

Aparecida Vitória Gonçalves de Souza

**Avaliação da proteção renal da melatonina em
altas doses em modelo de experimentação de
isquemia e reperfusão renal em ratos submetidos
à hiperglicemia**

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

Orientador: Professor Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna

**Botucatu – SP
2013**

Aparecida Vitória Gonçalves de Souza

**Avaliação da proteção renal da melatonina em
altas doses em modelo de experimentação de
isquemia e reperfusão renal em ratos submetidos
à hiperglicemia**

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

Orientador: Professor Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna

**Botucatu – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Souza, Aparecida Vitória Gonçalves de.

Avaliação da proteção renal da melatonina em altas doses em modelo de experimentação de isquemia e repertusão renal em ratos submetidos à hiperglicemia / Aparecida Vitória Gonçalves de Souza. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Pedro Thadeu Galvão Vianna

Capes: 20702043

1. Melatonina. 2. Rins - Efeito das drogas - Estudos experimentais.

Palavras-chave: Antioxidantes; Isquemia-reperfusão; Melatonina; Rim.

Dedicatória

Aos meus pais pela confiança depositada.

Aos meus irmãos pela paciência e apoio incondicional.

*A meu marido Woner, pelo o amor, companheirismo e
extrema paciência. Sem você não teria conseguido
concretizar esta tese, te amo muito.*

*A minha eterna orientadora Dra. Elenice Deffune,
O que sou e o que me tornarei foram moldados por suas
mãos. Os reflexos de suas ações me tornaram uma
pessoa melhor e apaixonada pela pesquisa.*

*Sua garra, coragem e grandeza me guiam todos os dias,
sob seu olhar me tornei um ser humano melhor, muito
obrigada por me amparar em seu colo ontem, hoje e
espero sempre...*

Obrigada doutora.

Agradecimento aos amigos

*A equipe do Laboratorio de Engenharia Celular agradeço
a ajuda, compreensão e carinho.*

*As minhas queridas irmãs por opção Janaína e Nati
gostaria multiplicar os poucos momentos que consigo
ficar com vocês.*

*A Josy sua ajuda e apoio foram indispensáveis nesta fase
da vida, muito obrigada.*

*A Marcela pela prontidão, conhecimento e amizade, terei
imensa dívida com você.*

*Ao Marquinho do Laboratório de Patologia da Faculdade
de Medicina, novamente obrigada.*

*A Dra. Maria Aparecida Custodio Domingues agradeço
imensamente os momentos de auxilio, carinho mesmo com
todos os horários tomados sempre houve um momento
para algumas palavras, agradeço o profissionalismo e
presteza.*

Agradecimento especial

*Ao Professor Titular Dr. Pedro Thadeu Galvão Vianna,
meu orientador, agradeço a oportunidade de realizar
esta tese sob suas orientações, obrigada pela paciência,
carinho e confiança em mim depositados.*

*O senhor é um exemplo de profissional envolvido e
arrebatado pela pesquisa, pela profissão e acima
de tudo pela dádiva de transmitir e ensinar a
seriedade da pesquisa científica na busca por
melhores condições aos seus pacientes.*

Obrigada

A equipe do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, sem vocês não teria sido possível, Cristiano, Jurandir, Neli, André, Dona Joana, Sonia agradeço de coração.

Cristiano seu profissionalismo e carinho foram divisores de água nesta tese.

Aos queridos: Florian, Martha e Vitor agradeço a confecção de minhas lâminas e ajuda

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Souza, AVG. Avaliação da proteção renal de doses altas de melatonina em modelo de experimenção de isquemia e reperfusão renal em ratos submetidos à hiperglicemia. Botucatu, 2013. Doutorado em Anestesiologia. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Resumo

Justificativa e Objetivo: A melatonina é um varredor de radicais livres com importantes ações no estudo da isquemia e reperfusão renal. O objetivo deste estudo é avaliar possível proteção renal de altas doses de melatonina em modelo experimental de I/R submetidos à hiperglicemia aguda em ratos anestesiados com isoflurano. **Método:** utilizou-se 44 ratos Wistar, machos, com peso superior a 300g, distribuídos de modo aleatório em cinco grupos, designados: sham (n=10); melatonina, (n=10, 50 mg.kg⁻¹); hiperglicemia (n=9, glicose 2,5 g.kg⁻¹); hiperglicemia/melatonina (n=10, glicose 2,5 g.kg⁻¹ + melatonina 50 mg.kg⁻¹); isquemia e reperfusão (n=5,). Todos os grupos receberam indução da anestesia com isoflurano a 4% e a manutenção com isoflurano de 1,5 a 2,0%. A pressão arterial média (PAM) foi medida para controle da anestesia. A injeção intraperitoneal da melatonina (melatonina e hiperglicemia/melatonina) ou glicose (hiperglicemia, hiperglicemia/melatonina) ou solução salina (isquemia e reperfusão) foi feita 40 minutos antes da isquemia renal esquerda. Nos três grupos a isquemia durou 25 minutos. Todos os animais foram submetidos à nefrectomia direita. Os valores plasmáticos da creatinina e glicose foram determinados no início (M1), no (M2) imediatamente após reperfusão e 24 horas após o final do experimento (M3), quando os animais retornaram ao laboratório e foram anestesiados com isoflurano para coleta de amostra sanguínea e nefrectomia esquerda. Para análise histológica foi utilizada uma escala para avaliação da necrose tubular (0 a 5 = lesão máxima). Houve tratamento estatístico para os valores da temperatura dos animais, peso, PAM, da creatinina plasmática, glicemia e das lesões histológicas, sendo as diferenças consideradas significantes quando $P < 0,05$. **Resultados:** a glicemia foi superior no M2 nos grupos que receberam suplementação de glicose, hiperglicemia ($356,00 \pm 107,83$) e hiperglicemia/melatonina ($445,3 \pm 148,32$). Os valores de creatinina foram maiores no M3, ($P=0,0001$) para isquemia e reperfusão ($3,6 \pm 0,37$), hiperglicemia/melatonina ($3,9 \pm 0,46$), e hiperglicemia ($3,71 \pm 0,69$) e menores nos grupos sham ($0,79 \pm 0,16$) e melatonina ($2,01 \pm 1,01$). A histologia evidenciou ausência de necrose em sham, lesão grau 2 em melatonina e necrose tubular aguda intensa em hiperglicemia (grau 4), hiperglicemia/melatonina (grau 5), isquemia e reperfusão (grau 4) $P<0,0001$. **Conclusões:** A melatonina protegeu os rins submetidos a I/R nos animais sem hiperglicemia, porem isto não aconteceu quando a lesão I/R foi associada a hiperglicemia transitoria.

Palavras-chave: Antioxidantes; Rim; Isoflurano; isquemia-reperfusão, melatonina.

Souza, AVG. Assessment of renal protection from high doses of melatonin in an experimental model of renal ischemia and reperfusion in hyperglycemic rats. Botucatu, 2011. Doctorate in Anesthesiology. Medicine College of Botucatu. Paulista State University “Júlio de Mesquita Filho”.

Abstract

Background: Melatonin is a free radical scavenger with important actions in the study of renal ischemia and reperfusion (I/R). This study aimed evaluate possible renal protection of high doses of melatonin in an experimental model of I/R, in which rats were submitted to acute hyperglycemia under anesthesia with isoflurane. **Method:** 44 male Wistar rats, weighing more than 300g, were randomly divided into five groups: sham (n=10); melatonin (n=10, 50 mg.kg⁻¹); hyperglycemia (n=9, glucose 2.5 g.kg⁻¹); hyperglycemia/melatonin (n=10, 2.5 g.kg⁻¹ glucose + melatonin 50 mg.kg⁻¹); ischemia and reperfusion (n=5). In all groups, anesthesia was induced with 4% isoflurane and maintained with 1.5 to 2.0% isoflurane. Mean arterial pressure (MAP) was measured to control anesthesia. Intraperitoneal injection of melatonin (melatonin and hyperglycemia/melatonin), glucose (hyperglycemia, hyperglycemia/melatonin) or saline (ischemia and reperfusion) was performed 40 min before left renal ischemia. In these groups, ischemia lasted 25 min. All the rats were submitted to right nephrectomy. Serum plasma values for creatinine and glucose were determined at baseline (T1), immediately following reperfusion (T2) and 24 h after completion of the experiment (T3), when the rats were returned to the laboratory and anesthetized with isoflurane to collect blood samples and for left nephrectomy. Histological analysis was performed to evaluate tubular necrosis (scale: 0 to 5 = maximal lesion). Statistical analysis was applied to the following values: temperature, weight, MAP, plasma creatinine, glucose and histological lesions. The differences were considered significant when P <0.05. **Results:** Serum glucose was higher at T2 in the groups supplemented with glucose, hyperglycemia (356.00 ±107.83) and hyperglycemia/melatonin (445.3 ±148.32). Creatinine values were higher at T3 (P=0.0001) for ischemia and reperfusion (3.6 ±0.37), hyperglycemia/melatonin (3.9 ±0.46) and hyperglycemia (3.71 ±0.69) and lower in the sham (0.79 ±0.16) and melatonin (2.01 ±1.01) groups. Histology showed no necrosis injury in the sham group, grade 2 lesion in the melatonin group, and severe acute tubular necrosis in the hyperglycemia (grade 4), hyperglycemia/melatonin (grade 5) and ischemia and reperfusion (grade 4) groups (P <0.0001). **Conclusions:** Melatonin protected the kidneys submitted to I/R in rats without hyperglycemia; however, this did not occur when the I/R lesion was associated with hyperglycemia.

Keywords: antioxidants; kidney; isoflurane; ischemia-reperfusion, melatonin.

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

1. Introdução	14
2. Objetivo	17
3. Material e Método	18
3.1 Modelo de Isquemia/Reperusão	18
3.2 Grupos Experimentais	18
3.3 Sequência experimental	18
3.4 Estudo Histológico	27
3.5 Análise Estatística	28
4 Resultados	29
4.1 Peso	29
4.2 Temperatura	30
4.3 Pressão Arterial Média (PAM)	31
4.4 Creatinina Plasmática	33
4.5 Glicemia Plasmática	35
4.6 Avaliação Histológica	37
5. Discussão	42
5.1 Modelo Animal	42
5.2. Avaliação da Creatinina Plasmática	43
5.3. Avaliação da Hiperglicemia Plasmática	44
5.4. Avaliação da Histologia Renal	45
5.5. Melatonina: Ação Antioxidante	45
6. Conclusão	49
7. Referências	50

Lista de Tabelas

Tabela 1	Grau de lesão renal utilizado para classificação do dano renal	28
Tabela 2	Peso (g) dos ratos. Média e desvio padrão segundo o grupo	30
Tabela 3	Temperatura retal (°C) dos ratos. Média e desvio-padrão segundo momento e grupo	31
Tabela 4	Pressão Arterial Média (mm Hg). Média e desvio-padrão segundo momento e grupo	32
Tabela 5	Creatinina plasmática dos ratos (mg.dL ⁻¹). Média e desvio-padrão segundo momento e grupo	34
Tabela 6	Glicemia plasmática dos ratos (mg.dL ⁻¹). Média e desvio-padrão segundo momento e grupo	36
Tabela 7	Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, entre colchetes, referentes à variável histológica segundo grupo	38

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Média e desvio-padrão referentes à PAM segundo momento e grupo. $p < 0,001$	36
Gráfico 2	Média e desvio-padrão referentes à glicemia segundo o momento e o grupo. $p < 0,001$	38
Gráfico 3	Média e desvio-padrão referentes à creatinina segundo o momento e o grupo. $p < 0,001$	40
Gráfico 4	Mediana, 1º e 3º quartil, referentes à histologia segundo grupo. $p < 0,001$.	42

Lista de Figuras

Figura 1	Valores médios e desvio padrão da PAM segundo momentos e grupos	32
Figura 2	Valores médios de creatinina plasmática segundo momentos e grupos	34
Figura 3	Valores médios de glicemia segundo momento e grupo	36
Figura 4	Boxplot do grau de intensidade da lesão renal entre grupos	38
Figura 5	Grupo sham – grau zero de Park (aumento 400x), coradas com HE .	39
Figura 6	Grupo melatonina – grau dois de Park (aumento 400x), coradas com HE.	39
Figura 7	Grupo hiperglicemia – grau quatro de Park (aumento 200x), coradas com HE	40
Figura 8	Grupo hiperglicemia + melatonina– grau cinco de Park (aumento 200x). Corada com HE	40
Figura 9	Grupo isquemia – grau quatro de Park (aumento 200x)	41
Figura 10	Vias de apoptose: intrínseca e extrínseca, afetadas pela ação da melatonina	47

1. Introdução

A lesão renal causada durante a isquemia e reperfusão (I/R) ocorre frequentemente em cirurgias vasculares e transplantes, devido à redução do fornecimento sanguíneo ao órgão. Procedimentos como transplante renal, cirurgia vascular da aorta, artérias renais e em nefrectomia parcial podem levar a danos celulares estruturais e funcionais irreversíveis como a disfunção do enxerto, rejeição aguda e doença renal aguda/crônica dependendo do grau de isquemia (MEDEIROS et al., 2010).

A privação de oxigênio acarreta alterações no metabolismo de nucleotídeos com diminuição do ATP. Esta queda leva ao desequilíbrio na fosforilação oxidativa com redução da capacidade glicolítica das células tubulares renais proximais mais susceptíveis às privações de ATP. A isquemia induz à expressão de moléculas de adesão epiteliais e produção de fator de necrose tumoral (TNF) permitindo a passagem de leucócitos e infiltração do parênquima renal (GOES et al., 1995).

Além da hipóxia e acidose frequente na lesão isquêmica ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o recrutamento de neutrófilos ativados. Estes radicais livres podem alterar a viabilidade das células através de vários mecanismos, interferindo no crescimento celular e na reparação, regeneração, proliferação tecidual, resposta inflamatória e processo imunológico (MANSANO et al., 2012). A liberação de radicais são fenômenos comumente evocados durante I/R, paralelamente com a produção local de óxido nítrico (NO^{*}). Em grandes concentrações o NO^{*} interage com superóxido e produz peroxinitrato, um potente oxidante da membrana celular. O óxido nítrico também modula interações celulares leucócito-endoteliais, inibe a infiltração neutrofílica e a agregação plaquetária. Todos estes eventos são importantes durante o processo de I/R.

Com o objetivo de proteger os órgãos contra os efeitos da I/R, procedimentos como o condicionamento isquêmico, descrito por Murry et al. (1986), podem ser empregados na rotina médica. No estudo, corações caninos, foram submetidos a quatro ciclos de isquemia com duração de cinco minutos, alternados entre isquemia/reperfusão da artéria coronária antes da isquemia de 40 minutos. Obtiveram redução na área de infarto em 75% no grupo que recebeu condicionamento isquêmico (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986)

. Nos procedimentos cirúrgicos os pacientes submetidos à anestesia com inalatórios halogenados apresentam fenômeno semelhante de proteção renal, denominado condicionamento anestésico (do inglês, APC). Estudos posteriores (CASON et al., 1997; COPE et al., 1997; KERSTEN et al., 1997) mostraram o paradoxal papel do ROS no APC, ou seja, era necessário haver liberação inicial do ROS para acontecer o fenômeno de proteção de órgão através do APC.

Mesmo sem evidências sólidas de que algum fármaco possa proteger os rins contra o desenvolvimento de falência aguda, no período pré-operatório, substâncias são utilizadas com este objetivo. Dentre as testadas e até já empregadas, estão os antioxidantes utilizados para interferir na formação de metabólitos reativos do oxigênio (KERSTEN et al., 1997; MELIN; HELLBERG; FELLSTRÖM, 2003; HIROSE et al., 2008; LIPSHUTZ; GROPPER, 2009). Entretanto, alguns varredores de ROS podem desencadear efeito antagônico quando empregados concomitantes com anestésicos halogenados. Varredores de ROS como *N*-(2-mercaptopropionyl)glycine (MPG) e o *Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrinchloride* (MnTBAP) inibiram a ação protetora cardíaca promovida pelo isoflurano (MÜLLENHEIM et al., 2002). Da mesma maneira a N-acetilcisteína (NAC) impediu o APC do isoflurano em coelhos intactos (TANAKA et al., 2002).

Dentre os produtos disponíveis com evidências de ação antioxidante a melatonina apresenta propriedades promissoras na proteção renal durante o período de isquemia. É conhecida e estudada sua capacidade para reduzir a inflamação e proteger o citoesqueleto celular contra a apoptose, em tecido nervoso (ESPOSITO; CUZZOCREA, 2010), hepático (KANG; LEE, 2012) e renal (KURCER et al., 2007; ERSOZ et al., 2009; LI et al., 2009; VINAGRE, 2011). Estes estudos utilizaram doses variando entre 10 a 15 mg.kg⁻¹ e acredita-se que o efeito antioxidante da melatonina aconteça de maneira dose dependente. A maior dose utilizada de melatonina como protetor cardíaco e renal foi 50 mg.kg⁻¹ (PETROSILLO et al., 2006; CEYRAN et al., 2008; LI et al., 2009)

A melatonina, isolada pela primeira vez de glândulas pineais de bovinos em 1958, é uma molécula com produção noturna rítmica sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é captado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da enzima triptofanohidroxilase 1 (TPH1) (LERNER; CASE; HEINZELMAN, 1959). Apesar da melatonina encontrada no sangue ser derivada quase exclusivamente

da secreção da glândula pineal dos mamíferos, esta pode ser gerada em outros órgãos com possível ação local.

Além de atuar através de receptores presentes nas membranas celulares a melatonina também age diretamente como eliminador de radicais livres em todas as células ou por toda a célula de um organismo. Esta ação direta sobre os radicais livres gera produtos também com ação antioxidantes e pode atuar diretamente em enzimas antioxidantes com a superóxido dismutase e glutathione peroxidase aumentando sua atividade (REITER et al., 2007).

A produção excessiva de ROS resulta na peroxidação da membrana lipídica das células e outros componentes como: proteínas, enzimas e ácidos nucleicos causando necrose e morte celular por apoptose. Neste âmbito a melatonina e seus metabolitos são eficientes na remoção destes radicais livres de oxigênio (HO e H₂O₂) e espécies reativas de oxigênio (ROS) além de estabilizarem as membranas celulares submetidas a I/R (TANAKA et al., 2002; KURCER et al., 2007).

Outro fator importante que será avaliado é a hiperglicemia transitória, comumente encontrada em pacientes submetidos a intenso estresse pode acentuar a LRI, apoptose e resposta inflamatória aumentada. No caso do transplante renal o risco de rejeição do enxerto aumenta (CAETANO et al., 2011). A hiperglicemia é também identificada como fator risco promovendo o aumento da morbidade e mortalidade no perioperatorio (HIROSE et al., 2008; HUHN et al., 2008; BLASI-IBANEZ et al., 2009; FAHY; SHEEHY; COURSin, 2009; LI et al., 2009; LIPSHUTZ; GROPPER, 2009; NUNNALLY; O'CONNOR, 2009), com especial ação deletéria para o tecido renal (HIROSE et al., 2008).

2. Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar possível proteção renal de altas doses de melatonina em modelo experimental de I/R submetidos à hiperglicemia aguda em ratos anestesiados com isoflurano.

3. Material e Método

3.1. Modelo de Isquemia/Reperusão

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Quarenta e quatro ratos machos *Wistar* (Biotério Central do de Botucatu Campus da UNESP), com peso < 300 g, foram anestesiados com isoflurano.

3.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos que receberam por via intraperitoneal (IP).

Grupo (1) sham (n = 10): solução salina isotônica;

Grupo (2) melatonina (n=10): melatonina 50 mg.kg⁻¹;

Grupo (3) hiperglicemia (n=9): glicose a 50% 2,5 g.kg⁻¹;

Grupo (4) hiperglicemia/melatonina (n=10): glicose a 50% 2,5 g.kg⁻¹ + melatonina 50 mg.kg⁻¹;

Grupo (5) isquemia e reperusão (n=5): solução salina isotônica.

3.3. Sequência Experimental

Todos os ratos foram submetidos à seguinte sequência:

1. jejum alimentar;
2. pesagem dos animais;
3. sob campânula, anestesia do animal com isoflurano a 4% com fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 1,0, fluxo de 3 L.min⁻¹, em vaporizador Isotec 5 da Ohmeda;
4. Após aproximadamente 04 minutos o rato anestesiado é colocado em decúbito dorsal (posição supina) sobre bolsa térmica gel (MERCUR®) aquecida em banho-maria (Banho Maria Modelo 102, FANEM LTDA®, São Paulo, Brasil),

para manutenção da temperatura retal em aproximadamente 37⁰ Este animal é acomodado numa plataforma de madeira.

5. manutenção da anestesia com isoflurano entre 1,5 e 2,0%, com 0,4 L.min⁻¹ de oxigênio;
6. fixação do animal sobre plataforma de madeira através de fios de *cordônê* nas suas 4 patas; colocação de bolsa térmica sob o animal;
7. termômetro ligado a transdutor introduzido no reto do animal;
8. tricotomia da região cervical e abdominal com máquina de tosa (Oster®), seguida de antissepsia das mesmas regiões;
9. incisão mediana na região cervical, dissecação e cateterismo da veia jugular externa direita com cateter “*extra-catch*” número 24, modelo Angiocatch® BD, para manutenção com 5 mL.kg⁻¹.h⁻¹ da solução de Ringer lactato (RL) através da bomba de infusão Anne®, Abbott, EEUU, para reposição das perdas; fixação da veia jugular externa com fio de algodão 3-0;
10. pela mesma incisão cervical, dissecação da carótida esquerda, cateterização da mesma com cateter “*extra-catch*” número 24, modelo Angiocatch® BD; fixação da carótida com fio de algodão 3-0; colocação dos transdutores para monitorização da pressão arterial média (PAM), através da conexão distal do cateter ao aparelho AS/3 da “DatexEngstrom®” tipo D-VCN 15-00-02 S/N 763177 (Finlândia); fechamento da incisão cervical com fio de nylon 4-0 em chuleio contínuo; a lavagem do sistema da pressão arterial invasiva foi feita com solução em frasco de 500 mL de RL, onde estava contido 2.500 unidades de heparina;
11. MOMENTO 1 (M1): coleta de 1,5 mL de sangue arterial para leitura da concentração de creatinina e glicemia, seguida de reposição da volemia com 3 mL da solução de cloreto de sódio a 0,9% pela veia jugular;
12. injeção de solução salina (Grupo sham e isquemia e reperfusão) ou solução de glicose a 50% 2,5 g.kg⁻¹ (Grupo hiperglicemia) ou 50 mg.kg⁻¹ de melatonina diluída em álcool a 1%; (Grupo melatonina) ou de glicose a 50% 2,5 g.kg⁻¹ +

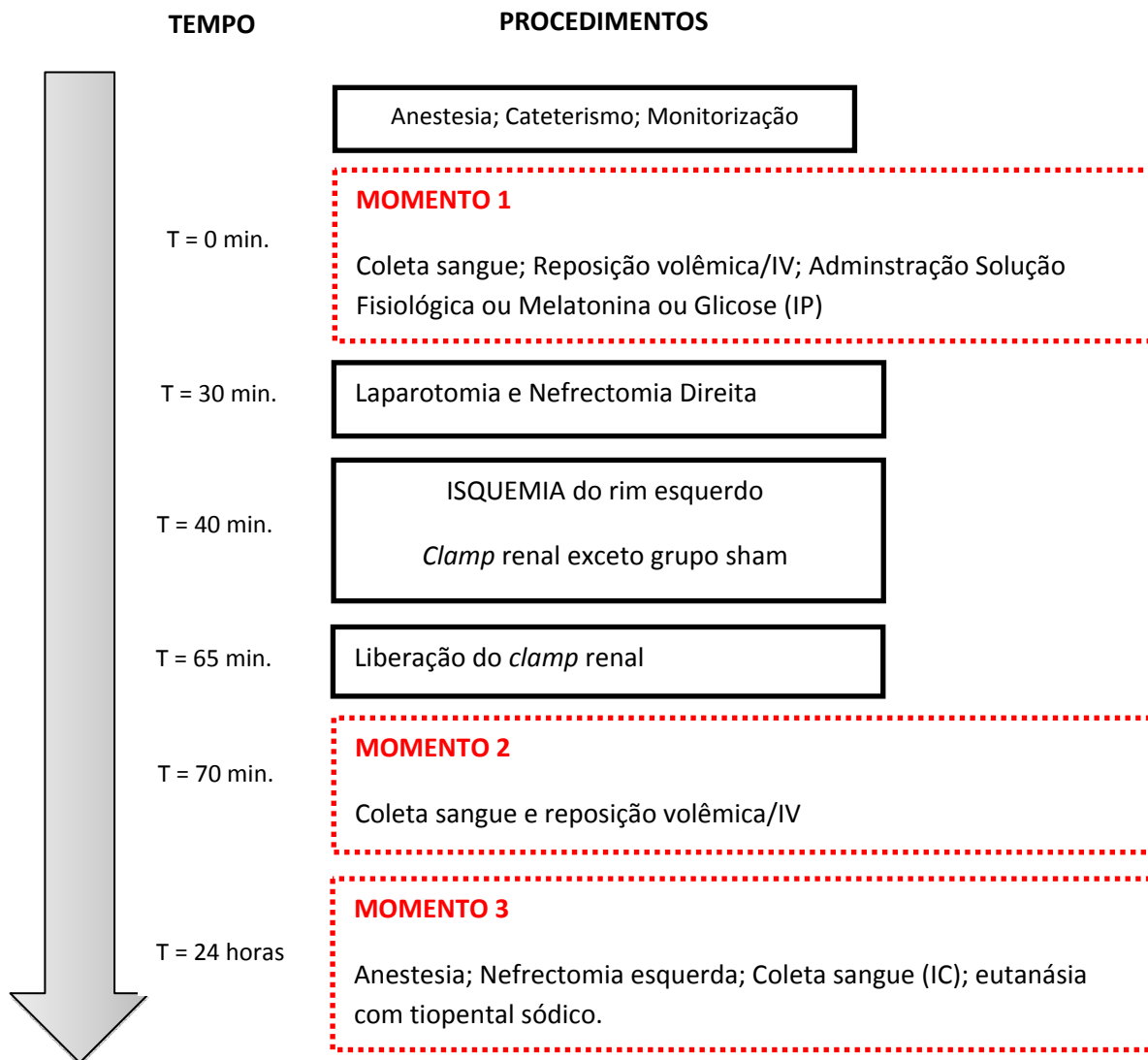
solução de melatonina (Grupo hiperglicemia e melatonina) em volumes iguais por via IP;

13. monitorização realizada através do aparelho Datex-Engstron (Finlândia). Os dados registrados em fichas individuais foram: a) temperatura retal (TR); b) frequência cardíaca (FC); c) pressão arterial média (PAM); d) saturação de oxigênio (sat O₂). Estes valores foram anotados a partir de M1 e na sequência após M1: aos 15 minutos, 30 minutos (nephrectomia direita), 35 minutos, 40 minutos (clampeamento da artéria renal esquerda e início da isquemia renal exceto o grupo sham), 50 minutos, 65 minutos (desclampeamento), pós-desclampeamento imediato e 70 minutos (M2).
14. nephrectomia direita (30 minutos após M1); cerca de 200 rins obtidos de nephrectomia direita por este laboratório, em pesquisas anteriores de I/R, foram submetidos aos exames histológicos e mostraram valores normais para este órgão.
15. exposição da artéria renal esquerda, isquemia renal através de *miniclamp* vascular atraumático (*bulldog*), aos 40 minutos após M1;
16. clampeamento da artéria renal esquerda por 25 minutos (exceto o grupo sham); observação da isquemia renal pela coloração do rim; durante o período de isquemia, a cavidade abdominal permaneceu fechada por meio de sutura com fio de nylon 4-0, com 3 a 4 pontos, em chuleio contínuo e recebeu aquecimento por bolsa térmica gel colocada sobre o abdome;
17. desclampeamento da artéria renal esquerda;
18. fechamento da parede abdominal com sutura contínua em único plano com fio de nylon 4-0 (geralmente 7 a 10 pontos); colocação de bolsa térmica gel sobre a parede abdominal até o término do procedimento;
19. MOMENTO 2 (M2): coleta de 1,5 mL de sangue arterial para leitura de creatinina e glicemia, seguida de reposição da volemia com 3 mL de solução salina;
20. ligadura da veia jugular externa direita;
21. ligadura da carótida esquerda;

22. infiltração da pele e subcutâneo com solução de bupivacaina (0,3 mL a 0,5%, diluídos com 0,7 mL de soro fisiológico (0,15 %), injetando-se 0,3 mL nas paredes da incisão cervical e 0,7 mL nas paredes da incisão abdominal;
23. recuperação anestésica do animal;
24. manutenção do animal em gaiola de *container* climatizado, com alimentação *ad libitum* por 24 horas;
25. 24 horas após a reperusão do rim esquerdo: foi feita anestesia do animal com isoflurano a 4%, sob a campânula;
26. colocação do animal anestesiado sobre o plano de madeira;
27. retirada dos pontos da laparotomia mediana;
28. MOMENTO 3 (M3): nefrectomia a esquerda para exame histológico; coleta de 3 mL de amostra sanguínea intracárdica, para as dosagens bioquímicas;
29. sacrifício dos animais com 160 mg.kg⁻¹ de tiopental sódico. pentobarbital sódico a 2,5%, por via intracárdica;

Os animais receberam infusão contínua de solução Ringer lactato a 5 mL. kg⁻¹. h⁻¹, para reposição de perdas de fluidos imediatamente após o cateterismo, com auxílio de bomba de infusão (Bomba de Anne, Abbott, EUA). A temperatura retal foi mantida entre 37 e 38,9 ° C.

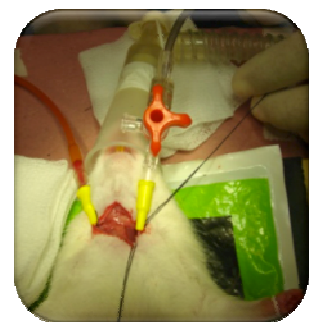
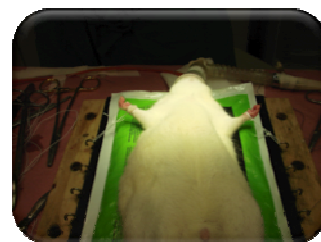
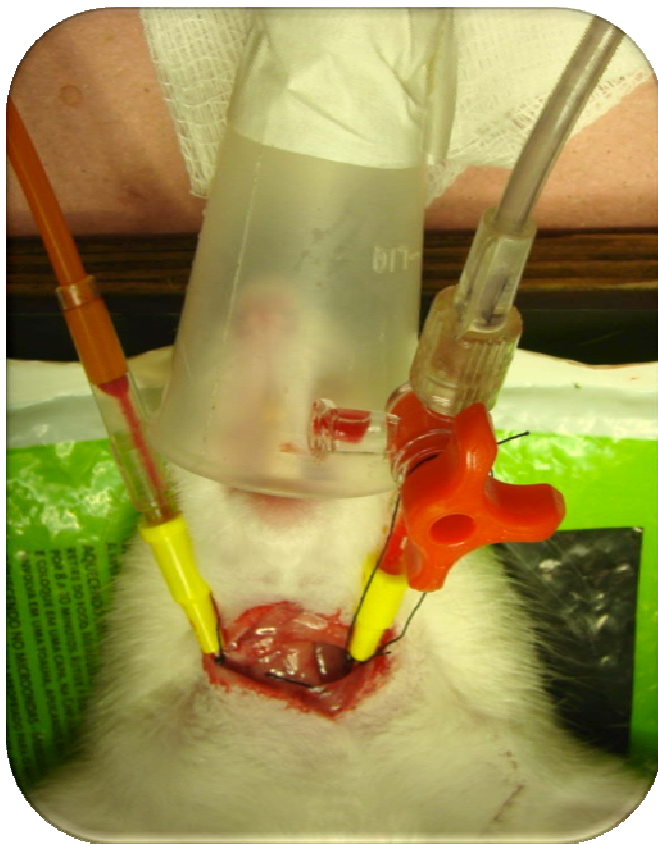
Sequência experimental com relação ao tempo.



IV: intravenosa; IP: intraperitonal; IC: intracárdica; T: tempo

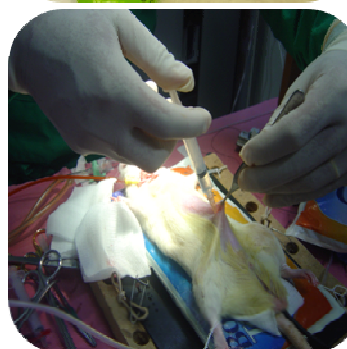
T = 0 min.

Anestesia; Cateterismo; Monitorização.



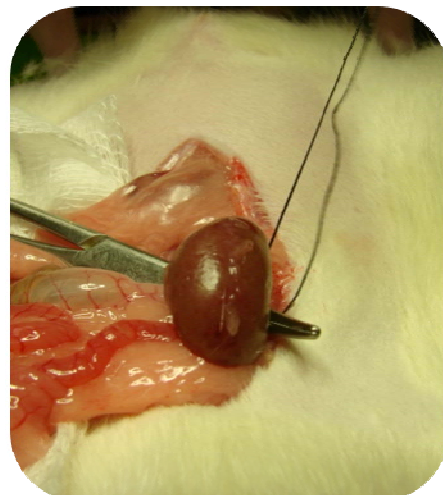
MOMENTO 1

Coleta sangue; Reposição volêmica/IV; Administração Solução Fisiológica ou Melatonina ou Glicose (IP)



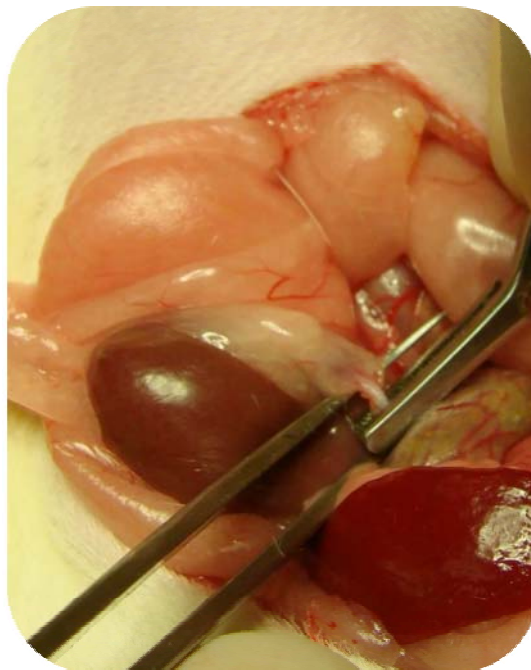
T = 30 min

Laparotomia e Nefrectomia Direita



T = 40 min.

ISQUEMIA do Rim Esquerdo - *Clamp* renal

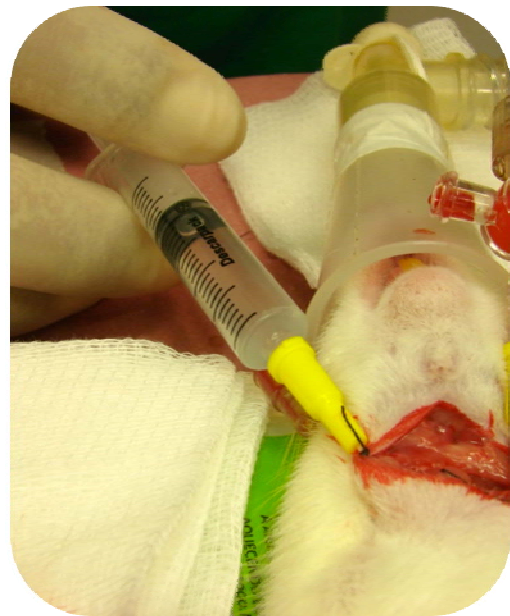


T = 65 min.

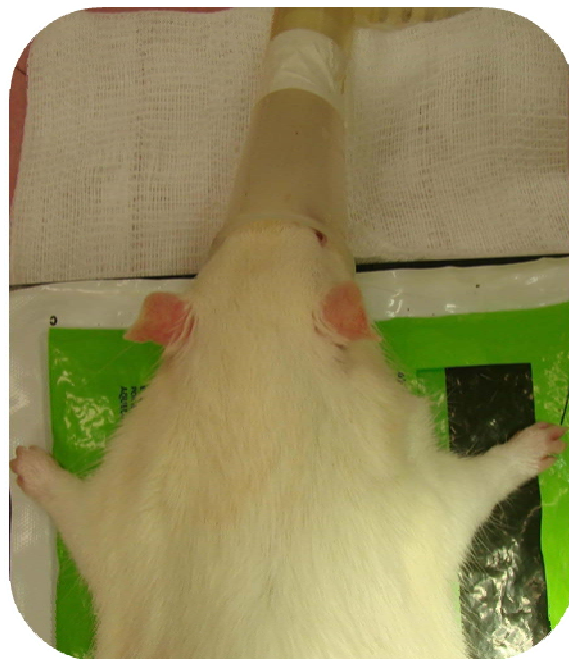
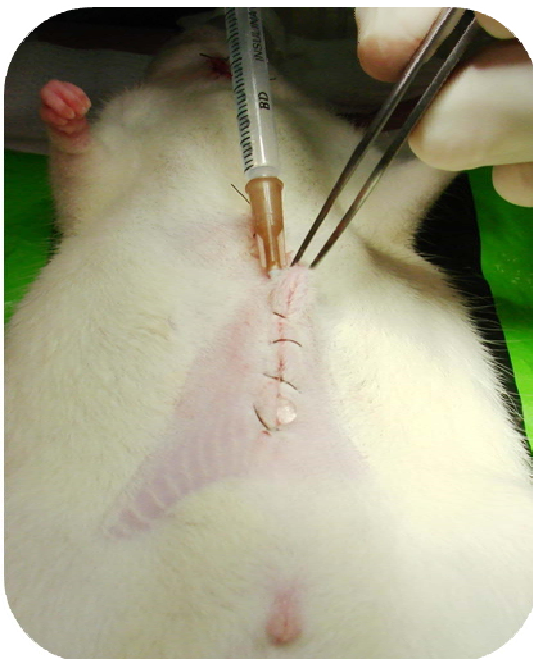
Liberação do *clamp* renal

MOMENTO 2

Coleta sangue e reposição volêmica/IV

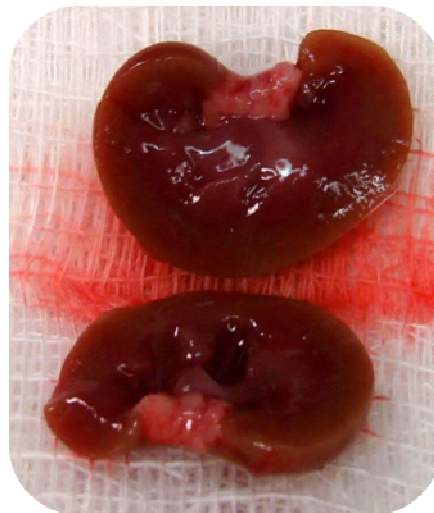
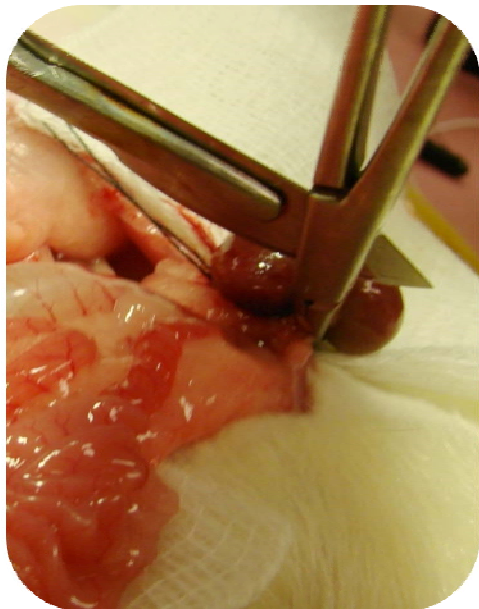


Infiltração da pele e subcutâneo com solução de bupivacaina e recuperação anestésica



MOMENTO 3

Anestesia; Nefrectomia esquerda; Coleta sangue (IC); Eutanásia com tiopental sódico.



3.4. Estudo histológico

Após nefrectomia o rim esquerdo foi removido e imediatamente seccionado ao longo do eixo maior. Metade deste foi fixado em solução de Formol Tamponado (Fosfato de sódio monobásico 20g, Fosfato de sódio dissódico anidro 22g, Água destilada 4500mL e Formoldeído 37%, 500mL) durante 48 horas e a seguir, armazenados em álcool 70% para posterior estudo histológico com coloração de hematoxilina-eosina (HE).

O patologista responsável pela avaliação das amostras não teve conhecimento sobre a qual grupo pertencia o rim. Na análise histologia todos os túbulos proximais e distais foram analisados e classificados de acordo com: degeneração tubular, picnose, cariorrexe, congestão vascular, dilatação tubular, necrose e presença de células inflamatórias. O grau de lesão renal(PARK et al., 2008) foi diagnosticado pela determinação da necrose presente em cada rim através de escala de 0-5 segundo o dano renal:

Tabela 1- Grau de lesão renal utilizado para classificação do dano renal

GRAU LESÃO	NECROSE TUBULAR
Grau 0	Sem alterações
Grau 1	Alterações leves (menos de 10%)
Grau 2	Alterações de leves a moderadas (10 a 25%)
Grau 3	Alterações de moderadas a intensas (25 a 50%)
Grau 4	Alterações intensas (50 a 75%)
Grau 5	Alterações intensas a muito intensas (acima de 75%)

Adaptado de Park et al., 2008.

3.5. Análise Estatística(MORRISON, 1967)

Para a análise estatística dos dados obtidos empregamos análise de variância inteiramente ao acaso, seguido do teste de Tukey para as comparações múltiplas entre as médias. Nas determinações das medianas empregamos teste de Kruskall-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Considerou-se estatisticamente significativo quando o $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Peso (g)

O peso dos animais não diferiu entre os grupos sham, melatonina, hiperglicemia/melatonina e isquemia renal, respectivamente, porém, o grupo hiperglicemia apresentou diferença significativa ($p=0,006$) dos demais grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Peso (g) dos ratos. Média e desvio padrão segundo o grupo

Grupos	Média
Sham	418,0±62,5B
Melatonina	431,0±37,6AB
Hiperglicemia	486,7±36,7A
Hiperglicemia/melatonina	421,5±37,3B
Isquemia renal	408,0±27,7B

Letras maiúsculas comparam médias dos grupos. Grupos seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente. Teste de Tukey, $p=0,006$.

4.2. Temperatura (°C)

A temperatura retal não apresentou diferença entre os grupos, momentos estudados ou interação entre momento x grupo (Tabela 3).

Tabela 3-Temperatura retal (°C) dos ratos. Média e desvio-padrão segundo momento e grupo

Grupos	Momento			Média geral grupo
	M1	M2	M3	
Sham	37,8±0,6	37,6±0,6	38,0±0,5	37,8±0,6
Melatonina	37,8±0,9	38,3±0,6	38,1±0,6	38,1±0,7
Hiperglicemia	37,8±0,5	38,2±0,7	38,3±0,4	38,1±0,6
Hiperglicemia/melatonina	38,5±0,4	38,8±0,8	38,7±0,6	38,7±0,6
Isquemia renal	37,8±0,9	37,6±0,9	37,8±0,4	37,7±0,7
Média geral momento	37,9±0,7	38,2±0,8	38,2±0,6	

Não houve efeito de grupo(P=0,45), nem houve efeito de momento(P=0,42) e nem da interação momento x grupo (P=0,51). Análise de perfil.

4.3 Pressão Arterial Média (mmHg)

A PAM (pressão arterial média) não diferiu individualmente entre os momentos M1, M2, M3 nos grupos estudados, porém houve diferença entre os grupos ($p<0,0001$), sendo que os grupos melatonina e hiperglicemia apesar de não diferirem entre si apresentaram as maiores médias (tabela 4 e figura 1). Os grupos sham e isquemia/reperfusão tiveram médias superiores ao grupo hiperglicemia/melatonina. Não ocorreu diferença estatísticas entre momento x grupo.

Tabela 4 - Pressão Arterial Média (mmHg). Média e desvio-padrão segundo momento e grupo

Grupos	Momento			Média geral de grupo
	M1	M2	M3	
Sham	108±7	97±10	93±12	99±12
Melatonina	123±8	121±7	122±15	122±10
Hiperglicemia	115±10	116±9	116±7	116±8
Hiperglicemia/ melatonina	72±11	71±12	70±17	71±13
Isquemia renal	98±15	93±13	95±11	95±12
Média geral de momento	103±21	100±21	99±23	

Houve efeito de grupo($P<0,0001$), mas não houve efeito de momento($P=0,10$) e nem da interação momento x grupo ($P=0,27$). Análise de perfil.

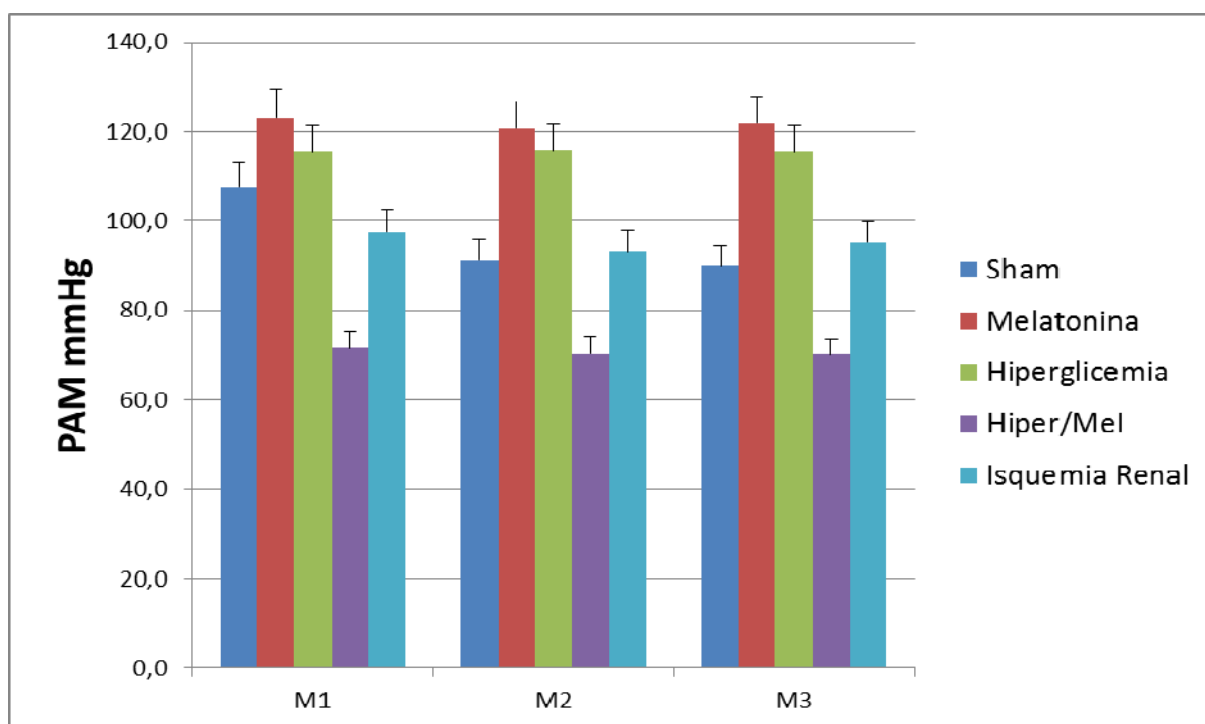


Figura 1- Valores médios e desvio padrão da PAM segundo momento e grupo.

4.4 Creatinina plasmática (mg.dL⁻¹)

As dosagens de creatinina plasmática mostraram aumento gradativo de seus valores nos momentos estudados, sendo que o M3 foi o maior em todos os grupos ($P=0,0001$) (tabela 5 e figura 2). Os grupos hiperglicemia/melatonina, hiperglicemia e isquemia renal apresentaram os maiores valores de M3 e o grupo sham teve valores menores enquanto o grupo melatonina teve valores intermediários entre o sham e os demais grupos ($P=0,0001$).

Tabela 5 - Creatinina plasmática dos ratos (mg.dL⁻¹). Média e desvio-padrão segundo momento e grupo

Grupo	Momento			Média geral do grupo
	M1	M2	M3	
Sham	0,31±0,03	0,39±0,07	0,79±0,16	0,50±0,24
Melatonina	0,28±0,04	0,57±0,07	2,01±1,01	0,95±0,95
Hiperglicemia	0,32±0,04	0,67±0,09	3,71±0,69	1,57±1,60
Hiperglicemia/melatonina	0,30±0,00	0,66±0,13	3,90±0,46	1,54±1,67
Isquemia renal	0,30±0,00	0,54±0,05	3,60±0,37	1,48±1,57
Média geral do momento	0,30±0,03	0,57±0,14	2,66±1,40	

($P<0,0001$) para grupo, ($P<0,0001$) para momento e ($P<0,0001$) para momento x grupo. Análise de perfil.

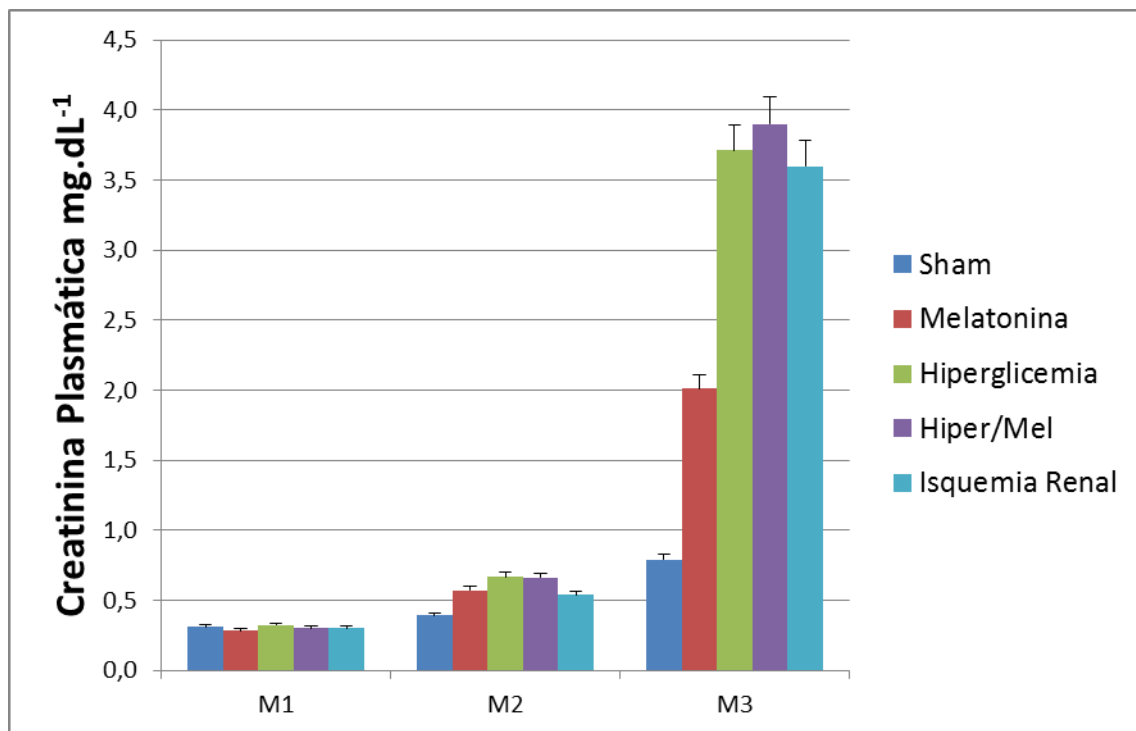


Figura 2- Valores médios de creatinina plasmática segundo momento e grupo.

4.5 Glicemia plasmática (mg.dL⁻¹)

A análise da glicemia sanguínea revelou diferenças entre os grupos ($P<0,0001$) sendo que os animais que receberam suplementação de glicose mantiveram glicemia acentuada no M2 com queda posterior em M3. Os grupos que apresentaram os menores valores no M2 foram: sham ($234,90 \pm 57,56$), melatonina ($295,90 \pm 92,30$) e isquemia renal ($225,80 \pm 30,63$) ($P=0,0003$), os grupos hiperglicemia ($356,00 \pm 107,83$) e hiperglicemia/melatonina ($445,3 \pm 148,32$) apontaram os maiores valores (tabela 6 e figura 3).

Tabela 6 - Glicemia plasmática dos ratos (mg.dL⁻¹). Média e desvio-padrão segundo momento e grupo

Grupo	Momento			Média geral do grupo
	M1	M2	M3	
Sham	231,20±55,5	234,90±57,56	187,30±47,6	217,80±56,34
Melatonina	263,80±43,2	295,90±92,30	186,20±24,9	248,63±74,91
Hiperglicemia	216,33±73,7	356,00±107,8	196,22±41,3	256,19±104,9
Hiperglicemia/Melatonina	246,70±21,7	445,30±148,3	162,00±45,2	284,67±150,3
Isquemia renal	220,00±18,7	225,80±30,63	159,20±20,3	201,67±38,19
Média geral do momento	237,82±50,0	320,32±126,9	179,93±39,8	

Houve efeito de grupo($P<0,0001$), de momento($P<0,0001$) e da interação momentoxgrupo($P=0,0003$).

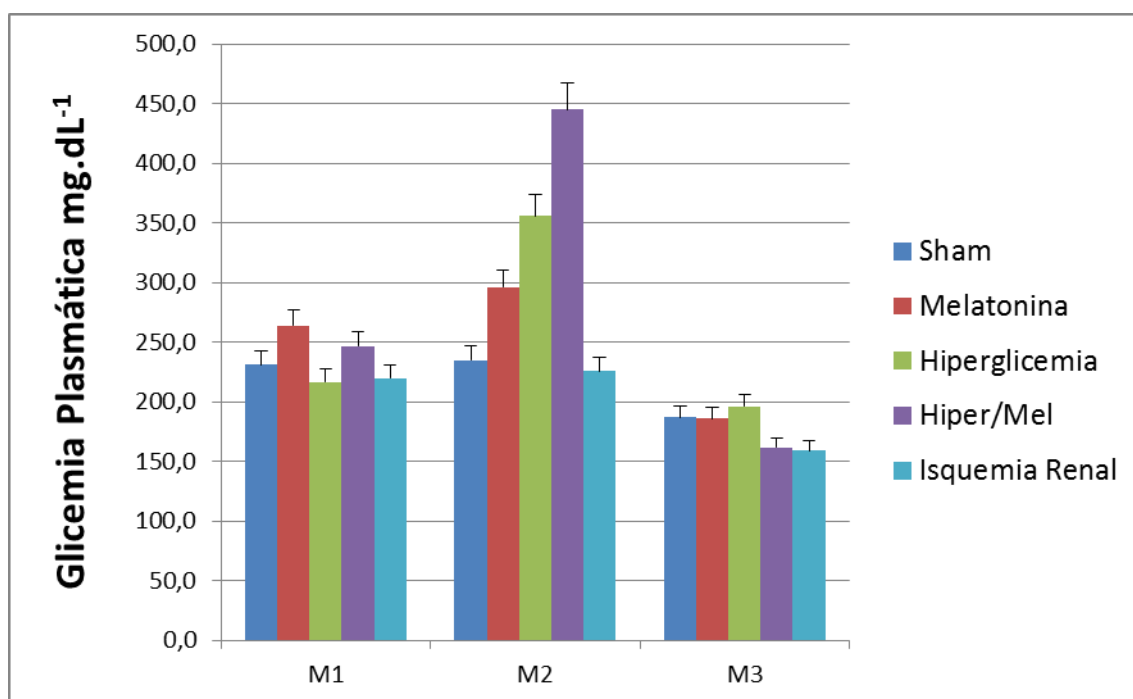


Figura 3 - Valores médios de glicemia segundo momento e grupo.

4.6 Avaliação Histológica

A avaliação histológica do rim esquerdo constatou ausência de lesão no grupo sham (0) e lesão grau 2 nos animais tratados com melatonina, grau 4 nos grupos hiperglicemia e isquemia renal e 5 para os ratos que receberam glicose e melatonina. Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) (tabela 7 e figuras 4 a 9).

Tabela 7 - Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes, referentes à variável histológica segundo grupo

Grupo	Mediana e quartis
Sham	0,0[0,0;0,0]C
Melatonina	2,0[2,0;2,0]B
Hiperglicemia	4,0[3,0;4,0]A
Hiperglicemia/Melatonina	5,0[4,0;5,0]A
Isquemia renal	4,0[4,0;5,0]A

Grupos seguidos de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente, $P < 0,0001$.

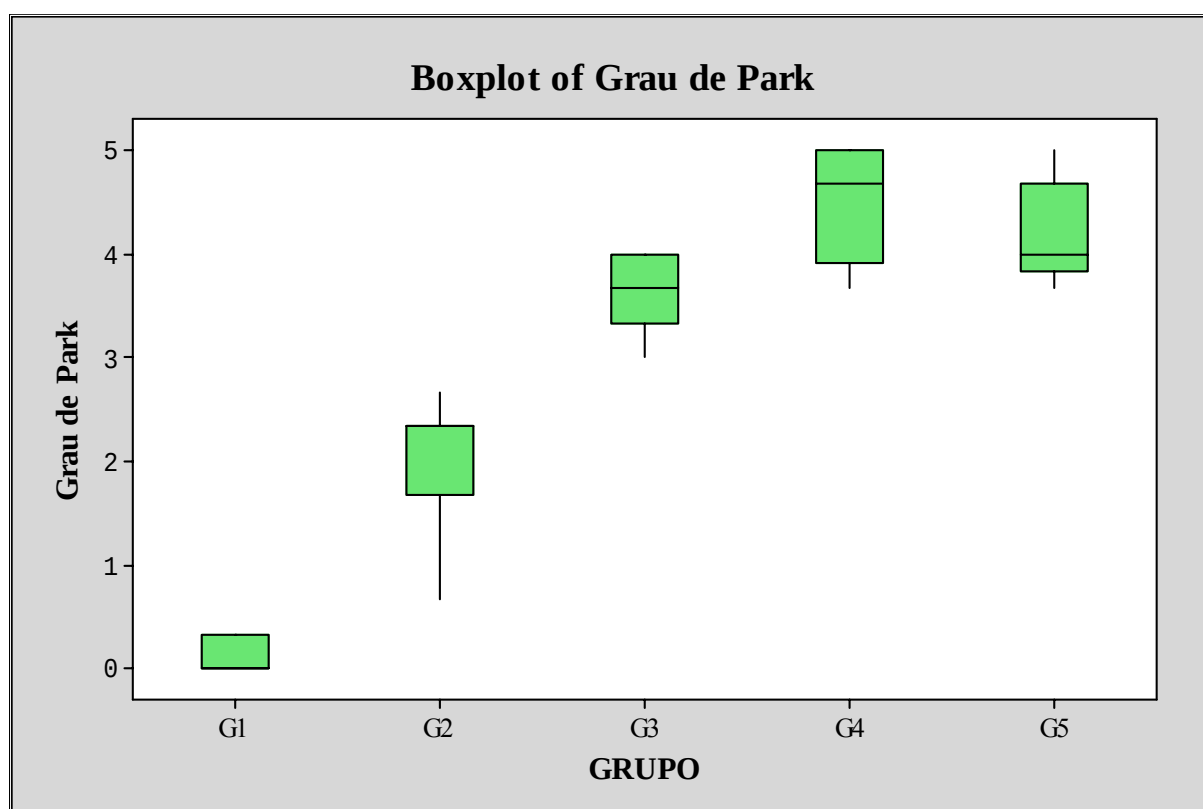


Figura 4 –Boxplot do grau de intensidade da lesão renal (PARK et al., 2008) entre grupos. (G1=sham, G2= metatonia, G3= hiperglicemia, G4= hiperglicemia/melatonina, G5 = isquemia e reperfusão).

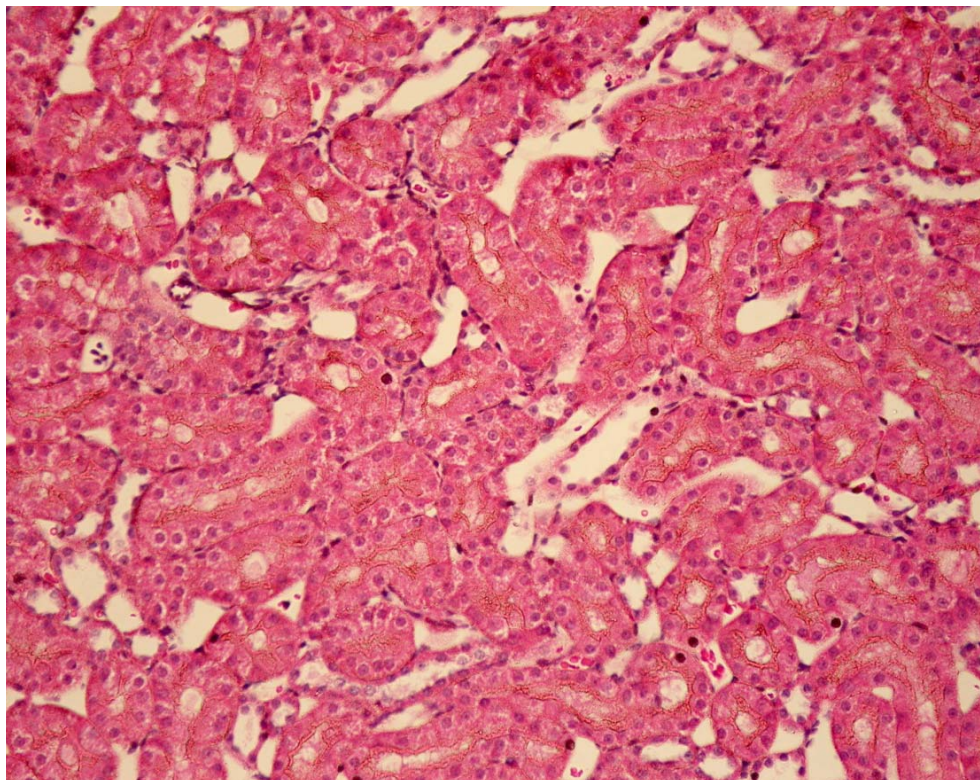


Figura 5 - Grupo sham – grau zero de Park (aumento 400x), corada com HE.

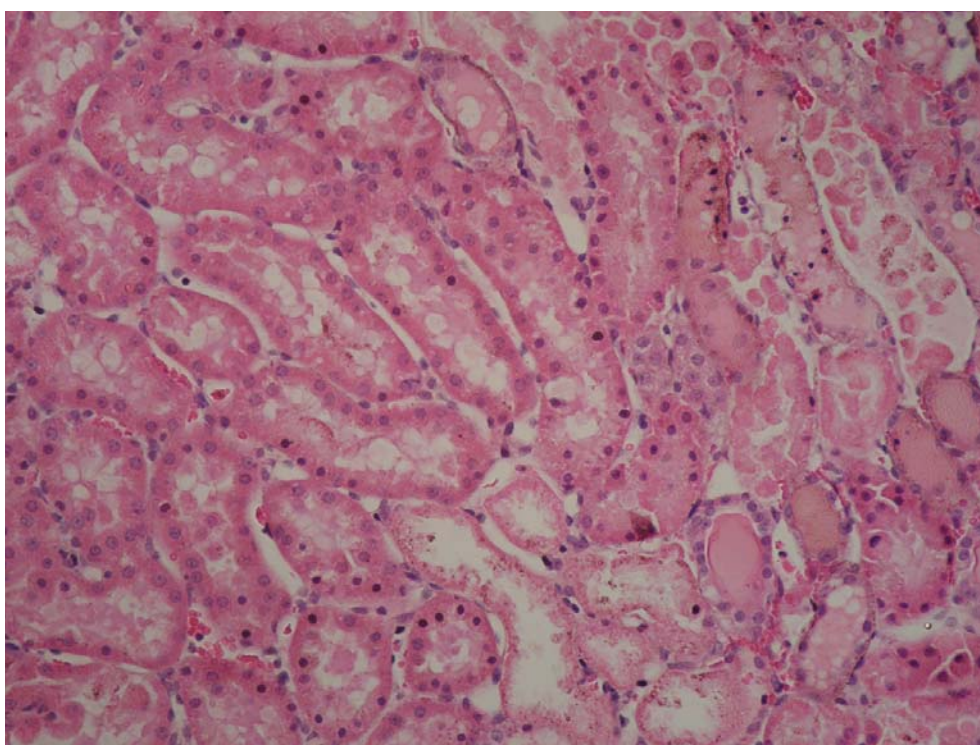


Figura 6 - Grupo melatonina – grau dois de Park (aumento 400x), coradas com HE. Necrose Tubular Aguda inferior a 20% em transição córtico-medular com núcleos picnóticos, perda da coesividade das células que revestem os túbulos.

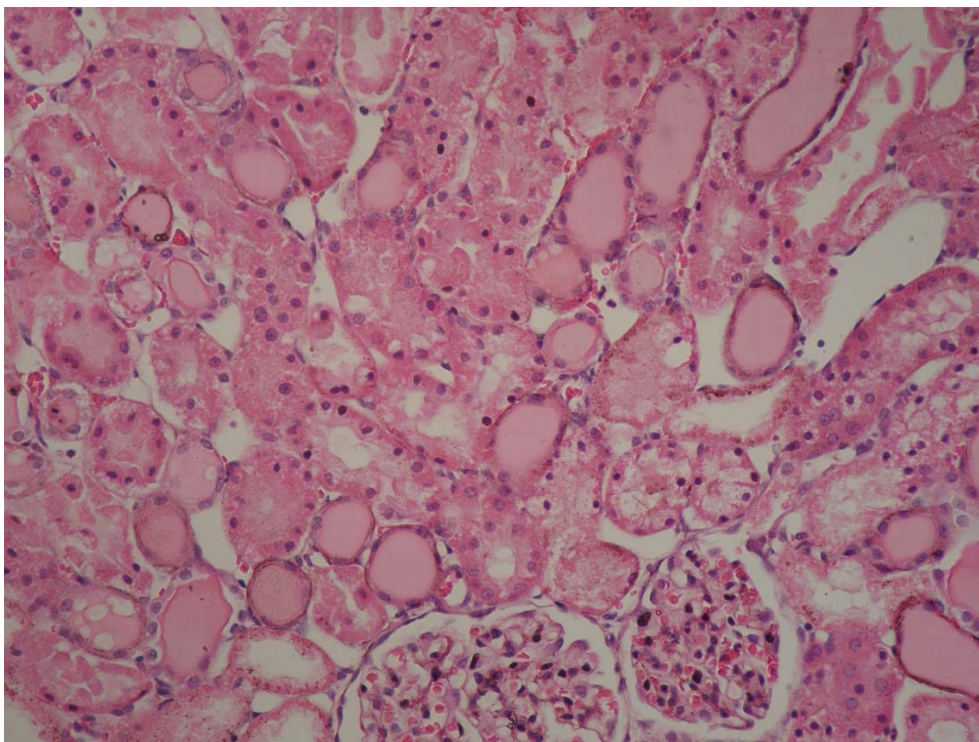


Figura 7 – Grupo hiperglicemia – grau quatro de Park (aumento 400x), coradas com HE, exibindo Necrose Tubular Aguda na transição córtico-medular em aproximadamente 70% da área. Presença intensa de cilindros hialinos intratubulares, cariorresis e núcleos picnóticos.

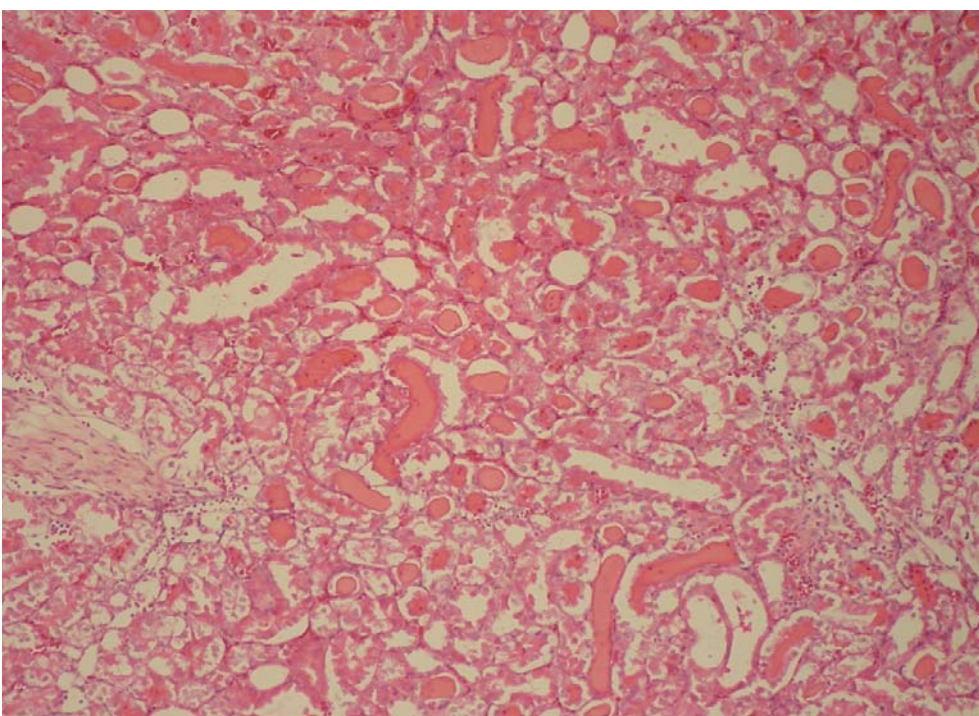


Figura 8 – Grupo hiperglicemia + melatonina– grau cinco de Park (aumento 200x). Corada com HE. Necrose Tubular Aguda com amplas áreas de hemorragia, cilindros hemáticos e hialinos intratubulares e núcleos picnóticos em mais de 75% do tecido.

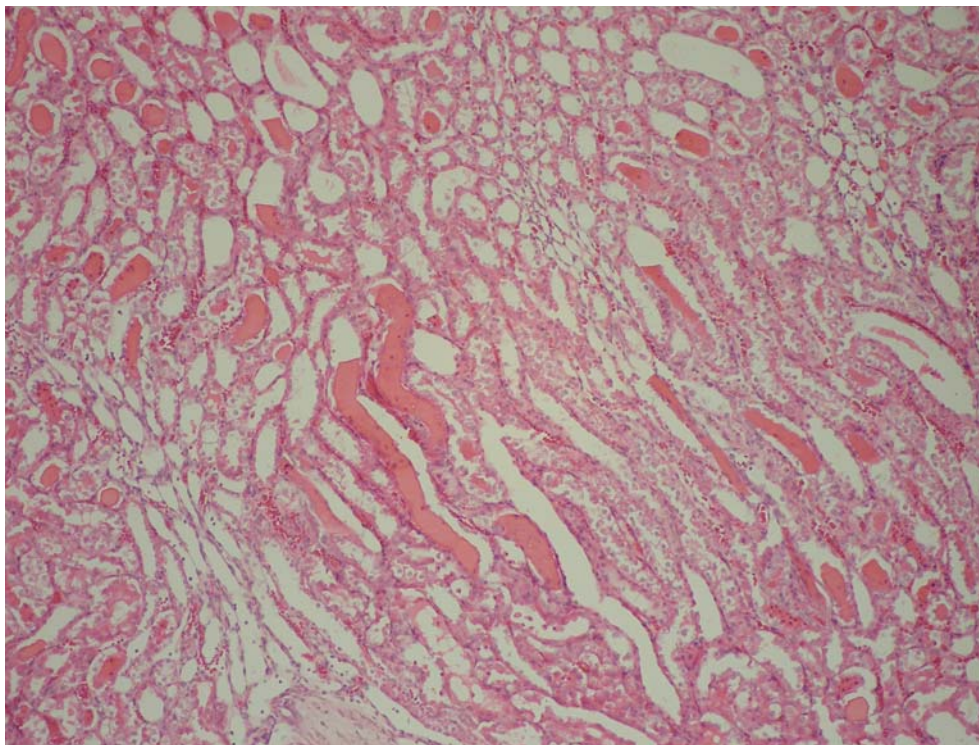


Figura 9 – Grupo isquemia e reperfusão– grau quatro de Park (aumento 200x). Necrose Tubular Aguda com amplas áreas de degeneração superior a 70%.

5 Discussão

5.1 Modelo Animal

A pesquisa científica busca respostas para alterações do homem e dos animais. O desenvolvimento de modelo biológico *in vivo* busca alcançar resultados análogos dos obtidos nos hospitais e têm por objetivo protegê-los de danos causados por substâncias, doenças ou outras causas que prejudiquem sua saúde ou bem estar e elucidar os mecanismos pelos quais uma doença pode ser evitada, minimizada ou mesmo curada.

Neste trabalho foram empregados ratos *Wistar* por apresentarem características anatômicas, fisiológicas e de susceptibilidade a lesão renal I/R (PARK et al., 2008; ROSO et al., 2012).

O modelo de condicionamento renal na injúria de isquemia/reperfusão (I/R) em ratos adotado neste trabalho é empregado no Laboratório de Anestesia Experimental da UNESP/Botucatu há seis anos com excelência na padronização e harmonização do ensaio (VIANNA et al., 2009; CAETANO et al., 2011; CURTIS et al., 2011; MANSANO et al., 2012; ROSO et al., 2012; AZEVEDO et al., 2013).

Os animais foram anestesiados com isofluorano com respiração espontânea e mantidos com máscara facial. As concentrações anestésicas de indução (4%) e manutenção (1,5 a 2%) permitiram incisão cirúrgica, nefrectomia e manutenção do transoperatório sem desconforto e com relaxamento muscular satisfatório para execução da técnica cirúrgica. O controle pós-operatório da dor se mostrou eficaz com infiltração da pele e subcutâneo com bupivacaina.

A profundidade da anestesia foi semelhante em todos os grupos. Neste modelo, a nefrectomia direita é feita com o intuito de minimizar o efeito compensatório do rim sem isquemia (PARK et al., 2008; ROSO et al., 2012).

A utilização da via intraperitoneal (quadrante inferior direito da região abdominal) permite a administração de volumes relativamente grandes (até 10 mL) sem causar complicações.

O tempo de isquemia de 25 minutos foi empregado por causar lesões de graus leves a moderadas (PARK et al., 2008) possibilitando a interação do efeito lesivo da hiperglicemia (HIROSE et al., 2008).

A isquemia transitória foi confirmada pela mudança de coloração do órgão (VIANNA et al., 2009; CAETANO et al., 2011; CURTIS et al., 2011; MANSANO et al., 2012; ROSO et al., 2012; AZEVEDO et al., 2013).

A manutenção de volemia dos animais com a reposição das perdas e infusão com Ringer lactato, tinha como meta evitar a hipovolemia e as sua consequência para o rim.

Como parâmetro do controle hemodinâmico bem sucedido pode-se apresentar a pressão arterial média (PAM) estável e sem diferença significativa entre momentos.

A estabilidade da temperatura retal (mantendo-se os animais normotérmicos $>37^{\circ}\text{C}$) (tabela 2) é fundamental ao modelo proposto, pois a hipotermia pode causar proteção do tecido renal (PARK et al., 2008).

A manutenção da temperatura no modelo de condicionamento I/R influencia diretamente a gravidade da lesão celular. A proteção de órgãos através da hipotermia intencional leva a proteção celular pela redução do metabolismo permitindo procedimentos como transplantes. Delbridge et al. (2007) obteve redução da lesão isquêmica em modelo de condicionamento nos animais submetidos à hipotermia ($36,2^{\circ}\text{C}$) com níveis de creatinina 2,8 vezes menor que o grupo normotérmico (37°C) e aproximadamente 5 vezes menor que o grupo hipertérmico (DELBRIDGE et al., 2007).

Os mecanismos de aumento da lesão renal na hipertermia podem estar relacionados com a diminuição da reabsorção tubular de sódio e de ATP, aumento da degradação inosina e hipoxantina que atuam como substrato para a enzima xantina oxidase levando a síntese de ácido úrico uma importante fonte de produção de radicais livres e aumento de ácidos graxos livres e lactato desidrogenase levando a morte celular (ZAGER; ALTSCHULD, 1986; DELBRIDGE et al., 2007).

5.2 Avaliação da creatinina plasmática

A creatinina é um produto endógeno do metabolismo muscular, eliminado pelos rins, empregado na prática clínica para avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG). Apesar de ser empregada como biomarcador da TFG sua interpretação deve ser acompanhada com cautela. O nível sérico de creatina sofre alterações dependentes da idade, do sexo, do estado nutricional e massa muscular e se mostra superior aos níveis basais após diminuição de 50 a 60% da TFG e pela baixa sensibilidade nas fases iniciais da lesão renal (METRA et al., 2012).

Pesquisas com biomarcadores como cistatina C, N-acetil-B-D-glucosaminidase (NAG), Lipocalina Associada com Gelatinase de Neutrófilos Humanos (NGAL), KIM-1 Kidney Injury Molecule-1 e IL 18 possibilitam a identificação da LRA precocemente antes do comprometimento estrutural do órgão (ABOUCACRA et al., 2012; TSIGOU et al., 2013). Como inconvenientes apresentam alto custo (TRAYNOR et al., 2006; BAGSHAW; GIBNEY, 2008). A creatinina é um biomarcador muito específico de lesão renal, mas, a sua elevação só acontece tardiamente. O modelo experimental usado nesta pesquisa avaliou a lesão renal 24 h após o episódio de I/R e assim a utilização da creatinina plasmática, neste estudo, está plenamente justificada.

As dosagens de creatinina plasmática mostraram aumento gradativo de seus valores nos momentos estudados. Os grupos hiperglicemia/melatonina, hiperglicemia e isquemia renal apresentaram os maiores valores de M3 e os grupos sham e melatonina foram menores, evidenciando proteção renal dos animais que receberam melatonina mesmo após I/R (tabela 5).

5.3 Avaliação da hiperglicemia plasmática

A análise da glicemia sanguínea revelou diferenças entre os grupos sendo que os animais que receberam suplementação de glicose mantiveram glicemia acentuada no M2 (hiperglicemia/melatonina e hiperglicemia) após I/R com queda posterior em M3, igualmente observada em todos os grupos. Os menores valores no M2 foram: sham, melatonina e isquemia renal (tabela 6).

Os efeitos deletérios da hiperglicemia em pacientes diabéticos ou com hiperglicemia transitória predispõe ao aumento da mortalidade no peri e pós operatório (FAHY; SHEEHY; COURSin, 2009a,b; FURNARY, 2009). Além de reduzir o benefício do condicionamento isquêmico e anestésico, especialmente dos inalatórios que são diminuídos ou abolidos na presença da hiperglicemia transitória ou crônica (KERSTEN et al., 1998).

O condicionamento obtido com o isoflurano é prejudicado pela diabetes induzida quimicamente ou pela administração de dextrose intravenosa. As concentrações de glicose no sangue foram determinantes para mensuração da área de infarto do miocárdio em um modelo canino de diabetes. A inibição do APC ocorreu possivelmente pela inibição da atividade do canal de KATP (canal de potássio sensível à adenosina tri-fosfato) *in vivo*, mecanismo necessário para que ocorra o APC (TANAKA et al., 2002).

Em estudo utilizando modelo de I/R idêntico ao empregado nesta tese, Hirose et al., demonstram que a hiperglicemia transitória imediatamente antes ou durante o período de isquemia renal diminui significativamente a função e aumenta a lesão renal. Os mecanismos envolvidos na lesão do órgão em condições de hiperglicemia crônica têm sido atribuídos ao aumento do estresse oxidativo. Nos animais com hiperglicemia transitória não diabéticos o aumento da degradação das xantinas geradoras de espécies reativas de oxigênio levam a estresse oxidativo que predispõe a liberação de cininas pró-inflamatórias, quimioquinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão predispondo a inflamação (PODRAZIK et al., 1989; HIROSE et al., 2008).

5.4 Avaliação da histologia renal

A análise histológica das lâminas dos rins esquerdos, utilizando o escore de 1 a 5 segundo Park et al. (2008) demonstraram ausência de lesão nos animais do grupo sham e mostrou que o modelo utilizado nesta pesquisa não causou alterações renais servindo de controle para os demais grupos experimentais.

O grupo melatonina diferiu do grupo sham pela presença de lesões leves a moderadas (máximo 25%). Entretanto, estas lesões foram menores do que a observada nos grupos com hiperglicemia ou isquemia sem melatonina que apresentaram necrose superior a 75%. Neste estudo a melatonina atenuou a gravidade da lesão causada pela I/R. Fica demonstrado o efeito protetor deste antioxidante, mas, esta melatonina, mesmo em dose elevada não foi capaz de impedir os efeitos da I/R associada a hiperglicemia.

Os rins com lesão necrótica apresentaram maior degeneração na região de transição corticomedular com intensa presença de picnose, cariorrexe, congestão e acúmulo de células inflamatórias como neutrófilos e linfócitos resultados similares foram obtidos por Park (PARK et al., 2008).

5.5 Melatonina: ação antioxidante

A apoptose descrita como regulador da homeostase é essencial durante o desenvolvimento e envelhecimento do organismo para eliminar células de maneira ordenada na ausência de processo inflamatório (RODRIGUEZ et al., 2013). Sua ação na defesa do organismo contra infecções, reações imunes ou células danificadas por doenças ou agentes nocivos mantem o equilíbrio celular. Existe uma variedade de estímulos e condições patológicas que desencadeiam a apoptose por enzimas pró-

apoptóticas extrínsecas como fator de necrose tumoral e Fas que ativam a via das caspases e intrínsecas (BH3, Bcl-2), associada às membranas do retículo endoplasmático, envelope nuclear e membrana mitocondrial externa. O estímulo apoptótico pode ser bloqueado por ação de proteínas anti-apoptóticas (família Bcl-2 - BH1, BH2, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w) que impedem a morte da célula (ELMORE, 2007; FERREIRA et al., 2010).

Com a ativação da via intrínseca ou mitocondrial por fatores como hipóxia tecidual ocorrem modificações nas mitocôndrias como o bloqueio da síntese de ATP e aumento de espécies reativas de oxigênio que predispõe a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos mais ativação de caspases (ELMORE, 2007).

Neste contexto a melatonina age diretamente nas vias extrínseca, ao modular expressão de receptores de morte e intrínseca ao eliminar radicais livres do citoplasma celular (FERREIRA et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2013).

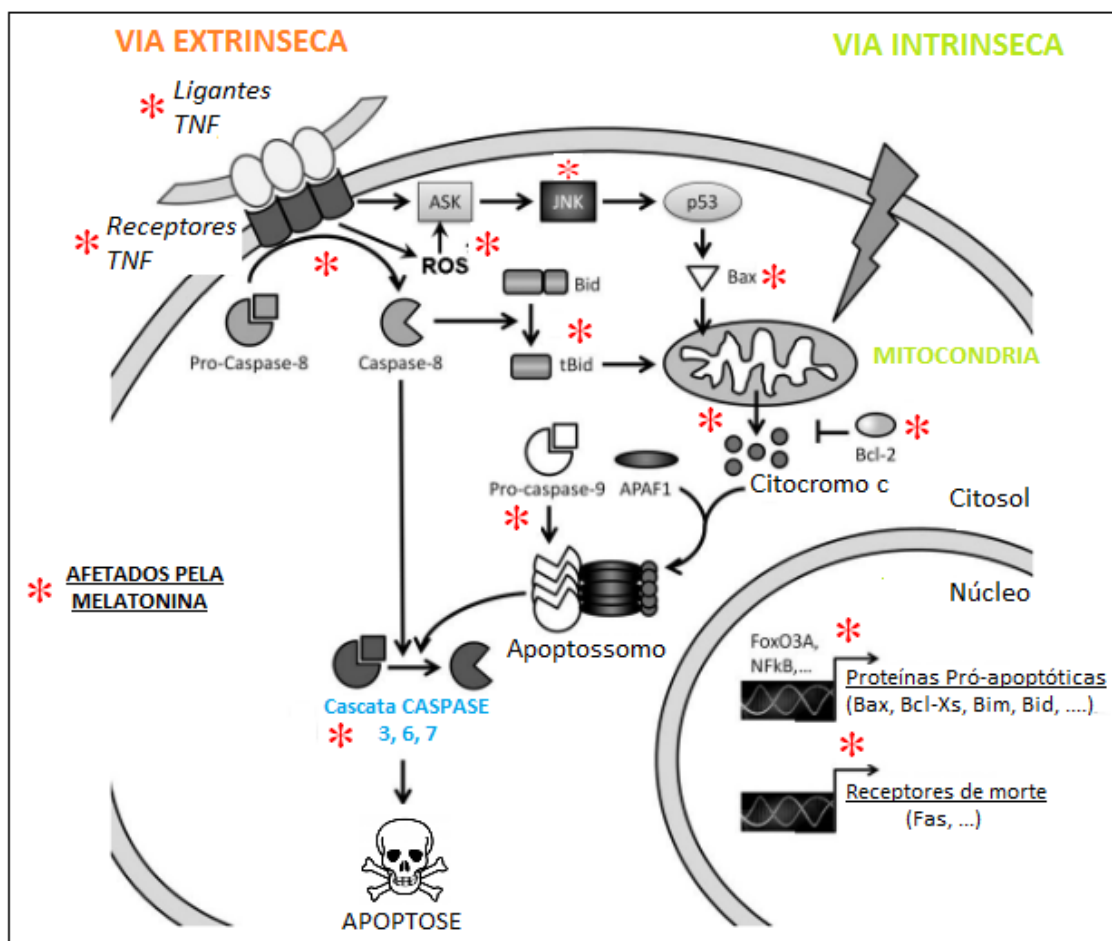


Figura 10 – Vias de apoptose: intrínseca e extrínseca, afetadas pela ação da melatonina (□). Adaptado (RODRIGUEZ et al., 2013)

Como importante varredor de radicais livres a melatonina apresenta ação antioxidante direta e indireta ao estimular enzimas antioxidantes ou potencializar seus efeitos além da estimulação da síntese de glutathiona (antioxidante intracelular) (REITER et al., 2007).

Neste trabalho foi empregado modelo experimental de I/R renal que é uma síndrome complexa que envolve vários mecanismos como a vasoconstrição renal, necrose tubular, bloqueio do ritmo de filtração e lesão glomerulares levando o animal a desenvolver doença renal aguda confirmada na dosagem de creatinina e na análise histológica. Mesmo com estes agravantes a melatonina foi capaz de atenuar a lesão renal após I/R (DENIZ et al., 2006).

Para determinar a dose de melatonina empregada nesta tese foi empregado o conhecimento adquirido em estudo anterior realizado pela mesma equipe (VINAGRE, 2011) que empregou a melatonina a 20mg.kg^{-1} trinta minutos antes da isquemia renal. Neste estudo a melatonina potencializou o efeito do isoflurano, mas, foi incapaz de impedir a lesão renal associada à hiperglicemia transitória.

Acreditou-se que a proteção renal da melatonina na I/R em animais hiperglicêmicos poderia ser dependente da dose usada. No projeto inicial da pesquisa consultou-se a literatura e a dose máxima de melatonina utilizada foi 50 mg.kg^{-1} (PETROSILLO et al., 2006). Li et al. (2009) também empregaram 50 mg.kg^{-1} de melatonina em modelo de transplante renal. Os animais doadores dos rins receberam melatonina dissolvida em leite duas horas antes da cirurgia por via oral. O enxerto renal foi estocado por 24 horas em solução fria antes do procedimento cirúrgico. Os ratos que receberam transplantes provenientes de animais tratados com melatonina apresentaram redução da lesão tubular, creatinina, ureia e lactato desidrogenase de 39 a 71%. A melatonina foi capaz de proteger o enxerto em decorrência de suas ações antioxidante e antiapoptótica.

Ceyran et al. (2008) usaram 50 mg.kg^{-1} de melatonina em ratos submetidos à isquemia e reperfusão miocárdica. Os animais tratados antes e após a isquemia apresentaram valores menores de lesão expressos pela determinação da mieloperoxidase, superóxido desmutase, malondialdeído, além dos achados histopatológicos e com elevada atividade anti-apoptótica do Bcl-2. Demonstrando o efeito protetor da melatonina em altas doses contra a isquemia do miocárdio.

6 Conclusões

A melatonina em dose alta atenuou a lesão renal quando administrada 30 minutos antes da realização da I/R em ratos sem hiperglicemia transitória porem não foi capaz de impedir a necrose tubular aguda em animais com hiperglicemia anestesiados com isoflurano.

7 Referências

ABOUCACRA, S. et al. Renal biomarkers for assessment of kidney function in renal transplant recipients: how do they compare? **Int. Urol. Nephrol.**, v. 44, n. 6, p. 1871-1876, Dec 2012.

AZEVEDO, V.L. et al. The effect of 6% Hydroxyethyl starch vs. Ringer's lactate on acute kidney injury after renal ischemia in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 28, n. 1, p. 5-9, Jan 2013.

BAGSHAW, S.M.; GIBNEY, R.T. Conventional markers of kidney function. **Crit. Care Med.**, v. 36, n. 4, Suppl, p. S152-158, Apr 2008.

BLASI-IBANEZ, A. et al. Predictors associated with terminal renal function in deceased organ donors in the intensive care unit. **Anesthesiology**, v. 110, n. 2, p. 333-341, Feb 2009.

CAETANO, A.M. et al. Erythropoietin attenuates apoptosis after ischemia-reperfusion-induced renal injury in transiently hyperglycemic Wister rats. **Transplant. Proc.**, v. 43, n. 10, p. 3618-3621, Dec 2011.

CASON, B.A. et al. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. **Anesthesiology**, v. 87, n. 5, p. 1182-1190, Nov 1997.

CEYRAN, H. et al. The effect of high dose melatonin on cardiac ischemia- reperfusion Injury. **Yonsei Med. J.**, v. 49, n. 5, p. 735-741, Oct 2008.

COPE, D.K. et al. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. **Anesthesiology**, v. 86, n. 3, p. 699-709, Mar 1997.

CURTIS, F.G. et al. Dexmedetomidine and S(+)-ketamine in ischemia and reperfusion injury in the rat kidney. **Acta Cir. Bras.**, v. 26, n. 3, p. 202-206, Jun 2011.

DELBRIDGE, M.S. et al. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. **Transplant. Proc.**, v. 39, n. 10, p. 2983-2985, Dec 2007.

DENIZ, E. et al. Melatonin attenuates renal ischemia-reperfusion injury in nitric oxide synthase inhibited rats. **Acta Histochem.**, v. 108, n. 4, p. 303-309, Jun 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007.

ERSOZ, N. et al. Comparison of the efficacy of melatonin and 1400W on renal ischemia/reperfusion injury: a role for inhibiting iNOS. **Ren. Fail.**, v. 31, n. 8, p. 704-710, Jun 2009.

ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 8, n. 3, p. 228-242, Sep 2010.

FAHY, B. G.; SHEEHY, A. M.; COURSin, D. B. Glucose control in the intensive care unit. **Crit. Care Med.**, v. 37, n. 5, p. 1769-1776, 2009a.

FAHY, B. G.; SHEEHY, A. M.; COURSin, D. B. Perioperative glucose control: what is enough? **Anesthesiology**, v. 110, n. 2, p. 204-206, 2009b.

FERREIRA CDA, S. et al. [Melatonin: cell death modulator]. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 6, p. 715-718, Nov 2010.

FURNARY, A.P. Clinical benefits of tight glycaemic control: focus on the perioperative setting. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 23, n. 4, p. 411-420, Dec 2009.

GOES, N. et al. Acute renal injury in the interferon-gamma gene knockout mouse: effect on cytokine gene expression. **Transplantation**, v. 60, n. 12, p. 1560-1564, Dec 1995.

HIROSE, R. et al. Transient hyperglycemia affects the extent of ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. **Anesthesiology**, v. 108, n. 3, p. 402-414, Mar 2008.

HUHN, R. et al. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. **Br. J. Anaesth.**, v. 100, n. 4, p. 465-471, Apr 2008.

KANG, J.W.; LEE, S.M. Melatonin inhibits type 1 interferon signaling of toll-like receptor 4 via heme oxygenase-1 induction in hepatic ischemia/reperfusion. **J. Pineal Res.**, v. 53, n. 1, p. 67-76, Aug 2012.

KERSTEN, J.R. et al. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 2 pt 2, p. H721-725, Aug 1998.

KERSTEN, J.R. et al. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. **Anesthesiology**, v. 87, n. 2, p. 361-370, Aug 1997.

KURCER, Z. et al. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. **J. Pineal Res.**, v. 43, n. 2, p. 172-178, Sep 2007.

LERNER, A.B.; CASE, J.D.; HEINZELMAN, R.V. Structure of melatonin¹. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 81, n. 22, p. 6084-6085, Aug 1959.

LI, Z. et al. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF-kB and apoptosis after experimental kidney transplantation. **J. Pineal Res.**, v. 46, n. 4, p. 365-372, Mai 2009.

LIPSHUTZ, A.K.; GROPPER, M.A. Perioperative glycemic control: an evidence-based review. **Anesthesiology**, v. 110, n. 2, p. 408-421, Feb 2009.

MANSANO, A.M. et al. Prevention of renal ischemia/reperfusion injury in rats using acetylcysteine after anesthesia with isoflurane. **Acta Cir. Bras.**, v. 27, n. 4, p. 340-345, Apr 2012.

MEDEIROS, P.J. et al. Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 25, n. 6, p. 490-495, Dec 2010.

MELIN, J.; HELLBERG, O.; FELLSTROM, B. Hyperglycaemia and renal ischaemia-reperfusion injury. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 18, n. 3, p. 460-462, Mar 2003.

METRA, M. et al. The role of the kidney in heart failure. **Eur. Heart J.**, v. 33, n. 17, p. 2135-2142, Sep 2012.

MORRISON, D.F. **Multivariate statistical methods**. New York: McGraw Hill Book Company, 1967.

MURRY, C.E.; JENNINGS, R.B.; REIMER, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, n. 5, p. 1124-1136, Nov 1986.

NUNNALLY, M.E.; O'CONNOR, M.F. Glycemic control for organs: a new approach to a controversial topic. **Anesthesiology**, v. 110, n. 2, p. 207-208, Feb 2009.

PARK, Y. et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. **Surgery**, v. 143, n. 2, p. 243-451, Feb 2008.

PETROSILLO, G. et al. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia- reperfusion: role of cardiolipin. **FASEB J**, v. 20, n. 2, p. 269-276, Feb 2006.

PODRAZIK, R.M. et al. Hyperglycemia exacerbates and insulin fails to protect in acute renal ischemia in the rat. **J. Surg. Res.**, v. 46, n. 6, p. 572-578, Jun 1989.

REITER, R.J. et al. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochim. Pol.**, v. 54, n. 1, p. 1-9, Feb 2007.

RODRIGUEZ, C. et al. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 4, p. 6597-6613, Apr 2013.

ROSO, N.C. et al. Caffeic acid phenethyl ester effects in the kidney during ischemia and reperfusion in rats anesthetized with isoflurane. **Transplant. Proc.**, v. 44, n. 5, p. 1211-1213, Jun 2012.

TANAKA, K. et al. Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. **Anesthesiology**, v. 97, n. 6, p. 1485-1490, Dec 2002.

TRAYNOR, J. et al. How to measure renal function in clinical practice. **BMJ**, v. 333, n. 7571, p. 733-737, Oct 2006.

TSIGOU, E. et al. Role of new biomarkers: functional and structural damage. **Crit. Care Res. Pract.**, v. 2013, p. 361078, Dec 2013.

VIANNA, P.T. et al. Remifentanyl, isoflurane, and preconditioning attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Transplant. Proc.**, v. 41, n. 10, p. 4080-4082, Dec 2009.

VINAGRE, R.C.O. Estudo da proteção renal com antioxidante durante isquemia e reperfusão e hiperglicemia transitória. 2011. 59f. Tese (Doutorado) - Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

ZAGER, R.A.; ALTSCHULD, R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. **Am. J. Physiol.**, v. 251, n. 1 Pt 2, p. F87-93, Jul 1986.