
| rato 7 | 98 | 344 |
| rato 8 | 180 | 251 |
| rato 9 | 127 | 263 |
| rato 10 | 117 | 304 |
| Média | 151,10 | 316,50 |
| ± DP | 39,87 | 75,78 |

Tabela 20 - Concentração sanguínea de citocina IL-1 em pg. mL⁻¹, com média e desvio padrão dos ratos de G2 nos momentos M1 e M3.

| | IL-1 | |
|----------------|-------------|-----------|
| | M1 | M3 |
| rato 1 | 281 | 162 |
| rato 2 | 186 | 173 |
| rato 3 | 246 | 181 |
| rato 4 | 381 | 211 |
| rato 5 | 104 | 117 |
| rato 6 | 121 | 188 |
| rato 7 | 304 | 277 |
| rato 8 | 217 | 304 |
| rato 9 | 162 | 124 |
| rato 10 | 361 | 206 |
| Média | 236,30 | 194,30 |
| ± DP | 95,68 | 59,55 |