

Síndrome de isquemia e reperfusão renal: efeito da lidocaína e do pós-condicionamento local

Kidney ischemia and reperfusion syndrome: effect of lidocaine and local postconditioning

IGOR NAGAIYAMAKI, AsCBC-PA¹; RUY VÍCTOR SIMÕES PONTES¹; FELIPE LOBATO DA SILVA COSTA²; VÍTOR NAGAI YAMAKI²; RENAN KLEBER COSTA TEIXEIRA³; EDSON YUZUR YASOJIMA, TCBC-PA²; MARCUS VINÍCIUS HENRIQUES BRITO, TCBC-PA².

R E S U M O

Objetivo: avaliar os efeitos do bloqueio da regulação do tônus vascular por meio do uso da lidocaína na técnica de pós-condicionamento isquêmico na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos. **Métodos:** trinta e cinco ratos foram randomizados em sete grupos de cinco animais: Grupo 1- Controle; Grupo 2- Isquemia e Reperfusão; Grupo 3- Isquemia, Reperfusão e Solução Salina; Grupo 4- Pós-condicionamento Isquêmico; Grupo 5- Pós-condicionamento Isquêmico e Solução Salina; Grupo 6- Lidocaína; Grupo 7- Pós-condicionamento Isquêmico e lidocaína. Com exceção do grupo controle, todos os demais foram submetidos à isquemia renal de 30 minutos. Nos grupos de pós-condicionamento, foi realizado o ciclo de isquemia e reperfusão de cinco minutos cada, aplicado logo após a isquemia principal. Nos grupos salina e lidocaína foram instiladas as substâncias numa taxa de duas gotas por minuto. Para comparar os grupos, foram dosados os níveis séricos de ureia e creatinina e análise histopatológica renal. **Resultados:** os grupos pós-condicionamento e pós-condicionamento + lidocaína apresentaram uma redução nos valores de ureia e creatinina. O grupo lidocaína apresentou apenas uma redução nos valores de creatinina. Na análise histopatológica, apenas os grupos submetidos ao pós-condicionamento isquêmico apresentaram redução do grau de necrose tubular. **Conclusão:** a lidocaína não bloqueou os efeitos do pós-condicionamento na síndrome de isquemia e reperfusão renal, mas conferiu melhor na proteção glomerular quando aplicada em conjunto com o pós-condicionamento isquêmico.

Descritores: Traumatismo Por Reperfusão. Isquemia Quente. Reperfusão. Pós-Condicionamento Isquêmico. Lidocaína. Ratos.

INTRODUÇÃO

A síndrome de isquemia e reperfusão contribui com 60-70% da morbimortalidade relacionada à lesão renal aguda presente em várias situações clínicas, como o transplante renal e a embolia de artéria renal¹⁻⁵. Embora a reperfusão arterial imediata seja a melhor conduta para eliminar o processo isquêmico⁶, a reoxigenação celular está associada a um aumento na peroxidação lipídica, no dano celular e na piora da função^{7,8}.

A recente descrição das técnicas de “condicionamento tecidual”, que consistem em breves ciclos alternados de isquemia e reperfusão, é uma abordagem promissora para o controle dos danos causados pela isquemia prolongada e pela lesão de reperfusão⁶.

Em 2003, Zhao *et al.*⁹ desenvolveram o conceito do pós-condicionamento isquêmico (POS), que consiste em pequenos ciclos de isquemia e reperfusão antes da reperfusão livre em um tecido previamente isquêmico. Esta técnica pode ser facilmente aplicada em situações

inesperadas de isquemia, principalmente quando comparada ao pré-condicionamento, com estudos que comprovam seus efeitos benéficos em seres humanos^{10,11}.

Os mecanismos envolvidos no efeito protetor do POS contra a síndrome de isquemia e reperfusão são pouco compreendidos. Sabe-se que este procedimento atua na modulação dos canais de potássio da mitocôndria, nos poros de transição de permeabilidade mitocondriais e na via de sinalização p13-kinase-pAkt¹².

Os exatos mecanismos intracelulares do POS ainda não foram totalmente determinados. Um mecanismo sugerido por alguns estudos seria a modulação do tônus vascular^{13,14}, em que o pós-condicionamento aumentaria o número e duração da contração das arteríolas impedindo um grande influxo de oxigênio e consequentemente a geração de espécies reativas de oxigênio. Contudo, na revisão de literatura realizada, não foi identificado nenhum estudo que avaliou diretamente esta via.

A lidocaína é um anestésico local muito utilizado para a realização de pequenos procedimentos ci-

1 - Faculdade de Medicina do Centro Universitário do Pará (CESUPA), Belém, PA, Brasil. 2 - Faculdade de Medicina da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, PA, Brasil. 3 - Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Pesquisa Experimental da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, PA, Brasil.

rúrgicos. Atua por meio do bloqueio de canais de sódio impedindo o influxo nervoso e a sensação dolorosa^{15,16}. Porém, quando administrado de forma sistêmica apresenta um efeito vasodilatador que poderia ser utilizado para bloquear a modulação do tônus vascular¹⁷.

Assim, esse estudo busca avaliar os efeitos do bloqueio da regulação do tônus vascular por meio do uso da lidocaína na técnica de pós-condicionamento isquêmico na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos.

MÉTODOS

Trinta e cinco ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos com 15 a 20 semanas, pesando entre 250-300 g, foram usados neste estudo. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará, em um ambiente controlado. Água e ração foram oferecidas *ad libitum*. Esta pesquisa seguiu a lei brasileira de experimentação animal (11.794/08). O projeto de pesquisa foi previamente aprovado no Comitê de Ética da Universidade do Estado do Pará (43/12)

Os animais foram randomicamente distribuídos em sete grupos de cinco animais cada: 1) Grupo Controle (CON) em que não foi induzida isquemia renal; 2) Grupo Isquemia e reperfusão (IR) em que foi realizada isquemia renal por 30 minutos seguida por reperfusão sem nenhuma técnica de condicionamento; 3) Grupo Isquemia e reperfusão salina (IRS) em que foi realizada isquemia renal por 30 minutos seguida por instilação de solução salina numa taxa de duas gotas por minuto (Figura 1); 4) Grupo Pós-condicionamento Isquêmico (POS) submetido a 30 minutos de isquemia renal seguida por 30 minutos do pós-condicionamento local (três

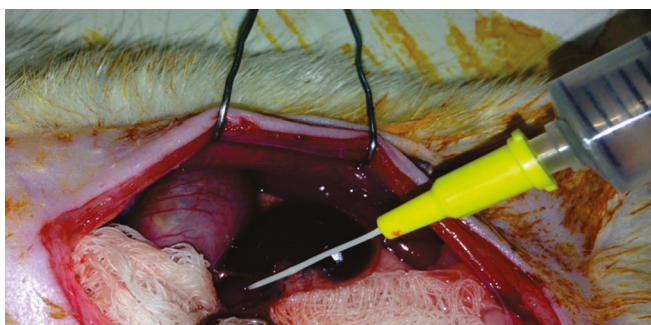


Figura 1. Técnica de instilação na artéria renal esquerda.

ciclos de cinco minutos de perfusão renal intercalados por cinco minutos de isquemia renal)¹³; 5) Grupo Pós-condicionamento isquêmico e Solução Salina (POSS) submetido a 30 minutos de isquemia renal seguida por 30 minutos do pós-condicionamento local (três ciclos de cinco minutos de perfusão renal intercalados por cinco minutos de isquemia renal)¹¹ e instilação de solução salina numa taxa de duas gotas por minuto; 6) Grupo Lidocaína (LIDO) submetido a 30 minutos de isquemia renal seguida por 30 minutos de instilação de lidocaína na artéria renal. A lidocaína foi instilada numa taxa de duas gotas por minuto; 7) Grupo Pós-condicionamento e Lidocaína (POLI) submetido a 30 minutos de isquemia renal seguida por 30 minutos do pós-condicionamento local e instilação de lidocaína.

Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia com quetamina 70mg/kg e xilazina 10mg/kg, intraperitoneal. Em todos os grupos foi realizada nefrectomia direita, e a artéria renal esquerda foi dissecada com o auxílio de um microscópio microcirúrgico. A isquemia renal foi induzida por meio da aplicação de um *clamp* microcirúrgico na artéria renal esquerda por 30 minutos. A temperatura dos animais foi mantida em 37°C por meio de manta térmica durante todo o procedimento. Foi realizado reidratação pós-operatória por meio de injeção de solução salina (10ml/Kg) subcutânea.

Durante o período de observação os animais receberam analgesia com dipirona 30mg/Kg de 8/8 horas e água e ração *ad libitum*. Os animais ficaram em gaiolas individuais no pós-operatório. Foi avaliada a quantidade de ração e água consumidas no pré e pós-operatório.

Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram novamente anestesiados. Amostras de sangue foram obtidas da veia cava e foram imediatamente encaminhadas para análise bioquímica. Os níveis séricos de ureia e creatinina foram mensurados por meio do ensaio colorimétrico no aparelho Selectra-E utilizando kits específicos da Labtest®. O rim esquerdo foi retirado e fixado em formol a 10% tamponado. As peças foram coradas em hematoxilina e eosina. Foi analisada a presença de necrose tubular, congestão medular e retração do tufo glomerular e graduado em 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; e 3 – intenso. Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de overdose anestésica.

Tabela 1. Níveis séricos de ureia e creatinina de acordo com os grupos estudados.

Grupo	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
CON	39,40 ± 03,43	0,50 ± 0,10
IR	216,30 ± 02,52	2,06 ± 0,26
IRS	208,40 ± 04,66	2,11 ± 0,19
POS	141,40 ± 43,77	0,93 ± 0,18
POSS	140,20 ± 30,98	1,02 ± 0,26
LIDO	187,80 ± 53,73	1,27 ± 0,41
POLI	80,50 ± 15,08	0,76 ± 0,08

$p < 0,05$ CON vs Demais grupos; $p > 0,05$ IR vs IRS e POS vs POSS.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. O software BioEstat® 5.4 (Belém, PA, Brasil) foi utilizado para realizar análise estatística. O teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, foi utilizado para comparar os níveis de ureia e creatinina entre os grupos e o teste de Kruskal-Wallis para comparar os escores histopatológicos. Foi adotado um valor menor do que 0,05 ou 5% para rejeitar a hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Durante todo o período de estudo nenhum animal morreu nem foi necessária a realização de manobras para reanimação. Não houve alteração no padrão alimentar dos animais durante o pré e o pós-operatório (18,63 vs 17,44 g/dia $p < 0,05$). A tabela 1 mostra os níveis séricos de ureia e creatinina por grupo. Percebe-se que, o grupo IR apresentou maiores níveis de ureia que os grupos CON, POS e POLI ($p < 0,01$), e não apresentou diferença significativa com o grupo LIDO ($p = 0,62$). O grupo POLI obteve melhores níveis séricos do que o grupo POS ($p = 0,045$). O grupo POLI foi o único grupo que apresentou níveis de ureia semelhantes ao CON ($p = 0,32$).

Com relação à creatinina, o grupo IR apresentou os mais altos níveis quando comparado com todos os outros grupos ($p < 0,001$); o grupo POLI obteve melhores níveis séricos do que o grupo POS ($p = 0,043$). O grupo POLI foi o único grupo que apresentou níveis de creatinina estatisticamente semelhante ao CON ($p = 0,57$). O grupo LIDO teve os níveis de creatinina maiores que os grupos POS e POLI ($p < 0,01$).

Os resultados da análise histopatológica estão descritos na tabela 2. Identifica-se um menor grau de

lesão glomerular em todos os grupos tratados ($p < 0,05$), porém apenas nos grupos em que foi realizado o pós-condicionamento houve uma redução do grau de lesão tubular ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O exato mecanismo do pós-condicionamento isquêmico é pouco compreendido. Sabe-se que seus efeitos são mediados por meio de canais de potássio^{16,18}, modulado por mecanismos neurais e humorais que dependem criticamente do momento em que o condicionamento é aplicado. Quando realizado imediatamente após a isquemia principal, a via neuronal é predominante, por ação parassimpática¹⁹. Contudo, quando aplicada um pouco depois da isquemia principal a via humoral é predominante, através das vias RISK e SAFE⁸.

Uma das ações do parassimpático é a regulação do tônus vascular que quando ativado promove um aumento do fluxo sanguíneo por vasodilatação²⁰. O tônus da artéria renal é regulado primordialmente pela via simpática, que quando inibida, promove sua dilatação²¹. Nossa hipótese com a instilação de lidocaína na artéria renal é de que isto deva gerar um efeito do tipo parassimpático através do bloqueio do tônus vascular simpático, resultando em uma vasodilatação sustentada com bloqueio da via neurogênica de ação do pós-condicionamento.

Os marcadores sanguíneos da função renal mostraram-se diminuídos no grupo submetido ao pós-condicionamento, como identificado em diversos outros estudos, porém os animais tratados com lidocaína também apresentaram efeito benéfico, principalmente em relação à creatinina, mostrando uma proteção glomerular adicio-

Tabela 2. Média dos escores histopatológicos de acordo com os grupos estudados.

Parâmetro	COM	IR	IRS	POS	POSS	LIDO	POLI
Necrose tubular	0,00	2,60	2,40	1,40	1,20	2,20	1,20
Congestão medular	0,00	2,80	2,60	1,20	1,40	2,20	1,00
Retração glomerular	0,00	2,40	2,60	1,40	1,00	1,40	1,20

$p < 0,05$ CON vs Demais grupos; $p > 0,05$ IR vs IRS e POS vs POSS.

Necrose tubular e Congestão medular: $p < 0,05$ POS, POSS e POLI vs COM, IR, IRS e LIDO; Retração glomerular: $p < 0,05$ POS, POSS, POLI e LIDO vs COM, IR e IRS.

nal²². Esta diferença não foi constatada em relação aos níveis de ureia, demonstrando maior comprometimento tubular, visto que, em condições normais, a alça de Henle é responsável por 60% da secreção urinária de ureia²³.

É importante verificar que os grupos tratados com solução salina não apresentaram efeito semelhante ao grupo lidocaína, evidenciando que a redução dos marcadores ocorreu devido às propriedades farmacológicas da lidocaína e não por uma possível sobrecarga volêmica da lidocaína instilada.

Um possível mecanismo envolvido na ação protetora da lidocaína é por meio do bloqueio dos canais NaV 1.9 intimamente relacionado à fisiopatologia da síndrome de isquemia e reperfusão¹⁶. Quando este canal é bloqueado há uma diminuição do influxo de sódio intracelular e menor lesão de reperfusão. Contudo, Lee *et al.*²⁴ demonstraram que a infusão contínua de lidocaína no subcutâneo de ratos apresentou efeitos deletérios na síndrome de isquemia e reperfusão renal, evidenciando que ainda há necessidade de maior compreensão dos efeitos deste fármaco e a influência da via de administração.

Na análise histopatológica não foram evidenciadas diferenças significativas na comparação do grau

histológico de lesão glomerular e tubular, com resultados semelhantes aos identificados na análise dos níveis séricos de ureia e creatinina e confirmando as ilações iniciais. Não foi identificado nenhum dano adicional pelo uso da lidocaína que em alguns estudos mostrou-se tóxico para o epitélio renal^{24,25}.

Novos estudos ainda são necessários antes do uso clínico da lidocaína, especialmente utilizando outros parâmetros de análise como estresse oxidativo e viabilidade celular, que neste estudo inicial não foram testados²⁶. Além disso, é controverso na literatura se o pós-condicionamento isquêmico é influenciado pelo número de ciclos ou pelo tempo de condicionamento²⁷. Ciclos de cinco minutos podem não ter sido o modelo adequado para determinar o máximo efeito protetor na lesão de isquemia e reperfusão renal. Assim, caso tivesse sido realizado um ciclo ideal a solução de lidocaína poderia não ter apresentado os efeitos descritos.

Em conclusão, a lidocaína não bloqueou os efeitos do pós-condicionamento na síndrome de isquemia e reperfusão renal, mas determinou um resultado melhor na proteção glomerular quando aplicada em conjunto com esta técnica.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the effects of blocking the regulation of vascular tone on the ischemia and reperfusion syndrome in rats through the use of lidocaine in the postconditioning technique. **Methods:** we randomized 35 rats into seven groups of five animals: Group 1- Control; Group 2- Ischemia and Reperfusion; Group 3- Ischemia, Reperfusion and Saline; Group 4- Ischemic Postconditioning; Group 5- Ischemic Postconditioning and Saline; Group 6- Lidocaine; Group 7- Ischemic Postconditioning and Lidocaine. Except for the control group, all the others were submitted to renal ischemia for 30 minutes. In postconditioning groups, we performed ischemia and reperfusion cycles of five minutes each, applied right after the main ischemia. In saline and lidocaine groups, we instilled the substances at a rate of two drops per minute. To compare the groups, we measured serum levels of urea and creatinine and also held renal histopathology. **Results:** The postconditioning and postconditioning + lidocaine groups showed a decrease in urea and creatinine values. The lidocaine group showed only a reduction in creatinine values. In histopathology, only the groups submitted to ischemic postconditioning had decreased degree of tubular necrosis. **Conclusion:** Lidocaine did not block the effects of postconditioning on renal ischemia reperfusion syndrome, and conferred better glomerular protection when applied in conjunction with ischemic postconditioning.

Keywords: Reperfusion Injury. Warm Ischemia. Reperfusion. Ischemic Postconditioning. Lidocaine. Rats.

REFERÊNCIAS

1. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
2. Nolan CR, Anderson RJ. Hospital-acquired acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9(4):710-8.
3. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005;112(17):2660-7.
4. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-401.
5. Castro e Silva Jr O, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Basic aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras*. 2002;17 (Suppl 3): 96-100.
6. Vinten-Johansen J, Shi W. Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16(3-4):260-6.
7. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998;38(2):291-300.
8. 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.
9. 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.
10. Venugopal V, Laing CM, Ludman A, Yellon DM, Hausenloy D. Effect of remote ischemic preconditioning on acute kidney injury in nondiabetic patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a secondary analysis of 2 small randomized trials. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(6):1043-9.
11. Er F, Nia AM, Dopp H, Hellmich M, Dahlem KM, Caglayan E, et al. Ischemic preconditioning for prevention of contrast medium-induced nephropathy: randomized pilot RenPro Trial (Renal Protection Trial). *Circulation*. 2012; 126(3):296-303.
12. Dow J, Bhandari A, Kloner RA. The mechanism by which ischemic postconditioning reduces reperfusion arrhythmias in rats remains elusive. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2009;14(2):99-103.
13. Costa FL, Yamaki VN, Goncalves TB, Coelho JV, Percário S, Brito MV. Combined remote ischemic preconditioning and local postconditioning on liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2014;192(1):98-102.
14. Hedegaard ER, Johnsen J, Povlsen JA, Jespersen NR, Shanmuganathan JA, Laursen MR, et al. Inhibition of KV7 channels protects the rat heart against myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016; 357(1):94-102.
15. Gawali VS, Lukacs P, Cervenka R, Koenig X, Rubi L, Hilber K, et al. Mechanism of modification, by lidocaine, of fast and slow recovery from inactivation of Voltage-Gated Na⁺ Channels. *Mol Pharmacol*. 2015;88(5):866-79.
16. Dusmez D, Cengiz B, Yumrutas O, Demir T, Oztuzu S, Demiryurek S, et al. Effect of verapamil and lidocaine on TRPM and NaV1.9 gene expressions in renal ischemia-reperfusion. *Transplant Proc*. 2014;46(1):33-9.
17. Kawahito S, Nakahata K, Azma T, Kuroda Y, Cook DJ, Kinoshita H. Protective effects of anesthetics on vascular function related to K⁺ channels. *Curr Pharm Des*. 2014;20(36):5727-37.
18. Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, Mrochek A, Pernow J, Sjöquist PO, et al. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Exp Physiol*. 2012;97(8):908-17.
19. Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, Pérez V, Inserte J, García-Dorado D, et al. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol*. 2013;98(2):425-34.
20. Schiller AM, Haack KK, Pellegrino PR, Curry PL, Zucker IH. Unilateral renal denervation improves autonomic balance in conscious rabbit with chronic heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(8):886-92.
21. DiBona GF. Neural control of renal function: role of renal alpha adrenoreceptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985;7 Suppl 8:S18-23.

22. Passos MT, Nishida SK, Câmara NO, Shimizu MH, Mastroianni-Kirsztajn G. Lohexol clearance for determination of glomerular filtration rate in rats induced to acute renal failure. *Plos One*. 2015;10(4):e0123753.
23. Pagana KD, Pagana TJ. Urea nitrogen, Blood. In: Pagana KD, Pagana TJ, editors. *Mosby's diagnostic & laboratory test reference*. 11th ed. St. Louis: Mosby; 2011. p. 131-3.
24. Lee HT, Krichevsky IE, Xu H, Ota-Setlik A, D'Agati VD, Emala CW. Local anesthetics worsen renal function after ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(1):F111-9.
25. Drewa TA, Wolski Z, Galazka P, Wlodarczyk Z, Wozniak A. Kidney preserving solutions containing lidocaine may increase urological complication rate after renal transplantation: an in vitro study. *Transplant Proc*. 2005;37(5): 2107-10.
26. Costa FL, Teixeira RK, Yamaki VN, Valente AL, Silva AM, Brito MV, et al. Remote ischemic conditioning temporarily improves antioxidant defense. *J Surg Res*. 2016;200(1):105-9.
27. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat. *Transpl Int*. 2008;21(4):364-71.

Recebido em: 06/04/2016

Aceito para publicação em: 01/09/2016

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Renan Kleber Costa Teixeira

E-mail: renankleberc@hotmail.com