

# Efeito protetor do per-condicionamento isquêmico remoto nas lesões da síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos

## *Protective effect of remote ischemic per-conditioning in the ischemia and reperfusion-induced renal injury in rats*

VITOR NAGAI YAMAKI<sup>1</sup>; THIAGO BARBOSA GONÇALVES<sup>1</sup>; JOÃO VITOR BAIA COELHO<sup>1</sup>; RUY VICTOR SIMÕES PONTES<sup>1</sup>; FELIPE LOBATO DA SILVA COSTA<sup>1</sup>; MARCUS VINICIUS HENRIQUES BRITO, TCBC-PA<sup>2</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** Avaliar o efeito protetor do per-condicionamento isquêmico remoto nas lesões de isquemia e reperfusão renal induzida. **Métodos:** Quinze ratos (*Rattus Novergicus*) foram randomizados em três grupos (n=5): Grupo Normalidade (GN), Grupo Controle - Isquemia e Reperfusão (GIR) e Grupo Per-condicionamento isquêmico remoto (GPER). Com exceção do grupo GN, todos os demais foram submetidos à isquemia renal de 30 minutos. No grupo GPER, foi realizado o per-condicionamento isquêmico remoto, constituído de três ciclos de isquemia e reperfusão de cinco minutos cada aplicado, durante o período de isquemia, no membro posterior esquerdo dos ratos, por meio de torniquete. Para quantificar as lesões, foram dosados os níveis séricos de ureia e creatinina, bem como, analisada a histopatologia renal. **Resultados:** O grupo GPER apresentou-se com melhores níveis de ureia ( $83,74 \pm 14,58\%$ ) e creatinina ( $0,72 \pm 26,14\%$ ) quando comparado ao grupo GIR, se aproximando do grupo GN. Na histopatologia, os menores níveis de degeneração hidrópica e congestão medular foram encontrados no grupo GPER. **Conclusão:** O per-condicionamento isquêmico remoto apresentou importante efeito protetor na lesão de isquemia e reperfusão renal.

**Descritores:** Traumatismo por reperfusão. Isquemia quente. Reperfusão. Rim. Ratos.

### INTRODUÇÃO

As lesões de isquemia e reperfusão culminam em diversos efeitos deletérios para os mais diferentes tipos de órgãos. Contraditoriamente, é a reperfusão a grande responsável pelas principais lesões nas células do órgão isquemiado. Inúmeras situações da prática clínica urológica convergem para a problemática da isquemia e reperfusão renal, notadamente, o transplante renal é a ocorrência mais comum deste tipo de lesão no cotidiano da Urologia. A insuficiência renal aguda possui a lesão de isquemia e reperfusão como o principal fator etiológico, caracteriza-se por elevação abrupta dos níveis séricos de ureia e creatinina<sup>1</sup>.

Como alternativa para diminuir os efeitos deletérios da síndrome de isquemia e reperfusão renal, diversas substâncias foram experimentadas, tais como a clorpromazina, verapamil, alopurinol, octreotida, óleo de copaíba, vitaminas C, D e E e ciclosporina A. No entanto, o efeito da maioria delas foi desapontador<sup>1,2</sup>.

Além disso, outras técnicas já foram relatadas, como o pré-condicionamento (PreC) e pós-condicionamento

isquêmico (PosC)<sup>3,4</sup>, que consistem em alguns ciclos de isquemia e reperfusão intercalados antes ou após o período de isquemia principal renal<sup>5</sup>. Esses procedimentos também já foram aplicados, com excelência, em outros órgãos, como o intestino, miocárdio e fígado<sup>6</sup>. Tais ciclos de isquemia/reperfusão (I/R) também podem ser aplicados em órgão ou tecido distante daquele que sofre a isquemia index, o que ficou conhecido como pré-condicionamento isquêmico remoto (rPreC) e pós-condicionamento isquêmico remoto (rPosC), que também obtiveram sucesso na minimização do traumatismo por reperfusão em diversos órgãos<sup>7,8</sup>.

Schmidt *et al.* relataram a técnica de per-condicionamento isquêmico remoto (rPerC)<sup>9</sup>, que consiste na aplicação do condicionamento isquêmico remoto, através de torniquete aplicado no membro posterior de suínos, durante o tempo de isquemia principal, o que realmente foi eficaz na prevenção de lesão de reperfusão na isquemia miocárdica. Este efeito protetor foi corroborado por estudos posteriores envolvendo isquemia miocárdica, e o procedimento foi expandido para a isquemia cerebral<sup>10,11</sup>.

Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará.

1. Pesquisador do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará; 2. Coordenador do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará.

Os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores do condicionamento isquêmico remoto contra a I/R são complexos e não são ainda totalmente conhecidos, parecem estar ligados com a ativação da via da RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*), por meio do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)-Akt e da proteína quinase ativada por mitógenos p44/p42, além da ERK 1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*). Foi demonstrado também o envolvimento dos canais de potássio ATP-dependentes, da adenosina e da via do SAFE (*Survivor Activating Factor Enhancement*)<sup>5,9,10,12</sup>.

Apesar de estas técnicas de condicionamento isquêmico remoto possuírem mecanismos que se entrelaçam, o rPreC possui aplicabilidade clínica limitada, visto que normalmente é impossível prever quando um órgão sofrerá evento isquêmico. Neste sentido, os estudos acerca do rPerC se mostram mais interessantes e promissores<sup>9</sup>. Todavia, inexistem relatos do efeito do rPerC na síndrome de isquemia e reperfusão renal.

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito do per-condicionamento isquêmico remoto nas lesões da síndrome de isquemia e reperfusão renal induzida em ratos.

## MÉTODOS

Foram utilizados 15 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus*), jovens, machos, pesando entre 250-300g. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará (LCE-UEPA) com temperatura, luminosidade, umidade e ruídos controlados, além de água e ração oferecidas *ad libitum*. A pesquisa seguiu rigidamente as normas do *Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) ethical code for animal experimentations*. Além disso, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado do Pará (CEUA-UEPA) (54/11).

Os animais foram distribuídos randomicamente nos seguintes grupos (n=5): Grupo Normalidade (GN), Grupo Controle - Isquemia e Reperfusão (GIR) e Grupo Per-condicionamento isquêmico (GPER).

Em todos os grupos o protocolo de anestesia adotado utilizou a associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, administrados por via intraperitoneal, nas doses de 60mg/kg e 6mg/kg, respectivamente. Os ratos do grupo GN foram utilizados para determinar o padrão de normalidade das amostras. Os dos demais grupos foram submetidos à laparotomia mediana superior de 3cm; em seguida realizou-se nefrectomia direita. Posteriormente, fez-se a dissecação da artéria renal esquerda e isquemia deste rim, através da aplicação de um *clamp* microcirúrgico para a oclusão da artéria renal, durante 30 minutos.

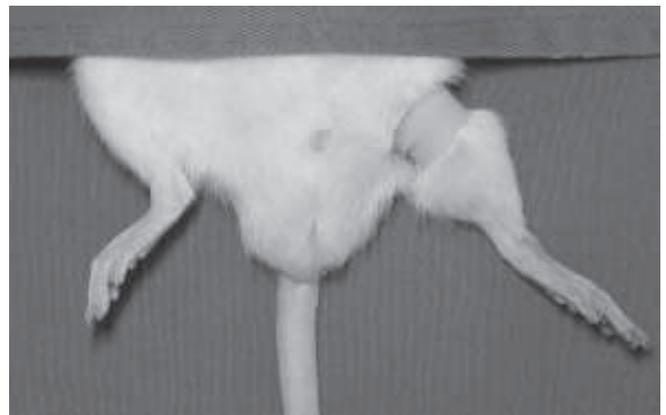
Para os animais do grupo GIR, nenhum procedimento adicional foi adotado. Já no grupo GPER, durante o

tempo da isquemia renal index, foram realizados três ciclos de isquemia intercalados por três ciclos de reperfusão, de cinco minutos cada, através de um torniquete aplicado por meio de uma tira elástica que ocluía os vasos, na base do membro posterior esquerdo do animal, de modo que os ciclos de per-condicionamento isquêmico remoto terminassem concomitantemente ao tempo de isquemia (Figura 1). Concluídos estes procedimentos, houve reperfusão livre de 24 horas.

A parede abdominal dos animais foi suturada em dois planos. Após a recuperação anestésica completa, os ratos foram colocados confortavelmente em gaiolas individuais e receberam água e ração *ad libitum*. Decorridas 24 horas, foram submetidos novamente ao protocolo anestésico supracitado; em seguida, realizou-se a coleta de sangue, pela punção da veia cava inferior, bem como, a coleta do rim esquerdo para análise histopatológica. Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de doses anestésicas letais.

As amostras de sangue foram imediatamente submetidas à dosagem dos níveis de ureia e creatinina. O rim esquerdo coletado foi fixado em formaldeído a 10%, submetido à impregnação por parafina e corado com hematoxilina e eosina. Múltiplos cortes foram analisados de acordo com a presença de necrose tubular, degeneração hidrópica, congestão medular, dilatação e atrofia tubular, seguindo o protocolo desenvolvido por Shih *et al.*<sup>13</sup> que considera grau '0' para o rim normal; grau '0,5' para pequenas áreas focais; grau '1' para envolvimento de menos de 10% do córtex renal; grau '2' para envolvimento de 10-25% do córtex renal; grau '3' para envolvimento de 25-75% do córtex renal; e grau '4' para envolvimento de mais de 75% do córtex renal.

Os resultados obtidos foram avaliados, nos diferentes grupos, pelo teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) para testar a distribuição gaussiana dos dados. Após isso, realizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida pela correção do teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .



**Figura 1** - Per-condicionamento isquêmico remoto aplicado, na base do membro posterior esquerdo, por meio de torniquete, utilizando-se uma tira elástica.

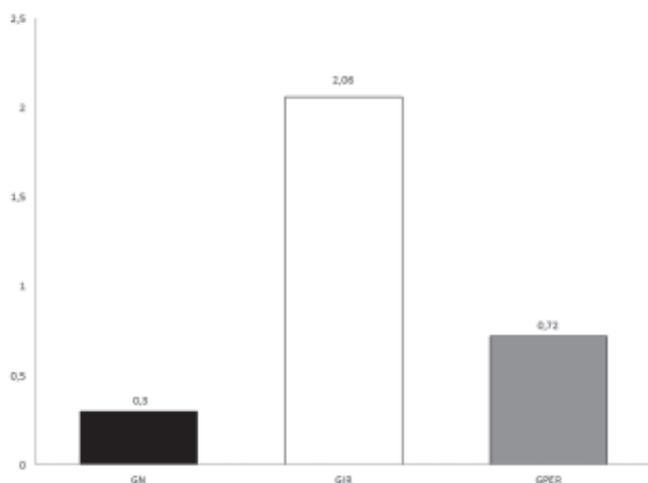
## RESULTADOS

Apenas o GIR apresentou níveis séricos de ureia diferentes estatisticamente dos grupos GPER e GN ( $p < 0,01$ ) (Figura 2). O grupo GPER ( $83,74 \pm 14,58\%$ ) apresentou os níveis séricos de uréia mais reduzidos em comparação com o grupo GIR ( $216,3 \pm 1,17\%$ ) ( $p < 0,01$ ); no entanto, a comparação do grupo submetido ao per-condicionamento isquêmico remoto com o grupo GN ( $72,16 \pm 9,9\%$ ) não apresentou resultados estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

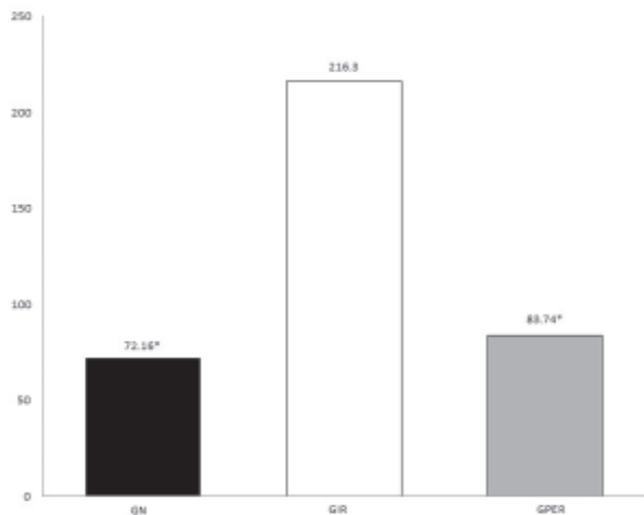
A partir dos níveis séricos de creatinina das amostras analisadas (Figura 3) pôde-se observar a diferença estatisticamente significativa entre os grupos GPER ( $0,72 \pm 26,14\%$ ) e GN ( $0,30 \pm 9,72\%$ ) que, diferente dos níveis de

ureia, na observação dos níveis séricos de creatinina, apresentaram diferença estatisticamente significativa. O grupo GIR ( $2,06 \pm 12,69\%$ ) apresentou os níveis mais altos comparado com os outros grupos. Portanto, todos os grupos foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,01$ ).

Ao exame histopatológico renal (Tabela 1), todos os animais submetidos aos procedimentos de isquemia renal apresentaram congestão medular e degeneração hidrópica (Figura 4) em diferentes graus. No grupo GIR, cuja histopatologia apresentou-se mais alterada, foram observadas extensas áreas de degeneração hidrópica, bem como, de necrose tubular leve (Figura 5) e congestão medular considerável, apresentando, portanto, um grau de lesão superior estatisticamente em relação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). O grupo normalidade, padrão de integridade do tecido renal, quando comparado ao grupo GPER, não apresentou diferença estatística.



**Figura 2** - Média dos níveis séricos de uréia, (mg/dl) segundo os grupos do experimento.  $p < 0,01$ .  $*p > 0,05$  (ANOVA). GN, grupo normalidade. GIR, grupo isquemia/reperfusão. GPER, grupo per-condicionamento.



**Figura 3** - Média dos níveis séricos de creatinina, (mg/dl) segundo os grupos do experimento.  $p < 0,01$  (ANOVA). GN, grupo normalidade. GIR, grupo isquemia/reperfusão. GPER, grupo per-condicionamento.

## DISCUSSÃO

O per-condicionamento isquêmico remoto é a mais recente técnica descrita como forma de atenuar a lesão de isquemia e reperfusão<sup>9</sup>. Na literatura, há descrições sobre o per-condicionamento em isquemia miocárdica e cerebral<sup>10,11</sup>. No entanto, a presente pesquisa buscou avaliar seus possíveis efeitos protetores na isquemia renal. Esta, por sua vez, é a gênese da insuficiência renal aguda que se caracteriza por níveis elevados de ureia e creatinina<sup>2</sup>.

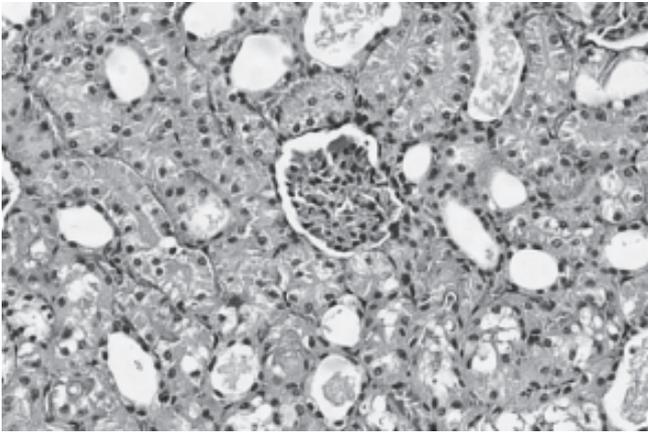
Os resultados da análise dos níveis séricos de ureia e creatinina dos ratos do grupo GIR (Figuras 2 e 3), submetidos apenas à isquemia e reperfusão, obtiveram os valores significativamente mais altos, comprovando a eficácia do modelo de isquemia utilizado. Por outro lado, os níveis séricos para o grupo GN apresentaram os valores mais baixos, já que não foram submetidos a procedimento algum.

Os níveis séricos de ureia acompanharam expressivamente os níveis de creatinina nos diferentes grupos. Exceto para a comparação entre os grupos GN e GPER, nos quais os valores da ureia não foram estatisticamente diferentes, os níveis de creatina apresentaram diferença

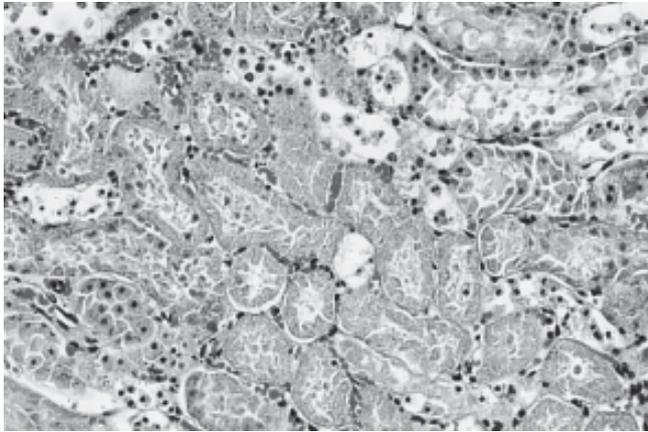
**Tabela 1** - Escores da análise histopatológica (Escala de Shih et al.)<sup>13</sup> de cada animal, segundo os grupos do experimento.

	GN	GIR	GPER
Rato I	0	1,0	0,5
Rato II	0	2,0	0,5
Rato III	0	1,0	0
Rato IV	0	2,0	0
Rato V	0	1,0	0,5
Média	0	1,4	0,3

$p < 0,05$  (ANOVA). GN, grupo normalidade. GIR, grupo isquemia/reperfusão. GPER, grupo per-condicionamento.



**Figura 4** - Corte de rim do rato II do grupo per-condicionamento isquêmico remoto, onde é possível visualizar leve congestão tubular e degeneração hidrópica, obtendo grau 0,5 na escala de Shih et al.<sup>13</sup>



**Figura 5** - Corte de rim do rato II do grupo Controle - Isquemia e Reperfusão, onde é possível visualizar degeneração hidrópica, congestão medular e necrose tubular. Grau 2 na escala de Shih et al.<sup>13</sup>

entre os referidos grupos. Sabe-se que a creatinina é produzida a partir da fosfocreatina muscular, dependendo, portanto, do metabolismo das células musculares, sendo pouco afetada pela dieta. Já a ureia tem seus níveis sanguíneos alterados de acordo com o tipo de alimentação.

Portanto, os níveis séricos de creatinina são mais confiáveis que os níveis séricos de ureia<sup>2</sup>, caracterizando, dessa forma, a diferença entre o padrão de normalidade e o grupo GPER.

Os valores de ureia e creatinina dos ratos do grupo GPER indicaram efeito protetor desta técnica na lesão de isquemia e reperfusão renal induzida, tendo os seus níveis bem próximos ao do grupo GN. Portanto, assim como o pré e o pós-condicionamento isquêmico que inicialmente foram descritos em isquemia miocárdica e depois foram introduzidos no estudo de isquemia e reperfusão renal, o per-condicionamento segue o mesmo caminho<sup>9</sup>, tendo agora comprovado sua eficácia na proteção desse tipo de lesão nos rins.

A histopatologia renal também tem sido amplamente utilizada para quantificar as lesões causadas pela síndrome de isquemia e reperfusão renal<sup>13</sup>; entretanto, o presente estudo mostra-se inovador na literatura no que diz respeito à avaliação histopatológica dos efeitos do per-condicionamento isquêmico na isquemia e reperfusão renal.

Para esta análise, foi adotada a escala de Shih et al.<sup>13</sup>, a qual quantifica a extensão da lesão de isquemia e reperfusão no tecido renal. No estudo, o maior comprometimento do tecido encontrado foi uma lesão de grau 2 no grupo GIR (Tabela 3). Tal fato pode ser explicado possivelmente pelo reduzido tempo de 30 minutos de isquemia adotado, bem como, pelo tempo de reperfusão livre, 24 horas, visto que, a lesão inflamatória necessita de pelo menos 48 horas para sua instalação de observação<sup>14</sup>, ao passo que, quando o grupo GN foi comparado ao grupo GPER, não foi possível identificar diferenças significantes, o que demonstra o efeito protetor dessa técnica.

Em conclusão, o per-condicionamento isquêmico remoto apresentou importante efeito protetor, segundo análise sérica e histopatológica, quando comparado com o grupo controle de isquemia e reperfusão. Além disso, o per-condicionamento aproximou-se consideravelmente do padrão de normalidade.

## A B S T R A C T

**Objective:** To evaluate the protective effect of remote ischemic per-conditioning in ischemia and reperfusion-induced renal injury. **Methods:** Fifteen rats (*Rattus norvegicus*) were randomized into three groups ( $n = 5$ ): Group Normality (GN), Control – Ischemia and Reperfusion (GIR) and Group remote ischemic per-conditioning (GPER). With the exception of the GN group, all others underwent renal ischemia for 30 minutes. In group GPER we performed the ischemic remote per-conditioning, consisting of three cycles of ischemia and reperfusion applied every five minutes during the ischemic period, to the left hindlimb of the rats by means of a tourniquet. To quantify the lesions we measured serum levels of creatinine and urea, as well as analyzed renal histopathology. **Results:** The GPER group presented with better levels of urea ( $83.74 \pm 14.58\%$ ) and creatinine ( $0.72 \pm 26.14\%$ ) when compared to GIR group, approaching the GN group. Histopathologically, the lower levels of medullary congestion and hydropic degeneration were found in group GPER. **Conclusion:** The remote ischemic per-conditioning had a significant protective effect on renal ischemia and reperfusion.

**Key words:** Reperfusion injury. Warm ischemia. Reperfusion. Rim. Rats.

## REFERÊNCIAS

1. Brito MVH, Moreira RJ, Tavares MLC, Carballo MCS, Carneiro TX, Santos AAS. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de ureia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta cir bras.* 2005;20(3):243-6.
2. Percário S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. *Rev Nutr.* 2010;23(2):259-67.
3. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-36.
4. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H579-88.
5. Wever KE, Warlé MC, Wagener F, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van de Vliet JA, et al. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26(10):3108-17.
6. Zhang WX, Yin W, Zhang L, Wang LH, Bao L, Tuo HF, et al. Preconditioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009;8(6):586-90.
7. Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection 'outside the box'—the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2003;98(3):149-57.
8. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol.* 2005;100(5):404-12.
9. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(4):H1883-90.
10. Xin P, Zhu W, Li J, Ma S, Wang L, Liu M, et al. Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(6):H1819-31.
11. Hahn CD, Manlihot C, Schmidt MR, Nielsen TT, Redington AN. Remote ischemic per-conditioning: a novel therapy for acute stroke? *Stroke.* 2011;42(10):2960-2.
12. Tamarelle S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croué A, Henrion D, et al. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(6):1329-39.
13. Shih W, Hines WH, Neilson EG. Effects of cyclosporine A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int.* 1988;33(6):1113-8.
14. Brito MVH, Nigro AJT, Montero EFS, Nascimento JLM, Silva PRF, Siqueira RBP. Viabilidade celular da mucosa do intestino delgado de ratos, após correção de choque hipovolêmico com solução NaCl 7,5%. *Acta cir bras.* 2003;18(4):326-31

Recebido em 29/04/2012

Aceito para publicação em 13/07/2012

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

### Como citar este artigo:

Yamaki VN, Gonçalves TB, Coelho JVB, Pontes RVS, Costa FLS, Brito MVH. Efeito protetor do per-condicionamento isquêmico remoto nas lesões da síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2012; 39(6). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

### Endereço para correspondência:

Marcus Vinicius Henriques Brito  
E-mail: [mnbrito@amazon.com.br](mailto:mnbrito@amazon.com.br)