



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Gabriela Faria Buys Gonçalves

**Avaliação histomorfométrica do rim após isquemia quente e o efeito protetor do resveratrol ou da quercetina em ratos Wistar**

Rio de Janeiro

2020

Gabriela Faria Buys Gonçalves

**Avaliação histomorfométrica do rim após isquemia quente e o efeito protetor do resveratrol ou da quercetina em ratos Wistar**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G635 Gonçalves, Gabriela Faria Buys.  
Avaliação histomorfométrica do rim após isquemia quente e o efeito protetor do resveratrol ou da quercetina em ratos Wistar / Gabriela Faria Buys Gonçalves – 2020.  
85f.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza.  
Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciência Cirúrgicas.

1. Isquemia- Teses. 2. Rins – Cirurgia - Teses. 3. Resveratrol - Teses. 4. Quercetina. 5. Traumatismo por Reperfusão. I Souza, Diogo Benchimol de. II. Sampaio, Marco Aurélio Pereira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.61-089

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Gabriela Faria Buys Gonçalves

**Avaliação histomorfométrica do rim após isquemia quente e o efeito protetor do resveratrol ou da quercetina em ratos Wistar**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2020.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio (Coorientador)

Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. José Aurelino Damasceno Ferreira Filho

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Leonardo De Albuquerque Dos Santos Abreu

Hospital Federal dos Servidores do Estado

Rio de Janeiro

2020

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo, agradeço a Deus, por toda a força e amor incondicionais cedidos a mim desde sempre.

Aos meus orientadores e amigos, professores Diogo Benchimol e Marco Sampaio, por sempre acreditarem no meu potencial, pela paciência e vontade de ensinar, por todo o conhecimento que me passaram, oportunidades que me foram dadas, lições que compartilharam comigo, e por sempre me motivarem e apoiarem na carreira acadêmica.

Ao professor Francisco Sampaio, professor Luciano Favorito, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas e à Unidade de Pesquisa Urogenital, que foi minha segunda casa nos últimos seis anos, por me acolherem desde o mestrado até o atual dia e pelo total apoio ao progresso da Ciência na UERJ, Rio de Janeiro, Brasil e mundo.

À CAPES e à FAPERJ por me concederem as bolsas de iniciação científica, mestrado, doutorado e doutorado nota 10, que foram imprescindíveis para a realização de toda a minha pós-graduação e produção científica.

A professora Maria Eduarda Silva, pela realização da histopatologia do material desse trabalho.

À minha mãe, Elaine, que sempre esteve ao meu lado e me incentivou a seguir minhas escolhas de vida, principalmente a de ser médica veterinária e seguir com a pós-graduação. Muito obrigada, mãe, pelas tantas vezes que pôs minha cabeça no lugar, enxugou minhas lágrimas e compartilhou minhas alegrias.

Ao meu pai, Flavio, por tudo que fez por mim e pela sua dedicação ao meu futuro, por sua presença em minha vida e por ser sempre meu eterno orientador. Pai, muito obrigada pelo seu amor, dicas e toques, incentivo total ao meu sonho acadêmico e sua eterna capacidade de me fazer sorrir.

Ao George, por todo o amor, paciência e compreensão que me dedica, por todos os nossos momentos juntos, e pelo grande incentivo que sempre me deu para que eu seguisse meus sonhos e o caminho do sucesso.

Aos membros de minha família e amigos amados, os quais tenho toda a certeza que, apesar da distância que os caminhos da vida acabam promovendo, sempre torceram pelo meu sucesso.

Eu não tenho nenhum vestido além do que uso todo dia. Se você for gentil o suficiente para me presentear um, só peço que seja prático e escuro para que eu possa vesti-lo e, logo em seguida, para ir para o laboratório.

*Marie Curie*

## RESUMO

GONÇALVES, Gabriela Faria Buys. *Avaliação histomorfométrica do rim após isquemia quente e o efeito protetor do resveratrol ou da quercetina em ratos Wistar*. 2020. 85f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

**Introdução e Objetivos:** A realização da isquemia/reperfusão durante a cirurgia poupadora de néfrons causa lesões que são uma questão crítica da nefrectomia parcial. Ainda não há resultados quantitativos do uso do resveratrol e da quercetina após a isquemia renal. Os objetivos deste estudo são avaliar quantitativamente a histomorfologia do córtex renal após isquemia quente e o possível efeito protetor do resveratrol ou da quercetina. **Métodos:** Sessenta ratos Wistar machos (9 semanas de idade) foram divididos em 6 grupos de 10 animais: Sham (S); Sham tratado com Resveratrol (SR), Sham tratado com Quercetina (SQ), Isquemia não tratado (I); Isquemia tratado com Resveratrol (IR) e Isquemia tratado com Quercetina (IQ). Os grupos SR e IR receberam 30 mg/kg de resveratrol por via intraperitoneal 60 minutos antes do procedimento cirúrgico. Os grupos SQ e IQ receberam 50 mg/kg de quercetina administrada por gavagem por 3 dias antes e após a laparotomia, e por via intraperitoneal 60 minutos antes da cirurgia. O grupo Isquemia teve a artéria e veia renais esquerdas clampeadas por 60 minutos. Os animais foram eutanasiados 4 semanas após o procedimento, o sangue foi coletado para dosagem sérica de uréia e creatinina e os rins foram coletados e fixados. O peso renal e o volume renal, a relação entre as áreas de córtex e não-córtex (C-NC), a densidade volumétrica glomerular (Vv[Glom]), volume glomerular médio ponderado (VWGV) e número de glomérulos por rim (N[Glom]) foram avaliados por métodos estereológicos. Os resultados foram comparados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, e considerados significativos quando o valor de  $p < 0,05$ . **Resultados:** A uréia sérica no grupo I foi aumentada em relação ao grupo S em 10,4%, e não foram observadas diferenças significativas nos grupos IR ou IQ quando comparados aos grupos S e SR ou S e SQ ( $p = 0,01$ ). A C-NC do grupo IQ foi maior que o I em 5,9%, e o grupo I foi significativamente menor em relação aos grupos S e SQ, e o grupo I também foi menor em relação ao grupo SR ( $p < 0,01$ ). A Vv[Glom] do grupo IR foi maior em 49,1% quando comparada ao I e não apresentou diferença significativa quando comparada aos grupos S e SR, já o grupo IQ apresentou esse parâmetro maior em 33,7% quando comparado ao grupo I, que diminuiu significativamente quando comparado aos grupos S e SQ ( $p < 0,01$ ). O N[Glom] do grupo IR apresentou-se aumentado em 35,6% quando comparado ao I e não apresentou diferenças significativas quando comparado aos grupos S e SR ( $p = 0,01$ ), e o IQ foi maior em 28,3% quando comparado ao I, que diminuiu em relação aos grupos S e SQ ( $p < 0,01$ ). O peso e volume renais e o VWGV não apresentaram diferença significativa entre os grupos. **Conclusões:** A isquemia renal quente arteriovenosa promove um grande dano ao tecido funcional do rim e a administração prévia de resveratrol ou quercetina tem efeitos protetores no córtex renal, sugerindo que esses compostos podem ser usados preventivamente na nefrectomia parcial.

**Palavras-chave:** Isquemia renal. Nefrectomia parcial. Resveratrol. Quercetina. Histomorfometria.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Gabriela Faria Buys. *Histomorphometric evaluation of the kidney after warm ischemia and the protective effect of resveratrol or quercetin in Wistar rats*. 2020. 85f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

**Introduction and Objectives:** Injury caused by ischemia/reperfusion in the kidney remains a critical issue regarding nephron sparing surgery. There are still no quantitative results of the use of resveratrol and quercetin after renal ischemia. The objectives of this study are to quantitatively assess the histomorphology of the renal cortex after warm ischemia and the possible protective effect of resveratrol or quercetin. **Methods:** Sixty male Wistar rats (9 weeks of age) were divided into 6 groups of 10 animals: Sham (S); Sham treated with Resveratrol (SR) and Sham treated with Quercetin (SQ), Untreated Ischemia (I); Ischemia treated with Resveratrol (IR) and Ischemia treated with Quercetin (IQ). SR and IR groups received 30 mg/kg of resveratrol intraperitoneally 60 minutes before the surgical procedure. The SQ and IQ groups received 50 mg/kg of quercetin administered by gavage for 3 days before and after laparotomy, and intraperitoneally 60 minutes before surgery. The Ischemia group had the left renal artery and vein clamped for 60 minutes. The animals were euthanized 4 weeks after the procedure, blood was collected for serum urea and creatinine, and the kidneys were collected and fixed. Renal weight and volume, the cortex-non-cortex areas ratio (C-NC), the glomerular volume density (Vv[Glom]), the weighted mean glomerular volume (VWGV), and glomerular number per kidney (N[Glom]) were evaluated by stereological methods. The results were compared by one-way ANOVA with Bonferroni post-test, and considered significant when the value of  $p < 0.05$ . **Results:** Serum urea in subgroup I was increased in relation to group S in 10.4%, and no significant differences were observed in the groups IR or IQ when compared to groups S and SR or S and SQ ( $p = 0.01$ ). The C-NC of the IQ group was higher than the I group in 5.9%, and the group I was significantly lower in relation to the S and SQ groups, which was also observed in relation to the SR group ( $p < 0.01$ ). The Vv[Glom] of the IR group was higher in 49.1% when compared to the group I and did not present significant difference when compared to the S and SR groups, whereas the IQ group had this parameter higher in 33.7% when compared to the group I, which decreased significantly when compared to S and SQ groups ( $p < 0.01$ ). The N[Glom] of the IR group was increased by 35.6% when compared to group I and did not present significant differences when compared to the S and SR groups ( $p = 0.01$ ), and the IQ was higher in 28.3% when compared to group I, which decreased in relation to the S and SQ groups ( $p < 0.01$ ). Renal weight and volume and VWGV showed no significant difference among groups. **Conclusions:** Arteriovenous warm renal ischemia promotes a great damage to the functional tissue of the kidney and previous administration of resveratrol or quercetin has protective effects on the renal cortex, suggesting that these compounds can be used preventively in partial nephrectomy.

**Keywords:** Renal ischemia. Partial nephrectomy. Resveratrol. Quercetin. Histomorphometry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura anatômica do rim.....	21
Figura 2 –	Histologia do córtex renal.....	23
Figura 3 –	Cadeia de reações isquêmicas iniciais.....	26
Figura 4 –	Principais reações de peroxidação lipídica e ação dos antioxidantes endógenos.....	28
Figura 5 –	Esquema demonstrativo dos procedimentos efetuados nos grupos experimentais.....	35
Figura 6 –	Clampeamento arteriovenoso esquerdo e evidências visuais dos momentos de reperfusão renal.....	36
Figura 7 –	Imagens demonstrativas da quantificação das áreas proporcionais total e de não córtex das fatias transversais pelo método de Cavalieri.....	42
Figura 8 –	Disposição da grade M42 para análise da densidade volumétrica glomerular.....	44
Figura 9 –	Disposição da grade com linhas paralelas para análise do volume glomerular médio ponderado.....	45
Figura 10 –	Fotomicrografias representativas do córtex renal dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol.....	51
Figura 11 –	Fotomicrografias representativas do córtex renal dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina.....	57

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Representação dos níveis séricos de uréia dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol.....	47
Gráfico 2 –	Representação da relação entre áreas de córtex e não córtex dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol.....	48
Gráfico 3 –	Representação da densidade volumétrica glomerular dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol.....	49
Gráfico 4 –	Representação do número de glomérulos por rim dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol.....	50
Gráfico 5 –	Representação dos níveis séricos de uréia dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina .....	53
Gráfico 6 –	Representação da relação entre áreas de córtex e não córtex dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina .....	54
Gráfico 7 –	Representação da densidade volumétrica glomerular dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina.....	55
Gráfico 8 –	Representação do número de glomérulos dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados bioquímicos e estereológicos dos rins esquerdos dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol.....	46
Tabela 2 –	Dados bioquímicos e estereológicos dos rins esquerdos dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NP	Nefrectomia parcial
IRQ	Isquemia renal quente
MPO	Mieloperoxidase
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
MDA	Malondialdeído
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathiona peroxidase
XO	Xantina oxidase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
NR	Nefrectomia radical
ATP	Adenosina trifosfato
ERO	Espécies reativas de oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
min	Minuto(s)
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais em pesquisa
N[Glom]	Número de glomérulos por rim
VC	Volume cortical do rim
Vv[Glom]	Densidade volumétrica glomerular
VWGV	Volume glomerular médio ponderado

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
α	Alfa
γ	Gama
ml	Mililitro
cm	Centímetro
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbico
μm	Micrômetro
g	Gramma
mm	Milímetro
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
1.1	<b>Um breve histórico da nefrectomia parcial</b> .....	18
1.2	<b>Anatomia macroscópica e microscópica renal</b> .....	19
1.3	<b>Fisiologia renal</b> .....	23
1.4	<b>Fisiopatologia da isquemia renal quente</b> .....	24
1.5	<b>Bioflavonóides</b> .....	30
1.5.1	<u>Resveratrol</u> .....	30
1.5.2	<u>Quercetina</u> .....	31
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1	<b>Geral</b> .....	32
2.2	<b>Específicos</b> .....	32
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1	<b>Delineamento experimental</b> .....	33
3.1.1	<u>Grupos Sham</u> .....	37
3.1.1.1	Grupo Sham não tratado (S).....	37
3.1.1.2	Grupo Sham tratado com resveratrol (SR).....	37
3.1.1.3	Grupo Sham tratado com quercetina (SQ).....	37
3.1.2	<u>Grupos Isquemia</u> .....	38
3.1.2.1	Grupo Isquemia não tratado (I).....	38
3.1.2.2	Grupo Isquemia tratado com resveratrol (IR).....	38
3.1.2.3	Grupo Isquemia tratado com quercetina (IQ).....	39
3.2	<b>Coleta e processamento dos materiais</b> .....	39
3.3	<b>Análise histopatológica</b> .....	40
3.4	<b>Análises morfométricas e estereológicas</b> .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	46
4.1	<b>Resveratrol</b> .....	46
4.1.1	<u>Análises bioquímicas</u> .....	46
4.1.2	<u>Análise histopatológica</u> .....	47
4.1.3	<u>Análises morfométricas e estereológicas</u> .....	48

4.2	<b>Quercetina</b> .....	52
4.2.1	<u>Análises bioquímicas</u> .....	52
4.2.2	<u>Análise histopatológica</u> .....	53
4.2.3	<u>Análises morfométricas e estereológicas</u> .....	54
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
	<b>ANEXO A</b> - Aprovação do Comitê de Ética.....	74
	<b>ANEXO B</b> - Artigo publicado.....	75
	<b>ANEXO C</b> - 2º artigo publicado.....	80

## INTRODUÇÃO

O câncer renal é o 6º tipo mais comum em homens e o 10º mais comum em mulheres em todo o mundo, representando 5% e 3% de todos os diagnósticos, respectivamente (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). A doença é classificada como a 16ª causa mais frequente de morte por câncer em todo o mundo (FERLAY et al., 2015). O tratamento cirúrgico é a base para a remoção segura de tumores renais (CAMPBELL et al., 2017).

Nos tempos atuais, a nefrectomia parcial (NP) é comum mesmo em pacientes com o rim ipsilateral sadio, objetivando poupar o máximo de néfrons funcionais (VEYS et al., 2018; CHOUDHARY et al., 2018). Isto pode ser explicado em parte pela melhoria das técnicas de diagnóstico por imagem renal (DENIFFEL et al., 2018) e melhores métodos cirúrgicos que vem sendo descobertos, descritos e reproduzidos (COOPER et al., 2018; GARISTO et al., 2018).

A isquemia renal quente (IRQ) é comumente realizada durante a NP, consistindo na interrupção temporária do fluxo sanguíneo renal (BAGETTI-FILHO et al., 2012; DE SOUZA et al., 2012; VOLPE et al. 2015; BECHARA et al., 2016; 2017; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018). O clampeamento vascular atraumático permite que o cirurgião trabalhe em um campo cirúrgico relativamente limpo devido à hemostasia provida pela IRQ, facilitando a ressecção tumoral, a correção e síntese dos defeitos parenquimatosos, além de prevenir a perda de sangue pelo paciente (FUNAHASHI et al., 2014). Após a completa ressecção da massa tumoral e síntese da área incisada, o fluxo sanguíneo é restabelecido pela retirada do instrumento cirúrgico pertinente, ocorrendo imediatamente a reperfusão do órgão (VOLPE et al. 2015).

A IRQ possui, de fato, vantagens transoperatórias e pós-operatórias imediatas, porém, a interrupção do suprimento sanguíneo e a conseguinte reperfusão tecidual são conhecidamente danosas ao tecido renal (BOLTON; LYNCH, 2018; BUYS-GONÇALVES et al., 2019).

A margem de tempo estipulada para a realização da NP com IRQ em humanos é de 30 minutos, objetivando minimizar os efeitos pós-operatórios da lesão isquêmica no tecido remanescente, mesmo já tendo sido relatado que esse tempo provoca alterações negativas aos parâmetros de função renal (THOMPSON et al., 2010; 2012). Estudo atual aponta que, em pacientes em que o tempo de é IRQ maior que 30 minutos, a taxa de filtração glomerular



diminuiu significativamente em ambos os rins 3 meses após a NP (CHOUDHARY et al., 2018). Cada minuto de IRQ conta para o aumento da lesão progressiva do tecido renal. Quanto menor o tempo de IRQ, menores as chances de desenvolvimento de insuficiência renal aguda e crônica (THOMPSON et al., 2010; 2012; ZABELL et al., 2017).

O uso de modelos animais é essencial para o avanço de variações técnicas da NP convencional, seja a laparoscópica (DE SOUZA et al., 2012; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017) ou robótica (KIM et al., 2016), o que também se aplica a testes de diferentes tipos de IRQ (BAGETTI-FILHO et al., 2012; BECHARA et al., 2016; 2017), técnicas operatórias alternativas a mesma (ABREU et al., 2018), pré-condicionamento isquêmico (XIE et al., 2018) ou até a ausência da IRQ durante a NP (HOU & JI, 2015).

Estudos experimentais em modelos animais são realizados há décadas em busca da amenização dos danos da IRQ e manutenção da função renal após a NP. Estudo em modelo suíno realizou a IRQ arteriovenosa de 16,5 minutos, em média, associada à NP, o que resultou na diminuição significativa da densidade volumétrica glomerular (DE SOUZA et al., 2012). Bechara et al. (2016) concluíram que a IRQ arteriovenosa de 30 minutos causa perda significativa do número de glomérulos nesse mesmo animal. Recentemente, Damasceno-Ferreira et al. (2017) realizaram um estudo em porcos, submetendo-os à IRQ arteriovenosa de 10, 20 ou 30 minutos. Cerca de um quarto dos glomérulos foi perdido no grupo de 30 minutos e a perda significativa desses não foi detectada antes de 20 minutos.

O modelo experimental mais utilizado para a IRQ é o murino. A IRQ bilateral de 40 minutos foi relacionada ao colapso glomerular, hipertensão tubular, coágulos plaquetários no glomérulo e necrose tubular em ratos (BERTELI et al., 2002). Sener et al. (2006) relataram, em um estudo que utilizou o modelo de 45 minutos de IRQ unilateral em ratos, hemorragia intersticial, dilatação tubular, degeneração e atrofia glomerular. O tempo prolongado de 120 minutos de IRQ produziu danos severos de edema glomerular, hemorragia intersticial, infiltrado inflamatório e apoptose (KINACI et al., 2012).

O tempo mínimo de IRQ para produção de alterações renais secundárias à isquemia severa em ratos é de 60 minutos, com perda significativa do número de glomérulos após análise histomorfométrica (BAGETTI-FILHO et al., 2012).

Ysebaert et al. (2000) observaram, em rins de ratos submetidos a 60 minutos de IRQ, necrose tubular aguda nas primeiras 12 a 24 horas pós-isquemia com importante atividade da mieloperoxidase (MPO) renal, refletindo ativação de células inflamatórias de adesão. Utilizando-se também do tempo de 60 minutos de IRQ, Khader et al. (2015) relataram lesão

celular tubular e perda estrutural de células epiteliais tubulares. Li et al. (2018) mencionam o aumento significativo sérico de uréia e creatinina, dano tecidual (infiltrado inflamatório, dilatação dos túbulos renais, edema glomerular), e aumento de malondialdeído (MDA) e citocinas, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 e interferon  $\gamma$  utilizando IRQ de 60 minutos em ratos.

Com a justificativa da busca por redução dos danos renais relacionados à IRQ, pesquisas com uso de drogas nefroprotetoras são constantemente relatadas na literatura científica (BERTELLI et al., 2002; KAHRAMAN et al., 2003; SENER et al., 2006; KINACI et al., 2012; CHEN et al., 2014; KHADER et al., 2015; WIETZIKOSKI et al., 2017; LI et al., 2018; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2018).

O resveratrol foi associado à conservação tecidual qualitativa como nefroprotetor contra os danos imediatos causados pela IRQ no tecido renal dos ratos tratados (BERTELLI et al., 2002; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018). Houve também manutenção do volume glomerular médio, aumento da relação entre as áreas do glomérulo/cápsula glomerular, diminuição de agregados plaquetários nos capilares glomerulares (BERTELLI et al., 2002), manutenção dos níveis séricos de uréia e creatinina (SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018) e ATP (KHADER et al., 2015), diminuição da expressão do TNF- $\alpha$ , lactato desidrogenase (SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015), MDA (SENER et al., 2006; LI et al., 2018), MPO, aspartato aminotransferase (KHADER et al., 2015), interleucinas (KHADER et al., 2015; LI et al., 2018) e manutenção da atividade da glutathione (SENER et al., 2006). Tal bioflavonóide também foi associado ao aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (KITADA; KOYA, 2013).

A quercetina produziu resultados positivos imediatos quando associada à IRQ, incluindo diminuição de infiltrado inflamatório tecidual e necrose (KINACI et al., 2012; CHEN et al., 2014). Diminuiu também a atividade da xantina oxidase (XO) e a produção de ânions superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994). O tratamento com a quercetina também provocou redução da expressão de MPO, TNF- $\alpha$  (KAHRAMAN et al., 2003), MDA e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (KINACI et al., 2012), além de outros indicadores de peroxidação lipídica (CHEN et al., 2014). Esse bioflavonóide também se demonstrou eficaz ao provocar o aumento da atividade da SOD e da CAT, assim como da expressão de glutathione (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012).

Como descrito acima, os efeitos nefroprotetores imediatos contra a IRQ do resveratrol e da quercetina estão amplamente relatados na literatura científica. Porém, não há nenhum estudo que ofereça dados bioquímicos, histopatológicos, morfométricos e estereológicos do estado do parênquima renal no pós-operatório mediato após IRQ associada ao tratamento com o resveratrol ou quercetina. Tais dados podem esclarecer se a morfologia do rim pós-isquêmico é beneficiada pelo tratamento pré-isquemia com esses antioxidantes e se a função do órgão é preservada.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Um breve histórico da nefrectomia parcial

No século passado, a nefrectomia radical (NR) foi a predominante abordagem cirúrgica para a excisão de neoplasias do rim (ROBSON, 1963), pelas principais razões de que remove o tumor primário com uma ampla margem de segurança cirúrgica e a maioria dos pacientes possui o rim contralateral normal (HERR, 2005; CHOUDHARY et al., 2018).

Abordagens cirúrgicas para tumores renais sempre foram determinadas por considerações patológicas e apresentação clínica do paciente (ERTEMI et al., 2017; CHOUDHARY et al., 2018). Uma base patológica para a cirurgia poupadora de néfrons foi estabelecida muito antes da tomografia computadorizada moderna e imagem de ressonância magnética viabilizarem tal procedimento cirúrgico (HERR, 2005).

Em 1869, a primeira NR planejada foi realizada e, em 1870, o mesmo cirurgião fez a primeira NP (SIMON, 1876). Durante essa época, dois fatos incontornáveis que influenciam a história inicial da cirurgia renal foram estabelecidos: um rim poderia ser excisado com segurança do corpo humano, e o paciente poderia sobreviver com um rim solitário. Tais duas descobertas levaram ao amplo uso da NR e da NP nas últimas décadas do século XIX (HERR, 2005).

No início do século XX, a NP continuou a ser subutilizada como tratamento de neoplasias malignas renais, sendo somente realizada como tratamento para doenças localizadas e não neoplásicas do rim, como cistos, tumores benignos, carbúnculos, hidronefrose localizada, suplantando a NR nesses casos. O entusiasmo pela NP para tumores malignos renais foi desencorajado pelo fato de que, na maioria dos casos, o tumor se apresentava distribuído pelos tecidos adjacentes, praticamente todos os pacientes tinham sintomatologia clínica e o tamanho da massa tumoral era de médio à grande (HERR, 2005).

Conclusões positivas para a NP como tratamento de tumores renais malignos de tamanho pequeno a moderado surgiram, apoiando sua realização nos casos em que o rim contralateral fosse insuficiente e necessitasse do apoio do tecido remanescente saudável do acometido (GOLDSTEIN; ABESHOUSE, 1937). Porém, a maioria dos cirurgiões a

considerava como tecnicamente mais exigente do que a NR, sendo associada a uma maior taxa de complicações e simplesmente desnecessária na maioria dos casos (HESS et al., 1950).

Em 1981, Engen e Herr removeram um tumor de 2 centímetros do rim direito de uma mulher de 40 anos com o rim ipsilateral normal e propuseram que a NP é uma opção cirúrgica que foi preferível à NR para pequenos tumores renais incidentais. Esses últimos passavam a ser descobertos com mais frequência devido ao aumento do uso da tomografia computadorizada a partir dos anos 90. A principal preocupação entre os urologistas era a possibilidade de recorrência local por insuficiência de excisão ou tumores multicêntricos (HERR, 2005). Licht e Novick (1993) relataram resultados favoráveis precoces em 241 casos coletados da literatura (1967 a 1991) de NP com o rim contralateral normal (apenas duas recidivas locais foram relatadas e 95% dos pacientes sobreviveram). O grupo advertiu que a NP era apropriada apenas para tumores renais pequenos, periféricos e acidentalmente descobertos.

Herr (1999) e Fergany; Hafez; Novick (2000) relataram mais 10 anos de acompanhamento em mais de 100 pacientes que apresentam recorrência e quase 100% de sobrevivência, especialmente naqueles com tumores unilaterais com menos de 4 centímetros. Atualmente, a NP é o tratamento padrão-ouro para tumores renais localizados classificados como T1 ( $\leq 4$  a 7 cm) (CAMPBELL et al., 2017). Veys et al. (2018) relatam a eficácia e segurança da NP em pacientes com carcinoma de células renais  $\geq T1b$  ( $\geq 7$  cm), e que a cirurgia poupadora de néfrons preservou a função renal com maior frequência do que nos pacientes que foram submetidos à NR.

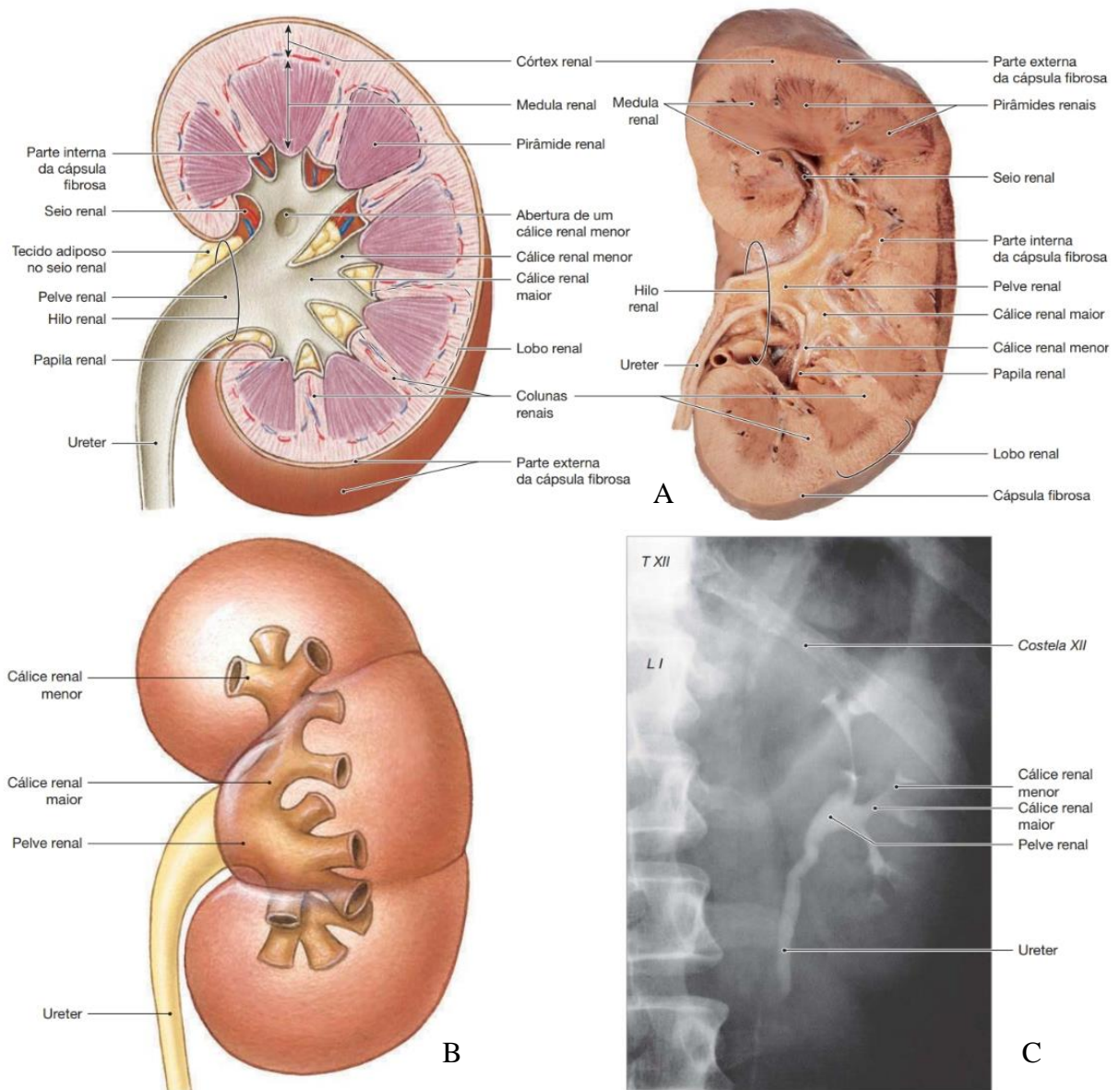
## 1.2 Anatomia macroscópica e microscópica renal

Topograficamente, os rins do humano estão localizados lateralmente à coluna vertebral, entre a última vértebra torácica e a terceira vértebra lombar, bilateralmente. O pólo superior do rim direito está muitas vezes situado inferiormente em relação ao pólo superior do rim esquerdo. Possuem formato de grão de feijão, apresentando uma borda lateral convexa e outra medial côncava, na qual se situa o hilo, onde entram e saem vasos sanguíneos e nervos e saem os ureteres. O hilo contém também tecido adiposo e os dois ou três cálices

maiores, que se reúnem para formar a pelve renal, parte superior, dilatada, do ureter (MARTINI; TIMMONS; TALLITSCH, 2009) (Figura 1).

O rim é constituído por duas regiões: a cortical e a medular. Em um corte longitudinal, o córtex compreende a camada externa do parênquima. A medula é formada por alguns cones invertidos circundados por todos os lados (exceto nos ápices), pela camada de tecido cortical. Nesse mesmo corte, esses cones assumem o formato de uma pirâmide, daí o termo estabelecido para denominar o tecido medular é pirâmide renal. O ápice de cada uma dessas pirâmides é denominado papila renal. As camadas de tecido cortical entre elas são denominadas colunas renais (KAYE; GOLDBERG, 1982; SAMPAIO; FAVORITO, 1993) que podem ser observadas na figura 1.

Figura 1 – Estrutura anatômica do rim



Legenda: A – Secção frontal do rim humano, mostrando as principais estruturas em um desenho e em uma peça anatômica. Os contornos de um lobo renal e de uma pirâmide renal estão indicados por linhas tracejadas. B – Desenho sombreado mostra a disposição dos cálices renais e da pelve renal dentro do rim.; C – Urograma do rim esquerdo, mostrando os cálices renais, a pelve renal e o ureter.

Fonte: MARTINI; TIMMONS; TALLITSCH, 2009.

Em cada rim humano há cerca de 600 a 800 mil néfrons, considerados suas unidades funcionais. O néfron é formado por uma parte dilatada, o corpúsculo renal, pelo túbulo contorcido proximal, pelas partes delgada e espessa da alça de Henle e pelo túbulo contorcido distal. O túbulo coletor conecta o túbulo contorcido distal aos segmentos corticais ou medulares dos ductos coletores (AARESTRUP, 2012). As pirâmides renais são constituídas

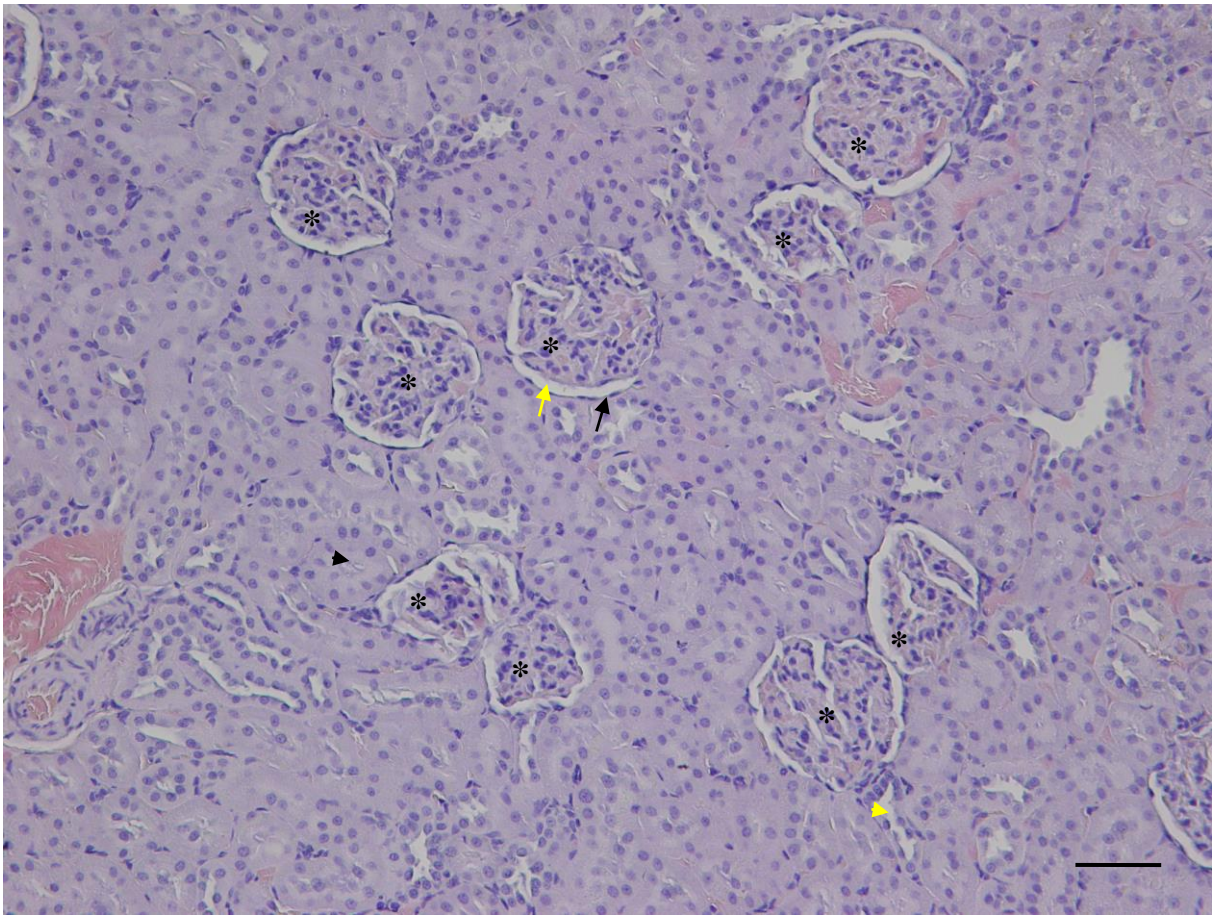
por alças de Henle e ductos coletores, os quais juntam-se (aproximadamente vinte) para formar os ductos papilares que desembocam na superfície papilar (região crivosa) drenando a urina no sistema coletor (fórnice do cálice menor) (SAMPAIO; MANDARIM-DE-LACERDA, 1988a; SAMPAIO; MANDARIM-DE-LACERDA, 1988b).

O tecido cortical, alvo deste estudo, é constituído por corpúsculos renais com túbulos contorcidos proximais e distais (Figura 2). O corpúsculo renal tem cerca de 200 µm de diâmetro e é formado por um tufo de capilares do tipo fenestrado, o glomérulo, que é envolvido pela cápsula glomerular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A cápsula contém dois folhetos, um interno, ou visceral, junto aos capilares glomerulares, e outro externo, ou parietal, que forma os limites do corpúsculo renal (Figura 2). Entre os dois folhetos da cápsula glomerular existe o espaço capsular, que recebe o líquido filtrado através da parede dos capilares e do folheto visceral da cápsula. Cada corpúsculo renal tem um polo vascular pelo qual penetra a arteríola aferente e sai a arteríola eferente, e um polo urinário, no qual tem início o túbulo contorcido proximal (AARESTRUP, 2012; GUERCI et al., 2017).

Ao penetrar o corpúsculo renal, a arteríola aferente divide-se em vários capilares, onde circula sangue arterial, cuja pressão hidrostática é regulada principalmente pela arteríola eferente, que tem maior quantidade de músculo liso do que a aferente (GUERCI et al., 2017). O folheto externo ou parietal da cápsula glomerular é constituído por um epitélio simples pavimentoso, que se apoia na lâmina basal e em uma fina camada de fibras reticulares. As células do folheto interno ou visceral são chamadas de podócitos e formadas pelo corpo celular, de onde partem diversos prolongamentos primários que dão origem aos prolongamentos secundários (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Esses últimos se encontram em contato com a membrana basal onde, entre eles, existem espaços denominados fendas de filtração, fechados por uma membrana com cerca de 6 nm de espessura. Há uma membrana basal entre as células endoteliais e os podócitos (fusão das membranas basais do endotélio e dos podócitos): a barreira de filtração glomerular (CUNNINGHAM; KLEIN, 2014).



Figura 2 – Histologia do córtex renal



Legenda: Fotomicrografia do córtex renal de um rato. \* – Glomérulos; Cabeça de seta preta – Túbulo contorcido proximal; Cabeça de seta amarela – Túbulo contorcido distal; Seta preta – Cápsula glomerular (folheto externo); Seta amarela – Espaço capsular. Hematoxilina e eosina, 200X. Barra de escala = 100 µm.

Fonte: A autora, 2020.

### 1.3 Fisiologia renal

A principal força diretriz da filtração glomerular é a pressão hidrostática do sangue arterial que passa pelos capilares glomerulares. As forças que se opõem à filtração são a pressão oncótica plasmática nos capilares glomerulares e a pressão hidrostática no espaço capsular, já que a pressão oncótica no espaço capsular é irrelevante, pois as proteínas de peso molecular médio a elevado não são filtradas (GUERCI et al., 2017). Em condições normais, os rins mantêm a taxa de filtração glomerular em um nível relativamente constante pela modulação renal da pressão arterial sistêmica e do volume intravascular e pelo controle intrínseco do fluxo sanguíneo renal e da pressão dos capilares glomerulares

(CUNNINGHAM; KLEIN, 2014). Os efeitos renais na pressão e volume arteriais são mediados, primariamente, por fatores humorais sistêmicos, em particular pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (EMDIN et al., 2015).

O controle intrínseco da perfusão dos capilares glomerulares é mediado pelo reflexo miogênico e o feedback tubuloglomerular (SCULLY et al., 2013). O reflexo miogênico regula o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular por constrição arteriolar aferente imediata após um aumento na tensão da parede arteriolar, aumentando, assim, a resistência ao fluxo sanguíneo em resposta à pressão de perfusão aumentada. Por outro lado, a dilatação arteriolar ocorre quase imediatamente após uma diminuição na tensão da parede arteriolar, reduzindo, assim, a resistência ao fluxo quando a pressão de perfusão vascular diminui. (CUNNINGHAM; KLEIN, 2014). A resposta miogênica depende da inervação renal, mas pode ser influenciada por mediadores químicos, como o óxido nítrico (DAUTZENBERG; KEILHOFF; JUST, 2011).

A porção distal do néfron está intimamente associada ao glomérulo do mesmo néfron. Um grupo anatomicamente distinto de células epiteliais, a mácula densa, localiza-se na porção distal do ramo ascendente espesso da alça de Henle (PRESTON; WILSON, 2014). A mácula densa situa-se entre as arteríolas aferente e eferente, adjacente à região mesangial extraglomerular. Essas quatro estruturas juntas são conhecidas como o aparelho justaglomerular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Caso haja um aumento do volume do filtrado glomerular e, conseqüentemente, da concentração de cloreto de sódio e a captação desse sal pelos receptores da mácula densa, há uma despolarização das células da mesma com liberação de adenosina trifosfato (ATP) (CUNNINGHAM; KLEIN, 2014). A presença dessa última molécula suprime a liberação de renina das células justaglomerulares, aumenta a resistência na arteríola aferente, diminui a pressão de perfusão capilar glomerular, desencadeia a contração celular mesangial e reduz o coeficiente de filtração glomerular. Essas respostas levam à redução da taxa de filtração glomerular no néfron (WANG et al., 2015).

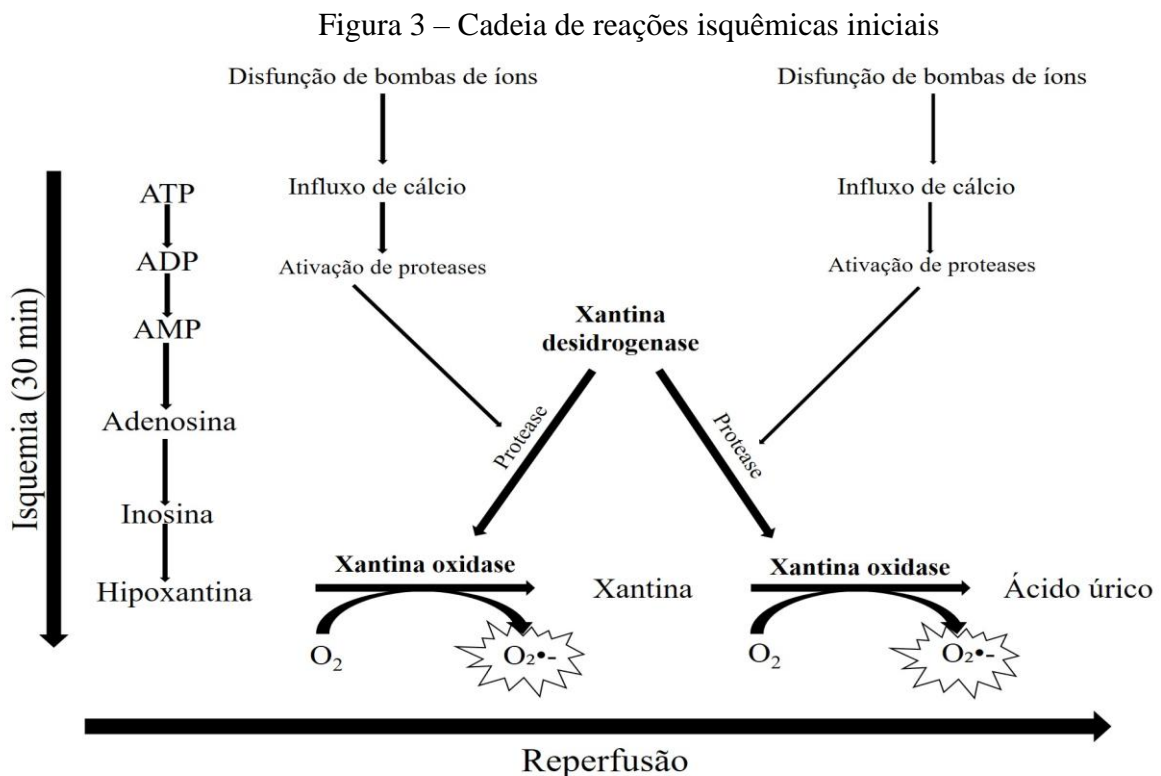
#### 1.4 Fisiopatologia da isquemia renal quente

Devido à sua essencial função de filtração sanguínea e manutenção do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido-básico, os rins são órgãos que possuem considerável vascularização, recebendo 20-25% do débito cardíaco (1 litro de sangue circula em ambos por minuto) (KAUFMAN; KNOHL, 2018). Quando o fluxo sanguíneo é interrompido durante a IRQ, uma sequencia de eventos bioquímicos é iniciada, levando à disfunção celular, com formação de edema citoplasmático e intersticial, seguido de morte da célula (MALEK; NEMATBAKSHSH, 2015; BUYS-GONÇALVES et al., 2019).

A lesão isquêmica é mais grave e aguda do que a puramente causada pela privação parcial do suprimento de oxigênio para a célula, a hipóxia (NORMAN et al., 2015). O oxigênio é criticamente importante para a fosforilação oxidativa da adenosina difosfato em ATP, sendo esta a forma de armazenamento de energia essencial para as funções celulares (CUNNINGHAM; KLEIN, 2014). Durante a hipóxia, a produção de energia celular fica dificultada ou até inibida pela carência do acceptor final de elétrons da fosforilação oxidativa mitocondrial, porém, como não necessariamente se trata de ausência de fluxo sanguíneo, a continuidade desse dispõe glicose, oriunda de diversas vias de obtenção, para a célula hipóxica (NORMAN et al., 2015). Sendo assim, a via anaeróbica de obtenção de ATP, a glicólise, torna-se uma opção viável para que a célula em hipóxia possa suprir, mesmo que minimamente, seus transportadores ativos por mais tempo que a célula isquêmica (AKRAM, 2013).

Com a interrupção do suprimento sanguíneo, além da hipóxia (e conseguinte anóxia), há também a não chegada de substratos para a glicólise. Logo, a geração de ATP é cessada de forma aguda quando estes são exauridos, ou até mesmo quando a glicólise é inibida pelo acúmulo de metabólitos que seriam removidos pela continuidade do fluxo sanguíneo (SECIN, 2008; MALEK; NEMATBAKSHSH, 2015). Devido a essas razões, a isquemia lesa os tecidos muito mais rapidamente do que a hipóxia, levando os mesmos à cessação de geração de ATP, lesão mitocondrial e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 3) (SECIN, 2018; SIMMONS; SCHREIBER; GILL, 2008; KANAGASUNDARAM, 2015; MALEK; NEMATBAKSHSH, 2015), com suas principais consequências descritas nos parágrafos seguintes.

O fosfato de alta energia, na forma de ATP, é necessário para todos os processos de síntese e degradação dentro da célula, incluindo o transporte de membrana, a síntese de proteínas, a lipogênese e as reações de diacilação-reacilação, necessárias para a renovação dos fosfolipídios (PRESTON; WILSON, 2014). A depleção significativa de ATP tem amplos efeitos críticos em muitos sistemas celulares. A atividade da bomba de sódio e potássio dependente de ATP é reduzida (FERNÁNDEZ-MONCADA; BARROS, 2014), resultando em acúmulo intracelular de sódio e efluxo de potássio. O ganho final de soluto é acompanhado por um ganho isosmótico de água, causando tumefação celular. Ocorre aumento compensatório na glicólise (KANAGASUNDARAM, MALEK; NEMATBAKHS, 2015). Como consequência, as reservas de glicogênio intracelular são rapidamente exauridas e o ácido lático se acumula, levando à diminuição do pH intracelular e à diminuição da atividade de muitas enzimas celulares (JHA et al., 2015). A falência na bomba de cálcio leva ao influxo desse cátion com efeitos danosos em vários componentes celulares (VISHNU et al., 2014) (Figura 3). A depleção prolongada ou crescente de ATP causa o rompimento estrutural do aparelho de síntese proteica, manifestado como desprendimento dos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (HAN et al., 2013).



Legenda: Durante a isquemia, os gradientes de íons transmembrana são dissipados, permitindo que as concentrações citosólicas do cálcio subam, o que, por sua vez, ativa a protease que converte irreversivelmente a xantina desidrogenase em xantina oxidase. Ao mesmo tempo, o ATP celular é

catabolizado em hipoxantina, que se acumula. Durante a reperfusão, xantina oxidase, usando oxigênio readmitido e hipoxantina, gera superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Fonte: BUYS-GONÇALVES et al., 2019.

As mitocôndrias produzem energia de sustentação da vida na forma de ATP (CUNNINGHAM; KLEIN, 2014), mas são também componentes críticos da lesão e morte celular, sendo sensíveis a vários tipos de estímulos nocivos, incluindo hipóxia. Os danos mitocondriais resultam em graves anormalidades bioquímicas além da falha na fosforilação oxidativa (GO et al., 2015), levando a depleção progressiva de ATP, fosforilação oxidativa anormal e à formação de ERO (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015). Essas organelas contêm também várias proteínas que, quando liberadas para o citoplasma, informam à célula que há uma lesão interna e ativam a via de apoptose (COOPER, 2018).

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um único elétron não pareado em órbita externa. Tais estados químicos são extremamente instáveis e reagem prontamente com químicos orgânicos e inorgânicos e, quando gerados nas células, atacam avidamente os ácidos nucleicos, assim como uma variedade de proteínas e lipídios celulares (NELSON; COX, 2014). Além disso, os radicais livres iniciam reações autocatalíticas; as moléculas que reagem com eles são, por sua vez, convertidas em radicais livres, propagando, assim, a cadeia de danos (SUN et al., 2018).

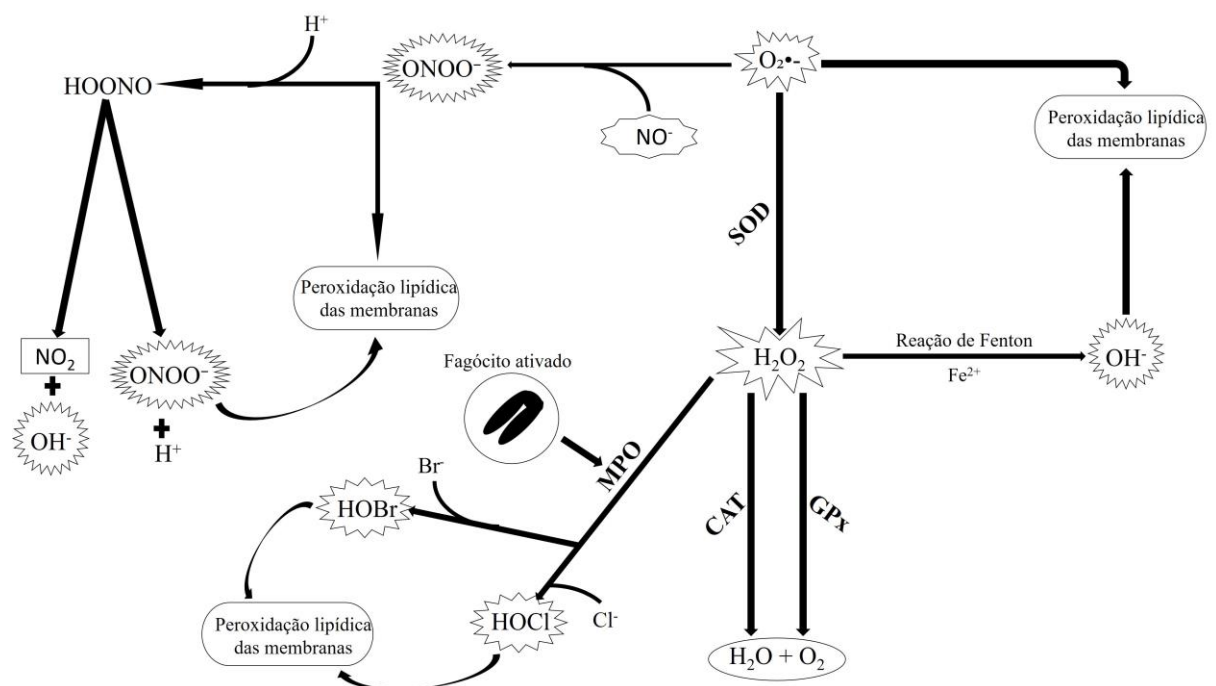
As ERO são um tipo de radical livre derivado do oxigênio normalmente produzidas em pequenas quantidades, em todas as células, durante as reações de oxidação e redução que ocorrem durante a respiração e a geração de energia mitocondrial (CUNNINGHAM; KLEIN, 2014). Nesse processo, o oxigênio é sequencialmente reduzido nas mitocôndrias através da adição de quatro elétrons para gerar água (NELSON; COX, 2014). Entretanto, essa reação é imperfeita, e pequenas quantidades de intermediários tóxicos altamente reativos são geradas quando o oxigênio é apenas parcialmente reduzido (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015; SIES, 2015). Quando a produção de ERO aumenta ou quando os sistemas de remoção são ineficientes, o resultado é um excesso desses radicais livres que leva a uma condição lesiva chamada de estresse oxidativo (SIES, 2015).

As células desenvolveram múltiplos mecanismos para a remoção de radicais livres e, desse modo, minimizar a ação danosa das ERO (LOMBARDO et al., 2013; TOVMASYAN; REBOUCAS; BENOVA, 2014; CHO et al., 2018; HUANG et al., 2018; LIN et al., 2018) (Figura 4). Existem vários sistemas enzimáticos e não enzimáticos que contribuem para a inativação das reações de radicais livres. A taxa de decomposição espontânea do superóxido é aumentada significativamente pela ação das SOD (CHO et al., 2018), GPx (HUANG et al.,

2018), e CAT (LIN et al., 2018). Apesar da relativa capacidade de autoproteção celular, o aumento patológico da produção e concentração de ERO sobressai-se a dos mecanismos antioxidantes endógenos (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015; SIES, 2015) (Figura 4).

A peroxidação lipídica das membranas plasmática e organelares é uma das reações nocivas causadas pelas ERO devido à grande vulnerabilidade das ligações duplas de lipídios polinsaturados. Além disso, as interações lipídio-radical geram peróxidos, que são instáveis e reativos, e sobrevém uma reação em cadeia autocatalítica (NEGRE-SALVAYRE et al., 2010). Ocorrem também lesões proteicas, já que as ERO promovem ligação cruzada das proteínas mediadas por sulfidril, resultando no aumento da degradação ou perda da atividade enzimática (SIDDIQUI et al., 2016). As reações radicais livres com a timina no ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial e nuclear produzem quebra do filamento único no DNA, causando a lesão irreversível final do estresse oxidativo (JENA, 2012) produzido pela lesão isquêmica e causa necrose.

Figura 4 – Principais reações de peroxidação lipídica e ação dos antioxidantes endógenos



Legenda: Papel do ânion superóxido na geração de outras ERO.  $O_2^{\bullet-}$  (superóxido);  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio);  $OH^{\bullet}$  (hidroxila);  $Fe^{2+}$  (ferro);  $H_2O$  (água);  $O_2$  (oxigênio);  $NO$  (óxido nítrico);  $ONOO^-$  (peroxinitrito);  $H^+$  (hidrogênio);  $HOONO$  (ácido peroxinitroso);  $NO_2$  (dióxido de nitrogênio); MPO (mieloperoxidase);  $Br^-$  (brometo);  $Cl^-$  (cloreto);  $HOBr$  (ácido hipobromico);  $HOCl$  (ácido hipocloroso); SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); GPx (glutaciona peroxidase).

Fonte: BUYS-GONÇALVES et al., 2019.

Durante a reperfusão, o retorno do sangue oxigenado ao tecido isquêmico inicia uma cascata de eventos que irão lesá-lo ainda mais (BRASILEIRO FILHO, 2011), apesar de apresentar alguns benefícios para o tecido isquêmico, já que o suprimento de oxigênio e, conseqüentemente, o energético, são restabelecidos e os metabólitos tóxicos são removidos pela corrente sanguínea (KANAGASUNDARAM, 2015; MALEK; NEMATBAKSH, 2015).

Devido à produção aumentada de ERO pelas células, o retorno abrupto do suprimento sanguíneo (100ml/min/100g de tecido) e, conseqüentemente, de oxigênio, provoca aumento correspondente na produção de ERO, especialmente porque a lesão mitocondrial leva a uma redução incompleta de oxigênio (BOULETI; MEWTON; GERMAIN, 2015). Os mecanismos de defesa antioxidantes celulares também podem ser comprometidos pela isquemia, favorecendo o acúmulo de ERO (MALEK; NEMATBAKSH, 2015). Os produtos dos leucócitos ativados podem causar lesão adicional ao tecido, também ocorrendo a ativação do sistema complemento. As proteínas do complemento ligam-se aos tecidos lesados ou a anticorpos depositados nos tecidos isquêmicos, e uma subsequente ativação do complemento acentua a inflamação e a lesão celular oxidativa (ZWAINI et al., 2017).

O tempo necessário para a ocorrência de lesão por isquemia no rim varia de acordo com a região tecidual a ser considerada (SECIN, 2008). A concentração de oxigênio é diretamente proporcional à ocorrência de circulação de sangue arterial, logo, o nível de oxigenação cortical é o mais alto, seguido da medula externa e o mais baixo se encontra na medula interna, atingindo seu mínimo na região papilar (SIMMONS; SCHREIBER; GILL, 2008). As células epiteliais corticais usam principalmente metabólitos de ácidos graxos, lactato, cetonas e aminoácidos para produção de ATP por vias aeróbicas (EVANS et al., 2011).

Células da medula externa metabolizam o succinato e, quando os níveis de oxigênio diminuem, as mesmas podem mudar para vias anaeróbicas independentes. A oxigenação medular é um subproduto da orientação contracorrente dos vasos arteriais e venosos (FRY et al., 2014), e as células dessa região utilizam predominantemente a glicólise anaeróbica, o que lhes confere baixa reserva de energia. Os mecanismos da lesão isquêmica afetam o tecido renal em orientação centrífuga, onde a primeira região a sofrer com a depleção sanguínea é a medula interna, seguida da externa e, por fim, a região cortical, que possui maior reserva de oxigênio e ATP (ABDELKADER et al., 2014).

## 1.5 Bioflavonóides

Os bioflavonóides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos está amplamente distribuída por todo o reino vegetal e, até o presente, são conhecidos mais de 4.200 variedades de flavonoides (PALIPOCH, 2013). Flavonóides estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de plantas, e sua estrutura baseia-se em um esqueleto formado por 15 átomos de carbono constituído por dois anéis de benzeno com três carbonos entre eles e um oxigênio como heteroátomo. Seus grupos funcionais hidroxila mediam seus efeitos antioxidantes pela eliminação de radicais livres e/ou pela quelação de íons metálicos (KUMAR; PANDEY, 2013). Esses antioxidantes naturais vem sendo estudados como preventivos de danos oxidativos sob diversas condições patológicas renais e tem se mostrado alternativas viáveis preventivas aos danos da IRQ (PALIPOCH, 2013; DENNIS; WITTING, 2017; BUYS-GONÇALVES et al., 2019).

### 1.5.1 Resveratrol

Da classe dos bioflavonóides, o resveratrol é de ocorrência natural em muitas plantas e seus produtos processados, como uvas, frutas vermelhas, vinho tinto e amendoim, sendo um dos polifenóis naturais mais importantes e tem sido amplamente estudado (ALBERTONI; SCHOR, 2014). Foi identificado e primeiramente isolado em 1940 da raiz do hellebore branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) e da raiz do knotweed japonês, *Polygonum cuspidatum*, nos anos 1960. Foi identificado como componente do vinho tinto em 1992, quando a fonte dietética mais notável do polifenol recebeu atenção especial devido a um estudo epidemiológico que demonstrou uma possível correlação entre a pouca incidência de doenças cardiovasculares e o consumo de vinho tinto, observado nas populações do Mediterrâneo (KAKOTI et al., 2015).

Foi demonstrado que a substância possui características antioxidantes (BERTELLI et al., 2002; SENER et al., 2006; DONG et al., 2013; LIN et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014; KHADER et al., 2015; SHIMIZU et al., 2016; LI et al., 2018), antiinflamatórias,



antibacterianas (WANG et al., 2018), cardioprotetoras, antidiabetes (XU et al., 2018), anti-câncer, quimiopreventivas (NAM et al., 2018), neuroprotetoras (BENSALEM et al., 2018) e anti-envelhecimento (ABHARZANJANI et al., 2017). Estudos recentes relataram os potenciais efeitos benéficos sobre doença renal proporcionados pelo resveratrol como um potente agente antioxidante que pode atuar como quelante de ERO e ferro (KITADA; KOYA, 2013; LI et al., 2018).

Estudos experimentais vem sendo realizados procurando testar a eficiência do resveratrol como protetor dos efeitos negativos da isquemia-reperfusão em diversos órgãos, sendo estes tubulares (DONG et al., 2013) ou parenquimatosos, como encéfalo (LIN et al., 2013), testículo (RIBEIRO et al., 2014), fígado (SHIMIZU et al., 2016) e rim (BERTELLI et al., 2002; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018). Em todos os estudos citados, os resultados foram satisfatórios.

### 1.5.2 Quercetina

A quercetina é um bioflavonóide bastante concentrado em vegetais comestíveis, como cebolas, couves e maçã. Possui concentrações menores em bebidas, tal como a cerveja, café e vinhos, sendo o chá preto a efusão que apresenta maior concentração desse polifenol (KAWABATA et al., 2015).

Os efeitos benéficos da quercetina são relatados atual e frequentemente na literatura científica, como o anti-envelhecimento (ABHARZANJANI et al., 2017), anti-câncer (PATRA et al., 2018), anti-inflamatório, cardioprotetor (WANG et al., 2018), anti-diabetes (SRINIVASAN et al., 2018) e antioxidante (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012; CHEN et al., 2014; TÓTH et al., 2017; PARK; SHAH; KOH, 2018; UYLAŞ et al., 2018).

Devido a suas propriedades antioxidantes cada vez mais testadas e comprovadas, a quercetina segue sendo estudada como protetora contra os danos da isquemia-reperfusão em diferentes órgãos e tecidos, sendo estes tubulares (TÓTH et al., 2017) ou parenquimatosos, como o rim (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012; CHEN et al., 2014), cérebro (PARK; SHAH; KOH, 2018) e fígado (UYLAŞ et al., 2018).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar funcional, histológica e quantitativamente rins de ratos submetidos a isquemia/reperfusão arteriovenosa com e sem o uso de nefroprotetores.

### **2.2 Específicos**

- a) Avaliar, através de análises bioquímicas, histopatológicas, morfométricas e estereológicas e o efeito nefroprotetor causado pela utilização de resveratrol associado à isquemia/reperfusão arteriovenosa;
- b) Avaliar, através de análises bioquímicas, histopatológicas, morfométricas e estereológicas e o efeito nefroprotetor causado pela utilização de quercetina associada à isquemia/reperfusão arteriovenosa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o experimento foi realizado de acordo com a legislação brasileira para uso científico de animais e foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ com número de protocolo CEUA/040/2017 (Anexo A).

O estudo foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Foram utilizados sessenta ratos Wistar machos com nove semanas idade, com peso médio de 300g, obtidos no biotério da Unidade de Pesquisa Urogenital. Os animais foram acondicionados em caixas próprias de polipropileno com, no máximo, três animais/caixa e receberam água e ração *ad libitum*. O biotério é aclimatado com temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade controladas ( $60\pm 10\%$ ) e ciclo de luz (12-12h claro/escuro).

#### 3.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 60 ratos machos Wistar de 9 semanas de idade. Para a realização do experimento, os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos de 10 indivíduos (Figura 5).

Para anestesia, foi utilizado o protocolo de associação de cetamina (Syntec, Santana de Parnaíba, Brasil - 100 mg/Kg) e xilazina (Syntec - 20 mg/Kg) por via intramuscular, com manutenção do plano anestésico com uso de subdoses complementares até o fim do procedimento. Antes da rafia da parede do abdomen, foi administrado cloridrato de tramadol (Cristália, São Paulo, Brasil - 5 mg/Kg) diretamente na cavidade abdominal, afim de proporcionar melhor analgesia aos animais. A pesagem de cada um dos ratos foi feita previamente para realização do cálculo da dosagem das medicações utilizadas.

Um dos ratos do grupo Sham tratado com resveratrol veio à óbito por parada cardiorrespiratória irreversível após a administração da associação anestésica, apesar da tentativa de reanimação por massagem cardíaca e oxigenação.

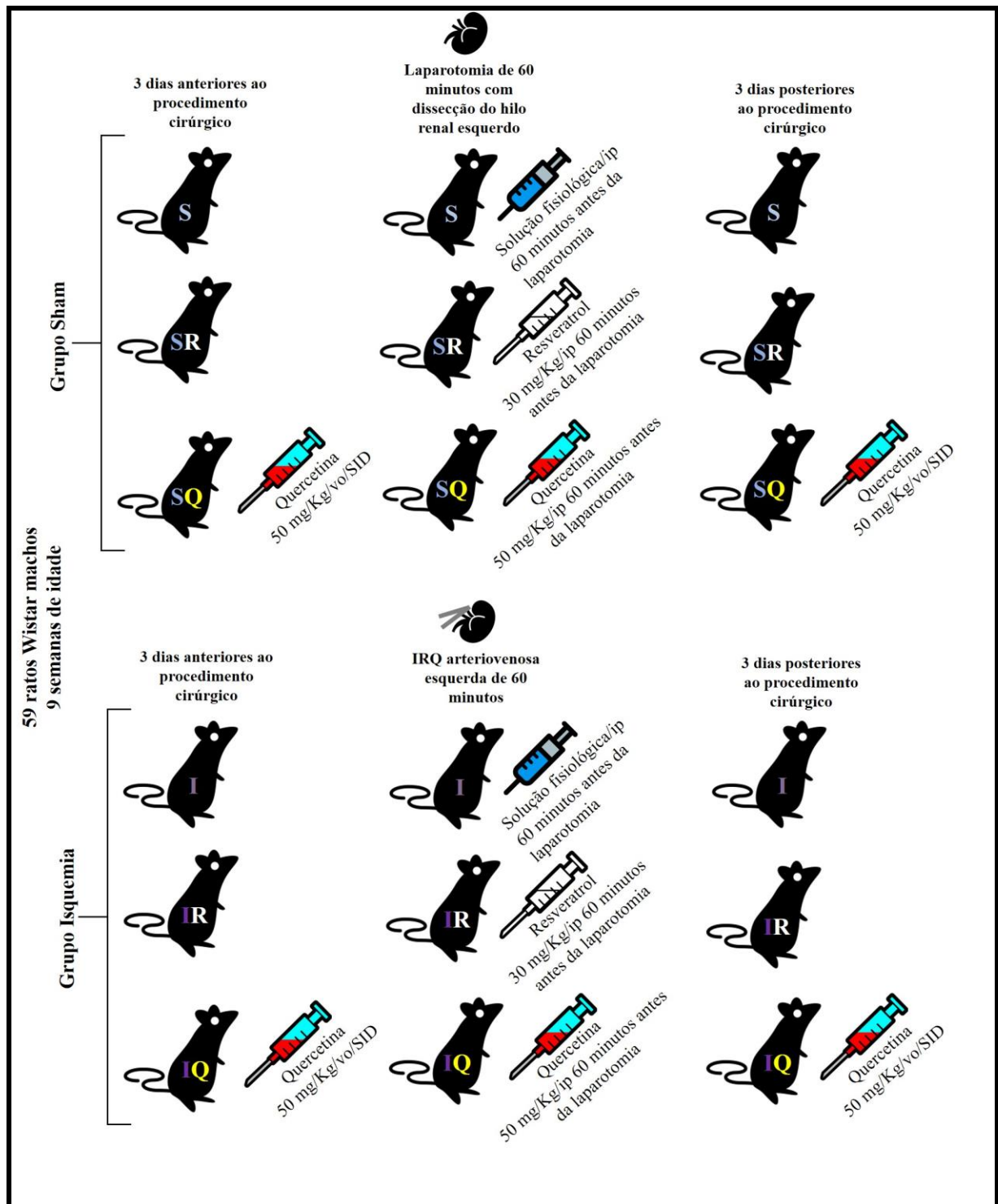
As caixas em que os animais seriam mantidos eram forradas com maravalha limpa. Folhas de gaze eram abertas e utilizadas para forrar os locais da caixa onde os ratos em pós-

opertório imediato seriam acomodados em decúbito ventral. Isso para que a maravalha não aderisse à ferida cirúrgica e interferisse no processo cicatricial. Além disso, uma folha de gaze dobrada foi colocada abaixo da cabeça do animal para que essa ficasse acima do nível da maravalha, afim de que a mesma não fosse aspirada pelo animal em recuperação anestésica.

Os animais retornaram para suas caixas imediatamente após a cirurgia em sala com temperatura ambiente (28°C) para evitar o agravamento da hipotermia causada pelo protocolo anestésico. Eram mantidos em observação na antessala do biotério até que se movimentassem com boa recuperação dos reflexos, se limpassem, interagissem entre si e demonstrassem interesse por água ou ração. Após tais sinais de boa recuperação anestésica, os ratos foram realocados no biotério e mantidos com água e ração *ad libitum*.

Os animais foram manipulados todos os dias até o sétimo dia após o procedimento cirúrgico para serem examinados clinicamente. Não houve casos de deiscência de sutura ou infecção da ferida cirúrgica. Foi administrado cloridrato de tramadol (Cristália - 5 mg/Kg) por via subcutânea uma vez ao dia, nos três dias seguintes ao procedimento cirúrgico. Todos os 59 ratos se mantiveram clinicamente estáveis pelos trinta dias pós-operatórios.

Figura 5 – Esquema demonstrativo dos procedimentos efetuados nos grupos experimentais

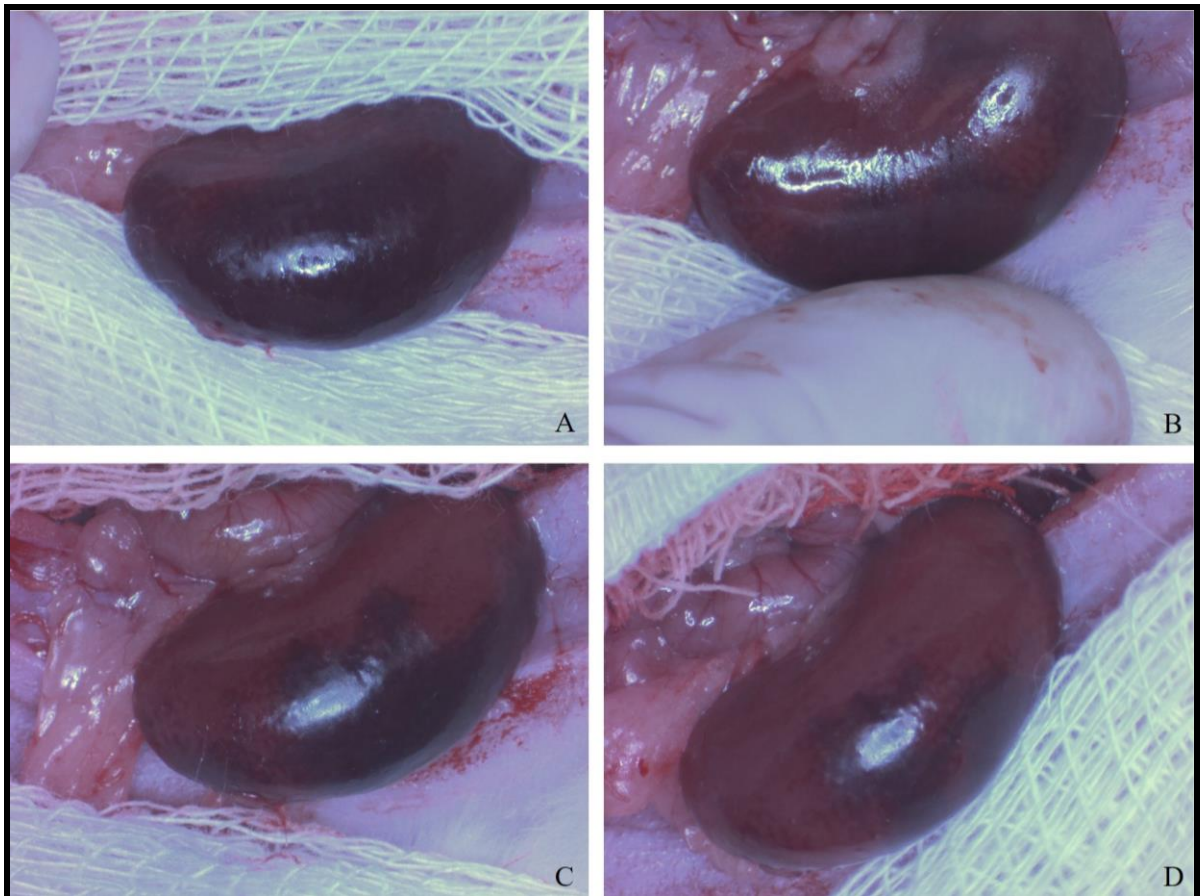


Legenda: S – grupo Sham; SR – grupo Sham tratado com resveratrol; SQ – grupo Sham tratado com quercetina; I – grupo Isquemia não tratado; IR – grupo Isquemia tratado com resveratrol; IQ – grupo Isquemia tratado com quercetina; IRQ – isquemia renal quente; vo – via oral; ip – intraperitoneal; SID - *semel in die* (uma vez ao dia).

Nota: O tratamento dos grupos quercetina foi reforçado com administração da droga por via oral SID por 3 dias antes e 3 dias após a laparotomia com ou sem IRQ.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 6 – Clampeamento arteriovenoso esquerdo e evidências visuais dos momentos de reperfusão renal



Legenda: Realização da isquemia renal quente arteriovenosa esquerda com pinça buldogue em animal do grupo Isquemia. A – Início da reperfusão; B – 1 minuto após início da reperfusão; C – 2 minutos após início da reperfusão; D – 4 minutos após início da reperfusão.

Nota: Observar a mudança gradativa de coloração do parênquima renal conforme o sangue volta a circular no mesmo.

Fonte: A Autora, 2020.

### 3.1.1 Grupos Sham

Os animais dos grupos Sham foram submetidos ao procedimento de laparotomia mediana, tiveram suas vísceras abdominais manipuladas e rebatidas, e o hilo renal esquerdo dissecado. As vísceras foram cobertas com gaze embebida em soro fisiológico durante o procedimento para impedir o ressecamento das mesmas. A laparotomia durou 60 minutos. Após esse tempo, a gaze foi retirada, as vísceras foram reposicionadas e, em seguida, foi procedida a rafia abdominal (sutura contínua simples com fio de nylon de calibre 3-0 (Technofio, Goiânia, Brasil) em dois planos, muscular e cutâneo.

#### 3.1.1.1 Grupo Sham não tratado (S)

Os animais desse grupo receberam injeção intraperitoneal de 1 ml soro fisiológico 60 minutos antes do procedimento cirúrgico (Figura 5).

#### 3.1.1.2 Grupo Sham tratado com resveratrol (SR)

Os ratos pertencentes a esse grupo receberam injeção intraperitoneal 30 mg/Kg de resveratrol (SENER et al., 2006) (Terraternal, Santa Clara, EUA, 99% de pureza) diluídos em 1 ml soro fisiológico 60 minutos antes do procedimento cirúrgico (Figura 5).

#### 3.1.1.3 Grupo Sham tratado com quercetina (SQ)

Os animais desse grupo receberam 50 mg/Kg de quercetina (KAHRAMAN et al., 2003) (New Roots Herbal, Vaudreuil-Dorion, Canadá, 98% de pureza) diluídos em 1 ml soro fisiológico por gavagem três dias antes e três dias após a laparotomia, ainda recebendo injeção

intraperitoneal 50 mg/Kg de quercetina diluídos em 1 ml soro fisiológico 60 minutos antes do procedimento cirúrgico (Figura 5).

### 3.1.2 Grupos Isquemia

Os ratos desse grupo foram submetidos ao procedimento de laparotomia mediana, tiveram suas vísceras abdominais manipuladas e rebatidas, e o hilo renal esquerdo dissecado. A artéria e a veia renais esquerdas foram isoladas e clampeadas com uma pinça buldogue (Figura 6), quando o aspecto isquêmico do rim pode ser observado imediatamente após a interrupção do fluxo sanguíneo. As vísceras foram cobertas com gaze embebida em soro fisiológico durante o procedimento para evitar o ressecamento das mesmas. A isquemia arteriovenosa foi mantida pelo período de 60 minutos. Após esse tempo, a pinça foi retirada e a reperfusão do órgão foi observada pelo retorno de sua coloração normal (Figura 6). A gaze foi retirada, as vísceras foram reposicionadas e então, a rafia abdominal foi procedida (sutura contínua simples com fio de nylon de calibre 3-0 (Technofio) em dois planos, muscular e cutâneo).

#### 3.1.2.1 Grupo Isquemia não tratado (I)

Os animais desse grupo receberam injeção intraperitoneal de 1 ml soro fisiológico 60 minutos antes do procedimento cirúrgico (Figura 5).

#### 3.1.2.2 Grupo Isquemia tratado com resveratrol (IR)

Os animais pertencentes a esse grupo receberam injeção intraperitoneal 30 mg/Kg de resveratrol (SENER et al., 2006) (Terraternal) diluídos em 1 ml soro fisiológico 60 minutos antes do procedimento cirúrgico (Figura 5).



### 3.1.2.3 Grupo Isquemia tratado com quercetina (IQ)

Os animais desse grupo receberam 50 mg/Kg de quercetina (KAHRAMAN et al., 2003) (New Roots Herbal) diluídos em 1 ml soro fisiológico por gavagem três dias antes e três dias após a laparotomia, ainda recebendo injeção intraperitoneal 50 mg/Kg de quercetina diluídos em 1 ml soro fisiológico 60 minutos antes do procedimento cirúrgico (Figura 5).

## 3.2 Coleta e processamento dos materiais

Após trinta dias da realização do procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica inalatória com isoflurano (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil). Após a morte do animal, foi realizada a punção cardíaca para a coleta de sangue, que foi posteriormente centrifugado para obtenção do soro e assim, feita a dosagem sérica de uréia (Uréia UV, REF 104-4/50, Lote 7013, Labtest, Lagoa Santa, Brasil) e creatinina (Creatinina K, REF 96-300, Lote 7013, Labtest) por analisador bioquímico semiautomático BIO-2000 (Bioplus, Barueri, Brasil). Essa análise foi realizada no laboratório de análises clínicas veterinárias do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF).

A cavidade abdominal foi aberta em seguida para acesso aos rins, que foram dissecados, coletados e pesados. O volume foi aferido pelo método de Scherle, que é utilizado para determinar o volume de corpos com superfície irregular baseado no princípio de Arquimedes, isto é, um corpo total ou parcialmente imerso em um fluido sofre um empuxo que é igual ao peso do volume do fluido deslocado pelo corpo. Para mensurá-lo, é feito registro do peso ( $W$ ) a ser dado através do deslocamento de uma solução salina isotônica pelo volume do órgão. Como a densidade ( $\sigma$ ) da solução salina isotônica é 1,0048 e o volume ( $V$ ) é obtido pela fórmula:  $V=W/\sigma$ , o valor do volume é semelhante ao peso ( $V\approx W$ ). Normalmente o peso é mensurado em gramas, mas se faz a conversão para a unidade de volume onde um grama equivale a 1,03 cm<sup>3</sup> (SCHERLE, 1970).

Os rins foram clivados transversalmente na região hilar e fixados em frascos separados contendo solução de formalina tamponada a 3,7%. Fragmentos isotrópicos, uniformes e

randômicos dos rins foram obtidos através do método de clivagem vertical. Os últimos foram processados rotineiramente para histologia em processadora automática Leica TP 1020 (Solms, Alemanha) com desidratação por banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, seguidas de clarificação em xilol e, finalmente, embebidos e emblocados em parafina no aparelho Leica EG 1150 H (Solms, Alemanha). Após secção de fatias de 5 µm de espessura através da microtomia (micrótomo Leica RM2125 RT) e a confecção de lâminas, as mesmas foram secas em estufa. Após a secagem, as lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina para as análises histopatológica e estereológicas de densidade volumétrica glomerular ( $V_v[\text{Glom}]$ ) e volume glomerular médio ponderado (VWGV) (BAGETTI-FILHO et al., 2012; BECHARA et al., 2016; 2017; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018; ABREU et al., 2018).

As análises foram realizadas utilizando-se fotomicrografias obtidas com resolução de 2040x1536 pixels, em um microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital (Olympus DP71, Tóquio, Japão) em aumento de 200x. Para cada análise, as fotomicrografias foram capturadas e salvas sob as mesmas condições.

### **3.3 Análise histopatológica**

Dez lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina randomicamente selecionadas de cada grupo foram enviadas para uma patologista veterinária experiente. As lâminas foram identificadas de forma aleatória para evitar viés quanto ao exame realizado. O exame histopatológico consistiu na análise microscópica do parênquima renal para a detecção de possíveis lesões existentes, a extensão e a intensidade das mesmas.

### **3.4 Análises morfométricas e estereológicas**

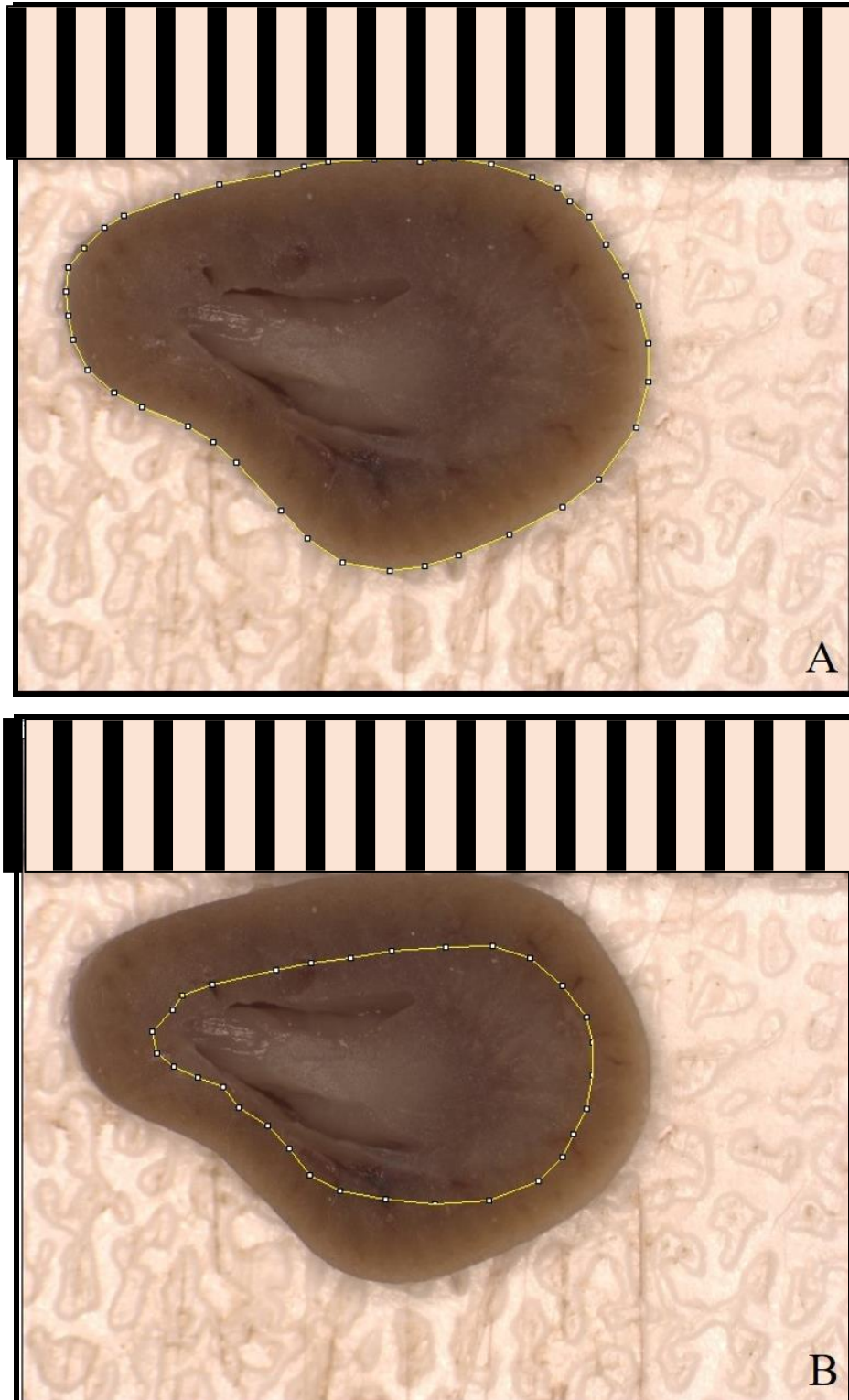
A área proporcional das regiões de córtex e não-córtex (medula, cápsula e tecido adiposo do seio renal) foi calculado utilizando-se o método de Cavalieri (DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018; ABREU et al., 2018) com a utilização do software ImageJ

(versão 1.47t, Image Processing and Analysis in Java). Os rins foram seccionados em sete a oito fatias transversais de 2 mm de espessura e uma superfície transvesal de cada fatia foi fotografada em câmera Axiocam 506 color (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Jena, Alemanha) acoplada ao estereomicroscópio Stereo Discovery.V8 (Carl Zeiss), junto com uma régua milimetrada para posterior calibração do ImageJ e, através do mesmo, as imagens foram analisadas sob magnificação de 15x.

Primeiro, calibrando-se através da régua a distância ocupada por um número determinado de pixels da imagem em milímetros. Depois da calibração, foi analisada primeiramente a área total da fatia e a área da região não cortical em cada imagem utilizando a ferramenta “Polygon selections” (Figura 7) e, através de subtração, foi possível o cálculo a área da região cortical.

Multiplicando o valor obtido pelo volume obtido pelo método de Scherle, foi possível calcular o volume de cada região, cortical (VC) e não cortical (BAGETTI-FILHO et al., 2012; BECHARA et al., 2016; 2017; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018; ABREU et al., 2018).

Figura 7 – Imagens demonstrativas da quantificação das áreas proporcionais total e de não córtex das fatias transversais pelo método de Cavalieri



Legenda: A – Área proporcional do rim; B – Área proporcional de região não córtex.

Nota: Corte transversal de rim esquerdo conservado em formalina tamponada a 3,7%.

Aumento de 15x. Análise realizada com uso do software Image J.

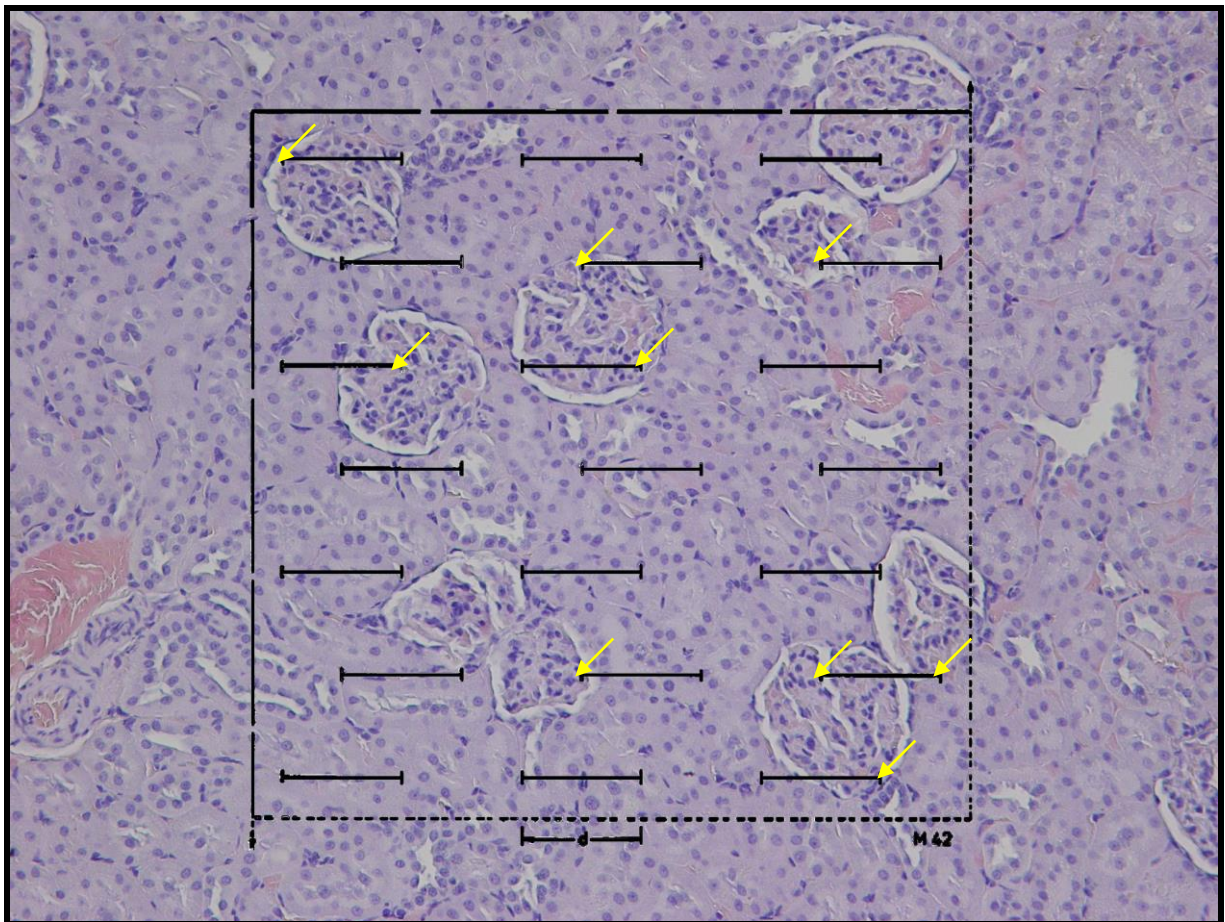
Fonte: A autora, 2020.

Para o cálculo da densidade volumétrica glomerular ( $V_v[\text{Glom}]$ ), a qual indica o volume ocupado pelos glomérulos no córtex de cada rim, foram analisados 25 campos histológicos obtidos de cinco diferentes secções do córtex renal, sendo esta estimada pelo método de contagem de pontos M42, onde essa área teste é sobreposta à fotomicrografia a ser analisada.

A M42 consiste em grade de área quadrangular delimitada por linhas e que contém 21 segmentos de reta (42 pontos). Os glomérulos que são tocados ou atravessados pelas linhas superior e lateral esquerda (linhas proibidas) são eliminados da análise. Os glomérulos restantes dentro da área quadrangular tocados/atravessados pelas linhas inferior e lateral direita (linhas permitidas) entram na avaliação e os pontos que se sobrepõem a eles são contabilizados (Figura 8).

A  $V_v[\text{Glom}]$  é dada por  $P_p/P_t$ , onde  $P_p$  é o número de pontos que se sobrepõem aos glomérulos e  $P_t$  o número total de pontos da grade (42). A  $V_v$  é dada em porcentagem e, multiplicando-se esse valor pelo VC e dividindo o resultado por 100, encontra-se o valor numérico da densidade absoluta glomerular em mililitros ( $VC \times V_v[\text{Glom}](\%) / 100 = \text{Densidade absoluta } [\text{Glom}] \text{ (ml)}$ ) (BAGETTI-FILHO et al., 2012; BECHARA et al., 2016; 2017; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018; ABREU et al., 2018).

Figura 8 – Disposição da grade M42 para análise da densidade volumétrica glomerular



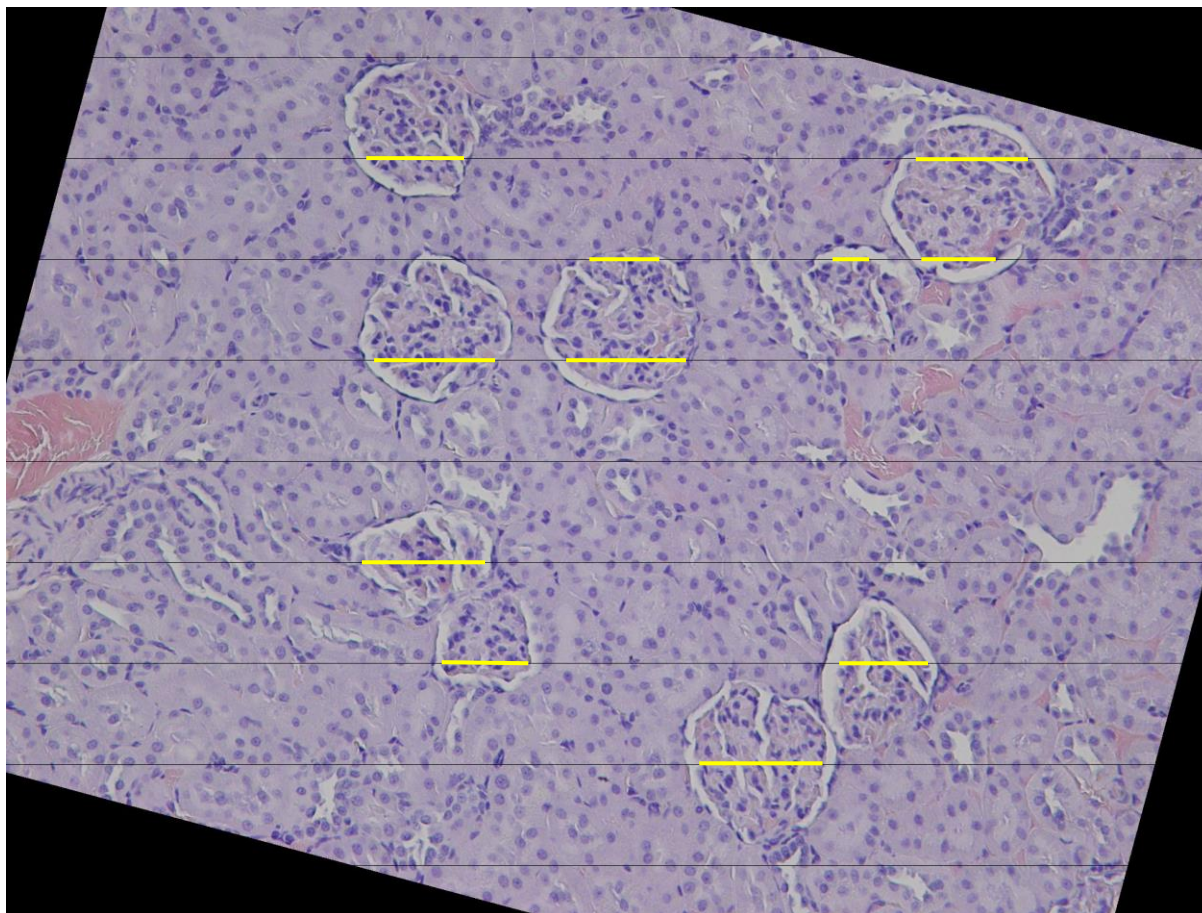
Legenda: As setas amarelas representam os pontos a serem contados na imagem, devido a sua sobreposição aos glomérulos que não tocam as linhas proibidas (lateral esquerda e superior).

Nota: Fotomicrografia corada em hematoxilina e eosina, aumento de 200x. Análise realizada com uso do software Image J.

Fonte: A autora, 2020.

O volume glomerular médio ponderado (VWGV) foi estimado usando o método de interceptação de pontos, analisando 50 mensurações de glomérulos por rim. Sobre o comprimento do glomérulo interceptado pela linha de uma grade com linhas paralelas entre si, é colocada uma régua logarítmica de 32 mm de comprimento composta de uma série de 15 classes. Essa grade é colocada sobre a imagem em ângulos aleatoriamente selecionados, sendo recalculado o ângulo, de modo aleatório, para cada imagem analisada (variando de 5° até 90°, com intervalos de 5°) (Figura 9) (DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018; ABREU et al., 2018).

Figura 9 – Disposição da grade com linhas paralelas para análise do volume glomerular médio ponderado



Legenda: As linhas amarelas representam as mensurações a serem realizadas na imagem, devido a sobreposição das linhas pretas aos glomérulos.

Nota: Fotomicrografia corada em hematoxilina e eosina, aumento de 200x. Análise realizada com uso do software Image J. A rotação da imagem acima é de 15°.

Fonte: A autora, 2020.

O número de glomérulos por milímetro cúbico de córtex renal ( $N[\text{Glom}]$ ) foi calculado pela fórmula  $VC \times Vv[\text{Glom}] / VWGV$  (BECHARA et al., 2016; 2017; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018; ABREU et al., 2018). Foi utilizado o software GraphPad Prism 5 para a análise estatística. Os dados bioquímicos e estereológicos obtidos foram comparados por one-way ANOVA (análise de variância) com o pós-teste de Bonferroni. Para todas as comparações, o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resveratrol

#### 4.1.1 Análises bioquímicas

Os níveis séricos de ureia no grupo I aumentaram em 10,4% em relação ao grupo S (Gráfico 1; Tabela 1). Não foram observadas diferenças entre os outros grupos. Além disso, nenhuma diferença foi observada em relação à análise da creatinina sérica (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados bioquímicos e estereológicos dos rins esquerdos dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol

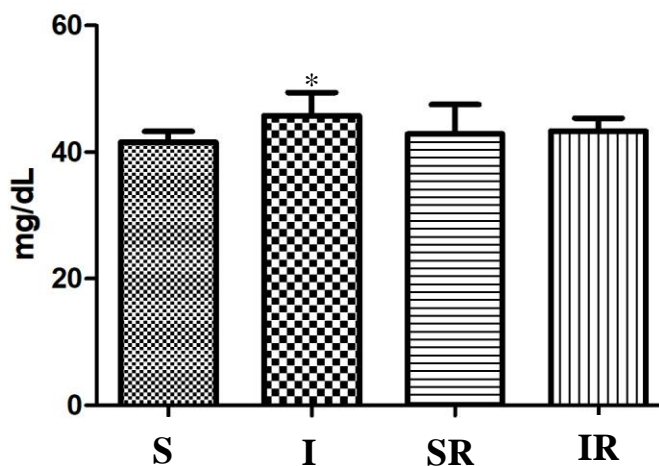
	S	I	SR	IR	p
<b>Uréia</b>	41,5±1,7 <sup>a</sup>	45,8±3,7 <sup>b</sup>	44,8±2,6	43,3±2,1	0,01*
<b>Creatinina</b>	0,44±0,01	0,47±0,03	0,46±0,03	0,46±0,05	0,21
<b>Peso Rim</b>	1,08±0,15	1,23±0,21	1,23±0,18	1,12±0,14	0,16
<b>Vol. Rim</b>	1,06±0,15	1,18±0,18	1,21±0,18	1,13±0,14	0,13
<b>VC</b>	0,79±0,09	0,82±0,11	0,93±0,14	0,81±0,10	0,05
<b>C-NC</b>	0,75±0,02 <sup>a</sup>	0,68±0,02 <sup>b,d</sup>	0,76±0,02 <sup>c,e</sup>	0,71±0,03 <sup>f</sup>	<0,01*
<b>Vv[Glom]</b>	5,99±0,77 <sup>a</sup>	4,03±0,46 <sup>b,d,e</sup>	5,52±1,05 <sup>c</sup>	6,01±0,65 <sup>f</sup>	<0,01*
<b>VWGV</b>	15,09±1,79	14,36±2,08	16,46±1,6	15,71±2,41	0,15
<b>N[Glom]</b>	31,50±4,90 <sup>a</sup>	23,30±4,10 <sup>b,d,e</sup>	31,80±8,70 <sup>c</sup>	31,60±6,90 <sup>f</sup>	0,01*

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão. S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SR – grupo Sham tratado com resveratrol; IR – grupo Isquemia tratado com resveratrol; IRQ – isquemia renal quente; VC – volume cortical; C-NC – relação entre as áreas de córtex e não córtex; Vv[Glom] – densidade volumétrica glomerular; VWGV – volume glomerular médio ponderado; N[Glom] – número de glomérulos por rim. a≠b, c≠d, e≠f – diferenças significativas entre as médias.

Fonte: A autora, 2020.



Grafico 1 – Representação dos níveis séricos de uréia dos grupos submetidos à laparotomia ou à IRQ sem e com tratamento com resveratrol



Legenda: “\*” - diferença significativa; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SR – grupo Sham tratado com resveratrol; IR – grupo Isquemia tratado com resveratrol; IRQ – isquemia renal quente.

Nota: Níveis séricos de ureia no grupo I aumentaram em 10,4% em relação ao grupo S, indicados pelo “\*”.

Fonte: A autora, 2020.

#### 4.1.2 Análise histopatológica

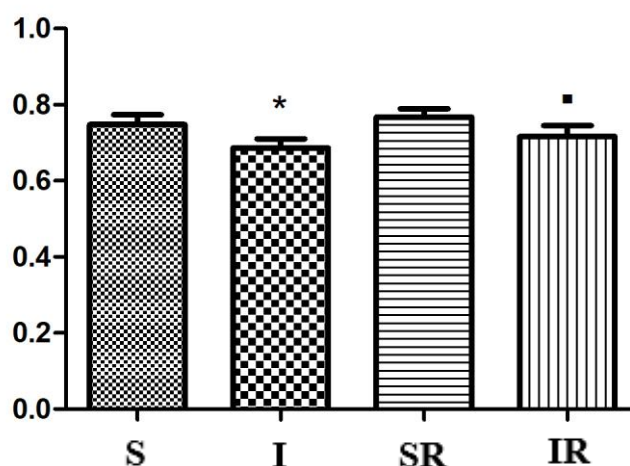
A análise histopatológica revelou congestão tubular e medular discreta em uma lâmina dos animais do grupo Sham e uma do grupo Sham tratado com resveratrol, mas a arquitetura cortical foi preservada (Figura 10).

Alterações histológicas graves apresentadas pelos rins do grupo Isquemia não tratado, degeneração glomerular, perda da região cortical, congestão cortical e medular, presença de material amorfo na luz tubular, material eosinofílico amorfo na região medular, perda da arquitetura cortical, a infiltrado mononuclear e a aparente perda de glomérulos foram mínimas no grupo Isquemia tratado com resveratrol (Figura 10).

#### 4.1.3 Análises morfométricas e estereológicas

Embora não tenham sido observadas diferenças em relação ao peso renal e o volume renal, VC e VWGV entre os grupos, outros parâmetros morfológicos apresentaram alterações importantes. A relação entre as áreas de córtex e não córtex do grupo Isquemia não tratado foi diminuída quando comparada aos grupos Sham e Sham tratado com Resveratrol (9,3% e 10,5%, respectivamente). Por outro lado, o grupo Isquemia tratado com Resveratrol não apresentou diferenças significativas quando comparado aos grupos Sham e Isquemia não tratado, diminuindo apenas em relação ao grupo Sham tratado com Resveratrol em 6,6% (Tabela 1; Gráfico 2).

Gráfico 2 – Representação da relação entre áreas de córtex e não córtex dos grupos submetidos à laparotomia ou à IRQ sem e com tratamento com resveratrol



Legenda: “\*”; “·” - diferenças significativas; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SR – grupo Sham tratado com resveratrol; IR – grupo Isquemia tratado com resveratrol; IRQ – isquemia renal quente.

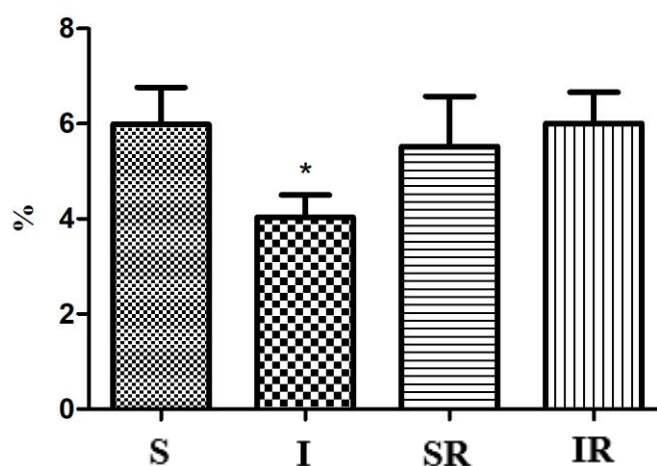
Nota: Relação entre áreas de córtex e não córtex de I foi diminuída quando comparada a S e SR, indicado pelo “\*”; IR diminuiu apenas em relação ao grupo SR, indicado pelo “·”

Fonte: A autora, 2020.

A densidade volumétrica glomerular do grupo Isquemia não tratado foi menor em 32,7% em relação ao grupo Sham, e 27% menor em relação ao grupo Sham tratado com Resveratrol. No grupo Isquemia tratado com Resveratrol, não foi observada diferença desse

parâmetro estereológico em relação aos grupos Sham e Sham tratado com Resveratrol, sendo observado aumento de 49,1% em relação ao grupo Isquemia não tratado (Gráfico 3; Tabela 1; Figura 10).

Gráfico 3 – Representação da densidade volumétrica glomerular dos grupos submetidos à laparotomia ou à IRQ sem e com tratamento com resveratrol



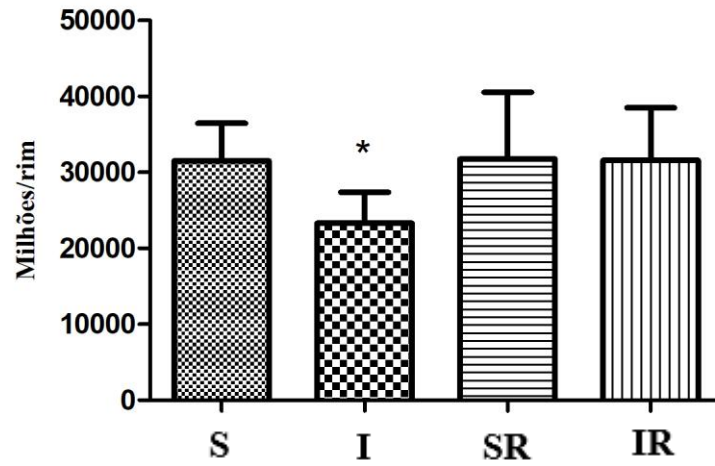
Legenda: “\*” - diferenças significativas; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SR – grupo Sham tratado com resveratrol; IR – grupo Isquemia tratado com resveratrol; IRQ – isquemia renal quente.

Nota: A densidade volumétrica glomerular de I foi diminuída quando comparada a S, SR e IR indicado pelo “\*”.

Fonte: A autora, 2020.

O número de glomérulos do grupo Isquemia não tratado apresentou-se diminuído em relação ao grupo Sham em 26% e em 26,7% quando comparado ao grupo Sham tratado com Resveratrol. Positivamente, o número de glomérulos do rim isquêmico tratado com Resveratrol foi 35,6% maior que o dos isquêmicos que não receberam o tratamento com o bioflavonóide, e não houve diferença significativa entre os grupos Sham, Sham tratado com Resveratrol e Isquemia tratado com Resveratrol (Gráfico 4; Tabela 1; Figura 10).

Gráfico 4 – Representação do número de glomérulos por rim dos grupos submetidos à laparotomia ou e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol

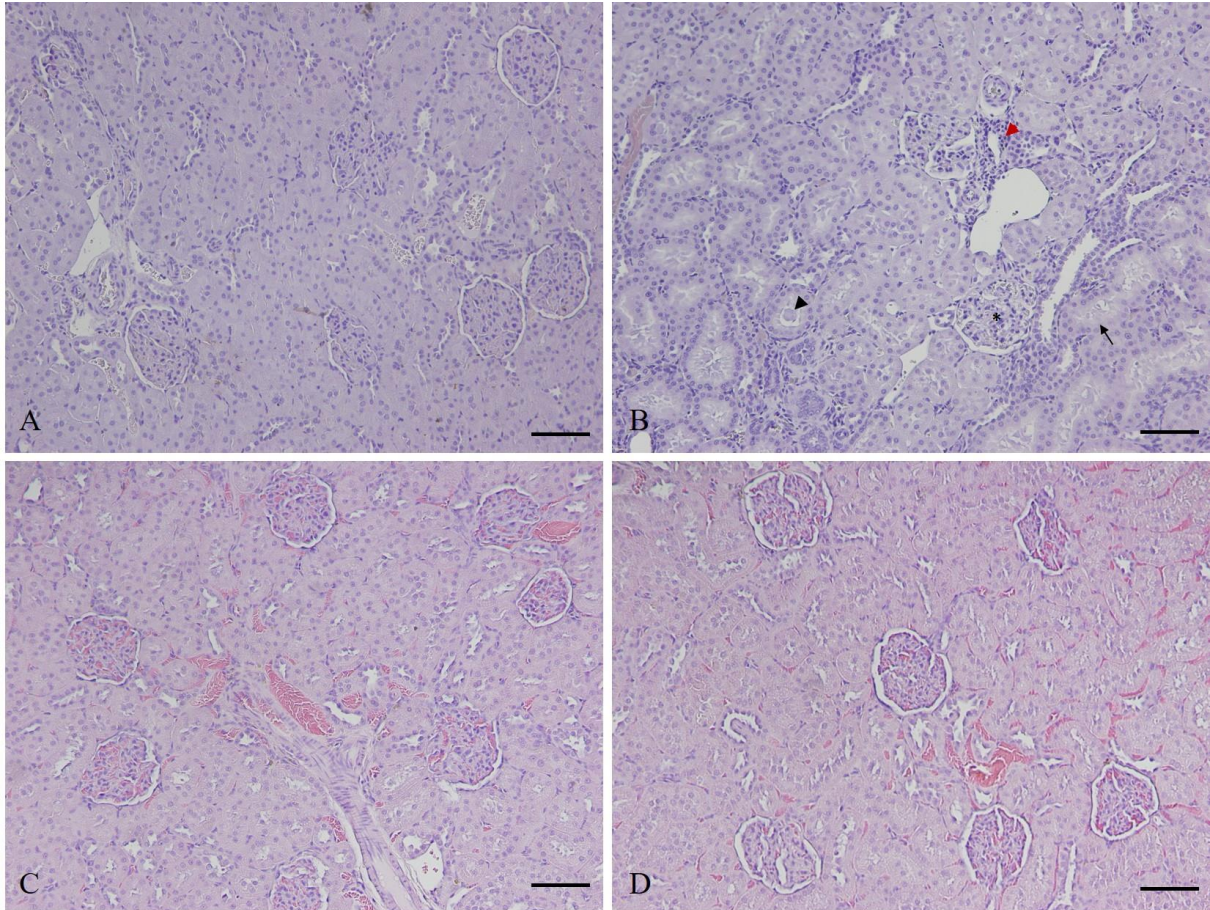


Legenda: “\*” - diferenças significativas; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SR – grupo Sham tratado com resveratrol; IR – grupo Isquemia tratado com resveratrol; IRQ – isquemia renal quente.

Nota: O número de glomérulos por rim de I foi diminuído quando comparado aos grupos S, SR e IR, indicado pelo “\*”.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 10 – Fotomicrografias representativas do córtex renal dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com resveratrol e à IRQ sem e com tratamento com resveratrol



Legenda: A – grupo Sham; B – grupo Isquemia não tratado; C – grupo Sham tratado com resveratrol; D – grupo Isquemia tratado com resveratrol; IRQ – isquemia renal quente; cabeça de seta preta – material proteico no lúmen tubular; asterisco (\*) – degeneração glomerular; seta preta – perda de epitélio tubular; cabeça de seta vermelha – infiltrado linfocítico. Hematoxilina e eosina, 200x; barra de escala: 100 µm.

Nota: Observar a diminuição do número de glomérulos na imagem B, representativa do grupo I, em relação aos demais grupos.

Fonte: A autora, 2020.

## 4.2 Quercetina

### 4.2.1 Análises bioquímicas

No grupo Isquemia não tratado, o valor de uréia sérica aumentou em 10,4% em relação ao grupo Sham. Não foram observadas diferenças significativas entre os outros grupos (Tabela 2; Gráfico 5). Nenhuma diferença foi observada em relação à análise da creatinina sérica (Tabela 2).

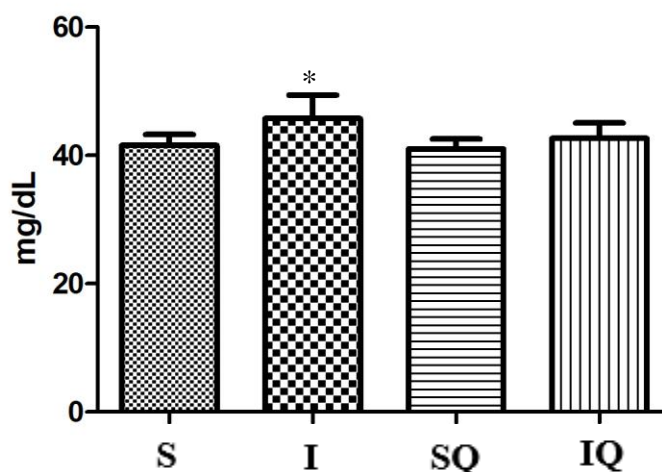
Tabela 2 – Dados bioquímicos e estereológicos dos rins esquerdos dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina

	S	I	SQ	IQ	P
<b>Uréia</b>	41,5±1,7 <sup>a</sup>	45,8±3,7 <sup>b</sup>	41,0±1,6	42,7±2,4	<0,01*
<b>Creatinina</b>	0,44±0,01	0,47±0,03	0,47±0,04	0,46±0,05	0,27
<b>Peso Rim</b>	1,08±0,15	1,23±0,21	1,24±0,15	1,19±0,11	0,15
<b>Vol. Rim</b>	1,06±0,15	1,20±0,18	1,19±0,15	1,17±0,11	0,15
<b>VC</b>	0,79±0,09	0,82±0,11	0,88±0,11	0,84±0,09	0,29
<b>C-NC</b>	0,75±0,02 <sup>a</sup>	0,68±0,02 <sup>b,d,e</sup>	0,74±0,02 <sup>c</sup>	0,72±0,02 <sup>f</sup>	<0,01*
<b>Vv[Glom]</b>	5,99±0,77 <sup>a</sup>	4,04±0,46 <sup>b,d,e</sup>	6,14±0,43 <sup>c</sup>	5,40±0,31 <sup>d,f</sup>	<0,01*
<b>VWGV</b>	15,1±1,79	1,44±2,08	15,5±1,61	1,52±1,31	0,63
<b>N[Glom]</b>	31,5±4,98 <sup>a</sup>	23,3±4,11 <sup>b,d,e</sup>	34,8±3,62 <sup>c</sup>	29,9±1,76 <sup>f</sup>	<0,01*

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão. S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SQ – grupo Sham tratado com quercetina; IQ – grupo Isquemia tratado com quercetina; IRQ – isquemia renal quente; VC – volume cortical; C-NC – relação entre as áreas de córtex e não córtex; Vv[Glom] – densidade volumétrica glomerular; VWGV – volume glomerular médio ponderado; N[Glom] – número de glomérulos por rim. a≠b, c≠d, e≠f – diferenças significativas entre as médias.

Fonte: A autora, 2020.

Grafico 5 – Representação dos níveis séricos de uréia dos grupos submetidos à laparotomia ou à IRQ sem e com tratamento com quercetina



Legenda: “\*” - diferença significativa; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SQ – grupo Sham tratado com quercetina; IQ – grupo Isquemia tratado com quercetina; IRQ – isquemia renal quente.

Nota: Níveis séricos de ureia no grupo I aumentaram em 10,4% em relação ao grupo S, indicados pelo “\*”.

Fonte: A autora, 2020.

#### 4.2.2 Análise histopatológica

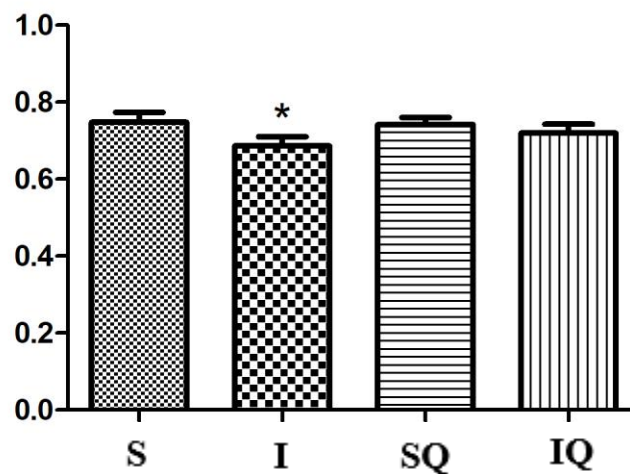
Como descrito anteriormente, a histopatologia revelou congestão tubular e medular discreta em uma lâmina do grupo Sham. Alterações pouco significativas também foram observadas em duas das lâminas do grupo Sham tratado com quercetina. Porém, a arquitetura cortical foi preservada em ambos os grupos (Figura 11).

Por outro lado, muitos focos de dano parenquimatoso foram observados nos rins do grupo Isquemia não tratado. Isso incluiu material amorfo no lúmen tubular, material eosinofílico amorfo na região medular, degeneração glomerular, infiltrado mononuclear e perda aparente de glomérulos e de arquitetura cortical. Esses achados patológicos foram mínimos nos rins do grupo Isquemia tratado com quercetina (Figura 11).

#### 4.2.3 Análises morfométricas e estereológicas

A relação entre as áreas de córtex e não córtex do grupo Isquemia não tratado foi diminuída quando comparada aos grupos Sham e Sham tratado com Quercetina e Isquemia tratado com Quercetina (9,3%, 5,5% e 5,9% respectivamente). Não existiram diferenças significativas entre o grupo Isquemia tratado com Quercetina, Sham e Sham tratado com Quercetina (Gráfico 6; Tabela 2).

Grafico 6 – Representação da relação entre áreas de córtex e não córtex dos grupos submetidos à laparotomia ou à IRQ sem e com tratamento com quercetina



Legenda: “\*” - diferenças significativas; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SQ – grupo Sham tratado com quercetina; IQ – grupo Isquemia tratado com quercetina; IRQ – isquemia renal quente.

Nota: Relação entre áreas de córtex e não córtex de I foi diminuída quando comparada a S, SQ e IQ, indicado pelo “\*”.

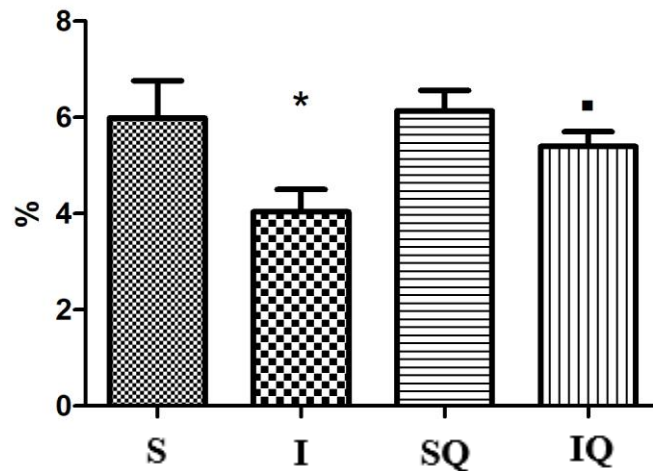
Fonte: A autora, 2020.

A densidade volumétrica glomerular do grupo Isquemia não tratado foi menor em 32,7% em relação ao grupo Sham, e 34,2% menor em relação ao grupo Sham tratado com Quercetina. No grupo Isquemia tratado com Quercetina foi observado 33,7% a mais em relação ao grupo Isquemia não tratado. O grupo Isquemia tratado com Quercetina teve esse



parâmetro diminuído em relação ao grupo Sham tratado com Quercetina em 12%, mas sem diferenças significativas quando comparado ao Sham (Gráfico 7; Tabela 2; Figura 11).

Gráfico 7 – Representação da densidade volumétrica glomerular dos grupos submetidos à laparotomia ou à IRQ sem e com tratamento com quercetina



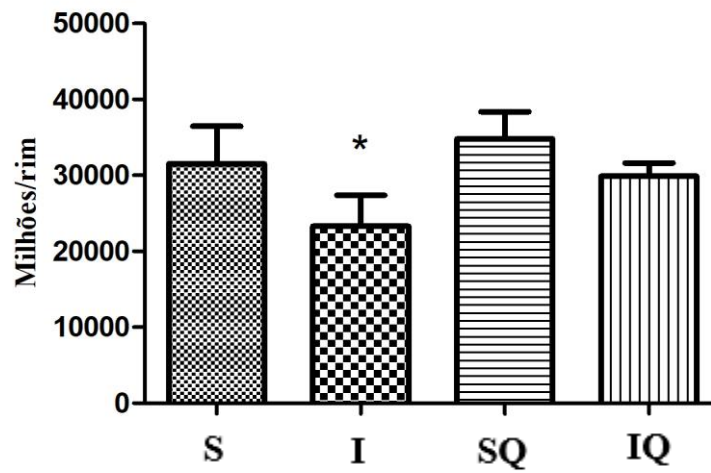
Legenda: “\*”; “·” - diferenças significativas; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SQ – grupo Sham tratado com quercetina; IQ – grupo Isquemia tratado com quercetina; IRQ – isquemia renal quente.

Nota: A densidade volumétrica glomerular de I foi diminuída quando comparada a S e SQ, indicado pelo “\*”; IQ diminuiu apenas em relação ao grupo SQ, indicado pelo “·”

Fonte: A Autora, 2020.

O número de glomérulos do grupo Isquemia não tratado apresentou-se diminuído em relação ao grupo Sham em 26% e em 33% quando comparado ao grupo Sham tratado com Quercetina. Felizmente, o número de glomérulos do rim isquêmico tratado com Quercetina foi 28,3% maior que o dos isquêmicos que não receberam o tratamento com esse polifenol, e não houve diferença significativa entre os grupos Sham, Sham tratado com Quercetina e Isquemia tratado com Quercetina (Gráfico 8; Tabela 2; Figura 11). O peso e volume renais, o VC e o VWGV não apresentaram diferenças entre os grupos (Tabela 2).

Grafico 8 – Representação do número de glomérulos dos grupos submetidos à laparotomia ou à IRQ sem e com tratamento com quercetina

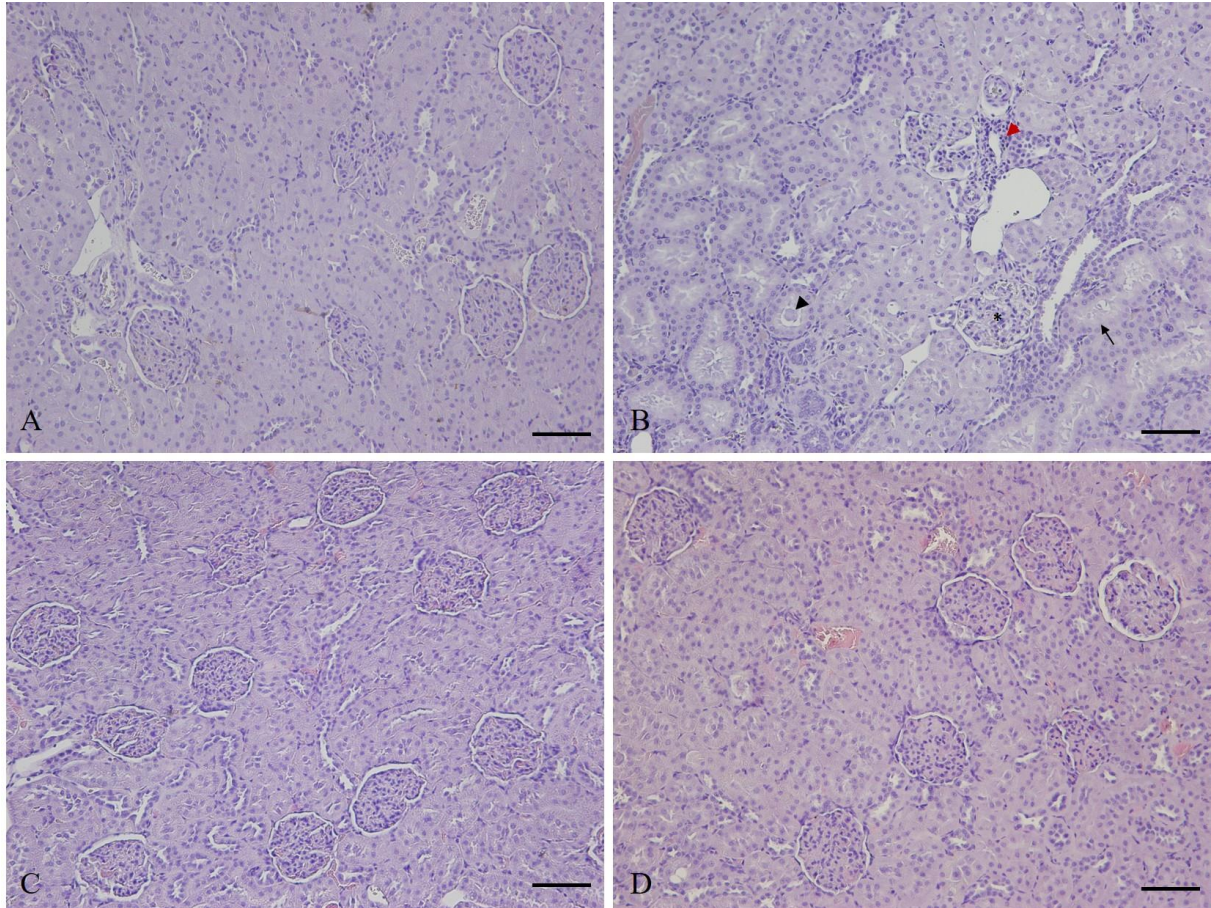


Legenda: "\*" - diferenças significativas; S – grupo Sham; I – grupo Isquemia não tratado; SQ – grupo Sham tratado com quercetina; IQ – grupo Isquemia tratado com quercetina; IRQ – isquemia renal quente.

Nota: O número de glomérulos de I foi diminuído quando comparado a S, SQ e IQ, indicado pelo "\*".

Fonte: A autora, 2020.

Figura 11 – Fotomicrografias representativas do córtex renal dos grupos submetidos à laparotomia sem e com tratamento com quercetina e à IRQ sem e com tratamento com quercetina



Legenda: A – grupo Sham; B – grupo Isquemia não tratado; C – grupo Sham tratado com quercetina; D – grupo Isquemia tratado com quercetina; IRQ – isquemia renal quente; cabeça de seta preta – material proteico no lúmen tubular; \* – degeneração glomerular; seta preta – perda de epitélio tubular; cabeça de seta vermelha – infiltrado linfocítico. Hematoxilina e eosina, 200x; barra de escala: 100  $\mu$ m.

Nota: Observar a diminuição do número de glomérulos na imagem B, representativa do grupo Isquemia não tratado, em relação aos demais grupos.

Fonte: A autora, 2020.

## 5 DISCUSSÃO

Considerando que a lesão isquêmica acarreta em alta produção de ERO com consequentes danos morfológicos e funcionais (MALEK; NEMATBAKSH, 2015; BUYS-GONÇALVES et al., 2019), o uso de antioxidantes é uma opção terapêutica razoável para a prevenção da lesão causada pela IRQ após NP. Muitos estudos mostraram que os antioxidantes podem prevenir lesões oxidativas isquêmicas (BERTELLI et al., 2002; KAHRAMAN et al., 2003; SENER et al., 2006; KINACI et al., 2012; DONG et al., 2013; LIN et al., 2013; CHEN et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014; KHADER et al., 2015; SHIMIZU et al., 2016; TÓTH et al., 2017; LI et al., 2018) ou não-isquêmicas (ABHARZANJANI et al., 2017; BENSALÉM et al.; NAM et al., 2018 ;WANG et al.; 2018) em diferentes órgãos.

O resveratrol (BERTELLI et al., 2002; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018) e a quercetina (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012; CHEN et al., 2014) são antioxidantes promissores, que mostraram efeitos protetores renais agudos após IRQ. Os resultados deste estudo demonstraram que o resveratrol e a quercetina foram eficazes na prevenção da perda glomerular, uma vez que o número de glomérulos/rim foi reduzido apenas em animais submetidos à isquemia e não tratados com resveratrol ou quercetina (grupo D).

Os valores de ureia sérica foram aumentados no grupo I, e os tratamentos com resveratrol ou quercetina preveniram o aumento dos níveis de ureia no grupo IR, assim como ocorreu com o grupo IQ. Esses achados estão de acordo com trabalhos publicados anteriormente, que reforçam os efeitos nefroprotetores do resveratrol (BERTELLI et al., 2002; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018) ou da quercetina (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012) após IRQ usando o rato como modelo.

No presente estudo, os rins isquêmicos não tratados (grupo I) apresentaram lesões histológicas relacionadas à IRQ, que foram previamente relatadas em estudos que utilizaram o rato como modelo de IRQ unilateral (YSEBAERT et al., 2000; SENER et al., 2006; KINACI et al., 2012; LI et al., 2018) ou bilateral (BERTELLI et al., 2002; KHADER et al., 2015), e que analisaram o tecido renal de 6 horas a 10 dias após a reperfusão. Os animais usados no atual estudo tiveram seus rins coletados 30 dias após a reperfusão. Logo, lesões histológicas como congestão, degeneração glomerular, infiltrado inflamatório e perda de arquitetura cortical podem ser relacionadas à evolução tardia do dano causado pela IRQ de 60 minutos.

O tratamento com resveratrol prévio à IRQ foi relacionado à diminuição significativa das lesões teciduais descritas acima no presente estudo, corroborando assim com dados de estudos prévios (BERTELI et al., 2002; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018). Resultados positivos quanto ao tratamento com quercetina antes e após a IRQ também foram demonstrados no atual estudo e se assemelham aos de Kinaci et al (2012), já que as lesões teciduais foram minimizadas no grupo IQ quando comparadas ao grupo I. No entanto, o objetivo principal do presente estudo foi a ação protetora do resveratrol ou da quercetina por meio de uma análise objetiva estereológica dos aspectos morfométricos dos rins submetidos à IRQ arteriovenosa.

Como o objetivo da NP é a remoção de tumores renais poupando o máximo de néfrons possível (CAMPBELL et al., 2017; VEYS et al., 2018; CHOUDHARY et al., 2018), é razoável que uma determinação imparcial do número glomerular (que é muito correspondente ao número de néfrons) seja importante para o estudo do impacto na função renal (BAGETTI-FILHO et al., 2012; BECHARA et al., 2016; 2017; DAMASCENO-FERREIRA et al., 2017; 2018; ABREU et al., 2018).

De acordo com a maior base de dados médico-científicos, o PubMed, este estudo é o primeiro a mostrar os efeitos protetores tardios do resveratrol ou da quercetina relacionados à IRQ. Estudos prévios utilizaram análises qualitativas imediatas para demonstrar alterações morfológicas renais após isquemia/reperfusão e os efeitos benéficos do resveratrol (BERTELLI et al., 2002; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018) ou da quercetina (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012; CHEN et al., 2014).

O modelo utilizado no presente estudo é amplamente conhecido por induzir alterações morfológicas (YSEBAERT et al., 2000; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018). A indução de 60 minutos de IRQ em ratos foi previamente relatada como levando à redução glomerular, conforme analisado por métodos estereológicos (BAGETTI-FILHO et al., 2012). Isso foi confirmado no presente estudo, já que houve uma diminuição na relação entre as áreas de córtex e não córtex, densidade volumétrica glomerular e número de glomérulos no grupo I, em comparação ao grupo S.

Os resultados mais importantes foram aqueles que apontaram que o resveratrol ou a quercetina preveniram a perda glomerular após lesão isquêmica. Os valores de densidade volumétrica glomerular e número de glomérulos em animais submetidos a isquemia renal e tratados com resveratrol (grupo IR) não foram diferentes dos do grupo S. Já o grupo de

animais que sofreu apenas isquemia renal I, que apresentou valores de densidade volumétrica glomerular e número de glomérulos significativamente inferiores.

Além disso, o grupo Sham tratado com resveratrol ou o tratado com quercetina não apresentaram alterações renais nem efeitos colaterais perceptíveis no estado geral dos animais. Tais resultados sugerem que o resveratrol e a quercetina podem ser potenciais protetores renais quando administrados em um paciente que será submetido à IRQ, e pode ter um grande impacto benéfico na função renal a longo prazo, diminuindo a incidência de doença crônica renal após o tratamento de tumores renais pequenos com a NP.

Além do mais, estudos publicados anteriormente mostraram os efeitos protetores do resveratrol (BERTELLI et al., 2002; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018) ou da quercetina (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012; CHEN et al., 2014) a curto prazo, pois a análise dessas pesquisas foi realizada entre 6 horas e 10 dias após a reperusão renal. O presente estudo adicionou informações a esse tópico científico, analisando os rins 30 dias após a lesão isquêmica e demonstrando que os efeitos protetores do resveratrol e da quercetina são permanentes.

Vale ressaltar que os resultados quantitativos do resveratrol no presente estudo podem ser relacionados aos seus efeitos relatados em estudos prévios. A prevenção da perda glomerular que prevaleceu no grupo IR corrobora com os resultados de Bertelli et al. (2002), que afirmam que esse flavonóide diminuiu a formação de agregados plaquetários nos capilares glomerulares. Agregados plaquetários ocorrem durante a IRQ devido às lesões ocorridas nas células endoteliais glomerulares que perdem a integridade e são estimuladas por citocinas inflamatórias (RUSSO et al. 2017). Logo, o resveratrol atua prevenindo a trombose glomerular que ocorre devido a exposição do fator de von Willebrand subendotelial e o colágeno da membrana basal, estimulando a adesão e ativação plaquetárias e a formação de coágulos.

A manutenção do número de glomérulos pelo resveratrol no grupo IR ou pela quercetina no grupo IQ desse estudo pode ser também associada às capacidades desses flavonoides em reduzir a expressão do TNF- $\alpha$  (KAHRAMAN et al., 2003; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015). Esse último é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos, principalmente, mas que também pode ser liberado por células endoteliais sob estresse oxidativo. Como consequência, o TNF- $\alpha$  induz a ativação da XO e produção de ânions superóxido, levando à disfunção endotelial (ZHANG et al. 2006). A quercetina ainda é relatada como fator que contribui para a redução da atividade da XO e quelante de ânions

superóxido (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994), sendo essa atividade um importante contribuinte para seu efeito nefroprotetor relacionado à IRQ.

O resveratrol e a quercetina foram, da mesma forma, associados à atenuação da MPO e do MDA quando associados à IRQ (KAHRAMAN et al., 2003; SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015; LI et al., 2018). A MPO uma peroxidase produzida principalmente em leucócitos polimorfonucleares, sendo catalisadora do processo de formação de radicais altamente reativos, como o ácido hipocloroso (HClO<sub>2</sub>). Essa enzima está conhecidamente envolvida na cascata patológica do estresse oxidativo e sua amplificação (NDREPEPA, 2019). O MDA é um conhecido marcador do estresse oxidativo sendo um produto da peroxidação lipídica potencialmente reativo e mutagênico (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Logo, a capacidade dos dois flavonoides em questão de reduzir a MPO e o MDA tem significância em seus efeitos mantenedores do número de glomérulos após a IRQ.

O resveratrol foi relatado previamente como redutor dos níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) (SENER et al., 2006; KHADER et al., 2015). Ambas são marcadores de lesões celulares diversas, inclusive renais. Logo, o flavonóide preveniu a necrose glomerular e liberação dessas enzimas intracelulares no líquido extracelular, o que corrobora com os resultados positivos desse estudo. Resveratrol também foi responsável pela diminuição de interleucinas em estudos prévios (KHADER et al., 2015; LI et al., 2018). As interleucinas são proteínas produzidas por leucócitos, principalmente linfócitos T, macrófagos e eosinófilos, sendo sinalizadores fundamentais durante os diversos mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo inflamatório. A lesão isquêmica causa a ativação do sistema imunológico e a liberação de interleucinas (MOMOZANE et al., 2018) logo, a amenização da liberação dessas pelo resveratrol condiz com seus efeitos benéficos sobre a preservação do número de glomérulos nos rins do grupo IR.

A glutathiona é um importante antioxidante endógeno envolvido na oxidação de peróxidos de hidrogênio como cofator da GPx e marcador de processos isquêmicos em humanos (DERIKX; SCHELLEKENS; ACOSTA, 2017). A manutenção da atividade e expressão da glutathiona foram associadas ao resveratrol e à quercetina quando utilizados como nefroprotetores relacionados a IRQ (KAHRAMAN et al., 2003; SENER et al., 2006; KINACI et al., 2012). Então, ambos os flavonoides podem ter seus efeitos nefroprotetores justificados por mais esse efeito positivo como contribuintes para a diminuição dos efeitos do estresse oxidativo e peroxidação lipídica.

O tratamento com a quercetina associada a IRQ provocou redução da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (KINACI et al., 2012). O óxido nítrico (NO) endógeno é um gás solúvel, altamente lipofílico sintetizado pelas células endoteliais. É um importante sinalizador intracelular e extracelular, e atua promovendo o relaxamento do músculo liso dos vasos o que provoca, como principal ação biológica, a vasodilatação (CUNNINGHAM; KLEIN, 2014). A IRQ arteriovenosa foi relatada em estudo prévio como promotora do aumento da expressão de eNOS e da consequente produção de NO endotelial glomerular, sendo a enzima utilizada como marcador de lesão isquêmica em ratos (VALDIVIELSO et al. 2001). Sendo a quercetina uma minimizadora da expressão de eNOS, seu efeito mantenedor do número de glomérulos no presente estudo pode ser assim também, justificado.

O resveratrol e a quercetina foram associados ao aumento da atividade de importantes antioxidantes endógenos, como a SOD, CAT e GPx (KAHRAMAN et al., 2003; KINACI et al., 2012; KITADA; KOYA, 2013). Tais enzimas em maior quantidade auxiliam de forma significativa no processo de prevenção e reversão das lesões pelo estresse oxidativo causadas pela IRQ (BUYS-GONÇALVES et al., 2019). O fato desses antioxidantes endógenos serem otimizados pelo resveratrol e quercetina também corroboram seus resultados positivos nos rins isquêmicos tratados dos grupos IR ou IQ.

A quercetina é comercializada em lojas de produtos naturais como suplemento alimentar em forma de di-hidrato de quercetina em cápsulas vegetais, em diversas dosagens e níveis de pureza, associada ou não a outros suplementos. Sua aparência é de um pó amarelo e não apresenta odor. O mesmo ocorre com o resveratrol, sendo esse disponibilizado na forma de trans-resveratrol, com aparência de um pó esbranquiçado e inodoro. Ambos os flavonoides apresentam a mesma faixa de preço, que varia bastante de acordo com o fabricante e pureza, associações com outro suplementos, quantidade de cápsulas e dose contida nas mesmas. O valor da quercetina utilizada no presente estudo foi de R\$191,56 com 90 cápsulas de 500 mg. A mesma foi importada do Canadá, já que somente o fabricante New Roots Herbal detinha o composto com 98% de pureza. O resveratrol da marca Terraternal custou R\$262,00 com 60 cápsulas de 500 mg e 99% de pureza, sendo esse importado dos Estados Unidos da América. Logo, a quercetina com maior nível de pureza disponível no mercado possui preço mais acessível do que o resveratrol.

Uma limitação do presente estudo é que seus resultados não podem ser diretamente transpostos para espécie humana, pois as respostas fisiopatológicas são diferentes entre



roedores e humanos. Embora o modelo murino de IRQ seja o mais comumente usado, este ainda é um cenário experimental, com várias diferenças para o cenário clínico.

O resveratrol e a quercetina detém resultados pré-clínicos positivos, não possuem efeitos colaterais relatados na literatura científica, são livremente comercializados como suplementos e possuem custo acessível. Ambos poderiam ser avaliados em estudos clínicos como tratamento complementar, a princípio, no pré e pós operatório da NP com IRQ, podendo ser administrados por via oral em tempo pré-determinado. A avaliação da função renal dos pacientes tratados complementarmente com resveratrol ou quercetina poderia ser comparada aos não tratados.

## CONCLUSÕES

A isquemia renal quente arteriovenosa de 60 minutos promove alterações séricas e irreversíveis no rim de ratos, resultando em um número reduzido de glomérulos.

A administração prévia de resveratrol ou quercetina protege o tecido renal das lesões isquêmicas de 60 minutos em ratos, minimizando a redução do número glomerular.

Futuros estudos clínicos investigando o uso do resveratrol e a quercetina como drogas nefroprotetoras em pacientes submetidos à NP com IRQ são necessários para conclusões de seus efeitos em humanos.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B.J. *Histologia Essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ABDELKADER, A. et al. Renal oxygenation in acute renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. v. 306, n. 9, p. F1026, May 2014.
- ABHARZANJANI, F. et al. Short-term High Dose of Quercetin and Resveratrol Alters Aging Markers in Human Kidney Cells. *Int J Prev Med*. v. 8 p. 64, Aug 2017.
- ABREU, L. A. D. S. et al. Volume and Shape Assessment of Renal Radiofrequency Ablation Lesion. *Urology*. v. 116, n. 229, p. e7-229, Jun 2018.
- AKRAM, M. Mini-review on glycolysis and cancer. *J Cancer Educ*. v. 28, n. 3, p. 454, Sep 2013.
- ALBERTONI, G.; SCHOR, N. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease-mini-review. *J Bras Nefrol*. v. 37, n. 1, p. 106, Jan 2015.
- BAGETTI-FILHO, H. J. et al. Different from renal artery only clamping, artery and vein clamping causes a significant reduction in number of rat glomeruli during warm ischemia. *J Endourol*. v. 26, n. 10, p. 1335, Oct 2012.
- BECHARA, G. R. et al. Glomerular loss after arteriovenous and arterial clamping for renal warm ischemia in a swine model. *Acta Cir Bras*. v. 31, n. 11, p. 753, Nov 2016.
- BECHARA, G. R. et al. Glomerular Morphology and Renal Function after Warm Ischemia by Main Artery or Selective Clamping in a Porcine Model. *Urol Int*. v. 99, n. 3, p. 262, Mar 2017.
- BENSALEM, J. et al. Polyphenol-rich extract from grape and blueberry attenuates cognitive decline and improves neuronal function in aged mice. *J Nutr Sci*. v, 21, n. 7, p. e19, May 2018.
- BERTELLI, A. A. et al. Resveratrol, a component of wine and grapes, in the prevention of kidney disease. *Ann N Y Acad Sci*. v. 957, p. 230, May 2002.
- BOLTON, E. M.; LYNCH, T. H. Impact of warm ischaemia time during partial nephrectomy on renal function - is it really a matter of time? *BJU Int*. v. 121, n. 1, p.3, Jan 2018.
- BOULETI, C.; MEWTON, N.; GERMAIN, S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Arch Cardiovasc Dis*. v. 108, n. 12, p. 661, Dec 2015.
- BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo - Patologia*. 8.ed. Rio de Janeiro: Gen, Guanabara Koogan, 2011.

BUYS-GONÇALVES, G. F. et al. Antioxidants as Renoprotective Agents for Ischemia during Partial Nephrectomy. *Biomed Res Int.* v. 7, n. 8575398, Feb 2019.

CAMPBELL, S. et al. Renal Mass and Localized Renal Cancer: AUA Guideline. *J Urol.* v. 198, n. 3, p. 520, Sep 2017.

CHEN, B. L. et al. Quercetin attenuates renal ischemia/reperfusion injury via an activation of AMP-activated protein kinase-regulated autophagy pathway. *J Nutr Biochem.* v. 25, n. 11, p. 1226, Nov 2014.

CHO, I. et al. Increased Superoxide Dismutase 2 by Allopregnanolone Ameliorates ROS-Mediated Neuronal Death in Mice with Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *Neurochem Res.* v. 43, n. 7., p. 1464, Jul 2018.

CHOUDHARY, G. R. et al. Evaluation of Quantitative and Qualitative Renal Outcome Following Nephron Sparing Surgery. *J Clin Imaging Sci.* v. 16, n. 8, p. 15, Apr 2018.

COOPER, C. A.; SHUM, C. F.; SUNDARAM, C. P. Robotic Partial Nephrectomy for a Peripheral Renal Tumor. *J Endourol.* v. 32, n. S1, p. S55, May 2018.

COOPER, K. F. Till Death Do Us Part: The Marriage of Autophagy and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev.* v. 2018, p. 4701275, May 2018.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. *Tratado de fisiologia veterinária.* 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

DAMASCENO-FERREIRA, J. A. et al. The relationship between renal warm ischemia time and glomerular loss. An experimental study in a pig model. *Acta Cir Bras.* v. 32, n. 5, p. 334, May 2017.

DAMASCENO-FERREIRA, J. A. et al. Mannitol reduces nephron loss after warm renal ischemia in a porcine model. *BMC Urol.* v. 2018, n. 18, p. 16, Mar 2018.

DAUTZENBERG, M.; KEILHOFF, G.; JUST, A. Modulation of the myogenic response in renal blood flow autoregulation by NO depends on endothelial nitric oxide synthase (eNOS), but not neuronal or inducible NOS. *J Physiol.* v. 589, n. 19, p. 4731, Oct 2011.

DENIFFEL, D. et al. Computed Tomography Perfusion Measurements in Renal Lesions Obtained by Bayesian Estimation, Advanced Singular-Value Decomposition Deconvolution, Maximum Slope, and Patlak Models: Intermodel Agreement and Diagnostic Accuracy of Tumor Classification. *Invest Radiol.* v. 53, n. 8, p. 477, Aug 2018.

DENNIS, J. M.; WITTING, P. K. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients.* v. 9, n. 7, p. 718, Jul 2017.

DE SOUZA, D. B. et al. Laparoscopic partial nephrectomy under warm ischemia reduces the glomerular density in a pig model. *J Endourol.* v. 26, n. 6, p. 706, Jun 2012.

DEL RIO, D., STEWART, A. J., PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* v.15, n. 4, p. 316, Aug 2005.

DERIKX, J. P., SCHELLEKENS, D. H., ACOSTA, S. Serological markers for human intestinal ischemia: A systematic review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* v. 31, n. 1, p. 69, Feb 2017.

DONG, W. et al. Resveratrol ameliorates subacute intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* v. 185, n. 1, p. 182, Nov 2013.

EMDIN, M. et al. Biomarkers of activation of renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure: how useful, how feasible? *Clin Chim Acta.* v. 30, n. 443, p. 85, Mar 2015.

ENGEN, D. E.; HERR, H. W. Conservative management of a renal adenoma vs adenocarcinoma. *Br J Urol.* n. 53, p. 378, 1981.

ERTEMI, H. et al. Optimising renal cancer patients for nephron-sparing surgery: a review of pre-operative considerations and peri-operative techniques for partial nephrectomy. *Urologia.* v. 84, n. 1, p. 20, Feb 2017.

EVANS, R. G. Stability of tissue PO<sub>2</sub> in the face of altered perfusion: a phenomenon specific to the renal cortex and independent of resting renal oxygen consumption. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v. 38, n. 4, p. 247, Apr 2011.

FERGANY, A. F., HAFEZ, K. S.; NOVICK, A. C.: Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup. *J Urol.* n. 163, p. 442, 2000.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* v. 136, n. 5, p. E359, Mar 2015.

FERNÁNDEZ-MONCADA, I.; BARROS, L. F. Non-preferential fuelling of the Na(+)/K(+)-ATPase pump. *Biochem J.* v. 460, n. 3, p. 353, Jun 2014.

FRY, B. C. et al. Impact of renal medullary three-dimensional architecture on oxygen transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 307, n. 3, p. F263, Aug 2014.

FUNAHASHI, Y. et al. Comparison of warm and cold ischemia on renal function after partial nephrectomy. *Urology.* v. 84, n. 6, p. 1408, Dec 2014.

GARISTO, J. D. et al. Precise Clamping of Renal Artery with Endovascular Stents during Robotic Partial Nephrectomy: Technical Hints to Optimize Outcomes. *Urology.* v. S0090-4295, n. 18, p. 30279, Apr 2018.

GUERCI, P.; ERGIN, B.; INCE, C. The macro- and microcirculation of the kidney. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* v. 31, n. 3, p. 315, Sep 2017.

GOLDSTEIN, A. E.; ABESHOUSE, B. S. Partial resections of the kidney. A report of 6 cases and a review of the literature. *J Urol.* n. 38, p. 15, Jul 1937.

- GO, K. L. et al. Mitochondrial Dysfunction and Autophagy in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Biomed Res Int.* n. 2015, p. 183469, Dec 2015.
- HAN, J. et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* v. 15, n. 5, p. 481, May 2013.
- HANASAKI, Y., OGAWA, S., FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* v. 16, n. 6, p. 845, Jun 1994.
- HESS, E. et al. Surgery for the conservation of renal parenchyma. *J Urol.* n. 64, p. 175, Aug 1950.
- HERR, H. W. Partial nephrectomy for unilateral renal carcinoma and A normal contralateral kidney: 10-year followup. *J Urol.* n. 161, p. 33, Jan 1999.
- HERR, H. W. A history of partial nephrectomy for renal tumors. *J Urol.* v. 173, n. 3, p. 705, Mar 2005.
- HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *Int J Biochem Cell Biol.* n. 63, p. 16, Jun 2015.
- HOU, W.; JI, Z. Achieving zero ischemia in minimally invasive partial nephrectomy surgery. *Int J Surg.*; n. 18, p. 48, Jun 2015.
- HUANG, J. Q. et al. Role of glutathione peroxidase 1 in glucose and lipid metabolism-related diseases. *Free Radic Biol Med.* v. S0891-5849, n. 18, p. 30910, May 2018.
- JENA, N. R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci.* v. 37, n. 3, p. 503, Jul 2012.
- JHA, M. K. et al. Metabolic Connection of Inflammatory Pain: Pivotal Role of a Pyruvate Dehydrogenase Kinase-Pyruvate Dehydrogenase-Lactic Acid Axis. *J Neurosci.* v. 35, n. 42, p. 14353, Oct 2015.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. *Histologia básica.* 13ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- KAHRAMAN, A. et al. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Nephrol.* v. 16, n. 2, p. 219, Mar 2003.
- KAKOTI, B. et al. Resveratrol and ômega 3 fatty acid: its implications in cardiocascular diseases. *Frontier in Cardiovascular Medicine.* v.2, n. 38, p. 1, Dec 2015.
- KANAGASUNDARAM, N. S. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem.* n. 52 (Pt 2), p. 193, Mar 2015.

- KAUFMAN, D. P.; KNOHL, S. J. *Physiology, Glomerular Filtration Rate (GFR)*. Finland: Treasure Island, StatPearls Publishing, 2018.
- KAWABATA, K.; MUKAI, R.; ISHISAKA, A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food Funct.* v. 6, n. 5, p. 1399, May 2015.
- KAYE, K. W.; GOLDBERG, M. E. Applied anatomy of the kidney and ureter. *Urol Clin N Amer.* v. 9, p. 3, Feb 1982.
- KHADER, A. et al. Novel resveratrol analogues attenuate renal ischemic injury in rats. *J Surg Res.* v. 193, n. 2, p. 807, Feb 2015.
- KIM, D. K.; PARK, D. W.; RHA, K. H. Robot-assisted Partial Nephrectomy with the REVO-I Robot Platform in Porcine Models. *Eur Urol.* v. 69, n. 3, p. 541, Mar 2016.
- KINACI, M. K. et al. Effects of quercetin on apoptosis, NF- $\kappa$ B and NOS gene expression in renal ischemia/reperfusion injury. *Exp Ther Med.* v. 3, n. 2, p. 249, Feb 2012.
- KITADA, M.; KOYA, D. Renal protective effects of resveratrol. *Oxid Med Cell Longev.* v. 2013, p. 568093, Nov 2013.
- KONOPKA, C. L.; JURACH, A.; WENDER, O. C. B. Experimental model for the study of chronic renal ischemia in rats. Morphologic, histological and ultra- structural analysis. *Acta Cirúrgica Brasileira.* v. 22, p. 12, Jan 2007.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal.* v. 2013, p. 162750, Dec 2013.
- LI, J. et al. Resveratrol Alleviates Inflammatory Responses and Oxidative Stress in Rat Kidney Ischemia-Reperfusion Injury and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced NRK-52E Cells via the Nrf2/TLR4/NF- $\kappa$ B Pathway. *Cell Physiol Biochem.* v. 45, p. 1677-1689, Feb 2018.
- LICHT, M. R.; NOVICK, A. C. Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma. *J Urol.* v. 149, p. 1, Fall 1993.
- LIN, C. et al. Electrochemistry of Single Enzymes: Fluctuations of Catalase Activities. *J Phys Chem Lett.* v. 9, n. 11, p. 2814, May 2018.
- LIN, Y. et al. Neuroprotective effect of resveratrol on ischemia/reperfusion injury in rats through TRPC6/CREB pathways. *J Mol Neurosci.* v. 50, n. 3, p. 504, Jul 2013.
- LOMBARDO, E. et al. Protection of cells against oxidative stress by nanomolar levels of hydroxyflavones indicates a new type of intracellular antioxidant mechanism. *PLoS One.* v. 8, n. 4, p. e60796, Apr 2013.
- MARTINI, F.; TIMMONS, M. J.; TALLITSCH, R. B. *Anatomia humana*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MALEK, M.; NEMATBAKHSI, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* v. 4, n. 2, p. 20, Jun 2015.

MOMOZANE, T. et al. Carnosol suppresses interleukin-6 production in mouse lungs injured by ischemia-reperfusion operation and in RAW264.7 macrophages treated with lipopolysaccharide. *Biochem Cell Biol.* v. 96, n. 6, p. 769, Dec 2018.

NAM, S. et al. Development of Resveratrol-Loaded Herbal Extract-Based Nanocomposites and Their Application to the Therapy of Ovarian Cancer. *Nanomaterials (Basel).* v. 8; n. 6. pii: E384, May 2018.

NDREPEPA, G. Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* n. 493, p. 36, Jun 2019.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* v. 44, n. 10, p. 1125, Oct 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger.* 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOMAN, M. Z. et al. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol.* v. 309, n. 9, p. C569, Nov 2015.

PALIPOCH, S. A Review of Oxidative Stress in Acute Kidney Injury: Protective Role of Medicinal Plants-Derived Antioxidants. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* v. 10, n. 4, p. 88, May 2013.

PARK, D. J.; SHAH, F. A.; KOH, P. O. Quercetin attenuates neuronal cells damage in a middle cerebral artery occlusion animal model. *J Vet Med Sci.* v. 80, n. 4, p. 676. Apr 2018.

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

PATRA, A et al. Formulation and evaluation of mixed polymeric micelles of quercetin for treatment of breast, ovarian, and multidrug resistant cancers. *Int J Nanomedicine.* v. 16, n. 13, p. 2869, May 2018.

PRESTON, R. R.; WILSON, T. E. *Fisiologia ilustrada.* Porto Alegre: Artmed, 2014.

RIBEIRO, C. T. et al. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol.* v. 191, n. 5 Suppl, p. 1578, May 2014.

ROBSON, C. J. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol.* v. 89, p. 37, Jan 1963.

RUSSO, I. et al. Platelets, diabetes and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Diabetol.* v. 16, n. 1, p. 71, May 2017.



- SAMPAIO, F. J. B.; FAVORITO, L. A. Ureteropelvic junction stenosis: vascular anatomical background for endopyelotomy. *J Urol.* v. 150, p. 1787, Dec 1993.
- SAMPAIO, F. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Anatomic classification of the kidney collecting system for endourologic procedures. *J Endourol.* v. 2, p. 247, Jan 1988.
- SAMPAIO, F. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. 3-Dimensional and radiological pelvicaliceal anatomy for endourology. *J Urol.* v. 140 p. 1352, Dec 1988.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., JEMAL A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* v. 69, n. 1, p. 7, Jan 2019.
- SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *MIKROSKOPIE.* v. 26, n. 1, p. 57, Jun 1970.
- SCULLY C. G. et al. Detecting physiological systems with laser speckle perfusion imaging of the renal cortex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 304, n. 11, p. R929, Jun 2013.
- SECIN, F. P. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. *Adv Urol.* v. 2008, p. 102461, 2008.
- SENER, G. et al. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res.* v. 37, n. 7, p. 822, Oct 2006.
- SHIMIZU, K. et al. Resveratrol Prevents Warm Ischemia-Reperfusion Injury in Liver Grafts From Non-Heart-Beating Donor Rats. *Transplant Proc.* v. 48, n. 4, p. 1221, May 2016.
- SIDDIQUI, T. et al. Reactive oxygen species and anti-proteinases. *Arch Physiol Biochem.* v. 122, n. 1, p. 1, Dec 2016.
- SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* v. 4, p. 180, Jan 2015.
- SIMON, G. *Chirurgie der Nieren.* Stuttgart: Ferdinand Enke, vol. II, 1876.
- SIMMONS, M. N.; SCHREIBER, M.; GILL, I. S. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *J Urol.* v. 180, n. 1, p. 19, Jul 2008.
- SRINIVASAN, P. et al. Anti-diabetic activity of quercetin extracted from *Phyllanthus emblica* L. fruit: In silico and in vivo approaches. *J Pharm Anal.* v. 8, n. 2, p. 109, Apr 2018.
- SUN, M. S. et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* v. 2018, p. 3804979, Jan 2018.
- THOMPSON, R. H. et al. Comparison of warm ischemia versus no ischemia during partial nephrectomy on a solitary kidney. *Eur Urol.* v. 58, n. 3, p. 331, Sep 2010.

THOMPSON, R. H. et al. Renal function after partial nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. *Urology*. v. 79, n. 2, p. 356, Feb 2012.

TÓTH, Š. et al. Quercetin attenuates the ischemia reperfusion induced COX-2 and MPO expression in the small intestine mucosa. *Biomed Pharmacother*. v. 95, p. 346, Nov 2017.

TOVMASYAN, A.; REBOUCAS, J. S.; BENOVA, L. Simple biological systems for assessing the activity of superoxide dismutase mimics. *Antioxid Redox Signal*. v. 20, n. 15, p. 2416, May 2014.

UYLAŞ, M. U. et al. Quercetin dose affects the fate of hepatic ischemia and reperfusion injury in rats: An experimental research. *Int J Surg*. v. 53, p. 117, May 2018.

VALDIVIELSO, J. M. et al. Renal ischemia in the rat stimulates glomerular nitric oxide synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 280, n. 3, p. R771, Mar 2001.

VEYS, R. et al. Oncological and functional efficacy of nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy in renal cell carcinoma stages  $\geq$ cT1b: a single institution, matched analysis. *Cent European J Urol*. v. 71, n. 1, p. 48, Dec 2018.

VISHNU, N. et al. ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Mol Biol Cell*. v. 25, n. 3, p. 368, Feb 2014.

VOLPE, A. et al. Renal Ischemia and Function After Partial Nephrectomy: A Collaborative Review of the Literature. *Eur Urol*. v. 68, n. 1, p. 61, Jul 2015.

WANG, D. et al. Quercetin protects against inflammation, MMP-2 activation and apoptosis induction in rat model of cardiopulmonary resuscitation through modulating Bmi-1 expression. *Mol Med Rep*. v. 18, n. 1, p. 610, Jul 2018.

WANG, H. et al. Tubuloglomerular and connecting tubuloglomerular feedback during inhibition of various Na transporters in the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*. v. 308, n. 9, p. F1026, May 2015.

WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, R. Alleviation of Acute Lung Injury in Rats with Sepsis by Resveratrol via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Nuclear Factor-Erythroid 2 Related Factor 2/Heme Oxygenase-1 (PI3K/Nrf2/HO-1) Pathway. *Med Sci Monit*. v. 30, n. 24, p. 3604, May 2018.

WIETZIKOSKI, E. G. G. et al. Tadalafil protector effect during ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. v. 32, n. 11, p. 973, Nov 2017.

XIE, Y. et al. Ischemic Preconditioning Promotes Autophagy and Alleviates Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Biomed Res Int*. v. 2018, p. 8353987, Jan 2018.

XU, K. et al. Resveratrol Modulates Apoptosis and Autophagy Induced by High Glucose and Palmitate in Cardiac Cells. *Cell Physiol Biochem*. v. 46, n. 5, p. 2031, Apr 2018.

YSEBAERT, D. K. et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*. v. 15, p. 1562, Oct 2000.

ZABELL, J. R. et al. Renal Ischemia and Functional Outcomes Following Partial Nephrectomy. *Urol Clin North Am*. v. 44, n. 2, p. 243, May 2017.

ZHANG, C. et al. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 26, n. 3, p. 475, Mar 2006.

ZWAINI, Z. et al. Role of Complement Properdin in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Curr Gene Ther*. v. 17, n. 6, p. 411, Dec 2017.

## **ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética**



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do parênquima renal após isquemia/reperfusão e efeito protetor do resveratrol e da quercetina em ratos", registrada com o nº 040/2017, sob a responsabilidade de **Diogo Benchimol de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 25/09/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	300 g / 9 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Setembro de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ

<http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica>  
[ceua.ibrag@yahoo.com.br](mailto:ceua.ibrag@yahoo.com.br)

**ANEXO B - Artigo publicado**

## ARTICLE IN PRESS

The American Journal of Surgery xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

The American Journal of Surgery

journal homepage: [www.americanjournalofsurgery.com](http://www.americanjournalofsurgery.com)

## Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol

Gabriela F. Buys-Gonçalves<sup>a</sup>, Francisco J.B. Sampaio<sup>a</sup>, Maria Eduarda M. Silva<sup>b</sup>,  
Marco A. Pereira-Sampaio<sup>a,c</sup>, Diogo B. De Souza<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Department of Veterinary Medicine, Educational Foundation Serra Dos Órgãos, Teresópolis, Brazil

<sup>c</sup> Department of Morphology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 August 2019

Received in revised form

10 February 2020

Accepted 14 February 2020

## Keywords:

Rat kidney

Ischemia, resveratrol

Resveratrol  
Histomorphometry

## ABSTRACT

**Background:** The objective of this study is to quantitatively evaluate the protective effects of resveratrol for using during renal warm ischemia.

**Methods:** Rats were allocated into 4 groups: Sham, Sham Resveratrol, Ischemia, Ischemia Resveratrol. Sham Resveratrol and Ischemia Resveratrol received resveratrol before surgery. Ischemia and Ischemia Resveratrol had renal vessels clamped. Animals were euthanized four weeks after. Serum urea and creatinine were measured. Renal weight and volume, cortex-non-cortex areas ratio, cortical volume, glomerular volumetric density, volume-weighted mean glomerular volume and number of glomeruli per kidney were evaluated.

**Results:** Serum urea in Ischemia increased by 10.4% compared to Sham and no differences were observed among Ischemia Resveratrol and sham groups. The glomerular volumetric density and number of glomeruli of Ischemia were lower than Sham but Ischemia Resveratrol had no difference compared to sham groups.

**Conclusions:** Preoperative administration of resveratrol has renoprotective effects, preventing the glomerular number reduction observed in warm ischemia.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

The diagnosis of small renal cell carcinoma has been rising over the recent years,<sup>1</sup> and partial nephrectomy is being increasingly performed to treat this type of tumor.<sup>1,2</sup> Nephron sparing surgery provides oncological outcomes comparable to those of radical nephrectomy for small renal cell masses with better preservation of renal function.<sup>2</sup> Therefore, partial nephrectomy has been considered the gold standard treatment for localized small renal masses.<sup>3</sup>

Renal warm ischemia is commonly performed during partial nephrectomy to achieve a bloodless surgical field. However, the ischemia/reperfusion injury is considered an important issue that may lead to renal failure.<sup>4,5</sup> Although renal ischemia has gained importance with the recent increase in partial nephrectomies, it is also an important issue during renal transplantation and

anatomic nephrolithotomy situations.<sup>6,7</sup> Therefore, drugs that may protect the kidney during the perioperative<sup>8,9</sup> and postoperative periods<sup>10,11</sup> of these procedures are warranted.

Resveratrol is a bioflavonoid whose antioxidant effects have been already proved on different organs and disease conditions,<sup>12–15</sup> including the kidney.<sup>16–18</sup> This polyphenol also has protective effects against ischemia/reperfusion injury in various organs and tissues.<sup>19–21</sup> Some studies showed resveratrol protective effects during renal warm ischemia,<sup>22–25</sup> however long-term and quantitative analysis demonstrating the prevention of glomeruli loss were not reported yet.

The objective of this study was to quantitatively evaluate the possible long-term protective effects of resveratrol for using during renal warm ischemia in a rat model.

## Methods

All experiments were performed according to the national and international laws for scientific use of animals, and this project was

\* Corresponding author. Urogenital Research Unit – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, Brazil  
E-mail address: [desouza.db@gmail.com](mailto:desouza.db@gmail.com) (D.B. De Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>  
0002-9610/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: Buys-Gonçalves GF et al., Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol, The American Journal of Surgery, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>

formally approved by the local Ethics Committee for animal experimentation.

Thirty-nine male Wistar rats (9 weeks of age) were used. The animals were randomly allocated into 4 groups: Sham (S) – group submitted to laparotomy and dissection of the renal pedicle; Sham Resveratrol (SR) – group treated with resveratrol and submitted to the same procedures of group Sham; Ischemia (I) – group submitted to renal warm ischemia; Ischemia Resveratrol (IR) – group treated with resveratrol and submitted to renal warm ischemia. Groups SR and IR received 30 mg/kg of resveratrol (Resveratrol, Terratec, Santa Clara, USA) intraperitoneally 60 min before the surgical procedure, while untreated groups (S and I) received saline injections.

All rats were anesthetized via intramuscular ketamine (Cetamin, Syntec, Santana de Parnaíba, Brazil, 100 mg/kg) and xylazine (Xilazin, Syntec, 20 mg/kg). Under aseptic technique a ventral midline incision was used to expose the abdominal viscera, which were displaced to expose the left kidney. The left renal artery and vein were isolated by blunt dissection. In animals of groups I and IR the renal vessels were clamped for 60 min, while in groups S and SR the pedicle was dissected but no ischemia was induced. All groups remained anesthetized for 60 min, when the abdominal viscera were replaced, and the incision was covered with moistened gauze. At the end of this period, vascular clamps were removed, and reperfusion was observed in groups I and IR. For all groups abdominal cavity was closed routinely.

The animals were euthanized 4 weeks after surgery by anesthetic overdose (Isoflurane, BioChimico, Rio de Janeiro, Brazil), when blood sample was collected by cardiac puncture. Urea and creatinine serum levels were determined by biochemical analysis (automated enzymatic method).

Left kidneys were collected and fixed in 4% buffered formaldehyde. The kidneys were weighed, and the renal volume was measured by the Scherle's method.<sup>26</sup> The cortex-non-cortex areas ratio (C-NC) was calculated by the Cavalieri method.<sup>27–29</sup> The

cortical volume (CV) was calculated by multiplying the renal volume by the C-NC.<sup>29</sup>

Random samples from all 39 kidneys were collected according the orientator method.<sup>30</sup> Briefly, three randomly-picked non-sequential transversal sections were placed with the cut surface facing down and, again at random, cut perpendicularly to the first plane. Again, the cut surface is faced down and a final randomly perpendicular cut is applied. From the twelve fragments obtained, five are randomly picked and used for analysis. These were processed for paraffin embedding, sectioned at 5 µm thickness, and stained with hematoxylin and eosin.

From each kidney, 25 histological fields, obtained from five different sections of the renal cortex, were examined. Glomerular volumetric density (Vv[Glom]), which indicates the proportional volume occupied by the glomeruli in the cortex, was estimated by the point-counting method.<sup>27–29</sup> The volume-weighted mean glomerular volume (VWGV) was estimated by using the point-sampled intercepts method.<sup>27–29</sup> The estimation of the total number of glomeruli per kidney (N[Glom]) was achieved through the formula  $CV \times Vv[Glom] / VWGV$ .<sup>29</sup>

The quantitative data were tested by D'Agostino & Pearson normality test and considered normally distributed. Further, all results were compared by one-way ANOVA with Tukey's post-test. Analyses were performed using GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, San Diego, USA). All results were considered significant when the value of  $p < 0.05$ .

All histological fields were examined microscopically for the characterization of histopathological changes by an experienced veterinary pathologist who was unaware of the treatment conditions.

## Results

The urea serum levels in group I was 10.4% increased in relation to the group S ( $p = 0.01$ ). No differences were observed among the other groups. Also, no difference was observed regarding the serum creatinine analysis.

Although no difference was noted regarding kidney weight, kidney volume, and VWGV among the groups, other morphological parameters presented important alterations. The C-NC of the group I was decreased when compared to groups S and SR (8.1% and 10.5% respectively). On the other hand, the C-NC of the group IR did not present significant differences when compared to group I, but it decreased 4.0% in comparison to group S and 6.6% in comparison to group SR. The analysis of CV presented significant difference among the groups ( $p = 0.0401$ ), as determined by ANOVA, but the only difference was a 17.7% increase in group SR, in comparison to group S; no difference among other groups was found.

The Vv[Glom] of the group I was 32.7% reduced in comparison to group S and 27.0% reduced in comparison to group SR. Again, the treatment with resveratrol in animals submitted to renal ischemia (group IR) prevented the reduction of Vv[Glom] observed in non-treated animals. In group IR no difference was observed in comparison to groups S and SR, while a 49.1% increase was noted in comparison to group I.

The ischemic untreated kidneys (group I) presented a reduced number of glomeruli in comparison to groups S and SR (26.0% and 26.7%, respectively). The treatment with resveratrol, in group IR, prevented this glomeruli loss, as this group showed no difference to groups S and SR, but 35.6% increased N[Glom] in comparison to group I. All quantitative data is presented in Table 1 and represented in Figs. 1 and 2.

Severe histological alterations presented by the untreated ischemic kidneys (group I) such as glomerular degeneration, loss of the cortical region, cortical and medullary congestion, presence of amorphous material in the tubular lumen, amorphous eosinophilic

material in the medullary region, loss of cortical architecture, mononuclear infiltration and apparent loss of glomeruli were minimal in the resveratrol treated ischemic kidneys (group IR). Fig. 1 illustrates these findings.

## Discussion

Considering that ischemic injury leads to a huge production of reactive oxygen species with consequent morphological and functional damages,<sup>8–10</sup> the use of antioxidants is a reasonable therapeutic option for prevention of the renal injury after warm ischemia during partial nephrectomy. With the advance of laparoscopic and robotic partial nephrectomy, the use of cold ischemia during nephron-sparing surgeries drastically decreased.<sup>31</sup> Further, the benefits of using of mannitol, which was the most used nephroprotective agent, was recently questioned, with divergent information regarding its effectiveness<sup>11,32</sup>. Thus, finding other drugs that could replace mannitol in the future is warranted.

Many studies showed that antioxidants can prevent ischemic<sup>8–11,13,16,19–25</sup> or non-ischemic<sup>12,14–18</sup> oxidative lesions in different organs. Resveratrol is a promising antioxidant, which showed renal protecting effects after renal warm ischemia.<sup>10,16,22–25</sup> The results of our study demonstrated that resveratrol was efficient to prevent the glomerular loss, since N [Glom] was reduced only in animals submitted to ischemia and non-treated with resveratrol.

Serum urea values were increased in group I, what was unexpected for an animal with untouched contralateral kidney. Nevertheless, the treatment with resveratrol prevented this urea levels

**Table 1**  
Morphological data of left kidneys and functional serological data of rats subjected to sham surgery or to left renal warm ischemia with or without resveratrol treatment.

	S	SR	I	IR	p value
Urea (mg/dl)	41.5 ± 1.7	44.8 ± 2.6	45.8 ± 3.7 <sup>a</sup>	43.3 ± 2.1	0.0108*
Creatinine (mg/dl)	0.44 ± 0.01	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.2117
Kidney weight (g)	1.08 ± 0.15	1.23 ± 0.18	1.23 ± 0.21	1.12 ± 0.14	0.1588
Kidney volume (ml)	1.06 ± 0.15	1.21 ± 0.18	1.18 ± 0.18	1.13 ± 0.14	0.1352
Cortex-non-cortex areas ratio	0.74 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.68 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>ab</sup>	<0.0001*
Cortical volume (ml)	0.79 ± 0.09	0.93 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.11	0.81 ± 0.10	0.0401*
Vv[Glom] (%)	5.99 ± 0.77	5.52 ± 1.05	4.03 ± 0.46 <sup>ab</sup>	6.01 ± 0.65 <sup>c</sup>	<0.0001*
VWGV (×10 <sup>3</sup> μm <sup>3</sup> )	15.09 ± 1.79	16.46 ± 1.6	14.36 ± 2.08	15.71 ± 2.41	0.1530
Number of glomeruli per kidney (×10 <sup>3</sup> )	31.50 ± 4.90	31.80 ± 8.7	23.30 ± 4.10 <sup>ab</sup>	31.60 ± 6.90 <sup>c</sup>	0.0121*

Data expressed as mean ± S.D. Vv[Glom]: Glomerular volumetric density; VWGV: Volume-weighted glomerular volume; S: Group submitted to sham surgery; SR: Group sham treated with resveratrol; I: Group submitted to 60 min of renal warm ischemia; IR: Group submitted to warm ischemia treated with resveratrol. a: different from group S; b: different from group SR; c: different from group I. \*: significant p value.

rising in group IR. These findings are in accordance to previous studies performed in single-kidney models, what reinforce the nephroprotective effects of resveratrol after renal warm ischemia in the rat kidney.<sup>23</sup> Severe tissue damage presented by untreated ischemic kidneys was alleviated by preventive treatment with resveratrol, which has also been reported in previous studies.<sup>22–25</sup> However, we believe that the main goal of the present study was the unbiased quantitative analysis of the morphometrical aspects of the kidney submitted to ischemia and the long-term protective effects of resveratrol.

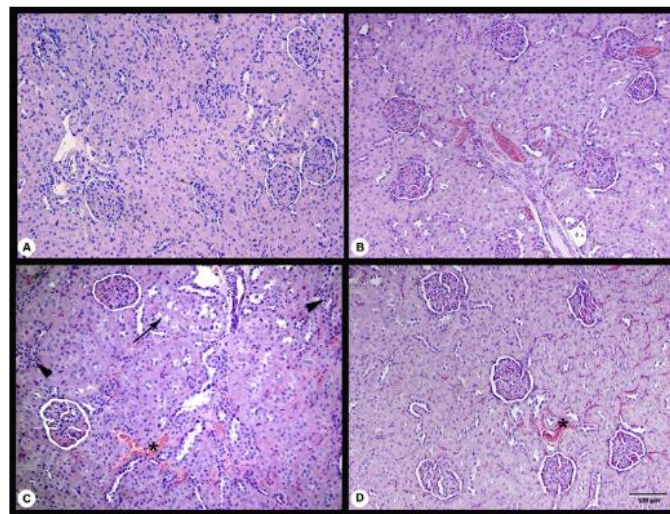
As the goal of partial nephrectomy is removing renal tumors, sparing as much nephrons as possible,<sup>2–5,33</sup> it is reasonable that an unbiased determination of the glomerular number (which is very correspondent to nephron number) is the end-point that should be studied to verify if surgical goal was achieved.<sup>11,27–29</sup> To the best of our knowledge, this study is the first one to report long-term effects of resveratrol preventing the glomerular losses after renal warm ischemia.

The model used in the present study is widely used and known to induce morphological alterations. The induction of 60 min of

warm ischemia in rat kidneys was previously reported as leading to glomerular reduction, as analyzed by stereological methods.<sup>27</sup> This was confirmed in the present study, as we observed a decrease in the C-NC, Vv[Glom] and N[Glom] in group I, in comparison to control group.

The most important results were those which pointed out that resveratrol prevented the glomerular loss after ischemic injury. The values of Vv[Glom] and N[Glom] in animals submitted to renal ischemia and treated with resveratrol were not different from those of the control group, but different from the group of animals that only suffered renal ischemia, which showed values of Vv[Glom] and N[Glom] significantly lower. Furthermore, the control group treated with resveratrol did not present any renal changes or noticeable side effects on the general state of animals. These results suggest that resveratrol could be a potential renal protector when administered in a patient who will be submitted to renal warm ischemia, and may have a great impact, decreasing the incidence of kidney chronic disease after the treatment of small renal mass.

Further, previously published studies showed the protective effects of resveratrol in a short-term period, as the analysis of these



**Fig. 1.** Renal cortex photomicrographs of kidneys from the experimental groups. A) Group submitted to sham surgery; B) Group sham treated with resveratrol; C) Group submitted to 60 min of renal warm ischemia; D) Group submitted to 60 min of renal warm ischemia treated with resveratrol. Arrow heads depicts mononuclear inflammatory infiltrate, Arrow depicts tubular degeneration, and asterisk (\*) depicts congestion areas. Hematoxylin and eosin, 200x.

Please cite this article as: Buys-Gonçalves GF et al., Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol, The American Journal of Surgery, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>



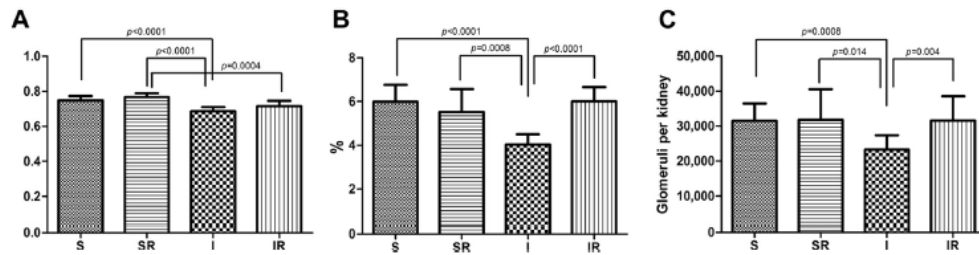


Fig. 2. Quantitative results of kidneys from group submitted to sham surgery (S), group sham treated with resveratrol (SR), group submitted to 60 min of renal warm ischemia (I), and group submitted to warm ischemia treated with resveratrol (IR). A) Cortex-non-cortex areas ratio (C-NC). B) Glomerular volumetric density (Wv[Glom]). C) Number of glomeruli per kidney (N[Glom]). Bars represents means  $\pm$  standard deviation.

studies were performed 24 h after renal ischemia, in both single-kidney or double-kidney models.<sup>22–25</sup> The present study added information to this topic, analyzing the kidneys 30 days after the ischemic injury, and demonstrating that the protective effects of resveratrol are permanent.

One limitation of the study is that its results cannot be directly transposed to humans as the pathophysiological responses are different among rodents and humans. Although the rat model of renal warm ischemia is the most commonly used, this is still an experimental setting, with several differences to the clinical setting. Future clinical studies investigating the use of resveratrol as a nephroprotective drug in patients submitted to partial nephrectomy with warm ischemia are warranted.

## Conclusion

The conclusion of the present study is that preoperative administration of resveratrol has renoprotective effects, preventing the glomerular number reduction observed when kidney is submitted to warm ischemia. These results suggest that this drug may improve postoperative renal function in patients submitted to partial nephrectomy with warm ischemia.

## Financial support/acknowledgments

This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES), and the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

## Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>.

## References

- Rossi SH, Klatte T, Usher-Smith J, Stewart GD. Epidemiology and screening for renal cancer. *World J Urol*. 2018;36:1341–1353.
- Cai Y, Li HZ, Zhang YS. Comparison of partial and radical laparoscopic nephrectomy: long-term outcomes for clinical T1b renal cell carcinoma. *Urol J*. 2018;15:16–20.
- Campbell S, Uzzo RG, Allaf ME, et al. Renal mass and localized renal cancer: AUA guideline. *J Urol*. 2017;198:520–529.
- Lee H, Song BD, Byun SS, Lee SE, Hong SK. Impact of warm ischaemia time on postoperative renal function after partial nephrectomy for clinical T1 renal cell carcinoma: a propensity score-matched study. *BJU Int*. 2018;121:46–52.
- Zabell JR, Wu J, Suk-Ouichai C, Campbell SC. Renal ischemia and functional outcomes following partial nephrectomy. *Urol Clin*. 2017;44:243–255.
- Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19:395–400.
- Giedelman C, Arriaga J, Carmona O, et al. Laparoscopic anastrophic nephrolithotomy: developments of the technique in the era of minimally invasive surgery. *J Endourol*. 2012;26:444–450.
- Dennis JM, Witting PK. Protective role for antioxidants in acute kidney disease. *Nutrients*. 2017;9(7):E718.
- Ozkan TA, Karakoyunlu N, Polat R, et al. An evaluation of the protective effect of esomeprazole in an experimental model of renal ischemia-reperfusion. *Int Urol Nephrol*. 2018;50:217–223.
- Xiao Z, Chen C, Meng T, Zhang W, Zhou Q. Resveratrol attenuates renal injury and fibrosis by inhibiting transforming growth factor- $\beta$  pathway on matrix metalloproteinase7. *Exp Biol Med*. 2016;241:140–146.
- Damasco-Ferreira JA, Abreu LAS, Bechara GR, et al. Mannitol reduces nephron loss after warm renal ischemia in a porcine model. *BMC Urol*. 2018;18:16.
- Pangeni R, Sahni JK, Ali J, Sharma S, Baboota S. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11:1285–1298.
- Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol*. 2014;191:1578–1584.
- Castro OW, Upadhyay D, Kodali M, Shetty AK. Resveratrol for easing status epilepticus induced brain injury, inflammation, epileptogenesis, and cognitive and memory dysfunction—are we there yet? *Front Neuro*. 2017;8:603.
- Nunes S, Danesi F, Del Rio D, Silva P. Resveratrol and inflammatory bowel disease: the evidence so far. *Nutr Res Rev*. 2018;31(1):85–97.
- Kitada M, Koya D. Renal protective effects of resveratrol. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:568093.
- Xu XH, Ding DF, Yong HJ, et al. Resveratrol transcriptionally regulates miRNA-18a-5p expression ameliorating diabetic nephropathy via increasing autophagy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21:4952–4965.
- Abharzanjani F, Afshar M, Hemmati M, Moossavi M. Short-term high dose of quercetin and resveratrol alters aging markers in human kidney cells. *Int J Prev Med*. 2017;8:64.
- Lin Y, Chen F, Zhang J, et al. Neuroprotective effect of resveratrol on ischemia/reperfusion injury in rats through TRPC6/CREB pathways. *J Mol Neurosci*. 2013;50:504–513.
- Dong WT, Li F, Pan Z, et al. Resveratrol ameliorates subacute intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2013;185:182–189.
- Shimizu K, Miyagi S, Miyazawa K, et al. Resveratrol prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donor rats. *Transplant Proc*. 2016;48:1221–1225.
- Bertelli AA, Migliori M, Panichi V, et al. Resveratrol, a component of wine and grapes, in the prevention of kidney disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:230–238.
- Sener G, Tuğtepe H, Yüksel M, Cetinel S, Gedik N, Yeğen BC. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res*. 2006;37:822–829.
- Khader A, Yang WL, Kunczewitch M, et al. Novel resveratrol analogues attenuate renal ischemic injury in rats. *J Surg Res*. 2015;193:807–815.
- Li J, Li L, Wang S, et al. Resveratrol alleviates inflammatory responses and oxidative stress in rat kidney ischemia-reperfusion injury and H2O2-induced NRK-52e cells via the Nr2/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45:1677–1689.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26:57–60.
- Bagetti-Filho HJ, Sampaio FJ, Marques RG, Pereira-Sampaio MA. Different from renal artery only clamping, artery and vein clamping causes a significant

Please cite this article as: Buys-Gonçalves GF et al., Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol, *The American Journal of Surgery*, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>

- reduction in number of rat glomeruli during warm ischemia. *J Endourol.* 2012;26:1335–1339.
28. Damasceno-Ferreira JA, Bechara GR, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJB, Souza DB. The relationship between renal warm ischemia time and glomerular loss. An experimental study in a pig model. *Acta Cir Bras.* 2017;32:334–341.
  29. Assunção RF, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJB, de Souza DB. Does a ureteral obstruction affect the contralateral kidney morphology? A stereological analysis in a rodent model. *Urol Int.* 2018;100:327–332.
  30. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Möller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc.* 1990;159:301–317.
  31. Gill IS, Abreu SC, Desai MM, et al. Laparoscopic ice slush renal hypothermia for partial nephrectomy: the initial experience. *J Urol.* 2003;170:52–56.
  32. Spaliviero M, Power NE, Murray KS, et al. Intravenous mannitol versus placebo during partial nephrectomy in patients with normal kidney function: a double-blind, clinically-integrated, randomized trial. *Eur Urol.* 2018;73:53–59.
  33. Berczi C, Thomas B, Bacso Z, Flasko T. Long-term oncological and functional outcomes of partial nephrectomy in solitary kidneys. *Clin Genitourin Canc.* 2016;14:e275–e281.

Please cite this article as: Buys-Gonçalves GF et al., Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol, *The American Journal of Surgery*, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>

## ANEXO C - 2º artigo publicado

## ARTICLE IN PRESS

The American Journal of Surgery xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

The American Journal of Surgery

journal homepage: [www.americanjournalofsurgery.com](http://www.americanjournalofsurgery.com)

## Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol

Gabriela F. Buys-Gonçalves<sup>a</sup>, Francisco J.B. Sampaio<sup>a</sup>, Maria Eduarda M. Silva<sup>b</sup>,  
Marco A. Pereira-Sampaio<sup>a,c</sup>, Diogo B. De Souza<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Department of Veterinary Medicine, Educational Foundation Serra Dos Órgãos, Teresópolis, Brazil

<sup>c</sup> Department of Morphology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 August 2019

Received in revised form

10 February 2020

Accepted 14 February 2020

#### Keywords:

Rat kidney

Warm ischemia

Resveratrol

Histomorphometry

### ABSTRACT

**Background:** The objective of this study is to quantitatively evaluate the protective effects of resveratrol for using during renal warm ischemia.

**Methods:** Rats were allocated into 4 groups: Sham, Sham Resveratrol, Ischemia, Ischemia Resveratrol. Sham Resveratrol and Ischemia Resveratrol received resveratrol before surgery. Ischemia and Ischemia Resveratrol had renal vessels clamped. Animals were euthanized four weeks after. Serum urea and creatinine were measured. Renal weight and volume, cortex-non-cortex areas ratio, cortical volume, glomerular volumetric density, volume-weighted mean glomerular volume and number of glomeruli per kidney were evaluated.

**Results:** Serum urea in Ischemia increased by 10.4% compared to Sham and no differences were observed among Ischemia Resveratrol and sham groups. The glomerular volumetric density and number of glomeruli of Ischemia were lower than Sham but Ischemia Resveratrol had no difference compared to sham groups.

**Conclusions:** Preoperative administration of resveratrol has renoprotective effects, preventing the glomerular number reduction observed in warm ischemia.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

The diagnosis of small renal cell carcinoma has been rising over the recent years,<sup>1</sup> and partial nephrectomy is being increasingly performed to treat this type of tumor.<sup>1,2</sup> Nephron sparing surgery provides oncological outcomes comparable to those of radical nephrectomy for small renal cell masses with better preservation of renal function.<sup>2</sup> Therefore, partial nephrectomy has been considered the gold standard treatment for localized small renal masses.<sup>3</sup>

Renal warm ischemia is commonly performed during partial nephrectomy to achieve a bloodless surgical field. However, the ischemia/reperfusion injury is considered an important issue that may lead to renal failure.<sup>4,5</sup> Although renal ischemia has gained importance with the recent increase in partial nephrectomies, it is also an important issue during renal transplantation and

anatomic nephrolithotomy situations.<sup>6,7</sup> Therefore, drugs that may protect the kidney during the perioperative<sup>8,9</sup> and post-operative periods<sup>10,11</sup> of these procedures are warranted.

Resveratrol is a bioflavonoid whose antioxidant effects have been already proved on different organs and disease conditions,<sup>12–15</sup> including the kidney.<sup>16–18</sup> This polyphenol also has protective effects against ischemia/reperfusion injury in various organs and tissues.<sup>19–21</sup> Some studies showed resveratrol protective effects during renal warm ischemia,<sup>22–25</sup> however long-term and quantitative analysis demonstrating the prevention of glomeruli loss were not reported yet.

The objective of this study was to quantitatively evaluate the possible long-term protective effects of resveratrol for using during renal warm ischemia in a rat model.

### Methods

All experiments were performed according to the national and international laws for scientific use of animals, and this project was

\* Corresponding author. Urogenital Research Unit – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, Brazil.  
E-mail address: [desouza.db@gmail.com](mailto:desouza.db@gmail.com) (D.B. De Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>  
0002-9610/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: Buys-Gonçalves GF et al., Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol, The American Journal of Surgery, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>

formally approved by the local Ethics Committee for animal experimentation.

Thirty-nine male Wistar rats (9 weeks of age) were used. The animals were randomly allocated into 4 groups: Sham (S) – group submitted to laparotomy and dissection of the renal pedicle; Sham Resveratrol (SR) – group treated with resveratrol and submitted to the same procedures of group Sham; Ischemia (I) - group submitted to renal warm ischemia; Ischemia Resveratrol (IR) - group treated with resveratrol and submitted to renal warm ischemia. Groups SR and IR received 30 mg/kg of resveratrol (Resveratrol, Terraternal, Santa Clara, USA) intraperitoneally 60 min before the surgical procedure, while untreated groups (S and I) received saline injections.

All rats were anesthetized via intramuscular ketamine (Cetamin, Syntec, Santana de Parnaíba, Brazil, 100 mg/kg) and xylazine (Xilazin, Syntec, 20 mg/kg). Under aseptic technique a ventral midline incision was used to expose the abdominal viscera, which were displaced to expose the left kidney. The left renal artery and vein were isolated by blunt dissection. In animals of groups I and IR the renal vessels were clamped for 60 min, while in groups S and SR the pedicle was dissected but no ischemia was induced. All groups remained anesthetized for 60 min, when the abdominal viscera were replaced, and the incision was covered with moistened gauze. At the end of this period, vascular clamps were removed, and reperfusion was observed in groups I and IR. For all groups abdominal cavity was closed routinely.

The animals were euthanized 4 weeks after surgery by anesthetic overdose (Isoflurane, BioChimico, Rio de Janeiro, Brazil), when blood sample was collected by cardiac puncture. Urea and creatinine serum levels were determined by biochemical analysis (automated enzymatic method).

Left kidneys were collected and fixed in 4% buffered formaldehyde. The kidneys were weighed, and the renal volume was measured by the Scherle's method.<sup>26</sup> The cortex-non-cortex areas ratio (C-NC) was calculated by the Cavalieri method.<sup>27–29</sup> The cortical volume (CV) was calculated by multiplying the renal volume by the C-NC.<sup>29</sup>

Random samples from all 39 kidneys were collected according the orientator method.<sup>30</sup> Briefly, three randomly-picked non-sequential transversal sections were placed with the cut surface facing down and, again at random, cut perpendicularly to the first plane. Again, the cut surface is faced down and a final randomly

perpendicular cut is applied. From the twelve fragments obtained, five are randomly picked and used for analysis. These were processed for paraffin embedding, sectioned at 5 µm thickness, and stained with hematoxylin and eosin.

From each kidney, 25 histological fields, obtained from five different sections of the renal cortex, were examined. Glomerular volumetric density (Vv[Glom]), which indicates the proportional volume occupied by the glomeruli in the cortex, was estimated by the point-counting method.<sup>27–29</sup> The volume-weighted mean glomerular volume (VWGV) was estimated by using the point-sampled intercepts method.<sup>27–29</sup> The estimation of the total number of glomeruli per kidney (N[Glom]) was achieved through the formula  $CV \times Vv[Glom] / VWGV$ .<sup>29</sup>

The quantitative data were tested by D'Agostino & Pearson normality test and considered normally distributed. Further, all results were compared by one-way ANOVA with Tukey's post-test. Analyses were performed using GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, San Diego, USA). All results were considered significant when the value of  $p < 0.05$ .

All histological fields were examined microscopically for the characterization of histopathological changes by an experienced veterinary pathologist who was unaware of the treatment conditions.

## Results

The urea serum levels in group I was 10.4% increased in relation to the group S ( $p = 0.01$ ). No differences were observed among the other groups. Also, no difference was observed regarding the serum creatinine analysis.

Although no difference was noted regarding kidney weight, kidney volume, and VWGV among the groups, other morphological parameters presented important alterations. The C-NC of the group I was decreased when compared to groups S and SR (8.1% and 10.5% respectively). On the other hand, the C-NC of the group IR did not present significant differences when compared to group I, but it decreased 4.0% in comparison to group S and 6.6% in comparison to group SR. The analysis of CV presented significant difference among the groups ( $p = 0.0401$ ), as determined by ANOVA, but the only difference was a 17.7% increase in group SR, in comparison to group S; no difference among other groups was found.

The Vv[Glom] of the group I was 32.7% reduced in comparison to group S and 27.0% reduced in comparison to group SR. Again, the treatment with resveratrol in animals submitted to renal ischemia (group IR) prevented the reduction of Vv[Glom] observed in non-treated animals. In group IR no difference was observed in comparison to groups S and SR, while a 49.1% increase was noted in comparison to group I.

The ischemic untreated kidneys (group I) presented a reduced number of glomeruli in comparison to groups S and SR (26.0% and 26.7%, respectively). The treatment with resveratrol, in group IR, prevented this glomeruli loss, as this group showed no difference to groups S and SR, but 35.6% increased N[Glom] in comparison to group I. All quantitative data is presented in Table 1 and represented in Figs. 1 and 2.

Severe histological alterations presented by the untreated ischemic kidneys (group I) such as glomerular degeneration, loss of the cortical region, cortical and medullary congestion, presence of amorphous material in the tubular lumen, amorphous eosinophilic material in the medullary region, loss of cortical architecture, mononuclear infiltration and apparent loss of glomeruli were minimal in the resveratrol treated ischemic kidneys (group IR). Fig. 1 illustrates these findings.

## Discussion

Considering that ischemic injury leads to a huge production of reactive oxygen species with consequent morphological and functional damages,<sup>9–10</sup> the use of antioxidants is a reasonable therapeutic option for prevention of the renal injury after warm ischemia during partial nephrectomy. **With the advance of laparoscopic and robotic partial nephrectomy, the use of cold ischemia during nephron-sparing surgeries drastically decreased.<sup>31</sup> Further, the benefits of using of mannitol, which was the most used nephroprotective agent, was recently questioned, with divergent information regarding its effectiveness<sup>11,32</sup>. Thus, finding other drugs that could replace mannitol in the future is warranted.**

Many studies showed that antioxidants can prevent ischemic<sup>8–11,13,16,19–25</sup> or non-ischemic<sup>12,14–18</sup> oxidative lesions in different organs. Resveratrol is a promising antioxidant, which showed renal protecting effects after renal warm ischemia.<sup>10,16,22–25</sup> The results of our study demonstrated that resveratrol was efficient to prevent the glomerular loss, since N [Glom] was reduced only in animals submitted to ischemia and non-treated with resveratrol.

Serum urea values were increased in group I, what was unexpected for an animal with untouched contralateral kidney. Nevertheless, the treatment with resveratrol prevented this urea levels

**Table 1**  
Morphological data of left kidneys and functional serological data of rats subjected to sham surgery or to left renal warm ischemia with or without resveratrol treatment.

	S	SR	I	IR	p value
Urea (mg/dl)	41.5 ± 1.7	44.8 ± 2.6	45.8 ± 3.7 <sup>a</sup>	43.3 ± 2.1	0.0108*
Creatinine (mg/dl)	0.44 ± 0.01	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.2117
Kidney weight (g)	1.08 ± 0.15	1.23 ± 0.18	1.23 ± 0.21	1.12 ± 0.14	0.1588
Kidney volume (ml)	1.06 ± 0.15	1.21 ± 0.18	1.18 ± 0.18	1.13 ± 0.14	0.1352
Cortex-non-cortex areas ratio	0.74 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.68 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>ab</sup>	<0.0001*
Cortical volume (ml)	0.79 ± 0.09	0.93 ± 0.14 <sup>d</sup>	0.82 ± 0.11	0.81 ± 0.10	0.0401*
Vv[Glom] (%)	5.99 ± 0.77	5.52 ± 1.05	4.03 ± 0.46 <sup>ab</sup>	6.01 ± 0.65 <sup>c</sup>	<0.0001*
VWGV (×10 <sup>5</sup> μm <sup>3</sup> )	15.09 ± 1.79	16.46 ± 1.6	14.36 ± 2.08	15.71 ± 2.41	0.1530
Number of glomeruli per kidney (×10 <sup>3</sup> )	31.50 ± 4.90	31.80 ± 8.7	23.30 ± 4.10 <sup>ab</sup>	31.60 ± 6.90 <sup>c</sup>	0.0121*

Data expressed as mean ± S.D. Vv[Glom]: Glomerular volumetric density; VWGV: Volume-weighted glomerular volume; S: Group submitted to sham surgery; SR: Group sham treated with resveratrol; I: Group submitted to 60 min of renal warm ischemia; IR: Group submitted to warm ischemia treated with resveratrol. a: different from group S; b: different from group SR; c: different from group I. \*: significant p value.

rising in group IR. These findings are in accordance to previous studies performed in single-kidney models, what reinforce the nephroprotective effects of resveratrol after renal warm ischemia in the rat kidney.<sup>23</sup> Severe tissue damage presented by untreated ischemic kidneys was alleviated by preventive treatment with resveratrol, which has also been reported in previous studies.<sup>22–25</sup> However, we believe that the main goal of the present study was the unbiased quantitative analysis of the morphometrical aspects of the kidney submitted to ischemia and the long-term protective effects of resveratrol.

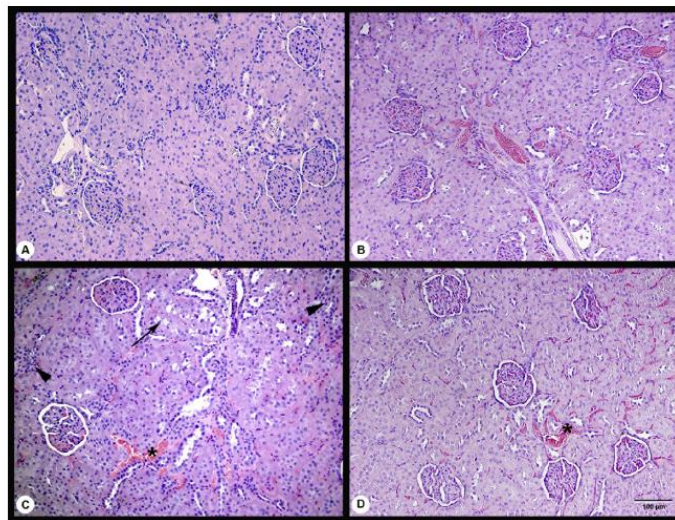
As the goal of partial nephrectomy is removing renal tumors, sparing as much nephrons as possible,<sup>2–5,33</sup> it is reasonable that an unbiased determination of the glomerular number (which is very correspondent to nephron number) is the end-point that should be studied to verify if surgical goal was achieved.<sup>11,27–29</sup> To the best of our knowledge, this study is the first one to report long-term effects of resveratrol preventing the glomerular losses after renal warm ischemia.

The model used in the present study is widely used and known to induce morphological alterations. The induction of 60 min of

warm ischemia in rat kidneys was previously reported as leading to glomerular reduction, as analyzed by stereological methods.<sup>27</sup> This was confirmed in the present study, as we observed a decrease in the C–NC, Vv[Glom] and N[Glom] in group I, in comparison to control group.

The most important results were those which pointed out that resveratrol prevented the glomerular loss after ischemic injury. The values of Vv[Glom] and N[Glom] in animals submitted to renal ischemia and treated with resveratrol were not different from those of the control group, but different from the group of animals that only suffered renal ischemia, which showed values of Vv[Glom] and N[Glom] significantly lower. Furthermore, the control group treated with resveratrol did not present any renal changes or noticeable side effects on the general state of animals. These results suggest that resveratrol could be a potential renal protector when administered in a patient who will be submitted to renal warm ischemia, and may have a great impact, decreasing the incidence of kidney chronic disease after the treatment of small renal mass.

Further, previously published studies showed the protective effects of resveratrol in a short-term period, as the analysis of these



**Fig. 1.** Renal cortex photomicrographs of kidneys from the experimental groups. A) Group submitted to sham surgery; B) Group sham treated with resveratrol; C) Group submitted to 60 min of renal warm ischemia; D) Group submitted to warm ischemia treated with resveratrol. Arrow heads depicts mononuclear inflammatory infiltrate, Arrow depicts tubular degeneration, and asterisk (\*) depicts congestion areas. Hematoxylin and eosin, 200x.

Please cite this article as: Buys-Gonçalves GF et al., Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol, The American Journal of Surgery, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>

4

G.F. Buys-Gonçalves et al. / The American Journal of Surgery xxx (xxxx) xxx

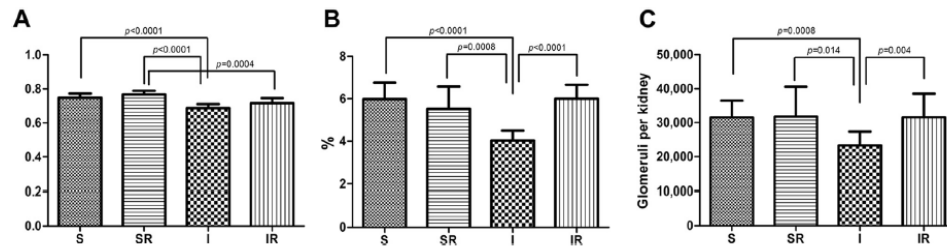


Fig. 2. Quantitative results of kidneys from group submitted to sham surgery (S), group sham treated with resveratrol (SR), group submitted to 60 min of renal warm ischemia (I), and group submitted to warm ischemia treated with resveratrol (IR). A) Cortex-non-cortex areas ratio (C-N-C). B) Glomerular volumetric density (Vv[Glom]). C) Number of glomeruli per kidney (N[Glom]). Bars represents means  $\pm$  standard deviation.

studies were performed 24 h after renal ischemia, in both single-kidney or double-kidney models.<sup>22–25</sup> The present study added information to this topic, analyzing the kidneys 30 days after the ischemic injury, and demonstrating that the protective effects of resveratrol are permanent.

One limitation of the study is that its results cannot be directly transposed to humans as the pathophysiological responses are different among rodents and humans. Although the rat model of renal warm ischemia is the most commonly used, this is still an experimental setting, with several differences to the clinical setting. Future clinical studies investigating the use of resveratrol as a nephroprotective drug in patients submitted to partial nephrectomy with warm ischemia are warranted.

### Conclusion

The conclusion of the present study is that preoperative administration of resveratrol has renoprotective effects, preventing the glomerular number reduction observed when kidney is submitted to warm ischemia. These results suggest that this drug may improve postoperative renal function in patients submitted to partial nephrectomy with warm ischemia.

### Financial support/acknowledgments

This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES), and the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

### Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>.

### References

- Rossi SH, Klatte T, Usher-Smith J, Stewart GD. Epidemiology and screening for renal cancer. *World J Urol*. 2018;36:1341–1353.
- Cai Y, Li HZ, Zhang YS. Comparison of partial and radical laparoscopic nephrectomy: long-term outcomes for clinical T1b renal cell carcinoma. *Urol J*. 2018;15:16–20.
- Campbell S, Uzzo RG, Allaf ME, et al. Renal mass and localized renal cancer: AUA guideline. *J Urol*. 2017;198:520–529.
- Lee H, Song BD, Byun SS, Lee SE, Hong SK. Impact of warm ischaemia time on

postoperative renal function after partial nephrectomy for clinical T1 renal cell carcinoma: a propensity score-matched study. *BJU Int*. 2018;121:46–52.

- Zabell JR, Wu J, Suk-Ouichai C, Campbell SC. Renal ischemia and functional outcomes following partial nephrectomy. *Urol Clin*. 2017;44:243–255.
- Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19:395–400.
- Giedelman C, Arriaga J, Carmona O, et al. Laparoscopic anastrophic nephrolithotomy: developments of the technique in the era of minimally invasive surgery. *J Endourol*. 2012;26:444–450.
- Dennis JM, Witting PK. Protective role for antioxidants in acute kidney disease. *Nutrients*. 2017;9(7):E718.
- Ozkan TA, Karakoyunlu N, Polat R, et al. An evaluation of the protective effect of esomeprazole in an experimental model of renal ischemia-reperfusion. *Int Urol Nephrol*. 2018;50:217–223.
- Xiao Z, Chen C, Meng T, Zhang W, Zhou Q. Resveratrol attenuates renal injury and fibrosis by inhibiting transforming growth factor- $\beta$  pathway on matrix metalloproteinase7. *Exp Biol Med*. 2016;241:140–146.
- Damaseno-Ferreira JA, Abreu LAS, Bechara GR, et al. Mannitol reduces nephron loss after warm renal ischemia in a porcine model. *BMC Urol*. 2018;18:16.
- Pangeni R, Sahni JK, Ali J, Sharma S, Baboota S. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expet Opin Drug Deliv*. 2014;11:1285–1298.
- Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol*. 2014;191:1578–1584.
- Castro OW, Upadhy D, Kodali M, Shetty AK. Resveratrol for easing status epilepticus induced brain injury, inflammation, epileptogenesis, and cognitive and memory dysfunction—are we there yet? *Front Neurol*. 2017;8:603.
- Nunes S, Danesi F, Del Rio D, Silva P. Resveratrol and inflammatory bowel disease: the evidence so far. *Nutr Res Rev*. 2018;31(1):85–97.
- Kitada M, Koya D. Renal protective effects of resveratrol. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:568093.
- Xu XH, Ding DF, Yong HJ, et al. Resveratrol transcriptionally regulates miRNA-18a-5p expression ameliorating diabetic nephropathy via increasing autophagy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21:4952–4965.
- Abharzanjani F, Afshar M, Hemmati M, Moossavi M. Short-term high dose of quercetin and resveratrol alters aging markers in human kidney cells. *Int J Prev Med*. 2017;8:64.
- Lin Y, Chen F, Zhang J, et al. Neuroprotective effect of resveratrol on ischemia/reperfusion injury in rats through TRPC6/CREB pathways. *J Mol Neurosci*. 2013;50:504–513.
- Dong W1, Li F, Pan Z, et al. Resveratrol ameliorates subacute intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2013;185:182–189.
- Shimizu K, Miyagi S, Miyazawa K, et al. Resveratrol prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donor rats. *Transplant Proc*. 2016;48:1221–1225.
- Bertelli AA, Migliori M, Panichi V, et al. Resveratrol, a component of wine and grapes, in the prevention of kidney disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:230–238.
- Sener G, Tuğtepe H, Yüksel M, Cetinel S, Gedik N, Yeğen BC. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res*. 2006;37:822–829.
- Khader A, Yang WL, Kuncewitch M, et al. Novel resveratrol analogues attenuate renal ischemic injury in rats. *J Surg Res*. 2015;193:807–815.
- Li J, Li L, Wang S, et al. Resveratrol alleviates inflammatory responses and oxidative stress in rat kidney ischemia-reperfusion injury and H2O2-induced NRK-52e cells via the Nlr2/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45:1677–1689.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26:57–60.
- Bagetti-Filho HJ, Sampaio FJ, Marques RG, Pereira-Sampaio MA. Different from renal artery only clamping, artery and vein clamping causes a significant

Please cite this article as: Buys-Gonçalves GF et al., Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol, *The American Journal of Surgery*, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025>

- reduction in number of rat glomeruli during warm ischemia. *J Endourol.* 2012;26:1335–1339.
28. Damasceno-Ferreira JA, Bechara GR, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJB, Souza DB. The relationship between renal warm ischemia time and glomerular loss. An experimental study in a pig model. *Acta Cir Bras.* 2017;32:334–341.
  29. Assunção RF, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJB, de Souza DB. Does a ureteral obstruction affect the contralateral kidney morphology? A stereological analysis in a rodent model. *Urol Int.* 2018;100:327–332.
  30. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Möller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc.* 1990;159:301–317.
  31. Gill IS, Abreu SC, Desai MM, et al. Laparoscopic ice slush renal hypothermia for partial nephrectomy: the initial experience. *J Urol.* 2003;170:52–56.
  32. Spaliviero M, Power NE, Murray KS, et al. Intravenous mannitol versus placebo during partial nephrectomy in patients with normal kidney function: a double-blind, clinically-integrated, randomized trial. *Eur Urol.* 2018;73:53–59.
  33. Berczi C, Thomas B, Bacso Z, Flasko T. Long-term oncological and functional outcomes of partial nephrectomy in solitary kidneys. *Clin Genitourin Canc.* 2016;14:e275–e281.