

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Avaliação dos Efeitos da Melatonina Associada à Hipotermia Tópica na
Lesão por Isquemia e Reperfusão Renal em Ratos**

Autor: Pablo Cambeses Souza

Orientador: Carlos Otávio Corso

Coorientador: Emanuel Burck dos Santos

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Avaliação dos Efeitos da Melatonina Associada à Hipotermia Tópica na
Lesão por Isquemia e Reperfusão Renal em Ratos**

Autor: Pablo Cambeses Souza

Orientador: Carlos Otávio Corso

Coorientador: Emanuel Burck dos Santos

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Cirúrgicas da Faculdade de Medicina
da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito para a
obtenção do título de Mestre.

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Pablo Cambeses

Avaliação dos Efeitos da Melatonina Associada à Hipotermia Tópica na Lesão por Isquemia e Reperusão Renal em Ratos / Pablo Cambeses Souza. -- 2018.

83 f.

Orientador: Carlos Otávio Corso.

Coorientador: Emanuel Burck dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Estresse Oxidativo. 2. Isquemia-Reperusão. 3. Melatonina. 4. Hipotermia. 5. Transplante Renal. I. Corso, Carlos Otávio, orient. II. dos Santos, Emanuel Burck, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Cristina e Emilio Hugo

Aos meus irmãos

À minha noiva Juliana

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Carlos Otávio Corso, pela dedicação à carreira acadêmica, por ter sido um dos meus primeiros professores na Faculdade de Medicina da UFRGS, na cátedra de Anatomia, onde fui seu monitor, o que com certeza influenciou na minha opção pelas ciências cirúrgicas, também por ser meu orientador no mestrado acadêmico, colaborando de forma decisiva para a realização do projeto.

Ao Dr. Emanuel Burck dos Santos, pelo incentivo, entusiasmo pela pesquisa básica experimental e apoio durante todas as fases do projeto, da concepção à conclusão.

Agradeço ao Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), chefiado pelo Prof. Brasil Silva Neto, durante a minha residência, sempre apoiando a pós-graduação e a qualificação no serviço. Ao Prof. Tiago Elias Rosito, atual chefe, o qual incentiva a pesquisa e produção científica. Em especial à equipe do transplante renal do HCPA, chefiada pela Dra. Nancy Tamara Denicol, exemplo de dedicação e pessoa fundamental na minha formação. Ao Dr. Leonardo Infantini Dini, Dr. Emanuel Burck dos Santos e Dr. Lucas Medeiros Burtett, pelo excelente convívio e ensinamentos.

Aos colegas de linha de pesquisa que colaboraram diretamente na execução do projeto, Guilherme Lang Motta, com quem compartilhei parte das atividades da pesquisa e também ao Guilherme Behrend Silva Ribeiro, pela contribuição ao projeto.

Agradeço à enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e às veterinárias Daniela Campagnol e Tuane Garcez da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA pelo apoio e suporte técnico.

À Dra. Silvia Regina Bona pelo profissionalismo e essencial contribuição à análise de marcadores de estresse oxidativo, no Laboratório de Fisiologia e Hepatologia Experimental do HCPA.

À equipe da Unidade de Patologia Experimental, Patologia Clínica, na pessoa do Dr. Pedro Guilherme Schaefer, pela fundamental contribuição ao trabalho.

Por fim, agradeço à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela excelente formação acadêmica proporcionada, estrutura e incentivo à pesquisa.

RESUMO

Introdução: A melatonina (MEL) e a hipotermia tópica (HT) diminuem a lesão renal na isquemia-reperfusão (I/R). Nosso estudo avalia se o efeito da combinação de ambas intervenções têm efeito benéfico aditivo.

Objetivos: Avaliar os efeitos da associação de MEL e HT na lesão renal por I/R, tendo como desfechos as alterações histopatológicas, dano por estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes e parâmetros de função renal.

Métodos: Trinta e dois ratos Wistar foram aleatoriamente alocados para quatro protocolos experimentais realizados no rim esquerdo: isquemia quente (IR), isquemia fria (HT+IR), melatonina (10mg / kg, IP) (MEL+IR) e melatonina (10mg / kg, IP) seguido de isquemia fria (MEL+HT+IR). Nefrectomia direita foi realizada em todos os ratos antes de qualquer procedimento. Oito rins direitos aleatoriamente designados constituíram o grupo controle. Nefrectomia esquerda foi realizada após 240 minutos de reperfusão para avaliação histopatológica, atividade de peroxidação lipídica e de enzimas antioxidantes. O soro foi coletado para avaliação de uréia e creatinina. MEL (10mg/Kg, IP) foi administrado 10 minutos antes da isquemia.

Resultados: A associação de MEL e HT (MEL + HT + IR) mostrou atenuar o dano histológico por isquemia e reperfusão em comparação com MEL e HT isoladamente ($P < 0,037$). Maiores valores de superóxido dismutase (SOD) ($p < 0,001$), diminuição da creatinina ($P < 0,001$) e uréia ($P < 0,001$).

Conclusão: A combinação de MEL e HT ofereceu melhor proteção contra lesão por I / R renal do que a MEL ou TH administrados isoladamente.

Palavras-chave: Melatonina. Hipotermia. Lesão por Isquemia-Reperfusão. Rim. Alterações histológicas. Estresse Oxidativo. Atividade Antioxidante. Ratos.

ABSTRACT

Background: Melatonin (MEL) and topical hypothermia (TH) decrease renal damage in ischemia-reperfusion (IR). Our study evaluates whether the combination of both interventions has beneficial additive effect.

Aim: To evaluate the effects of the association of MEL and TH on renal injury due to I/R, considering histopathological changes, oxidative stress damage, antioxidant enzyme activity and renal function parameters.

Methods: Thirty-two Wistar rats were assigned to four groups of eight rats each. Following right nephrectomy, their left kidneys were subjected to warm ischemia (IR), cold ischemia (TH+IR), intraperitoneal injection of 10 mg/kg melatonin (MEL+IR), and injection of 10 mg/kg melatonin followed by cold ischemia. Eight randomly assigned right kidneys constituted the control group. After 240 min of reperfusion, left nephrectomy was performed for histopathological evaluation, lipid peroxidation, and measurement of antioxidant enzyme activity. Serum was collected to measure urea and creatinine concentrations.

Results: Histopathological damage induced by ischemia and reperfusion was more attenuated in the MEL+TH+IR than in the MEL+IR and TH+IR groups ($p < 0.037$). Superoxide dismutase activity was significantly higher ($p < 0.001$) and creatinine ($p < 0.001$) and urea ($p < 0.001$) concentrations, significantly lower in the MEL+TH+IR than in the MEL+IR and TH+IR groups.

Conclusions: The combination of MEL and TH provides better protection against renal I/R injury than does MEL or TH alone.

Key words: Melatonin. Hypothermia. Reperfusion Injury. Oxidative Stress. Kidney. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação Histopatológica	41
Figura 2 - Diferenças entre os grupos em grau histopatológico.....	45
Figura 3 - Médias de TBARS.....	46
Figura 4 - Médias de SOD e Catalase.....	47
Figura 5 - Médias de Creatinina e Uréia.....	48
Figure 1 - Histopathological evaluation.....	66
Figure 2 - Differences between the groups in histopathological grade..	69
Figure 3 - Means of TBARS.....	70
Figure 4 - Means of SOD and Catalase	71
Figure 5 - Means of Creatinine and Urea	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Trifosfato de Adenosina

Ca²⁺: Cálcio

CAT: Catalase

DGF: Delayed Graft Function

eNOS: Óxido Nítrico Sintetase
Endotelial

F2IP: f2-isoprostanos

GPX: Glutadiona Peroxidase

HIOMT: Hidroxi-indol-O-
metiltransferase

HT: Hipotermia Tópica

HTK: Histidine-Tryptophan-
Ketoglutarate

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

IL-1: Interleucina-1

IP: Intraperitoneal

I/R: Isquemia-Reperfusão

K⁺: Potássio

Mg²⁺: Magnésio

Na⁺: Sódio

O₂: Oxigênio

OH⁻: Hidroxila

MDA: Malondialdeído

MEL: Melatonina

NAC: N-acetilcisteína

NAT: N-acetiltransferase

NO: Óxido Nítrico

RNA_m: Ácido ribonucleico
mensageiro

SOD: Superóxido Dismutase

TBARS: Substâncias Reativas ao
Ácido Tiobarbitúrico

TNF: Fator de Nefrose Tumoral

TPH: Triptofano Hidroxilase

UW: Universidade de Wisconsin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2.1 Isquemia e Reperfusão	13
2.2 Fisiopatologia da Lesão Renal por Isquemia e Reperfusão	14
2.3 Estratégias para Reduzir a Lesão por Isquemia e Reperfusão	16
2.4 Melatonina.....	19
4 OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo Geral.....	22
4.2 Objetivos Específicos	22
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	23
6 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA PORTUGUESA	34
7 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA INGLESA.....	60
8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
9 – PERSPECTIVAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

O dano renal causado durante a isquemia e reperfusão (I/R) é comum em transplantes renais e cirurgias vasculares devido à cessação temporária do suprimento sanguíneo renal. Procedimentos como nefrectomia parcial, transplante renal, cirurgia vascular da aorta e artérias renais podem levar a dano estrutural e funcional irreversível, como disfunção do enxerto, rejeição aguda e insuficiência renal aguda/crônica, dependendo do grau de isquemia (1).

A melatonina (*N-acetyl-5-methoxytryptamine*) tem sido estudada na diminuição do dano renal na I/R. É o principal produto da glândula pineal, tem como função a regulação do sono, ritmo circadiano e sistema imune (2). Melatonina (MEL) e seus metabólitos têm potentes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes que são efetivas em situações de estresse oxidativo e inflamação (3). MEL não só neutraliza espécies reativas ao nitrogênio e espécies reativas ao oxigênio, mas também atua através da estimulação de sistemas antioxidantes e na estabilização de membranas celulares (4). MEL modula a expressão genética de enzimas protetoras, reduz apoptose e a peroxidação lipídica (5).

A hipotermia tópica (HT), estratégia fundamentada na literatura para reduzir a lesão renal por I/R, atua reduzindo o metabolismo celular e o estresse oxidativo que é essencial para a viabilidade do órgão durante o período de isquemia. Utilizada principalmente em transplantes renais e nefrectomias parciais com clampeamento arterial. O resfriamento a 4°C resulta em redução do metabolismo

a 5-8%, na maioria das células e diminui atividade enzimática (6-8).

Apesar de ambas as estratégias para redução de dano renal na I/R serem estudadas individualmente e com outras associações, o presente estudo observa os efeitos da associação entre a MEL e HT na lesão por I/R renal em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Isquemia e Reperfusão

Lesão por isquemia e reperfusão I/R é caracterizada pela restrição do suprimento de sangue a um órgão seguido pelo reestabelecimento do fluxo sanguíneo e reoxigenação. As lesões podem ocorrer após infarto, sepse, transplante de órgãos. Este fenômeno exacerba o dano tecidual por iniciar uma cascata inflamatória incluindo radicais livres, citocinas e ativação de leucócitos (9, 10). O dano causado por isquemia ao coração ou cérebro, pela deprivação de oxigênio, são as maiores causas de morte no mundo. A sobrevivência do tecido à isquemia é variável, o tecido muscular é bastante resistente à isquemia, entretanto o tecido cerebral é mais sensível. Muitos tecidos podem se adaptar a determinados graus de hipóxia, no entanto, qualquer tecido de mamífero submetido à isquemia por um período suficiente, vai sofrer lesão irreversível (11). Se o período de deprivação de O_2 não é longo o suficiente para causar lesão irreversível, a reperfusão com sangue, reintroduzindo O_2 e nutrientes, pode salvar o tecido. Entretanto, a reintrodução do O_2 a um tecido isquêmico pode causar lesão adicional, que é mediada em parte pela produção de espécies reativas ao oxigênio e depende do período que o tecido ficou exposto à isquemia (12).

Caso o tempo de isquemia seja prolongado, o tecido estará irreversivelmente lesado e evoluirá com necrose, logo, a reoxigenação pouco

adiciona à lesão existente. A reperfusão de um tecido necrótico pode liberar agentes tóxicos na circulação, como a xantina oxidase, causando problema para outros órgãos do corpo, como a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (13). Em transplante de órgãos de doador falecido, para prevenir com sucesso a lesão por reperfusão, as ações devem ser aplicadas precocemente, nos estágios dos distúrbios hemodinâmicos do doador, retirada e preservação de órgãos. No entanto, algumas intervenções podem ser úteis quando utilizadas na reperfusão do enxerto no receptor (14).

2.2 Fisiopatologia da Lesão Renal por Isquemia e Reperfusão

A isquemia causa morte das células parenquimatosas, consequência do distúrbio generalizado do metabolismo celular resultante do consumo do glicogênio, falta do suprimento de oxigênio e depleção do trifosfato de adenosina (ATP), fundamental para o adequado funcionamento celular através da geração de energia, funcionamento das bombas de sódio-potássio (Na^+/K^+) e cálcio-magnésio ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). Ocorre também a degradação do ATP em seus metabólitos (adenosina, inosina e hipoxantina), conversão da xantina oxidase pela xantina desidrogenase e redução do pH intracelular (15). A diminuição do pH é acompanhada pela diminuição da fosforilação oxidativa mitocondrial (16). Há também redução da perfusão vascular, causado pelo edema endotelial, hemoconcentração intravascular e o desequilíbrio entre o óxido nítrico (NO) e

endotelina (17). A lesão por reperfusão envolve mecanismos diretos e indiretos, incluindo resposta imune, com liberação de mediadores inflamatórios, interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF), causando lesão por estresse oxidativo e recrutamento de leucócitos (18).

Durante a reperfusão, ocorre a formação de metabólitos do ATP com aumento nos níveis das espécies reativas ao oxigênio, como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (OH^\cdot) (19). A reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à hidroxila (OH^\cdot), pelo ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^{2+}), inicia o processo de peroxidação lipídica, processo que consiste em uma reação em cadeia que leva à destruição de ácidos graxos poli-insaturados. A peroxidação lipídica rompe a permeabilidade da membrana celular causando edema celular, sobrecarga de Ca^{2+} , Na^{2+} e lise celular (20). Na peroxidação lipídica, indicadores de lesão tecidual devido às espécies reativas ao O_2 , como F2 isoprostanos, o malondialdeído (MDA), e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (21). Como resultado da depleção de ATP e aumento do Ca^{2+} intracelular, ocorre aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial na peroxidação lipídica, causando aumento do Ca^{2+} mitocondrial, esta alteração leva à liberação de citocromo C no citoplasma e subsequente ativação da caspase e início da morte celular por apoptose (22). Este processo em que ocorre adaptação, regeneração e apoptose pode demorar de horas a dias, dependendo do tecido afetado (23). No néfron, o seguimento mais afetado pela lesão por I/R é o túbulo contorcido proximal e o ramo ascendente espesso da alça de Henle, devido à alta demanda metabólica e baixa capacidade de adaptação ao metabolismo anaeróbio. Na fase

de reperfusão, ocorre a fase de extensão renal da lesão isquêmica, em que a congestão da microvasculatura, e conseqüente hipoperfusão tecidual, ocasionam expansão da lesão isquêmica (24). No néfron afetado pela lesão por I/R ocorre diminuição da filtração glomerular por obstrução dos túbulos proximais, fenômeno que ocorre devido à perda da integridade das microvilosidades das células do túbulo proximal, com conseqüente liberação de debris para a luz tubular, onde formam-se cilindros obstrutivos (10).

2.3 Estratégias para Reduzir a Lesão por Isquemia e Reperfusão

Um dos motivos pelos quais todo esforço direcionado a criar novas e eficazes estratégias para preservar o rim e reduzir o dano da lesão por I/R é a crescente demanda por transplante renal e o não acompanhamento proporcional da oferta de órgãos. Razão pela qual os programas de transplantes cada vez mais têm usado rins de critério expandido, definidos como rins de doadores com mais de 60 anos ou doadores entre 50 e 59 anos com hipertensão, creatinina acima de 1,5 mg/dl ou morte de causa cerebrovascular (25). Evidências mostram que em comparação a doadores vivos e doadores não critério expandido, rins de doadores de critério expandido têm maior imunogenicidade (26), maiores taxas de rejeição e risco aumentado de perda do enxerto (27), sendo fundamental o uso de estratégias de preservação e manejo, adaptadas para cada tipo de doador, a fim de otimizar resultados funcionais e de qualidade de vida para os pacientes.

A principal estratégia de preservação renal é o resfriamento. Calne *et al.* mostraram que o simples resfriamento renal em água gelada preserva a função renal por 12 horas (28). A redução da temperatura abaixo de 4°C reduz o metabolismo a 5-8%, resultando em menor depleção de ATP, menor produção de xantina oxidase e menor produção de espécies reativas ao O₂ (6). Santos *et al.* demonstraram em estudo experimental em ratos, que a temperatura renal com melhor evidência de proteção é de 4°C (29). Apesar do benefício conceitual da hipotermia, ocorrem efeitos colaterais como edema celular, acidose, acúmulo de cálcio e produção de radicais livres, que podem ser parcialmente atenuados com as soluções de preservação mais utilizadas (30). Inúmeras soluções de preservação foram desenvolvidas e avaliadas para perfusão estática hipotérmica de rins para transplante (31). As principais soluções de preservação utilizadas no transplante renal são a pioneira Euro-collins, desenvolvida nos anos 60, o custodiol (HTK, *Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate*) nos anos 70 a solução da Universidade de Wisconsin (UW), desenvolvida por Belzer e Southard nos anos 80. Apesar de cada solução ter características diferentes, a solução considerada padrão ouro até o momento é a da UW, por ter sido demonstrado menor DGF (*delayed graft function*) e maior sobrevida do enxerto em um ano (31, 32). Na sua composição, a solução da UW possui substratos inertes como lactobionato e rafinose, que servem como agentes osmóticos, como colóide, é utilizado o hidroxietilamido, que previne o edema intersticial e têm efeito benéfico nas metaloproteinases, contém glutadiona, que previne a formação de radicais livres, o alopurinol, que inibe a xantina oxidase, melhorando a preservação renal. Para

estabilização de membrana, contém magnésio e dexametasona (6). Devido à mudança no perfil dos doadores, com doadores de critério expandido, e em particular doadores sem batimentos cardíacos, ressurgiu interesse na máquina de perfusão hipotérmica, que era o método original de preservação renal nos anos iniciais do transplante renal (33). Jochmans *et al.* mostraram em ensaio clínico randomizado uma grande redução na DGF (de 70% para 54%) quando foi usada a máquina de perfusão hipotérmica (34).

Estratégias para limitar a lesão por I/R em cirurgias renais, como nefrectomia parcial e cirurgias vasculares renais, limitam-se ao resfriamento tópico e redução do tempo do clampeamento vascular. Em nefrectomias parciais, tem se avaliado o benefício de clampeamento vascular seletivo e desclampeamento precoce, o uso de manitol não mostrou benefício em pacientes com função renal normal prévia (35, 36).

Novas estratégias têm sido testadas, como o pré-condicionamento isquêmico (PCI), que induz a tolerância e adaptabilidade de um órgão ou tecido após a exposição a um breve estímulo isquêmico (37). O rim tem a habilidade de ser pré-condicionado por um período não letal de isquemia, o que o faz tolerar subsequente lesão induzida por isquemia (38). Em estudos, PCI reduziu lise celular, apoptose e peroxidação lipídica, com melhora da função renal no rim submetido à isquemia (39). Como alternativas ao PCI são testados o pré-condicionamento local (PCIL) isolado (40), associado à hipotermia (41) e o pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) (42).

Diversos estudos testaram substâncias antioxidantes em relação à sua capacidade de reduzir a lesão por I/R, como a N-acetil cisteína (NAC) (43), vitamina C e E (44) e melatonina (45).

2.4 Melatonina

A melatonina é um hormônio endógeno, sintetizado e secretado principalmente pela glândula pineal (46). Identificada quimicamente e isolada pela primeira vez nos anos 60, como *N-acetyl-5-methoxytryptamine* (47). MEL é uma indolamina sintetizada a partir do triptofano. Este aminoácido essencial é transformado em serotonina e então a serotonina é transformada em melatonina, em reações sequenciais envolvendo quatro enzimas, triptofano hidroxilase (TPH), descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos, N-acetiltransferase (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (48, 49). A MEL é também produzida pelo cérebro, epitélio respiratório, medula óssea, intestino, ovários, testículos, pele entre outros (50). Quando comparada com outras substâncias antioxidantes, a MEL tem certas vantagens devido a importantes propriedades físicas e químicas, naturalmente encontrado no corpo humano. Por ser uma molécula anfifílica (são moléculas que apresentam a característica de possuírem uma região hidrofílica, solúvel em meio aquoso, e uma região hidrofóbica, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos) permite que a MEL entre em todos os órgãos e compartimentos subcelulares por difusão, o que é um diferencial

importante em relação a outros eliminadores de radicais livres (*radical scavengers*). Comparada com outros antioxidantes (vitaminas C e E), em relação à proteção de tecidos de lesão oxidativa, MEL tem mostrado melhor ou igual eficácia. Outra característica inerente da MEL, que não é comum entre outros antioxidantes, que talvez seja a característica mais interessante do hormônio hipofisário, é a seletividade pela membrana mitocondrial (51). Toxicidade aguda por MEL é extremamente baixa, seja em estudos com animais ou humanos (52), com uma larga margem de segurança (53). Não há registro sobre efeitos toxicológicos sérios, efeitos colaterais mais frequentemente observados em estudos clínicos são sonolência e fadiga (54).

A ação da MEL na redução da lesão por I/R se dá grandemente por sua ação como eliminadora de radicais livres (*free radical scavenger*), assim como suas ações antioxidantes indiretas, como a estimulação do sistema de defesa antioxidante celular, aumentando níveis de RNAm e atividades de diversas enzimas antioxidantes (55). Isto inclui superóxido dismutase (SOD), que cataliza a conversão do O_2^- em H_2O_2 , catalase (CAT), glutadiona peroxidase (GPX), glutamyl-cisteína-ligase, que promove a síntese de outro importante antioxidante intracelular, a glutadiona (4, 5, 56, 57). MEL age diretamente eliminando diversos radicais livres e espécies reativas ao nitrogênio, gerados durante a lesão por I/R (20, 58), reduzindo a atividade da mieloperoxidase (59). Vários estudos apontam que MEL protege contra o prejuízo na respiração mitocondrial, edema mitocondrial e peroxidação lipídica (60, 61). Durante I/R, MEL regula a atividade de um marcador de integridade da membrana mitocondrial, glutamato desidrogenase.

Além disto, estabiliza a membrana microssomal, permitindo, de maneira concentração-dependente, resistir à rigidez induzida pela ação de radicais livres (62) e suprime o citocromo C liberado no citoplasma devido ao edema mitocondrial (63). MEL preserva o *status* funcional e energético celular durante I/R devido à capacidade de reduzir TNF α e inibir a produção de NO, aumentando a expressão de óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), fator de proteção endotelial (64), que, se produzido precocemente, pode revogar o dano da microcirculação da reperfusão do enxerto (65). Elif *et al.* administraram 10mg/kg de MEL intraperitoneal (IP) em modelo experimental em ratos submetidos a I/R, e demonstraram ter revertido a elevação do TNF α e a lesão histopatológica no tecido renal (66).

Apesar de a literatura dispor de muitos estudos analisando o efeito da MEL e também da HT na prevenção de lesão por I/R, não foram identificados estudos analisando se há melhora no efeito protetor combinando ambas estratégias.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar se a administração de MEL 10mg/kg IP por 10 minutos previamente à isquemia e hipotermia tópica (HT) renal a 4°C durante a isquemia, diminuem a lesão renal por I/R em um modelo experimental com ratos.

4.2 Objetivos Específicos

Principal: avaliar se o rim submetido à MEL e HT associados têm menor lesão tecidual por I/R.

Secundários: Avaliar os efeitos da associação de MEL e HT em relação ao estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes e parâmetros funcionais bioquímicos na lesão renal por I/R

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Medeiros PJ, Villarim Neto A, Lima FP, Azevedo IM, Leao LR, Medeiros AC. Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2010;25(6):490-5.
2. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, et al. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;738:419-20.
3. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*. 2005;165(1-2):139-49.
4. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 2004;36(1):1-9.
5. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;854:410-24.

6. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988;45(4):673-6.
7. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation proceedings*. 2007;39(10):2983-5.
8. Susantitaphong P, Alfayez M, Cohen-Bucay A, Balk EM, Jaber BL. Therapeutic hypothermia and prevention of acute kidney injury: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Resuscitation*. 2012;83(2):159-67.
9. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2009;130(1):41-50.
10. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature reviews Nephrology*. 2011;7(4):189-200.
11. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-66.
12. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney international*. 1997;51(5):1341-51.

13. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free radical biology & medicine*. 2002;33(6):774-97.
14. Shemie SD, Ross H, Pagliarello J, Baker AJ, Greig PD, Brand T, et al. Organ donor management in Canada: recommendations of the forum on Medical Management to Optimize Donor Organ Potential. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006;174(6):S13-32.
15. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2003;18(8):891-902.
16. Kanoria S, Glantzounis G, Quaglia A, Dinesh S, Fusai G, Davidson BR, et al. Remote preconditioning improves hepatic oxygenation after ischaemia reperfusion injury. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2012;25(7):783-91.
17. Kukan M, Haddad PS. Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2001;7(5):381-400.

18. Lutz J, Thurmel K, Heemann U. Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation. *Journal of inflammation (London, England)*. 2010;7:27.
19. Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(4):652-8.
20. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2009;15(1-2):43-50.
21. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *Journal of hepatology*. 1996;25(5):774-80.
22. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical journal*. 1999;341 (Pt 2):233-49.
23. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation proceedings*. 2008;40(10):3279-88.

24. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney international*. 2004;66(2):496-9.
25. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation*. 2002;74(9):1281-6.
26. Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney international*. 1999;56(4):1551-9.
27. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, et al. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Annals of surgery*. 2000;232(2):263-71.
28. Calne RY, Pegg DE, Pryse-Davies J, Brown FL. RENAL PRESERVATION BY ICE-COOLING: AN EXPERIMENTAL STUDY RELATING TO KIDNEY TRANSPLANTATION FROM CADAVERS. *British medical journal*. 1963;2(5358):651-5.
29. Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho Tde J, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, et al. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under

various degrees of hypothermia in rats. *Acta chirurgica brasileira*. 2013;28(8):568-73.

30. Salahudeen AK, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney international*. 2004;65(2):713-8.

31. de Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, van der Velde O, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1999;12(6):447-53.

32. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. *Lancet (London, England)*. 1992;340(8812):129-37.

33. Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, Powell M. Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *The New England journal of medicine*. 1968;278(11):608-10.

34. Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HG, Treckmann J, Paul A, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys donated after cardiac death: a multicenter, randomized, controlled trial. *Annals of surgery*.

2010;252(5):756-64.

35. Smith ZL. Current Status of Minimally Invasive Surgery for Renal Cell Carcinoma. *Current urology reports*. 2016;17(6):43.

36. Spaliviero M, Power NE, Murray KS, Sjoberg DD, Benfante NE, Bernstein ML, et al. Intravenous Mannitol Versus Placebo During Partial Nephrectomy in Patients with Normal Kidney Function: A Double-blind, Clinically-integrated, Randomized Trial. *European urology*. 2018;73(1):53-9.

37. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends in neurosciences*. 2003;26(5):248-54.

38. Kinsey GR, Huang L, Vergis AL, Li L, Okusa MD. Regulatory T cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney. *Kidney international*. 2010;77(9):771-80.

39. 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. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2008;21(4):364-71.

40. Toosy N, McMorris EL, Grace PA, Mathie RT. Ischaemic preconditioning

protects the rat kidney from reperfusion injury. *BJU international*. 1999;84(4):489-94.

41. Ribeiro GB, Santos EBD, Bona SR, Schaefer PG, Garcez TA, Rabolini EB, et al. The effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2017;32(10):816-26.

42. MacAllister R, Clayton T, Knight R, Robertson S, Nicholas J, Motwani M, et al. Efficacy and Mechanism Evaluation. REmote preconditioning for Protection Against Ischaemia-Reperfusion in renal transplantation (REPAIR): a multicentre, multinational, double-blind, factorial designed randomised controlled trial. Southampton (UK): NIHR Journals Library 2015.

43. Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urological research*. 2006;34(1):41-6.

44. Loong CC, Chang YH, Wu TH, King KL, Yang WC, Wu CW, et al. Antioxidant supplementation may improve renal transplant function: a preliminary report. *Transplantation proceedings*. 2004;36(8):2438-9.

45. Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *American journal of physiology Renal*

physiology. 2008;294(2):F336-44.

46. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2004;25(3-4):177-95.

47. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *The Journal of biological chemistry*. 1960;235:1992-7.

48. Klein DC, Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain research*. 1979;174(2):245-62.

49. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science (New York, NY)*. 1960;131(3409):1312.

50. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2009;44(4):175-200.

51. Dragicevic N, Copes N, O'Neal-Moffitt G, Jin J, Buzzeo R, Mamcarz M, et al. Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer's mice: a mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling. *J Pineal*

Res. 2011;51(1):75-86.

52. Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. *MedGenMed : Medscape general medicine*. 2004;6(2):46.

53. Arendt J. Safety of melatonin in long-term use (?). *Journal of biological rhythms*. 1997;12(6):673-81.

54. Schernhammer ES, Giobbie-Hurder A, Gantman K, Savoie J, Scheib R, Parker LM, et al. A randomized controlled trial of oral melatonin supplementation and breast cancer biomarkers. *Cancer causes & control : CCC*. 2012;23(4):609-16.

55. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry international*. 1995;26(5):497-502.

56. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science*. 2000;7(6):444-58.

57. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*. 2005;27(2):119-30.

58. Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res.* 2010;181:127-51.
59. Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res.* 2002;33(2):72-80.
60. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol.* 2003;469(1-3):145-52.
61. Kireev R, Bitoun S, Cuesta S, Tejerina A, Ibarrola C, Moreno E, et al. Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2013;701(1-3):185-93.
62. Garcia JJ, Lopez-Pingarron L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, Garcia-Gil FA, et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res.* 2014;56(3):225-37.

6 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA PORTUGUESA

Efeitos combinados da melatonina e hipotermia tópica na lesão isquemia-reperusão renal em ratos

Pablo Cambeses Souza^I, Emanuel Burck dos Santos^{II}, Guilherme Lang Motta^{III}, Silvia Regina Bona^{IV}, Pedro Guilherme Schaefer^V, Daniela Campagnol^{VI}, Tiago Bortolini^{VII}, Carlos Otávio Corso^{VIII}.

^I Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{II} Departamento de Urologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{III} Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{IV} Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^V Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{VI} Unidade de Experimentação Animal, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{VII} Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{VIII} Serviço de Cirurgia Digestiva, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil; e Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência: Carlos Otávio Corso, MD, PhD. Serviço de Cirurgia Digestiva, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 747, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90035-903. E-mail: corso@portoweb.com.br. Telefone: 55-51-3359.8232

Resumo

Introdução: A isquemia renal é a causa mais comum de lesão renal aguda. Melatonina (MEL) e a hipotermia tópica (HT) diminuem a lesão renal na isquemia-reperfusão (I/R). Nosso estudo avalia se o efeito da combinação de ambas intervenções têm benefício aditivo na diminuição do dano renal devido à lesão I / R em ratos.

Objetivos: Avaliar os efeitos da associação de MEL e HT na lesão renal por IR, tendo como desfechos: alterações histopatológicas, dano por estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes e parâmetros de função renal.

Métodos: Trinta e dois ratos Wistar foram alocados aleatoriamente em quatro grupos de oito ratos cada. Após a nefrectomia direita, os rins esquerdos foram submetidos à: isquemia quente (IR), isquemia fria (HT + IR), injeção intraperitoneal de 10 mg / kg de melatonina (MEL + IR) e injeção de 10 mg / kg de melatonina seguida de isquemia fria (MEL + TH + IR). O grupo controle foi composto por oito rins direitos escolhidos de forma randomizada. Após 240 min de reperfusão, realizou-se nefrectomia esquerda para avaliação histopatológica, peroxidação lipídica e medição da atividade enzimática antioxidante. O soro foi coletado para medir a concentração de uréia e creatinina.

Resultados: A associação de MEL e HT (MEL + HT + IR) mostrou atenuar o dano histológico por isquemia e reperfusão em comparação com MEL e HT, isoladamente (P <0,037). Identificamos maiores valores de superóxido dismutase (SOD) (P <0,001), diminuição da creatinina (P <0,001) e da uréia (P <0,001).

Conclusões: A combinação de MEL e HT ofereceu melhor proteção contra lesão por I/R renal do que a MEL ou TH administrados isoladamente.

Palavras-chave: Melatonina. Hipotermia. Lesão por Isquemia-Reperfusão. Rim. Alterações Histológicas. Estresse Oxidativo. Atividade Antioxidante. Ratos.

INTRODUÇÃO

A isquemia renal é a causa mais comum de lesão renal aguda. Está presente em muitas situações clínicas, como transplante renal, nefrectomia parcial e cirurgia cardiovascular (1) e em unidades de terapia intensiva, e também é responsável por altas taxas de mortalidade (2). A lesão por IR leva a um aumento da produção de anticorpos, que pode ser prejudicial aos enxertos renais, o que pode explicar a fisiopatologia da associação entre a função tardia do enxerto e a falha de enxerto a longo prazo (3). Durante a fase de reperfusão da IR, o fluxo sanguíneo pode produzir radicais livres de oxigênio que promovem a peroxidação lipídica envolvida no dano aos tecidos. A peroxidação da membrana lipídica, o dano oxidativo das proteínas e do DNA favorecem a apoptose e a morte celular (4). Além disso, a redução da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, enzimas antioxidantes, pode ser a via da lesão por isquemia-reperfusão (5). Estudos têm demonstrado efeitos benéficos de antioxidantes e eliminadores de radicais livres, inibindo esta via para proteger da lesão por IR (6).

A hipotermia tópica (HT) tem sido amplamente aceita como uma estratégia importante de preservação renal e é protetora contra lesões causadas por isquemia e reperfusão (IR). A redução da temperatura central do rim abaixo de 4°C resulta em uma diminuição do metabolismo em 5-8%, na maioria das células, e na redução da atividade enzimática (7). A melhoria das soluções de preservação, com o objetivo de neutralizar vias nocivas durante a preservação a

frio, permite tempos de armazenamento mais longos e com melhor qualidade de preservação (8). Apesar das vantagens da hipotermia, ocorrem efeitos colaterais indesejáveis, como edema celular, acidose, atividade enzimática alterada, acúmulo de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio (9).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um importante produto da glândula pineal, tem função imunológica, reguladora do sono e ritmo circadiano. Além disso, a melatonina (MEL) possui uma potente atividade de eliminação de radicais livres devido à sua capacidade de ser um doador de elétrons (10, 11). A MEL provou ser um antioxidante / antiinflamatório importante, atuando em várias situações relacionadas ao estresse oxidativo e à inflamação (12-14). MEL influencia em vários estágios na redução de lesões por IR, ativa enzimas antioxidantes como SOD e CAT, também reduz a peroxidação lipídica e a apoptose. (10, 15).

Sabe-se que HT e administração de MEL individualmente tem benefícios na redução da lesão por IR. O objetivo deste estudo é observar os resultados da associação dessas estratégias para avaliar se há um benefício adicional em danos histológicos, estresse oxidativo, atividade enzimática antioxidante e parâmetros bioquímicos.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Projeto número 15-0472, em conformidade com os Princípios Internacionais para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, publicados pelo Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), assim como com a lei brasileira de uso científico de animais (Lei 11.794/2008).

Animais e desenho experimental

Ratos Wistar adultos do sexo masculino, com peso entre 276 e 406g (8 a 10 semanas de idade), foram alojados na Unidade de Experimentação Animal do HCPA em grupos de quatro, em gaiolas separadas, à temperatura ambiente (22 ± 2 ° C), com um Ciclo claro / escuro de 12 horas e acesso livre à água e ração padronizada. De forma prospectiva, ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos experimentais. No Grupo 1 (IR, n = 8) o rim esquerdo foi submetido à isquemia quente durante 40 minutos e reperfusão de 4 horas. No grupo 2 (HT + IR, n = 8) o rim esquerdo foi submetido à isquemia fria durante 40 min e reperfusão de 4 h. O grupo 3 (MEL + IR, n = 8) MEL (10 mg / kg; IP) foi administrado 10 min antes da isquemia, seguido de isquemia quente durante 40 min e reperfusão de 4 h. O grupo 4 (MEL + HT + IR, n = 8) MEL (10 mg / kg; IP) foi administrado 10 min antes da isquemia, o rim esquerdo foi submetido à isquemia fria por 40 min e reperfusão de 4 h. Nefrectomia direita foi realizada em todos os

ratos antes da isquemia. Oito rins direitos aleatoriamente designados constituíram o grupo controle (n = 8).

Após pesagem, os animais foram submetidos à indução inalatória da anestesia geral com vaporizador de isoflurano a 3-5%, administrado através de campânula. Após, os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida, em posição supina, e os reflexos da pata traseira foram testados para garantir que o plano anestésico estava adequado. Para manutenção da anestesia, foram utilizados fluxo de oxigênio a 1l/min e vaporizador de isoflurano a 2-3%. Um termômetro eletrônico retal comum (Termomed 1.0, Incoterm, Porto Alegre, Brasil) foi utilizado para aferição da temperatura sistêmica. Se necessário, uma lâmpada incandescente era utilizada para manter a temperatura sistêmica entre 35,5°C-37,5°C. Antes da incisão abdominal, foi injetado bupivacaína 0,5% na parede abdominal, para garantir controle da dor durante e após o procedimento. Nos grupos expostos a melatonina, (MEL + IR e MEL + HT + IR), MEL (10 mg / kg; IP) foi administrado 10 min antes da isquemia. MEL (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em etanol absoluto e depois diluído em solução salina, para dar uma concentração final de álcool a 1%. Foi realizada uma incisão mediana longitudinal e em seguida a nefrectomia direita. Metade do rim direito foi colocada em formalina 10% e a outra metade congelada e armazenada a -80°C. Após, o rim esquerdo foi submetido a um dos quatro protocolos experimentais previamente descritos. Para induzir isquemia, o pedículo renal foi clampeado com um clipe microvascular atraumático (Medicon, Tuttlingen, Alemanha). A temperatura cortical do rim esquerdo foi aferida com um probe intraparenquimatoso conectado a um

termômetro específico (BAT 12, IITC Life Science, W. Hills, CA, EUA). Nos grupos expostos à HT (Grupos HT+IR e MEL+HT+IR), a temperatura-alvo (4°C) do rim esquerdo foi obtida com gelo picado de solução salina. Para evitar hipotermia sistêmica, um sistema de sucção foi utilizado para remover a solução salina derretida e o rim esquerdo foi isolado do resto da cavidade abdominal através da aplicação de um dispositivo especialmente confeccionado. Após 40 min de HT com isquemia, o pedículo renal era desclampeado e a parede abdominal fechada. Os animais eram movidos para uma nova gaiola com água, mas sem comida. Após 4 h de reperfusão, eles eram novamente movidos da gaiola para a mesa cirúrgica. Novamente era realizada anestesia geral inalatória. As suturas da parede abdominal eram removidas e, subsequentemente, era realizada a nefrectomia esquerda. Os mesmos procedimentos empreendidos com o rim direito eram praticados no rim esquerdo. Amostra de sangue era coletada através de punção cardíaca. Cardiectomia foi feita para garantir a morte do animal durante a anestesia.

Alterações histopatológicas

Metade de cada rim foi fixado em formalina 10%, embebido em parafina, cortado em lâminas e corado pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) e ácido periódico de Schiff (PAS). Os critérios empregados para graduar a gravidade da necrose tubular aguda foram uma adaptação da escala de Jablonski *et al* (16). Com os seguintes graus de lesão: 1, mitose e necrose de células individuais; 2,

necrose de todas as células adjacentes aos túbulos contorcidos proximais, mas com viabilidade dos túbulos vizinhos; 3, necrose confinada ao terço distal dos túbulos contorcidos proximais, com uma banda de necrose estendendo-se através do córtex interno; 4, necrose afetando todos os três segmentos dos túbulos contorcidos proximais. Foi atribuído grau zero para descrever achados normais. Todas as lâminas foram examinadas por patologista experiente em patologia renal, cegado para os grupos controle e experimentais (**Figura 1**).

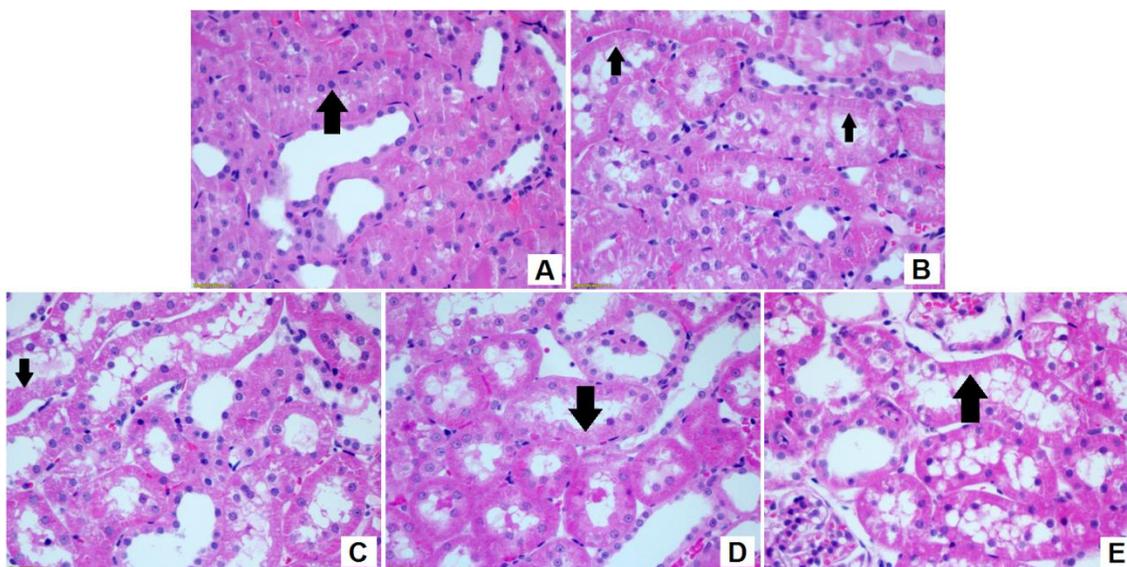


Figura 1 - Avaliação Histopatológica

Avaliação histopatológica de rins de ratos que mostram os graus de necrose tubular aguda descrita por Jablonski et al(16) (examinados sob microscópio de luz, Olympus bx41, Tóquio, Japão): Fotomicrografias do córtex renal: (A) não apresentando anormalidade, grau 0 (HE x 400); (B) mostrando necrose de células individuais e células mitóticas em necrose tubular aguda, grau 1 (HE x 400); (C) mostrando necrose de um grupo de túbulos contornados proximais em necrose tubular aguda, grau 2 (HE x 400); (D) necrose do terço distal dos túbulos contorcidos proximais em necrose tubular aguda, grau 3 (HE x 400); (E) necrose afetando todos os três segmentos dos túbulos contorcidos proximais, grau 4.

Preparação do homogeneizado de rim

Os rins foram pesados e homogeneizados por 40 seg em uma homogeneizadora Ultra-Turrax (IKA Works Inc., Wilmington, DE, EUA) a 4°C na presença de 1,15% KCL (9ml por g de tecido) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a uma concentração de 100 mM em isopropanol (10 µl por ml of KCl). O homogeneizado foi então centrifugado por 10 min a 3.000 rpm em uma centrífuga refrigerada (SORVALL Super T21; Kendro Laboratory Products, Weaverville, NC, EUA). O precipitado foi descartado e o sobrenadante retirado e congelado a -80°C para análises bioquímicas subsequentes.

Proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina bovina como padrão, seguido de espectrofotometria a 595 nm. A concentração de proteína foi utilizada para determinar os níveis das enzimas antioxidantes.

Dano por estresse oxidativo

Os níveis de malondialdeído (MDA) foram medidos usando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da reação do radical superóxido com adrenalina em um espectrofotômetro a 480 nm.

Os resultados são expressos como USOD/min/mg proteína. A atividade da catalase (CAT) foi calculada baseado na decomposição do peróxido de hidrogênio em um espectrofotômetro a 240 nm. Os resultados desse procedimento são expressos como pmol/mg proteína.

Parâmetros funcionais bioquímicos

Os níveis séricos de uréia e creatinina no início (sangue coletado do plexo retro-orbital) e no final do experimento (do sangue coletado do coração) foram estimados usando equipamento de bioquímica automático Roche Cobas 8000 c702. Os parâmetros funcionais bioquímicos foram analisados apenas em relação aos grupos experimentais, pois a uréia e a creatinina foram estimados a partir do sangue periférico.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como frequência e porcentagem e média \pm desvio padrão (P). Realizamos associações entre variáveis com os testes qui-quadrado C^2 . Para comparar variáveis contínuas, utilizou-se o teste ANOVA. O teste Turkey foi aplicado para comparações *post hoc*. Diferenças estatisticamente significativas estatístico foram aceitas com $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (PASW Statistics for Windows, Versão 18.0. Chicago: SPSS Inc).

Resultados

As características de base dos ratos, nos quatro grupos de estudo e no grupo controle, incluindo o peso, a temperatura e as concentrações séricas de creatinina e uréia foram semelhantes.

A avaliação histopatológica revelou diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 2). O grau de lesão por I / R foi maior nos grupos IR, HT + IR e MEL + IR do que no grupo controle. Há ratos nos grupos IR e HT + IR apresentados com lesão de grau 4, enquanto que nenhum dos ratos no grupo MEL + IR apresentou uma lesão de grau 4 e um tinha grau 0. O grupo MEL + HT + IR apresentou o menor grau de lesão, nenhum dos ratos com lesão de grau 3 ou 4 e um com grau 0, semelhante ao grupo controle, rins não submetidos a I / R.

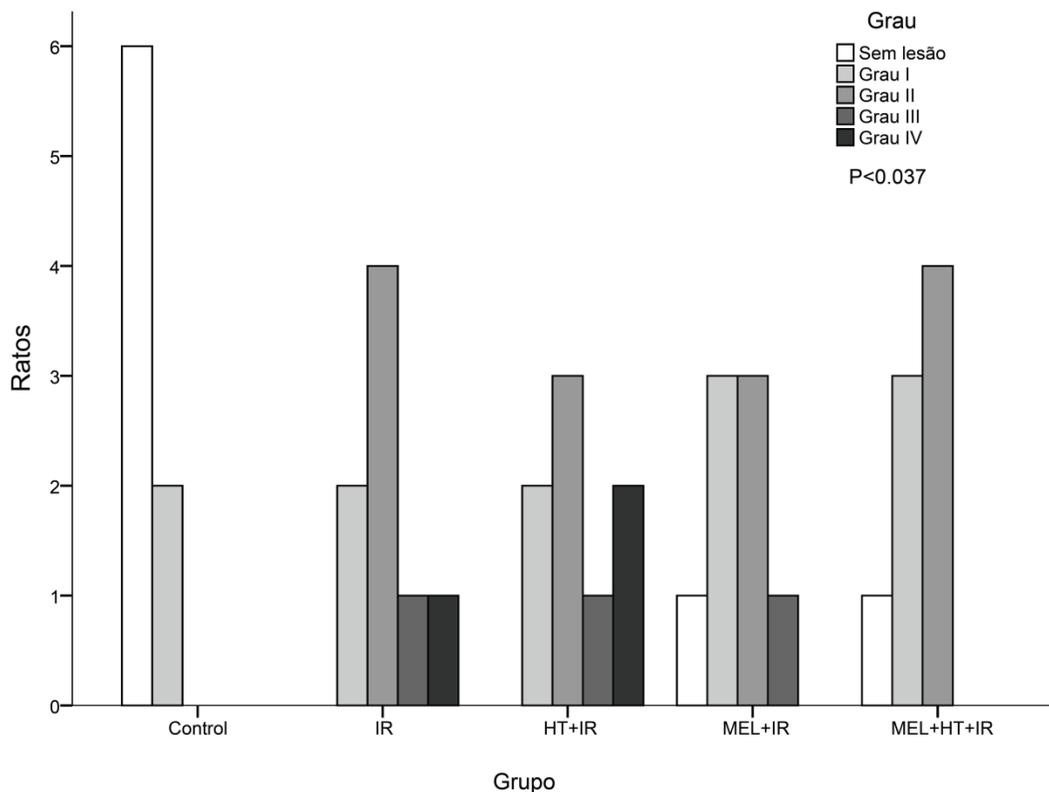


Figura 2 - Diferenças entre os grupos em grau histopatológico

IR, isquemia e reperfusão; **HT + IR**, hipotermia tópica + isquemia e reperfusão; **MEL + IR**, melatonina + isquemia e reperfusão; **MEL + HT + IR**, melatonina + hipotermia tópica + isquemia e reperfusão. Teste do qui-quadrado ($p < 0,037$).

O dano ao estresse oxidativo foi medido pelo teste de tecido TBARS, que avalia o grau de peroxidação lipídica. Os valores de TBARS foram mais altos nos grupos IR e HT + IR, mas foram menores nos ratos em que foi administrado MEL. Os valores TBARS foram significativamente menores no MEL + IR do que em todos os outros grupos ($P < 0,05$; Figura 3).

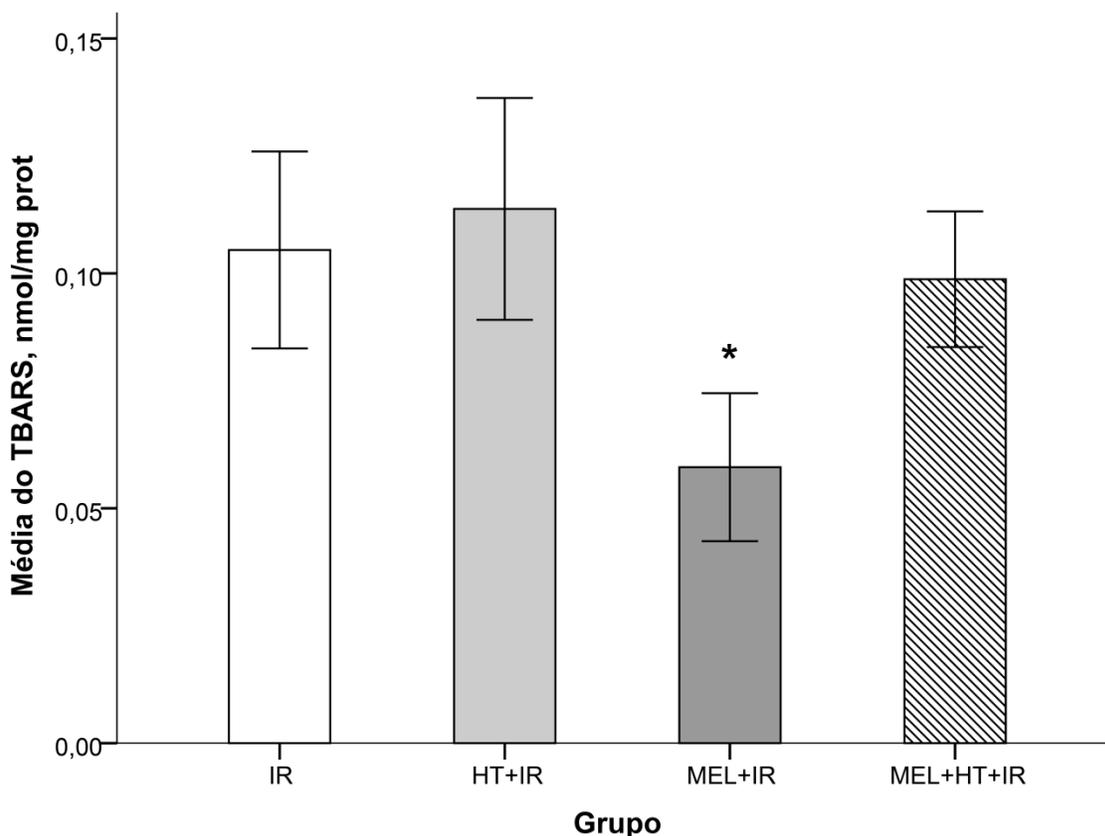


Figura 3 - Médias de TBARS

IR, isquemia e reperfusão; **HT + IR**, hipotermia tópica + isquemia e reperfusão; **MEL + IR**, melatonina + isquemia e reperfusão; **MEL + HT + IR**, melatonina + hipotermia tópica + isquemia e reperfusão, **TBARS**; espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico.

* **MEL+IR vs IR** ($P < 0.05$); **HT+IR** ($P < 0.05$); **MEL+HT+IR** ($P < 0.05$).

Nota: Para comparar variáveis contínuas, utilizou-se o teste ANOVA. O teste Turkey foi aplicado para comparações *pos hoc*.

A atividade da SOD foi menor no grupo IR do que nos outros grupos e foi significativamente maior nos grupos MEL + HT + IR e HT + IR que no grupo IR ($P < 0,05$), a liberação de CAT foi maior no grupo MEL + HT + IR do que nos outros grupos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$; Figura 4).

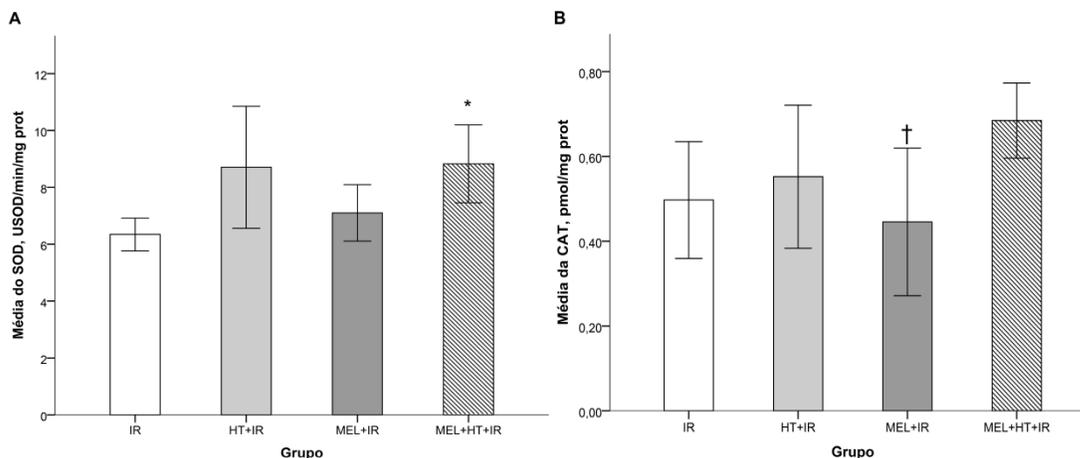


Figura 4 - Médias de SOD e Catalase

IR, isquemia e reperfusão; **HT + IR**, hipotermia tópica + isquemia e reperfusão; **MEL + IR**, melatonina + isquemia e reperfusão; **MEL + HT + IR**, melatonina + hipotermia tópica + isquemia e reperfusão; **SOD**, superoxide dismutase; **CAT**, catalase. **A**, SOD; **B**, CAT.

* **IR vs HT+IR** ($P < 0.05$); **MEL+HT+IR** ($P < 0.05$).

† Não há diferenças estatisticamente significativas.

Nota: Para comparar variáveis contínuas, utilizou-se o teste ANOVA. O teste Turkey foi aplicado para comparações *pos hoc*.

A avaliação dos parâmetros funcionais, no final do protocolo experimental, mostrou que as concentrações séricas de creatinina e uréia foram mais elevadas no grupo IR. As concentrações de ambas foram significativamente menores no grupo MEL + HT + IR do que nos outros grupos ($P < 0,05$). As diferenças da linha de base também foram menores no grupo MEL + HT + IR, enquanto que o grupo HT + IR apresentou diferença significativa entre as concentrações de creatinina final e basal, Figura 5.

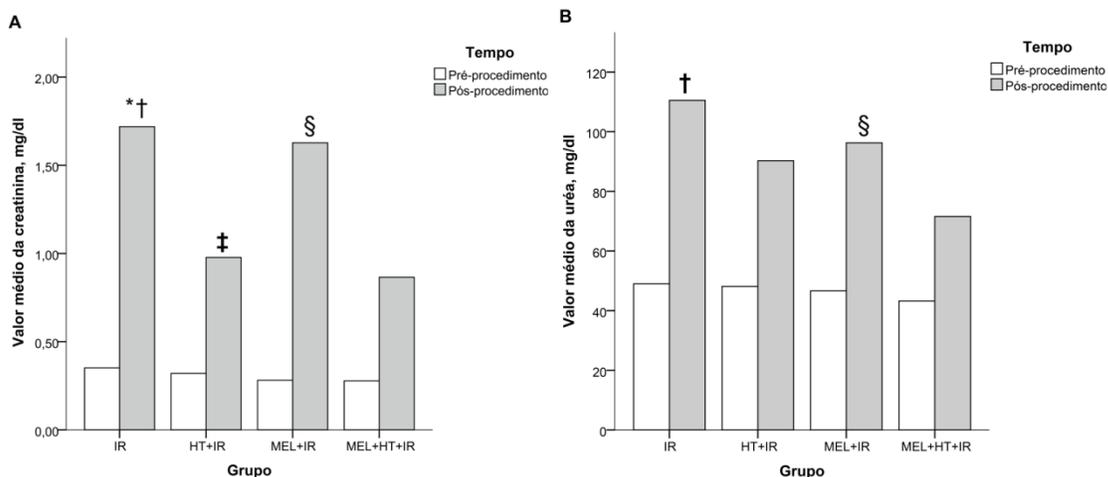


Figura 5 - Médias de Creatinina e Uréia

Médias de creatinina e uréia entre os grupos de estudo pré e pós-procedimento.

IR, isquemia e reperfusão; HT + IR, hipotermia tópica + isquemia e reperfusão; MEL + IR, melatonina + isquemia e reperfusão; MEL + HT + IR, melatonina + hipotermia tópica + isquemia e reperfusão. A, creatinina; B, ureia.

* IR vs HT+IR (P<0.001);

† IR vs MEL+HT + IR (P<0.001).

‡ HT+IR vs MEL+IR (P<0.001).

§ MEL+IR vs MEL+HT +IR (P<0.001).

Nota: Para comparar variáveis contínuas, utilizou-se o teste ANOVA de dois sentidos. O teste da Turquia foi aplicado para comparações pos hoc.

Discussão

Identificamos que a I/R causou alterações histopatológicas, incluindo graus 3 e 4 (16), nos grupos IR e HT + IR. O pré-tratamento com MEL isolada (MEL + IR) atenuou levemente o dano histopatológico, não apresentando lesão grau 4, mas o dano não diferiu significativamente do grupo de controle. Estudos relataram que a MEL desempenha um papel de citoproteção na lesão induzida por IR, revertendo os danos causados pela nefrotoxicidade por I/R(17). O grupo em que foi realizado pré-tratamento com MEL foi associado com hipotermia tópica a 4°C (MEL+HT+IR) reduziu marcadamente a lesão histopatológica por I/R ($P < 0,037$). Apresentando lesões grau zero, 1 e 2, mas não apresentou lesões grau 3 ou 4. Não havendo, em relação ao grupo controle, diferença estatística. Assim, o tratamento combinado mostrou benefícios, reduzindo a extensão histopatológica da lesão tecidual.

Diferentes estudos avaliam o uso da melatonina isolada ou em combinação com outras substâncias para reduzir a lesão por I/R (18-20). No entanto, nenhum estudo foi encontrado para avaliar se a combinação do pré-tratamento com MEL com hipotermia tópica promove a redução dano por IR. Em trabalho com modelo experimental de I/R com ratos, em que pré-tratamento com Melatonina 10mg/kg IP, 10 minutos antes da isquemia, atenuou alterações histopatológicas e índices bioquímicos (21). Com o conhecimento de que a hipotermia tópica é uma

estratégia consolidada para reduzir o dano renal por I/R, atuando na redução do metabolismo celular e o estresse oxidativo, essencial para a viabilidade dos órgãos durante o período de isquemia (7).

A lesão renal induzida por IR está relacionada à peroxidação lipídica, um mecanismo que causa dano oxidativo da membrana celular, levando à produção de radicais livres (10), TBARS é um bom indicador do grau de peroxidação lipídica, em nosso estudo o grupo IR aumentou significativamente os níveis de TBARS, o que demonstra aumento da peroxidação lipídica devido ao aumento do estresse oxidativo (22). Nossos dados mostraram que, no grupo MEL + IR, o valor TBARS diminuiu significativamente quando comparado a todos os outros grupos ($P < 0,001$). O resultado observado mostra que a melatonina reduziu a produção de TBARS, o que indica diminuição da peroxidação lipídica e danos celulares. Esta diminuição da peroxidação lipídica pode ser, em parte, devido à propriedade de MEL eliminar o ânion peroxinitrito (ONOO^-) e o radical hidroxila (OH) (23). No grupo 4 (MEL + TH + IR), houve uma tendência para diminuir a média de TBARS, mas este achado não foi estatisticamente significativo.

Atividade das enzimas antioxidantes é um desfecho relevante em pesquisas sobre I/R. Acúmulo de radicais livres e redução de enzimas antioxidantes causam lesão celular ao nível da membrana, DNA e proteína. O SOD diminui rapidamente durante a isquemia renal, sendo o principal fator o tempo de exposição ao insulto isquêmico (24, 25). De acordo com os achados mostrando que a MEL ativa o SOD (10), identificamos que a atividade SOD foi significativamente maior no MEL + HT + IR do que no grupo IR ($P < 0,02$). Em contraste, nem HT e nem MEL de forma

isolada aumentaram significativamente a atividade SOD. Esses achados sugerem que a combinação de MEL e TH estimulou as enzimas antioxidantes protetoras, corroborando nossos achados histopatológicos.

Identificamos também que o grupo IR apresentou aumento significativo das concentrações de creatinina e uréia, mostrando que I/R tem efeitos deletérios sobre a função renal, mesmo agudamente. As concentrações de creatinina foram menores no grupo MEL + HT + IR do que nos grupos IR e MEL + IR, evidenciando que a terapia combinada fornece proteção aditiva da função renal ($P < 0,05$). Além disso, a isquemia fria isoladamente no grupo de TH + IR apresentou melhor proteção da função renal quando comparada aos grupos IR e MEL + IR ($P < 0,05$). Como esperado, as concentrações de uréia pós-isquemia foram maiores no grupo IR, constatando que I/R prejudica a função renal. Embora as concentrações de uréia tenham sido mais baixas nos grupos TH + IR e MEL + IR do que no grupo IR, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Em contraste, as concentrações de uréia foram significativamente menores no grupo MEL + TH + IR do que nos outros grupos ($P < 0,05$), provavelmente devido ao efeito protetor sinérgico de ambas as intervenções. Os benefícios da isquemia fria a 4°C incluem a redução do metabolismo celular(26, 27) e a produção reduzida de xantina oxidase(7), enquanto os benefícios da MEL incluem a ativação de enzimas antioxidantes e a proteção da fosforilação oxidativa. Assim, em conjunto, a HT e a MEL reduzem as concentrações de creatinina e uréia, ambos os parâmetros da função renal.

Em revisão da literatura, até o momento, este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos de MEL e HT sobre lesão renal induzida por IR. Este modelo experimental foi considerado adequado, gerando alterações histopatológicas induzidas por IR, alteração de fatores relacionados ao estresse oxidativo e piora da função renal. Todos esses parâmetros foram atenuados pela MEL e TH, especialmente pela combinação das duas intervenções. Esta combinação mostrou benefícios no desfecho principal estudado, histopatologia, bem como alterando a atividade da enzima antioxidante SOD, e os parâmetros funcionais de creatinina e uréia.

O presente estudo tem várias limitações. Nossa utilização de um modelo de lesão induzida por I/R aguda pode ser diferente da lesão I/R crônica ou em seres humanos. O acompanhamento em longo prazo pode revelar benefícios adicionais de MEL + TH.

A melatonina tem sido estudada em várias situações, e embora seu papel no transplante de órgãos ainda não seja estabelecido, estudos experimentais demonstram seus potenciais efeitos benéficos no transplante de órgãos(28). O fato de ter uma extensa janela terapêutica e não possuir efeitos colaterais significativos(29) sugerindo que mais estudos são justificados.

Além de HT, as estratégias clínicas atuais para reduzir o dano renal por I/R incluem fluidos de perfusão, uso de uma máquina de perfusão hipotérmica, administração de manitol, um período reduzido de isquemia(30). O uso de MEL,

se comprovadamente eficaz em modelos animais de I / R e em seres humanos, pode se tornar uma ferramenta disponível para prevenir o dano renal renado induzido por I/R.

Conclusão

Este estudo evidenciou que a combinação de MEL e HT foi mais efetiva para atenuar a lesão induzida por I/R do que ambas intervenções isoladas. Estudos adicionais, com maior seguimento, são necessários para consolidar estes achados.

Declaração de conflito de interesse: não há conflito de interesse.

Financiamento: FIPE/HCPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Paller MS. Acute renal failure: controversies, clinical trials, and future directions. *Seminars in nephrology*. 1998;18(5):482-9. PMID: 9754600
2. Rodriguez F, Bonacasa B, Fenoy FJ, Salom MG. Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(15):2776-94. PMID: 23092323
3. Fuquay R, Renner B, Kulik L, McCullough JW, Amura C, Strassheim D, et al. Renal ischemia-reperfusion injury amplifies the humoral immune response. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(7):1063-72. PMID:23641055
4. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation proceedings*. 2008;40(10):3279-88. PMID:19100373
5. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 1993;125(2):97-104. PMID: 8283974
6. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents

for human diseases. A critical review. *Free radical biology & medicine*. 1990;8(2):201-9. PMID:2185145

7. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annual review of medicine*. 1995;46:235-47. PMID: 7598460

8. McAnulty JF, Reid TW, Waller KR, Murphy CJ. Successful six-day kidney preservation using trophic factor supplemented media and simple cold storage. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002;2(8):712-8. PMID: 12243492

9. Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JF, Russel FG, Groot H, Rauen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology*. 2003;47(1):82-91. PMID: 12963415

10. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science*. 2000;7(6):444-58. PMID: 11060493

11. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging

actions. *Acta biochimica Polonica*. 2007;54(1):1-9. PMID: 17351668

12. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200. PMID: 16217132

13. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*. 2005;165(1-2):139-49. PMID: 15975667

14. Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res*. 2005;39(2):215-6. PMID: 16098101

15. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;854:410-24. PMID: 9928448

16. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*. 1983;35(3):198-204. PMID: 6340272

17. Banaei S, Ahmadiasl N, Alihemmati A. Comparison of the Protective Effects of Erythropoietin and Melatonin on Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Trauma monthly*. 2016;21(3):e23005. PMID: 27921018
18. Yilmaz M, Mogulkoc R, Baltaci AK. EFFECT OF THREE-WEEK ZINC AND MELATONIN SUPPLEMENTATION ON THE OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN EXPERIMENTAL RENAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS. *Acta clinica Croatica*. 2015;54(4):395-401. PMID: 27017711
19. Sezgin G, Ozturk G, Guney S, Sinanoglu O, Tuncdemir M. Protective effect of melatonin and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail*. 2013;35(3):374-9. PMID: 23356461
20. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik H, et al. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J Pineal Res*. 2007;43(2):172-8. PMID: 17645695
21. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res*. 2002;32(2):120-6. PMID: 12071469
22. Eschwege P, Paradis V, Conti M, Holstege A, Richet F, Deteve J, et al. In

situ detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidneys. *The Journal of urology*. 1999;162(2):553-7. PMID: 10411087

23. Reiter RJ, Oh CS, Fujimori O. Melatonin Its intracellular and genomic actions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 1996;7(1):22-7. PMID: 18406721

24. Li Z, Nickkholgh A, Yi X, Bruns H, Gross ML, Hoffmann K, et al. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF- κ B and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J Pineal Res*. 2009;46(4):365-72. PMID:19552759

25. Conti M, Eschwege P, Ahmed M, Paradis V, Droupy S, Loric S, et al. Antioxidant enzymatic activities and renal warm ischemia: correlation with the duration of ischemia. *Transplantation proceedings*. 2000;32(8):2740-1. PMID: 11134780

26. Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho Tde J, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, et al. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2013;28(8):568-73. PMID: 23896835

27. Ribeiro GB, Santos EBD, Bona SR, Schaefer PG, Garcez TA, Rabolini EB, et al. The effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2017;32(10):816-26. PMID: 29160368

28. Esteban-Zubero E, Garcia-Gil FA, Lopez-Pingarron L, Alatorre-Jimenez MA, Inigo-Gil P, Tan DX, et al. Potential benefits of melatonin in organ transplantation: a review. *The Journal of endocrinology*. 2016;229(3):R129-46. PMID: 27068700

29. Andersen LP, Gogenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. The Safety of Melatonin in Humans. *Clinical drug investigation*. 2016;36(3):169-75. PMID: 26692007

30. Spaliviero M, Power NE, Murray KS, Sjoberg DD, Benfante NE, Bernstein ML, et al. Intravenous Mannitol Versus Placebo During Partial Nephrectomy in Patients with Normal Kidney Function: A Double-blind, Clinically-integrated, Randomized Trial. *European urology*. 2018;73(1):53-9. PMID:28822586

7 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA INGLESA

Combined Effects of Melatonin and Topical Hypothermia on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats ¹

Pablo Cambeses Souza^I, Emanuel Burck dos Santos^{II}, Guilherme Lang Motta^{III}, Silvia Regina Bona^{IV}, Pedro Guilherme Schaefer^V, Daniela Campagnol^{VI}, Tiago Bortolini^{VII}, Carlos Otávio Corso^{VIII}

^IFellow Master Degree, Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study; technical procedures; acquisition, interpretation and analysis of data; manuscript writing.

^{II}MSc, PhD, Department of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Conception and design of the study, critical revision.

^{III} Fellow Master Degree, Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. Acquisition and interpretation of data; technical procedures.

^{IV} PhD, Laboratory of Experimental Gastroenterology and Hepatology, HCPA, Brazil. Acquisition and interpretation of data, technical procedures.

^V MD, Department of Pathology, HCPA, Porto Alegre-RS, Brazil. Histopathological examinations, acquisition of data

^{VI} PhD, Animal Experimentation Unit, HCPA, Porto Alegre-RS, Brazil. Technical procedures.

^{VII} Fellow Master Degree, Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil. Analysis and interpretation of data; manuscript writing.

^{VIII} MSc, PhD, Associate Professor of Surgery, Digestive Surgery Unit, HCPA, and

Department of Surgery, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study, interpretation of data, manuscript writing, critical revision, final approval.

Abstract

Purpose: Renal ischemia is the most common cause of acute kidney injury. Melatonin (MEL) and topical hypothermia (TH) have been shown to reduce renal ischemia-reperfusion (I/R) injury. This study evaluated whether their combination was more effective than either alone in decreasing renal damage due to I/R injury in rats.

Methods: Thirty-two Wistar rats were assigned to four groups of eight rats each. Following right nephrectomy, their left kidneys were subjected to warm ischemia (IR), cold ischemia (TH+IR), intraperitoneal injection of 10 mg/kg melatonin (MEL+IR), and injection of 10 mg/kg melatonin followed by cold ischemia (MEL+TH+IR). Eight randomly assigned right kidneys constituted the control group. After 240 min of reperfusion, left nephrectomy was performed for histopathological evaluation, lipid peroxidation, and measurement of antioxidant enzyme activity. Serum was collected to measure urea and creatinine concentrations.

Results: Histopathological damage induced by ischemia and reperfusion was more attenuated in the MEL+TH+IR than in the MEL+IR and TH+IR groups ($p<0.037$). Superoxide dismutase activity was significantly higher ($p<0.001$) and creatinine ($p<0.001$) and urea ($p<0.001$) concentrations, significantly lower in the MEL+TH+IR than in the MEL+IR and TH+IR groups.

Conclusions: The combination of MEL and TH better protects against renal I/R injury than does MEL or TH alone.

Key words: Melatonin. Hypothermia. Reperfusion Injury. Oxidative Stress. Kidney. Rats.

Introduction

Renal ischemia, the most common cause of acute kidney injury, occurs in many clinical situations, such as renal transplantation, partial nephrectomy, and cardiovascular surgery(1), and is being responsible for high mortality rates in intensive care units (ICUs)(2). Renal ischemia-reperfusion (I/R) injury increases antibody production, which can be harmful to renal allografts, and may explain the pathophysiology underlying the association between delayed graft function and long-term allograft failure(3). Blood flow during the reperfusion phase of I/R injury can produce oxygen free radicals, which promote lipid peroxidation and can cause tissue injury. Lipid membrane peroxidation and oxidative damage to proteins and DNA can result in apoptosis and cell death(4). I/R injury may result from the downregulation of the antioxidants such as catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase(5). Thus, antioxidants and radical scavengers, which inhibit this pathway, can protect from I/R injury(6).

Topical hypothermia (TH) has also been shown to protect against renal I/R injury and has been utilized in kidney preservation, especially during kidney transplantation. A reduction in the core temperature of the kidney under 4°C reduces metabolism in the majority of kidney cells to 5-8%, as well as enzyme activity(7). The improvement of preserving solutions that target harmful pathways during cold storage better preserve organ quality for longer periods of time(8). Despite these advantages, hypothermia also has undesirable side effects, including cell swelling, acidosis, altered enzyme activity, calcium accumulation, and production of reactive oxygen species (ROS)(9).

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an important product of the pineal gland that acts as a regulator of sleep, immune function, and circadian rhythm. Furthermore, as an electron donor, melatonin (MEL) is a potent scavenger of ROS (10, 11). MEL has been shown to have important antioxidant and anti-inflammatory

effects in situations related to oxidative stress and inflammation(12-14). MEL has been found to reduce I/R injury, to activate antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and to reduce lipid peroxidation and apoptosis(10, 15).

The finding that both TH and MEL reduce I/R injury suggested that the two together may have synergistic effects. This study therefore evaluated whether TH and MEL alone or in combination, had greater benefit in terms of improving histopathological parameters, oxidative stress damage, antioxidant enzyme activity, and biochemical parameters after I/R in rat kidneys.

Methods

The study was approved by the Animals Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (case 15-0472) and was performed in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, published by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), as well as with the Brazilian law on the scientific use of animals (Law 11794/2008).

Animals and experimental design

Adult male Wistar rats, weighing 276–406 g (age, 8–10 weeks old), were housed in the Animal Experimentation Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre in groups of four in separate cages at room temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12-hour light/dark cycle and free access to water and rat chow. The rats were randomly allocated to four experimental groups of eight rats each (Figure 1). Following right nephrectomy, their left kidneys were subjected to warm ischemia for 40 min and reperfusion for 4 h (IR group); cold ischemia for 40 min and reperfusion for 4 h (TH+IR group); intraperitoneal injection of 10 mg/kg MEL 10 min prior to warm ischemia for 40 min and reperfusion for 4 h (MEL+IR group); or intraperitoneal injection of 10 mg/kg MEL 10 min prior to cold ischemia for 40 min and reperfusion for 4 h (MEL+TH+IR group). Eight randomly assigned right kidneys constituted the

control group.

The surgical procedure began with the induction of inhalation general anesthesia with an isoflurane vaporizer at 3-5%, administered through a campanula. Blood was collected from the retro-orbital plexus. The animals were placed on a warm surgical table in the supine position, and their rear paw reflexes were tested to ensure that adequate anesthesia was achieved. Anesthesia was maintained with 1 L/min oxygen and 2-3% isoflurane. A common electronic rectal thermometer (Termomed 1.0, Incoterm, Porto Alegre, Brazil) was used to assess systemic temperature. If needed, a heating lamp was used for maintaining the systemic temperature between 35.5°C and 37.5°C. Before making an abdominal incision, bupivacaine 0.5% was injected into the abdominal wall to ensure pain control during and after the procedure. MEL (Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in absolute ethanol and diluted in saline to yield an ethanol concentration of 1%. Rats in the MEL+IR and MEL+TH+IR groups were intraperitoneally administered MEL (10 mg/kg) 10 min prior to ischemia. A longitudinal median incision was made on the abdomen and surgical retractors were applied. Right nephrectomy was performed. Half of the right kidney was immersed in 10% formalin and the other half frozen and stored at -80°C. Ischemia was induced in the left kidneys by clamping the renal pedicle with an atraumatic microvascular surgery clip (Medicon, Tuttlingen, Germany). Cortical left kidney temperature was assessed with an intra-parenchymal probe connected to a specific thermometer (BAT 12, IITC Life Science, W. Hills, CA, USA). The left kidneys in the TH, TH+IR and MEL+TH+IR groups were flushed with ice-cold saline solution to achieve a target temperature of 4°C. To avoid systemic hypothermia, a suction system was installed to remove the cold saline solution, and the left kidney was isolated from the rest of the abdominal cavity using a device made of polystyrene and latex. After 40 min of TH or warm ischemia, the clamp was removed from the renal pedicle and the abdominal wall was closed. The animals were moved to a new warm cage with water, but without food. After 4 h of reperfusion, they were moved again to the surgical table and again anesthetized by inhalation general anesthesia. The

abdominal wall sutures were removed and left nephrectomy was performed. Blood samples were collected through heart puncture. Cardiectomy was performed to ensure animal death under anesthesia.

Histopathological changes

Half of each kidney was fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sliced, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS) stain. The sections were examined under light microscope (Olympus bx41, Tokyo, Japan) at a magnification of 400× in a blinded manner by an experienced renal pathologist. The samples were graded histopathologically as described previously(16), with grade 1 indicating mitoses and necrosis of individual cells; grade 2 indicating necrosis of all cells in adjacent proximal convoluted tubules, with survival of surrounding tubules; grade 3 indicating necrosis confined to the distal third of the proximal convoluted tubule with a band of necrosis extending across the inner cortex; and grade 4 indicating necrosis affecting all three segments of the proximal convoluted tubules. In addition, normal findings were designated grade 0 (Figure 1).

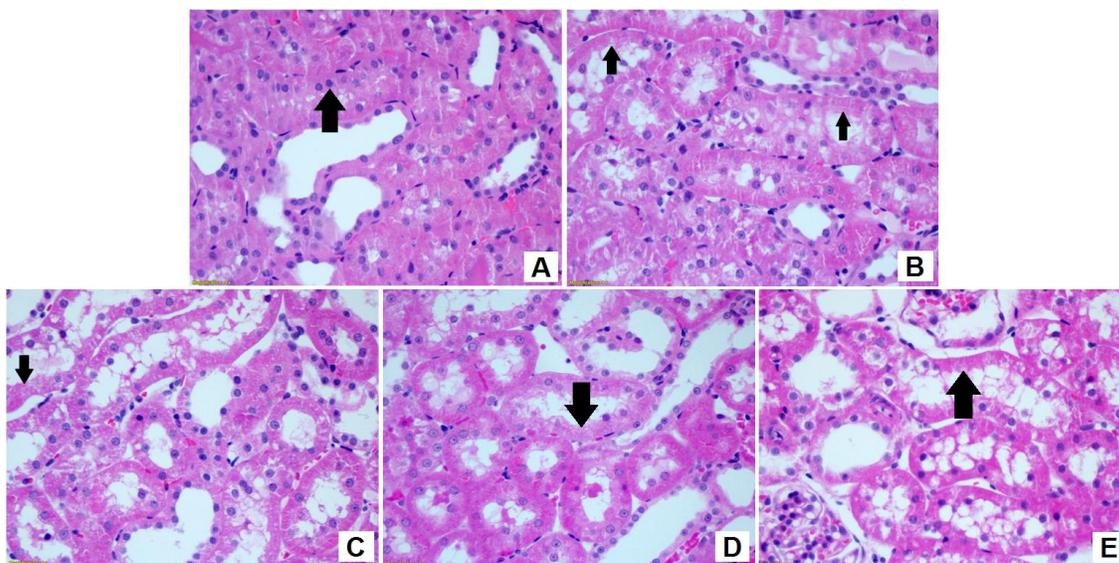


Figure 1 - Histopathological evaluation

Histopathological evaluation of rat kidneys showing the degrees of acute tubular necrosis described by Jablonski *et al*(16) (examined under a light microscope; Olympus bx41, Tokyo, Japan): Photomicrographs of the renal cortex: (A) showing no abnormality, grade 0 (HE $\times 400$); (B) showing necrosis of individual cells and mitotic cells in Grade 1 acute tubular necrosis (HE $\times 400$); (C) showing necrosis of a group of proximal convoluted tubules in Grade 2 acute tubular necrosis (HE $\times 400$); (D) showing necrosis of the distal third of the proximal convoluted tubules in Grade 3 acute tubular necrosis (HE $\times 400$); (E) showing necrosis affecting all three segments of the proximal convoluted tubules.

Kidney homogenate preparation

Kidneys were weighed and homogenized for 40 sec in an Ultra-Turrax homogenizer (IKA Works Inc., Wilmington, DE, USA) at 4°C in the presence of 1.15% KCl (9 ml per g of tissue) and phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF) at a concentration of 100 mM in isopropanol (10 μ l per ml of KCl). The homogenate was centrifuged for 10 min at 3,000 rpm in a refrigerated centrifuge (SORVALL Super T21; Kendro Laboratory Products, Weaverville, NC, USA), the precipitate was discarded, and the supernatant was frozen at -80°C for subsequent

biochemical analysis.

Protein

Protein concentrations were determined using the Bradford method with bovine albumin as a standard, followed by spectrophotometry at 595 nm.

Oxidative stress damage

Malondialdehyde (MDA) levels were measured using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Antioxidant enzyme activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by assessing the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation, spectrophotometrically at 480 nm. The results were expressed as USOD/min/mg protein. Catalase (CAT) activity was calculated based on the decomposition of hydrogen peroxide, as shown spectrophotometrically at 240 nm, with the results expressed as pmol/mg protein.

Biochemical functional parameter analysis

Serum concentrations of urea and creatinine (sCr) at baseline and at the end of the experiment, from the blood samples collected from the retro-orbital plexus and heart, respectively, were estimated using a Roche Cobas 8000 c702 automatic biochemistry apparatus. Biochemical functional parameters were analyzed only with regard to experimental groups because urea and sCr were estimated from peripheral blood.

Statistical Analysis

Data were presented as frequency and percentage or as mean \pm SD. Associations between variables were assessed using χ^2 tests. Continuous variables were compared by one-ANOVA, followed by Turkey's test for post hoc comparisons. Statistical significance was set at $P < 0.05$. All statistical analyses

were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc).

Results

The baseline characteristics of rats in the four study groups and the control group, including weight, temperature, and serum creatinine and urea concentrations were similar.

Histopathological evaluation revealed significant differences among the groups studied (Figure 2). The degree of I/R injury was greater in the IR, TH+IR and MEL+IR groups than in the control group. There are rats in the IR and TH+IR groups presented with grade 4 injury, whereas none of the rats in the MEL+IR group presented with a grade 4 injury and one had grade 0. The MEL+TH+IR group showed the lowest degree of injury, with none of the rats having a grade 3 or 4 injury and one having grade 0, similar to the control group of kidneys not subjected to I/R.

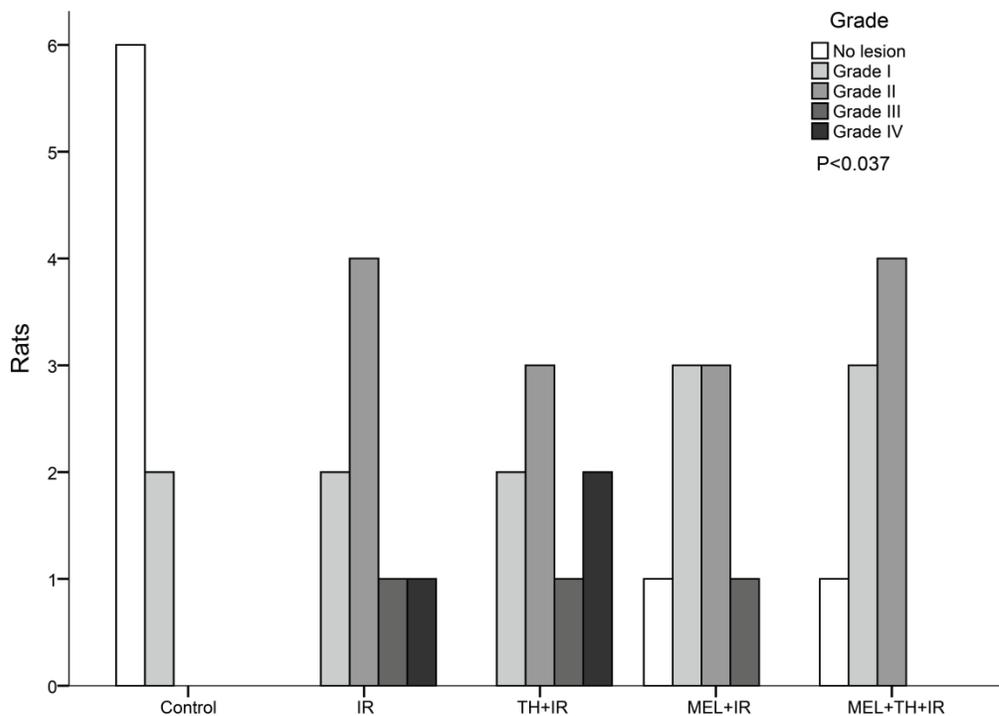


Figure 2 - Differences between the groups in histopathological grade

IR, ischemia and reperfusion; **TH+IR**, topical hypothermia+ischemia and reperfusion; **MEL+IR**, melatonin+ischemia and reperfusion; **MEL+TH+IR**, melatonin+topical hypothermia+ ischemia and reperfusion. Chi-square test ($p < 0.037$)

Oxidative stress damage was measured by TBARS tissue assay, which assesses the degree of lipid peroxidation. TBARS values were highest in the IR and TH+IR groups, but were lower in rats administered MEL. The TBARS values were significantly lower in the MEL+IR than in all of the other groups ($P < 0.05$; Figure 3).

SOD activity was lower in the IR than in the other groups, and was significantly higher in the MEL+TH+IR and TH+IR groups than in the IR group ($P < 0.05$), CAT release was higher in the MEL+TH+IR group than in the other groups, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$; Figure 4).

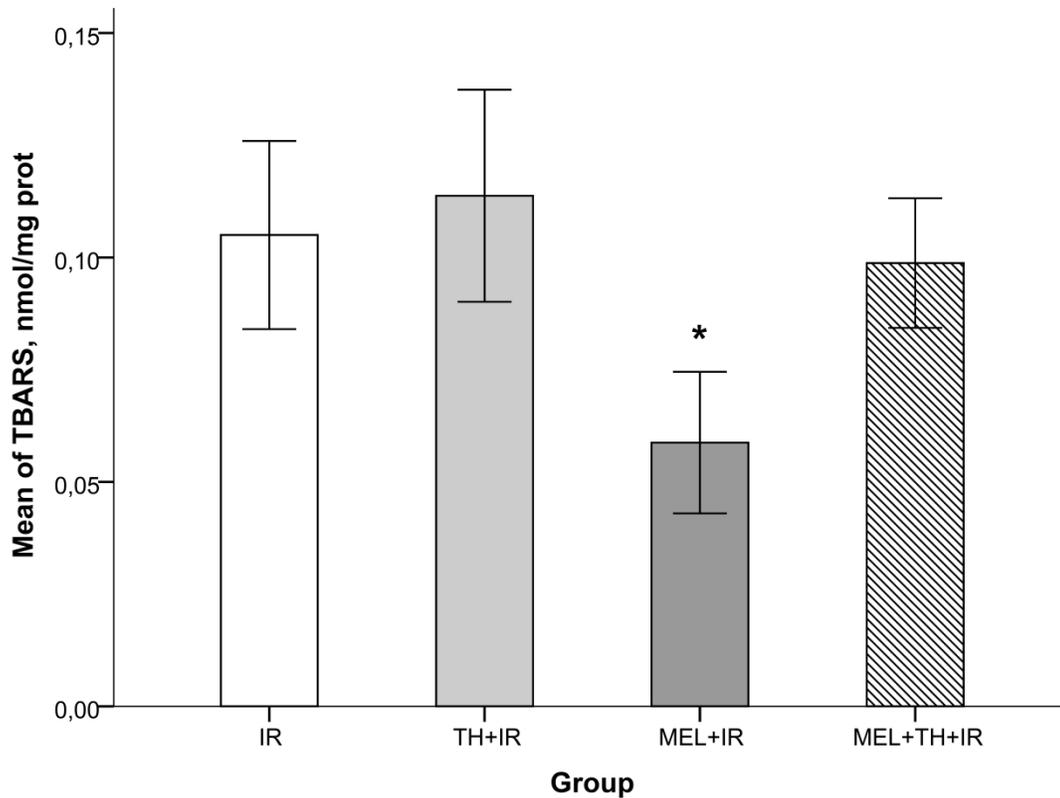


Figure 3 - Means of TBARS

IR, ischemia and reperfusion; **TH+IR**, topical hypothermia+ischemia and reperfusion; **MEL+IR**, melatonin+ischemia and reperfusion; **MEL+TH+IR**, melatonin+topical hypothermia+ischemia and reperfusion, TBARS; thiobarbituric acid reactive species.

* **MEL+IR** vs IR ($P < 0.05$); **TH+IR** ($P < 0.05$); **MEL+TH+IR** ($P < 0.05$).

Note: For comparing continuous variables the one-ANOVA test was used. The Turkey's test was applied for post hoc comparisons.

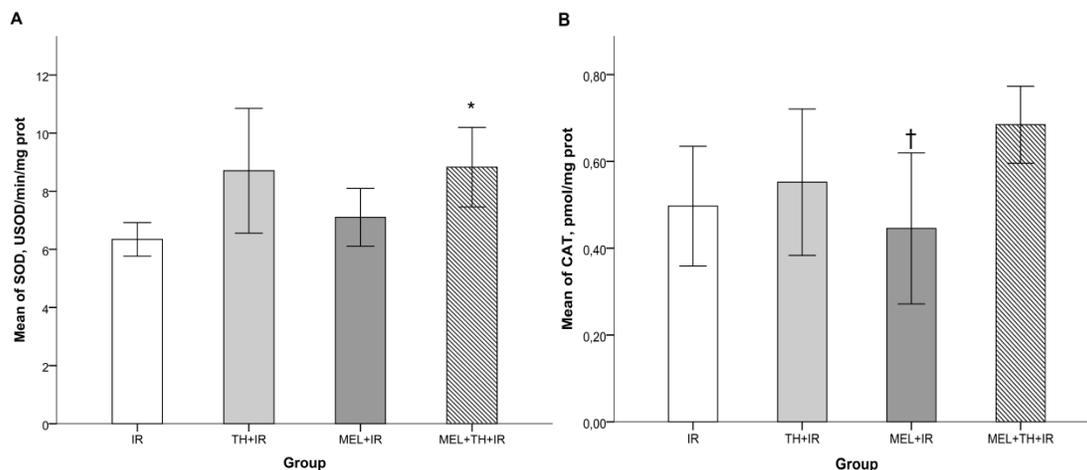


Figure 4 - Means of SOD and Catalase

IR, ischemia and reperfusion; **TH+IR**, topical hypothermia+ischemia and reperfusion; **MEL+IR**, melatonin+ischemia and reperfusion; **MEL+TH+IR**, melatonin+topical hypothermia+ischemia and reperfusion; SOD, superoxide dismutase. A, SOD; B, catalase.

* **IR vs TH+IR** ($P < 0.05$); **MEL+TH+IR** ($P < 0.05$).

† There are no statistically significant differences.

Note: For comparing continuous variables the one-ANOVA test was used. The Turkey's test was applied for post hoc comparisons.

Assessment of functional parameters at the end of the experimental protocol showed that serum creatinine and urea concentrations were highest in the IR group. The concentrations of both were significantly lower in the MEL+TH+IR group than in the other groups ($P < 0.05$). Differences from baseline were also lowest in the MEL+TH+IR group. The TH+IR group showed significant differences in creatinine concentrations compared to IR and MEL+IR (Figure 5).

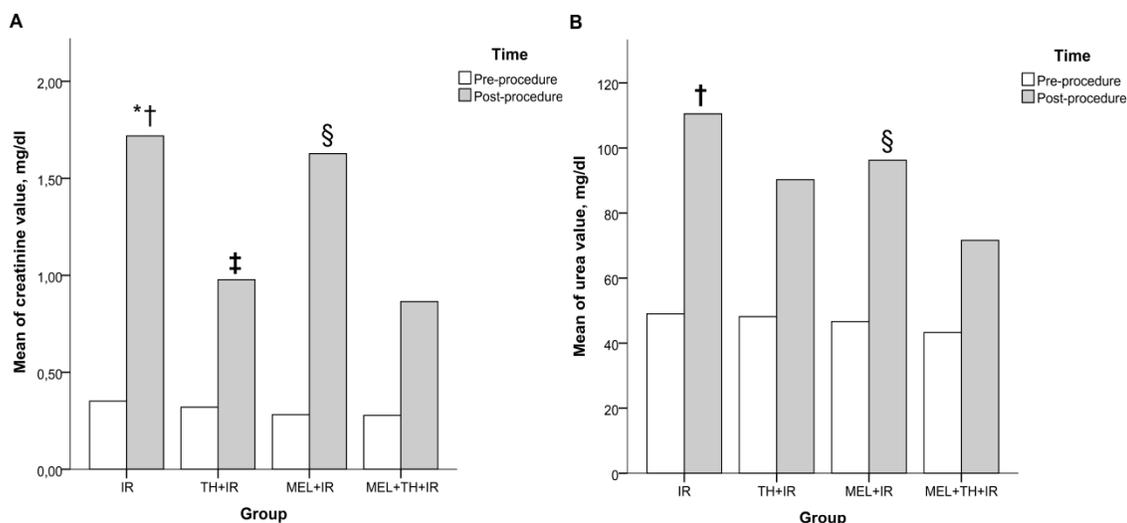


Figure 5 - Means of Creatinine and Urea

Means of creatinine and urea between the study groups pre- and post-procedure.

IR, ischemia and reperfusion; **TH+IR**, topical hypothermia+ischemia and reperfusion; **MEL+IR**, melatonin+ischemia and reperfusion; **MEL+TH+IR**, melatonin+topical hypothermia+ischemia and reperfusion. **A**, creatinine; **B**, urea.

* **IR vs TH+IR** ($p < 0.001$);

† **IR vs MEL+TH + IR** ($p < 0.001$).

‡ **TH+IR vs MEL+IR** ($p < 0.001$).

§ **MEL+IR vs MEL+TH +IR** ($p < 0.001$).

Note: For comparing continuous variables the two way ANOVA test was used. The Turkey's test was applied for post hoc comparisons.

Discussion

In our study, I/R caused histopathological changes, including grades 3 and 4 injury(16), in both the IR and TH+IR groups. Pre-treatment with MEL alone (MEL+IR) slightly attenuated these histopathological damages, with no kidney experiencing grade 4 injury, but the damage did not differ significantly from that in the control group. MEL has been shown to act as a cytoprotective agent in I/R-induced lesions, reversing the damage caused by I/R nephrotoxicity(17). The combination of MEL pre-treatment plus topical hypothermia at 4°C (MEL+TH+IR)

markedly reduced the degree of histopathological damage induced by I/R. Although some of these kidneys had grade 1 and 2 injuries, none had grade 3 and 4 lesions, showing no difference with the control group. Thus, combined treatment showed benefits, reducing the histopathological extent of tissue injury.

Several studies have evaluated the effects of MEL alone or in combination with other substances on I/R injury(18-20), previous study evaluated whether pre-treatment with MEL reduced I/R injury(21) In that study, which used an experimental IR model in rats, pre-treatment with 10 mg/kg MEL 10 minutes prior to ischemia attenuated histopathological changes and reduced biochemical indices. I/R-induced renal damage can also be reduced by topical hypothermia, which reduces cellular metabolism and oxidative stress, making it essential for organ viability during the period of ischemia(7).

I/R-induced renal injury is associated with lipid peroxidation, a mechanism that causes oxidative damage to the cell membrane, leading to the production of free radicals(10), and TBARS is a good indicator of the degree of lipid peroxidation. We found that the level of TBARS was significantly higher in the IR than in the control group, indicative of increased lipid peroxidation due to high oxidative stress(22). We also found that TBARS was significantly lower in the MEL+IR than in the other groups ($P < 0.001$). This finding, that MEL reduces the production of TBARS indicates that MEL decreases lipid peroxidation and cellular damage. This reduction in lipid peroxidation may be partly due to MEL scavenging the peroxynitrite (ONOO⁻) radicals and hydroxyl (OH) ions(23). Although TBARS also tended to be lower in the MEL+TH+IR group than in the IR and IR+TH groups these differences were not significant.

I/R causes accumulation of free radicals and the reduction of antioxidant enzymes, which have deleterious effects on the cell membrane, DNA, and protein. SOD and CAT activities decrease markedly during renal ischemia, with the main factor being the time of exposure to ischemic insult(24, 25). In agreement with findings showing that MEL activates SOD(10), we found that SOD activity was

significantly higher in the MEL+TH+IR than in the IR group ($P < 0.02$). In contrast, neither TH nor MEL alone significantly increased SOD activity. These findings suggest that the combination of MEL and TH stimulated protective antioxidant enzymes, corroborating our histopathological findings.

We also found that IR significantly increased creatinine and urea concentrations, showing that I/R has deleterious effects on renal function, even acutely. Creatinine concentrations were lower in the MEL+TH+IR than in the IR and MEL+IR groups, showing that combined therapy additionally protects of renal function ($P < 0.05$). Moreover, cold ischemia alone in the TH+IR group showed better protection of renal function when compared with the IR and MEL+IR groups ($P < 0.05$). As expected, post-ischemia urea concentrations were higher in the IR group, showing that I/R damaged renal function. Although urea concentrations were lower in the TH+IR and MEL+IR groups than in the IR group, the differences were not statistically significant. In contrast, urea concentrations were significantly lower in the MEL+TH+IR group than in the other groups ($P < 0.05$), probably due to the synergistic protective effect of both interventions. The benefits of cold ischemia at 4°C include the reduction of cellular metabolism(26, 27) and the reduced production of xanthine oxidase(7), whereas the benefits of MEL include the activation of antioxidant enzymes and the protection of oxidative phosphorylation. Thus, together, cold ischemia and MEL reduce creatinine and urea concentrations, both parameters of renal function.

To our knowledge, our study is the first to assess the effects of both MEL and TH on IR-induced renal injury. This experimental model was found to be adequate, as IR induced histopathological changes, altered factors related to oxidative stress, and worsened renal function. All of these parameters were attenuated by MEL and TH, especially by their combination. This combination showed benefits in the main outcome studied, histopathology, as well as altering the activity of the antioxidant enzyme SOD, and the functional parameters creatinine and urea.

The present study had several limitations. Our utilization of a model of acute I/R-

induced injury may be different from chronic I/R injury or in humans. Longer-term follow-up may reveal additional benefits of MEL+TH.

Although MEL has been studied in several situations, its role in organ transplantation has not yet been established. Experimental studies have shown, however, that MEL may have potential beneficial effects on organ transplantation(28). MEL has a wide therapeutic window and few important side effects(29), suggesting that further studies are warranted.

In addition to TH, current clinical strategies to reduce kidney damage by I/R include perfusion fluids, use of a hypothermic perfusion machine, administration of mannitol, a reduced period of ischemia(30). The use of MEL, if proven effective in animal models of I/R and in humans, may become an available tool to prevent I/R-induced kidney damage.

Conclusions

In conclusion, this study showed that the combination of MEL and TH was more effective at attenuating I/R-induced injury than was either alone. Additional studies, with longer follow-up, are warranted.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES:

1. Paller MS. Acute renal failure: controversies, clinical trials, and future directions. *Seminars in nephrology*. 1998;18(5):482-9. PMID: 9754600
2. Rodriguez F, Bonacasa B, Fenoy FJ, Salom MG. Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(15):2776-94. PMID: 23092323
3. Fuquay R, Renner B, Kulik L, McCullough JW, Amura C, Strassheim D, et al. Renal ischemia-reperfusion injury amplifies the humoral immune response. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(7):1063-72. PMID:23641055
4. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation proceedings*. 2008;40(10):3279-88. PMID:19100373
5. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 1993;125(2):97-104. PMID: 8283974

6. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free radical biology & medicine*. 1990;8(2):201-9. PMID:2185145
7. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annual review of medicine*. 1995;46:235-47. PMID: 7598460
8. McAnulty JF, Reid TW, Waller KR, Murphy CJ. Successful six-day kidney preservation using trophic factor supplemented media and simple cold storage. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002;2(8):712-8. PMID: 12243492
9. Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JF, Russel FG, Groot H, Rauen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology*. 2003;47(1):82-91. PMID: 12963415
10. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science*. 2000;7(6):444-58. PMID: 11060493

11. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta biochimica Polonica*. 2007;54(1):1-9. PMID: 17351668
12. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200. PMID: 16217132
13. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*. 2005;165(1-2):139-49. PMID: 15975667
14. Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res*. 2005;39(2):215-6. PMID: 16098101
15. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;854:410-24. PMID: 9928448
16. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia.

Transplantation. 1983;35(3):198-204. PMID: 6340272

17. Banaei S, Ahmadiasl N, Alihemmati A. Comparison of the Protective Effects of Erythropoietin and Melatonin on Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Trauma monthly*. 2016;21(3):e23005. PMID: 27921018

18. Yilmaz M, Mogulkoc R, Baltaci AK. EFFECT OF THREE-WEEK ZINC AND MELATONIN SUPPLEMENTATION ON THE OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN EXPERIMENTAL RENAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS. *Acta clinica Croatica*. 2015;54(4):395-401. PMID: 27017711

19. Sezgin G, Ozturk G, Guney S, Sinanoglu O, Tuncdemir M. Protective effect of melatonin and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail*. 2013;35(3):374-9. PMID: 23356461

20. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik H, et al. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J Pineal Res*. 2007;43(2):172-8. PMID: 17645695

21. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res*. 2002;32(2):120-6. PMID: 12071469

22. Eschwege P, Paradis V, Conti M, Holstege A, Richet F, Deteve J, et al. In situ detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidneys. *The Journal of urology*. 1999;162(2):553-7. PMID: 10411087
23. Reiter RJ, Oh CS, Fujimori O. Melatonin Its intracellular and genomic actions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 1996;7(1):22-7. PMID: 18406721
24. Li Z, Nickkholgh A, Yi X, Bruns H, Gross ML, Hoffmann K, et al. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF-kB and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J Pineal Res*. 2009;46(4):365-72. PMID:19552759
25. Conti M, Eschwege P, Ahmed M, Paradis V, Droupy S, Loric S, et al. Antioxidant enzymatic activities and renal warm ischemia: correlation with the duration of ischemia. *Transplantation proceedings*. 2000;32(8):2740-1. PMID: 11134780
26. Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho Tde J, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, et al. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2013;28(8):568-

73. PMID: 23896835

27. Ribeiro GB, Santos EBD, Bona SR, Schaefer PG, Garcez TA, Rabolini EB, et al. The effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2017;32(10):816-26. PMID: 29160368

28. Esteban-Zubero E, Garcia-Gil FA, Lopez-Pingarron L, Alatorre-Jimenez MA, Inigo-Gil P, Tan DX, et al. Potential benefits of melatonin in organ transplantation: a review. *The Journal of endocrinology*. 2016;229(3):R129-46. PMID: 27068700

29. Andersen LP, Gogenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. The Safety of Melatonin in Humans. *Clinical drug investigation*. 2016;36(3):169-75. PMID: 26692007

30. Spaliviero M, Power NE, Murray KS, Sjoberg DD, Benfante NE, Bernstein ML, et al. Intravenous Mannitol Versus Placebo During Partial Nephrectomy in Patients with Normal Kidney Function: A Double-blind, Clinically-integrated, Randomized Trial. *European urology*. 2018;73(1):53-9. PMID:28822586

8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

No nosso protocolo experimental, a terapia combinada de MEL+HT atenuou a lesão histopatológica renal. A terapia com MEL isolada teve menores valores de TBARS, demonstrando a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica. Houve maior atividade de enzimas antioxidantes nos rins submetidos à MEL+HT, além disso, melhora nos parâmetros de função renal, demonstrando o efeito protetor da terapia combinada.

9 – PERSPECTIVAS

Para fundamentar a terapia combinada com MEL e HT, tendo em vista que este é um protocolo experimental para lesão renal aguda, torna-se necessário trabalho com maior tempo de acompanhamento dos animais após a I/R. Caso os achados positivos sejam mantidos, justifica-se a possibilidade de avaliação dos efeitos da terapia combina de MEL e HT em humanos.