


## Benefícios do D-005, um extrato lipídico de frutos da *Acrocomia crispera*, na prevenção de lesão renal aguda induzida por nefrotoxicidade em ratos

Benefits of D-005, a lipid extract from *Acrocomia crispera* fruits, in the prevention of acute kidney injury induced by nephrotoxicity in rats

### Autores

Sandra Rodríguez-Salgueiro<sup>1,2</sup> 

Leyanis Ocaña-Nápoles<sup>1</sup>

Ambar Oyarzábal-Yera<sup>1</sup>

Lucía González-Núñez<sup>2</sup>

Giselle Breña-Betancourt<sup>1</sup>

María Flavia Pérez-Pino<sup>1</sup>

José A. Medina-Pérez<sup>1</sup>

Sonia Jiménez-Despaigne<sup>1</sup>

Vivian Molina-Cuevas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Investigación Científica, Departamento de Farmacología, Havana, Cuba.

<sup>2</sup>Facultad Latinoamericana de Medicina, Departamento de Ciencias Morfológicas, Havana, Cuba.

Data de submissão: 01/03/2021.

Data de aprovação: 12/05/2021.

### Correspondência para:

Sandra Rodríguez-Salgueiro.

E-mail: sandra.rodriguez@cnic.cu

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2021-0048>

### RESUMO

**Introdução:** Lesão renal aguda induzida por aminoglicosídeos é uma patologia intimamente ligada a reações oxidativas e inflamatórias. Considerando efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios relatados anteriormente do D-005, um extrato lipídico de frutos da palmeira cubana *Acrocomia crispera* (Arecaceae), este trabalho avaliou efeitos do D-005 na LRA induzida por canamicina. **Métodos:** Dividiu-se ratos Wistar machos em 7 grupos: controle negativo (veículo, Tween 65/H<sub>2</sub>O) e seis grupos tratados com canamicina para induzir LRA: controle positivo (veículo), D-005 (25, 100, 200, 400 mg/kg) e extrato de semente de uva (ESU, 200 mg/kg). D-005, veículo, e tratamentos orais com ESU foram administrados uma vez por dia durante sete dias, 1 h antes da canamicina (500 mg/kg, i.p.). Avaliou-se concentrações séricas de ácido úrico e ureia, histopatologia renal e marcadores oxidativos (malondialdeído (MDA), grupos sulfidríla (SH), atividade de catalase (CAT)). **Resultados:** D-005 reduziu significativamente níveis de ácido úrico e ureia, partindo de D-005 100 mg/kg. Histopatologicamente, D-005, em todas as doses testadas, protegeu estruturas do parênquima renal (glomérulos, túbulos proximais e interstício). Estes achados foram acompanhados por uma redução significativa das concentrações de MDA e grupo SH, e pela restauração da atividade CAT. As maiores porcentagens de inibição foram obtidas com a dose de 400 mg/kg. ESU, a substância de referência, também evitou alterações bioquímicas e histopatológicas induzidas por canamicina, reduziu MDA e grupos SH e restaurou atividade CAT. **Conclusão:** A administração de doses orais repetidas de D-005 protegeu significativamente contra LRA induzida por canamicina, que pode estar associada aos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios deste extrato.

**Descritores:** *Acrocomia crispera*; Toxicidade; Renal; Antibióticos Aminoglicosídeos; Estresse oxidativo; Inflamação.

### ABSTRACT

**Introduction:** Aminoglycoside-induced acute kidney injury (AKI) is a pathology closely linked to oxidative and inflammatory reactions. Taking into account the previous reported antioxidant and anti-inflammatory effects of D-005, a lipid extract obtained from Cuban palm *Acrocomia crispera* (Arecaceae) fruits, this work aimed to evaluate the effects of D-005 on kanamycin-induced AKI. **Methods:** Male Wistar rats were divided into 7 groups: negative control (vehicle, Tween 65/H<sub>2</sub>O) and six groups treated with kanamycin to induce AKI: positive control (vehicle), D-005 (25, 100, 200, and 400 mg/kg) and grape seed extract (GSE, 200 mg/kg). D-005, vehicle, and GSE oral treatments were administered once daily for seven days, 1 h before kanamycin (500 mg/kg, i.p.). Serum uric acid and urea concentrations, renal histopathology, and oxidative markers (malondialdehyde (MDA), sulfhydryl (SH) groups, and catalase (CAT) activity) were assessed. **Results:** D-005 significantly reduced uric acid and urea levels, starting from D-005 100 mg/kg. Histopathologically, D-005, at all the tested doses, protected renal parenchyma structures (glomeruli, proximal tubules, and interstitium). These findings were accompanied by a significant reduction of MDA and SH group concentrations as well as restoration of CAT activity. The highest percentages of inhibition were obtained with the dose of 400 mg/kg. GSE, the reference substance, also prevented kanamycin-induced biochemical and histopathological changes, as well as reduced MDA and SH groups and restored CAT activity. **Conclusion:** The administration of repeated oral doses of D-005 significantly protected against kanamycin-induced AKI, which could be associated with the antioxidant and anti-inflammatory effects of this extract.

**Keywords:** *Acrocomia crispera*; Renal Toxicity; Aminoglycoside Antibiotics; Oxidative Stress; Inflammation.



## INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome clínica de etiologia variada caracterizada por uma diminuição repentina da função renal, acúmulo de metabólitos residuais, desequilíbrio água-mineral e sintomas sistêmicos. É um problema comum na medicina intensiva, uma vez que uma LRA moderada aumenta o risco de óbito em aproximadamente cinco vezes<sup>1,2</sup>.

Vários medicamentos normalmente utilizados no ambiente clínico, incluindo antibióticos aminoglicosídeos (AMGs), contribuem para a LRA devido aos seus efeitos colaterais nefrotóxicos. A LRA induzida pelo tratamento com AMG tem uma incidência mundial de 5 a 15%, aparecendo 7 a 10 dias após o início da administração do AMG. As manifestações clínicas imediatas são: oligúria com disfunção da excreção renal e aumento da creatinina sérica, ureia e outros produtos metabólicos<sup>3</sup>.

O acúmulo de AMG no epitélio tubular desencadeia a fase inicial da LRA, levando a uma inter-relação complexa de processos vasculares e tubulares causando disfunção renal. A toxicidade tubular por AMG é caracterizada principalmente por várias alterações patológicas nas células epiteliais tubulares no segmento proximal, associadas a um importante componente inflamatório seguido por alterações funcionais não letais de componentes-chave envolvidos no transporte de água e solutos<sup>4,5</sup>.

Como consequência do dano celular tubular induzido por AMG, algumas células epiteliais se destacam levando à formação de cilindros, compostos por células e proteínas, em lúmens tubulares. Os cilindros obstruem os lúmens tubulares, provocando um aumento na pressão intratubular, que reduz a função excretora dos néfrons afetados e eleva a pressão hidrostática na cápsula de Bowman, diminuindo assim a taxa de filtração glomerular. Além disso, uma pressão intratubular mais elevada promove o vazamento de filtrado para o espaço intersticial e capilares peritubulares e reduz a excreção dos produtos filtrados<sup>4</sup>.

A vasculatura renal e a função de filtração glomerular também são afetadas por AMGs através da estimulação da contração, proliferação e apoptose de células mesangiais. Estes processos são mediados pela elevação de cálcio citosólico, estresse oxidativo, inflamação e liberação de vasoconstritor. Além disso, a redução do fluxo sanguíneo e da taxa de filtração glomerular pode contribuir para agravar o dano

tubular induzido por AMG, provavelmente limitando a disponibilidade de oxigênio e nutrientes e, ao mesmo tempo, facilitando o estresse oxidativo, semelhante à LRA isquêmica<sup>4</sup>.

A LRA induzida por AMG é fatal em alguns casos. No entanto, os pacientes podem sobreviver devido à capacidade regenerativa das células tubulares, o que lhes permite recuperar-se assim que o tratamento com AMG é interrompido<sup>6</sup>. Contudo, mesmo que a LRA possa ser reversível, alguns pacientes não se recuperam completamente e geralmente desenvolvem uma doença renal crônica<sup>7</sup>.

Até agora, não há alternativa terapêutica eficaz para prevenir a toxicidade renal por AMG na prática clínica e os tratamentos atuais não são capazes de evitar a progressão da LRA para doença renal crônica. Neste contexto, é necessário buscar novas alternativas que contribuam para acelerar a regeneração das células tubulares renais e prevenir a LRA.

Diversas substâncias naturais e sintéticas têm demonstrado ações benéficas na LRA induzida por AMGs. Os agentes antioxidantes estão entre os melhores candidatos devido à sua eficácia em prevenir a geração de espécies reativas de oxigênio<sup>8-10</sup>. De acordo com esta abordagem, extratos obtidos de plantas pertencentes à família *Arecaceae*, como *Cocos nucifera* e *Phoenix dactylifera*, têm prevenido LRA induzida por gentamicina em ratos<sup>11,12</sup>.

O D-005, um extrato lipídico saponificado obtido do fruto da *Acrocomia crispata*, palmeira endêmica de Cuba, da família das *Arecaceae*, contém uma mistura reproduzível de ácidos graxos, principalmente oleico, palmítico, láurico e mirístico, enquanto os ácidos palmitoleico, caprílico, cáprico e esteárico são encontrados em concentrações mais baixas<sup>13,14</sup>.

Recentemente, o D-005 demonstrou prevenir alterações patológicas induzidas por isquemia/reperfusão renal em ratos, diminuindo as concentrações séricas de creatinina, ácido úrico e ureia e reduzindo as alterações histopatológicas tubulares no córtex renal. Isto foi associado aos efeitos antioxidantes do D-005, uma vez que diminuiu as concentrações de malondialdeído (MDA) e grupos sulfidrila (SH) no plasma e homogenato renal, bem como restaurou a atividade enzimática da catalase (CAT) no rim<sup>15</sup>.

Além disso, estudos anteriores revelaram que o D-005 exerce efeitos anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, ao inibir as enzimas 5-lipooxigenase (5-LOX) e ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2) e ao prevenir a

infiltração inflamatória durante danos pulmonares agudos em camundongos<sup>16,17</sup>.

Considerando o papel crucial desempenhado pelo estresse oxidativo e pela inflamação na fisiopatologia da LRA induzida por AMG, bem como os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios anteriores do D-005, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do D-005 na LRA induzida por canamicina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### PREPARAÇÃO DE EXTRATOS

O D-005 foi obtido a partir de frutos maduros da *Acrocomia crispera* previamente autenticados (N<sup>o</sup> 1982-1031, Jardim Botânico Nacional, Havana, Cuba) no Laboratório de Química Farmacêutica, Centro de Produtos Naturais (CPN) pertencente ao Centro Nacional de Investigações Científicas (CNIC), Havana, Cuba. Em resumo, os frutos foram secos ao ar livre, moídos a 2,36 mm, e extraídos com n-hexano à temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi removido a 60 °C sob vácuo, em um evaporador rotativo, e o óleo resultante foi saponificado em refluxo com uma solução hidroalcoólica de hidróxido de potássio (0,5 mol/L). Posteriormente, os ácidos graxos foram liberados com HCl (10 %) até pH 1-2, e a fase orgânica foi lavada com água e secada sob vácuo a 110 °C<sup>13,14</sup>.

O lote D-005 obtido dessa forma (Lote S-291215) foi caracterizado por cromatografia gasosa, sendo sua composição de ácidos graxos: ácidos láurico (41,77%), oleico (28,10%), mirístico (12,57%), palmítico (7,83%), esteárico (2,93%), cáprico (3,33%), caprílico (1,73%) e palmitoleico (0,05%), para um teor total de ácidos graxos de 98,30%. O D-005 foi suspenso em Tween 65/H<sub>2</sub>O (2%) pouco antes do uso.

O extrato de semente de uva (ESU) foi utilizado como substância de referência (95 % proantocianidina), Lote: R3992407, de Blackmores (Sidney, Austrália). O ESU foi dissolvido em goma arábica/H<sub>2</sub>O (1 %) antes da administração em ratos.

### ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300 g) do Centro Nacional de Produção de Animais de Laboratório (CENPALAB, Havana, Cuba). Os ratos foram aclimatados por 7 dias a condições laboratoriais controladas (25 ± 2 °C de temperatura, 60 ± 5 % de umidade relativa e 12 horas de ciclo claro/escuro) e

livre acesso a alimentos e água (alimentação padrão para roedores do CENPALAB). Após esse período, foram classificados como adequados para uso experimental. O manuseio dos animais foi realizado de acordo com as Diretrizes Cubanas para Manuseio de Animais e o Código Cubano de Boas Práticas de Laboratório. O conselho de ética independente do CPN aprovou o uso de animais e os protocolos de estudo (número de aprovação 007/2018 assinado em 29 de novembro de 2018).

Os ratos foram randomizados em 7 grupos (10 ratos/grupo): um controle negativo (tratado com veículo, Tween 65/H<sub>2</sub>O) e seis grupos aos quais foi administrada canamicina para induzir LRA: um grupo controle positivo tratado com Tween 65/H<sub>2</sub>O, quatro grupos tratados com D-005 (25, 100, 200 e 400 mg/kg) e um grupo tratado com ESU (200 mg/kg). A programação de dosagem do D-005 foi baseada em seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios anteriores<sup>15</sup>. A dose escolhida de ESU mostrou efeitos antioxidantes em estudos anteriores e se enquadra na faixa de doses anteriormente utilizadas em modelos de nefrotoxicidade<sup>18-20</sup>. O D-005, o veículo e o ESU foram administrados oralmente por gavagem intragástrica a fim de garantir que os ratos recebessem a dose exata e de acordo com estudos anteriores<sup>15,21</sup>. Todos os tratamentos foram administrados uma vez por dia durante sete dias.

A LRA foi induzida por injeções diárias com canamicina (sulfato de canamicina, 500 mg/kg, i.p.) durante sete dias, concomitantemente com o curso dos tratamentos com D-005, veículo, e ESU, 1 h após receber estes tratamentos. Vinte e quatro horas após o último tratamento (8<sup>o</sup> dia), os ratos foram anestesiados usando tiopental sódico (30 mg/kg) e amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal para bioquímica sanguínea (concentrações séricas de ácido úrico e ureia) e determinação dos parâmetros de oxidação (concentrações de MDA e grupos SH, bem como atividade de CAT). Imediatamente, ambos os rins foram removidos; o esquerdo foi usado para análise histopatológica e o direito foi usado para a determinação dos parâmetros de oxidação. Os rins utilizados para análise bioquímica foram homogeneizados utilizando um homogeneizador de lâminas (Ultra-Turrax) em um banho de gelo e uma solução-tampão adequada de acordo com a técnica a ser realizada. As amostras homogeneizadas foram armazenadas a -20 °C.

## DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS DO SANGUE

As concentrações de ácido úrico e ureia foram medidas em amostras séricas usando kits reagentes Spinreact Signature em um Espectrofotômetro UV-Genesys 10S. As leituras de ácido úrico foram feitas a 520 nm e reportadas como  $\mu\text{mol/L}$ , enquanto as leituras de uréia foram feitas a 340 nm e reportadas como mg/dL.

## ANÁLISE E PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

Os rins foram seccionados através do hilo seguindo o plano sagital e imediatamente imersos em formalina tamponada a 4%. Posteriormente, as amostras foram submetidas a passes de etanol, xilol e parafina. Em seguida, elas foram embutidos em blocos de parafina e seções de 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas usando um micrótomo Sakura. Foram preparadas duas lâminas histológicas por animal: uma lâmina foi corada com hematoxilina e eosina, e a segunda com ácido periódico de Schiff (PAS)<sup>22</sup>.

A análise histopatológica foi realizada do polo superior ao inferior de cada hemi-seção renal. A morfologia dos glomérulos e túbulos proximais, assim como a condição do interstício, foram estudadas por meio de um microscópio óptico Zeiss Primo Star. As seguintes variáveis foram avaliadas:

- Dano glomerular: avaliado utilizando os seguintes escores de 0-2: 0: aparência normal; 1: expansão mesangial (áreas amplas e fortemente coradas no mesângio) e/ou hiperplasia mesangial (presença de mais de três núcleos no mesângio); 2: retração do tufo glomerular com aumento do espaço de Bowman.
- Dano tubular: avaliado utilizando os seguintes escores de 0-4: 0: estrutura normal; 1: alguns túbulos com células danificadas ou necróticas; 2: áreas isoladas de necrose tubular; 3: áreas frequentes de necrose tubular; 4: necrose generalizada ou difusa.
- Dano intersticial: avaliado pela presença ou ausência de células inflamatórias no interstício utilizando os seguintes escores (0-2): 0: ausência de células inflamatórias; 1: células inflamatórias escassas (1-5 células por campo); 2: células inflamatórias abundantes (mais de 5 células/campo).
- Dano renal global: calculado a partir da soma dos valores do dano glomerular, dano tubular e dano intersticial atribuídos a cada animal.

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MDA

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês thiobarbituric acid reactive substances) foi realizada de acordo com uma técnica descrita anteriormente<sup>23</sup>. Em resumo, a mistura de reação (plasma ou homogenato renal) foi tratada com 0,2 mL de dodecil sulfato de sódio (DSS) (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%, pH 3,5) e 1,5 mL de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (0,8%) e depois aquecida a 95 °C. A fim de evitar a produção de peroxidação adicional que poderia constituir um erro na determinação durante o processo de aquecimento, foi adicionado hidroxitolueno butilado (1 mmol/L) ao meio. As amostras foram resfriadas e 5 mL de uma mistura de n-butanol-piridina (15:1 v/v) foram adicionados a cada uma. Elas foram então agitadas vigorosamente usando um vórtice, centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min. A camada orgânica foi removida e sua absorvância foi lida a 534 nm em um espectrofotômetro. Para os cálculos dos níveis de TBARS, foi traçada uma curva padrão com MDA bis (dimetilacetal). Os valores de MDA foram reportados como nmol de MDA/mg de proteína. As concentrações de proteína foram obtidas através do método Lowry modificado<sup>24</sup>.

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GRUPO SH

Resumindo, 600  $\mu\text{L}$  de tampão de ácido tris-etilenodiamina tetraacético (20 mmol/L), pH 8,2, 40  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) (10 mmol/L), e 3,16 mL de etanol (100%) foram adicionados a uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da amostra (plasma ou homogenato renal). A mistura foi incubada durante 15-20 min à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 3.000 rpm por 10 min. A absorvância do sobrenadante foi lida a 412 nm. Um branco foi preparado com DTNB, e a concentração total de SH foi calculada usando 13.600  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  de absorvância e relatada em mmol/L<sup>25</sup>.

## AVALIAÇÕES DE ATIVIDADE DE CAT

Primeiramente, a remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi controlada a 240 nm durante 5 min em um espectrofotômetro. Foi adicionado a 10  $\mu\text{L}$  de amostra (plasma ou homogenato renal), 2,89 mL de tampão de fosfato de potássio (50 mmol/L, pH 7,4). A reação começou com a adição de 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a um volume final de 3 mL a 25 °C. A atividade de CAT foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ( $43,6 \times 10^{-3}$ ) e foi expressa em UI/min mg de proteína  $\times 10^{-1}$ <sup>26</sup>.



As porcentagens de inibição dos grupos D-005 e ESU para as variáveis ácido úrico, ureia, dano renal global, MDA e grupos SH foram calculadas usando a seguinte fórmula:

$$I = 100 - \frac{(T-CN) \times 100}{CP-CN}$$

onde: I é inibição, T é a média do grupo tratado, CN é a média do controle negativo, e CP é a média do controle positivo.

Para a atividade de CAT, as porcentagens de restauração dos grupos D-005 e ESU foram calculadas usando a seguinte fórmula:

$$R = 100 - \frac{(CN-T) \times 100}{CN-CP}$$

em que: R é a restauração, T é a média do grupo tratado, CN é a média do controle negativo, CP: média do controle positivo.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste U de Mann Whitney não paramétrico. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com um valor de  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 5.0 para Windows (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As análises da relação dose/efeito foram baseadas no método de regressão linear e correlação usando o software Origin versão 5.0, Microcal Software, Inc. 1991-1997.

## RESULTADOS

### EFEITOS DO D-005 EM BIOMARCADORES DE LRA

A canamicina causou um aumento acentuado e significativo nos níveis séricos de ácido úrico e ureia

no grupo controle positivo em comparação com o grupo controle negativo. O ESU, utilizado como substância de referência, diminuiu acentuada e significativamente as concentrações de ácido úrico e ureia, em comparação ao controle positivo, atingindo 93,0 e 64,3 % de inibição, respectivamente (Tabela 1).

O D-005 diminuiu significativamente, de forma dose-dependente, o aumento dos níveis séricos de ácido úrico ( $p = 0,023$ ,  $r = 0,976$ ) e ureia ( $p = 0,039$ ,  $r = 0,960$ ), partindo da dose de 100 mg/kg e atingindo as mais altas porcentagens de inibição em 400 mg/kg (96,6% em ácido úrico e 70,3% em ureia) (Tabela 1).

### EFEITOS DO D-005 NA HISTOPATOLOGIA RENAL

A estrutura normal do parênquima renal foi observada nos ratos do grupo controle negativo, mostrando bordas em escova PAS-positivas proeminentes em túbulos proximais (Figura 1A). Os ratos pertencentes ao grupo controle positivo apresentaram um aumento do mesângio glomerular, hiperplasia mesangial e, ocasionalmente, retração do tufo glomerular com aumento do espaço do Bowman, perda de bordas em escova e necrose tubular frequente, bem como infiltrado inflamatório peritubular na zona média do córtex renal (Figura 1B).

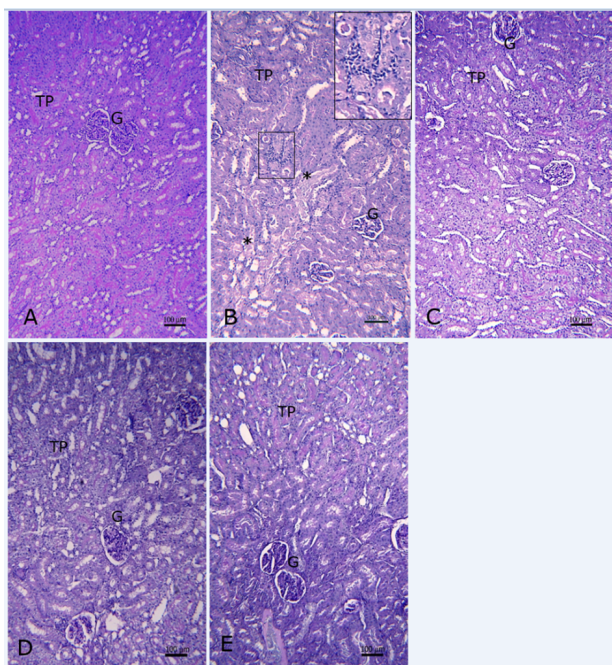
Além disso, o grupo controle positivo apresentou um aumento acentuado e significativo nos escores histopatológicos de danos glomerular, tubular e intersticial, bem como dano renal global, que foi obtido pela contribuição dessas três variáveis (Tabelas 2 e 3).

O ESU, substância de referência neste estudo, preveniu parcialmente alterações histopatológicas induzidas por canamicina nas estruturas renais, mostrando numerosos túbulos proximais com bordas em escova bem preservadas (Figura 1C). Constatou-se que o ESU também previne significativamente o aumento dos escores de danos glomerular, tubular e intersticial, bem como o dano renal global induzido por canamicina (Tabelas 2 e 3).

**TABELA 1** EFEITOS DO D-005 NAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CREATININA E ÁCIDO ÚRICO EM RATOS COM LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR CANAMICINA

Tratamento	Ácido úrico ( $\mu\text{mol/L}$ )	I (%)	Ureia (mg/dL)	I (%)
Controle negativo (veículo)	66,23 $\pm$ 7,17 ***	-	81,31 $\pm$ 4,08 ***	-
Controle positivo (veículo + canamicina)	119,48 $\pm$ 8,49	-	192,90 $\pm$ 22,47	-
D-005 (25 mg/kg) + canamicina	104,52 $\pm$ 11,2	28,1	170,11 $\pm$ 22,96	20,4
D-005 (100 mg/kg) + canamicina	83,35 $\pm$ 8,51 *	67,8	129,20 $\pm$ 13,24 *	57,1
D-005 (200 mg/kg) + canamicina	69,14 $\pm$ 7,11 ***	94,5	116,01 $\pm$ 10,12 **	68,9
D-005 (400 mg/kg) + canamicina	68,06 $\pm$ 6,51 ***	96,6	114,45 $\pm$ 9,66 **	70,3
ESU (200 mg/kg) + canamicina	69,95 $\pm$ 4,98 ***	93,0	121,13 $\pm$ 14,37 *	64,3

ESU: extrato de semente de uva, I: inibição. Os dados são reportados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; Comparação com o grupo controle positivo. Teste U de Mann Whitney.



**Figura 1.** Cortéx renal de ratos com coloração PAS. Uma imagem representativa de cada grupo experimental é mostrada. A) Controle negativo, B) Controle Positivo (Canamicina), C) Extrato de semente de uva (200 mg/kg) + Canamicina, D) D-005 25 mg/kg + Canamicina, E) D-005 400 mg/kg + Canamicina. Bars- 100 µm. G: glomérulos; TP: túbulos proximais; \* necrose tubular; retângulo em B abrange infiltrado inflamatório peritubular (inserção com ampliação maior no canto superior direito).

Os tratamentos com D-005, a partir da menor dose avaliada, protegeram as estruturas do parênquima renal (glomérulos, túbulos proximais e interstício) da lesão induzida pela canamicina (Figura 1D, E) e causaram uma diminuição significativa das variáveis histopatológicas: danos glomerular, tubular e intersticial, assim como dano renal global. Os efeitos do D-005 sobre os danos intersticial e renal global foram dose-dependentes ( $p = 0,020$ ,  $r = 0,980$  e  $p = 0,057$ ,  $r = 0,942$ , respectivamente). As maiores porcentagens de inibição foram obtidas com a dose de 400 mg/kg de D-005 em ambas as variáveis (Tabelas 2 e 3).

#### EFEITOS DO D-005 NOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os ratos do grupo controle positivo, tratados com canamicina, alcançaram valores significativamente mais altos de MDA e grupos SH, bem como uma depleção da atividade de CAT em comparação com o controle negativo, tanto no plasma quanto no homogenato renal (Tabelas 4 e 5).

A substância de referência (ESU) diminuiu significativamente as concentrações de MDA e grupos SH e restaurou parcialmente a atividade de CAT no plasma e no homogenato renal (Tabelas 4 e 5).

O D-005 em todas as doses testadas (25, 100, 200, e 400 mg/kg) diminuiu significativamente o aumento da concentração de MDA tanto no plasma quanto no homogenato renal, atingindo maiores porcentagens de inibição nas doses de 400 mg/kg no plasma e 200 mg/kg em amostra tecidual (76,5 e 100 %, respectivamente) (Tabelas 4 e 5).

Além disso, o D-005 diminuiu significativamente os grupos SH de forma dose-dependente tanto no plasma ( $p = 0,012$ ,  $r = 0,987$ ) quanto no homogenato renal ( $p = 0,025$ ,  $r = 0,975$ ), sendo a maior porcentagem de inibição na dose de 400 mg/kg (88,5% no plasma e 99,01% no homogenato renal) (Tabelas 4 e 5).

Os efeitos do D-005 (25-400 mg/kg) na atividade de CAT no plasma e no homogenato renal também são mostrados nas Tabelas 4 e 5. O D-005, a partir da menor dose testada, restabeleceu a atividade de CAT de maneira significativa e dose-dependente ( $p = 0,039$ ,  $r = 0,960$  no plasma e  $p = 0,019$ ,  $r = 0,981$  no homogenato renal), atingindo a maior porcentagem de recuperação na dose de 400 mg/kg (97,02% no plasma e 69,6% no homogenato renal).

#### DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram o efeito protetor de doses orais repetidas de D-005 sobre a LRA induzida por canamicina.

As alterações bioquímicas e histopatológicas no grupo controle positivo (ratos tratados com canamicina) estão de acordo com as descritas por outros autores sob condições similares<sup>27,28</sup>. O aumento das concentrações séricas de ácido úrico e ureia neste grupo indica uma diminuição na taxa de filtração glomerular, que constitui uma marca registrada de LRA<sup>29-31</sup>, sendo o aumento da ureia no grupo controle positivo de acordo com valores reportados em diversos modelos animais de LRA induzida por aminoglicosídeos<sup>8</sup>.

Além disso, embora a quantificação da concentração de creatinina sérica constitua o padrão ouro no diagnóstico clínico de LRA, no modelo de nefrototoxicidade induzida por aminoglicosídeos o diagnóstico é mais bem estabelecido pelo aumento da concentração de ureia - às vezes expressa como BUN - uma vez que a ureia aumenta 60 vezes mais do que a creatinina neste tipo de dano experimental<sup>8,10</sup>. Portanto, não ter quantificado a concentração de creatinina não pode ser considerado uma limitação deste estudo.

Com relação a nossos achados histopatológicos, o tratamento nefrotóxico prejudicou a morfologia do

**TABELA 2** EFEITOS DO D-005 NOS ESCORES HISTOPATOLÓGICOS RENAIIS DE DANOS GLOMERULAR, TUBULAR E INTERSTICIAL EM RATOS COM LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR CANAMICINA

Tratamento	Dano glomerular		Dano tubular		Dano intersticial	
	(escore)	I (%)	(escore)	I (%)	(escore)	I (%)
Controle negativo (veículo)	0,80 ± 0,13 ***	-	0,10 ± 0,10 ***	-	0,0 ± 0,0 ***	-
Controle positivo (veículo + canamicina)	1,90 ± 0,10	-	2,84 ± 0,23	-	1,90 ± 0,10	-
D-005 (25 mg/kg) + canamicina	1,24 ± 0,25 *	59,6	1,80 ± 0,29 *	37,9	1,40 ± 0,16 *	26,3
D-005 (100 mg/kg) + canamicina	1,22 ± 0,25 *	61,4	1,78 ± 0,33 *	38,7	1,20 ± 0,29 *	36,8
D-005 (200 mg/kg) + canamicina	1,12 ± 0,18 **	70,6	1,71 ± 0,25 **	41,2	1,13 ± 0,18 **	40,5
D-005 (400 mg/kg) + canamicina	1,10 ± 0,10 ***	72,5	1,64 ± 0,12 ***	43,8	1,10 ± 0,10 ***	42,1
ESU (200 mg/kg) + canamicina	1,10 ± 0,23 **	72,5	1,60 ± 0,34 *	43,9	1,40 ± 0,16 *	26,3

ESU: extrato de semente de uva; I: inibição. Os dados são reportados como média ± EPM (erro padrão da média). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Comparação com o grupo controle positivo. Teste U de Mann Whitney.

**TABELA 3** EFEITOS DO D-005 NO DANO RENAL GLOBAL EM RATOS COM LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR CANAMICINA

Tratamento	Dano renal global (escore)	I (%)
Controle negativo (veículo)	0,90 ± 0,10 ***	-
Controle positivo (veículo + canamicina)	6,54 ± 0,36	-
D-005 (25 mg/kg) + canamicina	4,88 ± 0,38 *	29,4
D-005 (100 mg/kg) + canamicina	4,01 ± 0,63 *	44,9
D-005 (200 mg/kg) + canamicina	3,96 ± 0,35 **	45,7
D-005 (400 mg/kg) + canamicina	3,92 ± 0,14 ***	48,2
ESU (200 mg/kg) + canamicina	4,2 ± 0,35 **	41,5

ESU: extrato de semente de uva; I: inibição. Os dados são reportados como média ± EPM (erro padrão da média). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Comparação com o grupo controle positivo. Teste U de Mann Whitney.

**TABELA 4** EFEITOS DO D-005 NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MDA E GRUPOS SH E NA ATIVIDADE DE CAT EM RATOS COM LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR CANAMICINA

Tratamento	MDA	I	Grupos SH	I	CAT	R
	(nmol/mg de pt)	(%)	(mmol/L)	(%)	(UI/min/mg de pt)	(%)
Controle negativo (veículo)	1,41 ± 0,13 ***	-	0,49 ± 0,02 ***	-	4,14 ± 0,40 ***	-
Controle positivo (veículo + canamicina)	4,50 ± 0,24	-	0,80 ± 0,06	-	1,02 ± 0,19	-
D-005 (25 mg/kg) + canamicina	2,99 ± 0,18 ***	48,7	0,63 ± 0,04 *	53,4	3,27 ± 0,24 ***	72,2
D-005 (100 mg/kg) + canamicina	2,85 ± 0,22 ***	53,5	0,56 ± 0,03 **	75,9	3,52 ± 0,35 ***	80,2
D-005 (200 mg/kg) + canamicina	2,38 ± 0,31 ***	68,5	0,54 ± 0,04 **	82,3	3,97 ± 0,18 ***	94,7
D-005 (400 mg/kg) + canamicina	2,14 ± 0,29 ***	76,5	0,52 ± 0,03 **	88,5	4,04 ± 0,26 ***	97,0
ESU (200 mg/kg) + canamicina	2,22 ± 0,28 ***	73,7	0,60 ± 0,02 **	64,8	3,53 ± 0,26 ***	80,7

ESU: extrato de semente de uva; I: inibição; R: restauração; pt: proteína. Os dados são reportados como média ± EPM (erro padrão da média). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Comparação com o grupo controle positivo. Teste U de Mann Whitney.

**TABELA 5** EFEITOS DO D-005 NAS CONCENTRAÇÕES DE MDA E GRUPOS SH E NA ATIVIDADE DE CAT EM HOMOGENATO RENAL EM RATOS COM LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR CANAMICINA

Tratamento	MDA	I	Grupos SH	I	CAT	R
	(nmol/mg de pt)	(%)	(mmol/L)	(%)	(UI/min/mg de pt)	(%)
Controle negativo (veículo)	1,98 ± 0,40 ***	-	0,67 ± 0,02 ***	-	2,13 ± 0,20 ***	-
Controle positivo (veículo + canamicina)	5,69 ± 0,21	-	1,14 ± 0,06	-	0,55 ± 0,06	-
D-005 (25 mg/kg) + canamicina	2,58 ± 0,4 ***	83,7	0,89 ± 0,04 **	52,8	1,03 ± 0,10 **	30,5
D-005 (100 mg/kg) + canamicina	2,02 ± 0,23 ***	98,8	0,74 ± 0,04 ***	85,5	1,42 ± 0,22 **	55,4
D-005 (200 mg/kg) + canamicina	1,93 ± 0,21 ***	100	0,71 ± 0,06 ***	90,9	1,60 ± 0,24 ***	66,4
D-005 (400 mg/kg) + canamicina	1,93 ± 0,30 ***	100	0,67 ± 0,05 ***	99,0	1,65 ± 0,45 ***	69,6
ESU (200 mg/kg) + canamicina	2,42 ± 0,51 ***	88,1	0,72 ± 0,04 ***	90,1	1,40 ± 0,30 **	53,4

ESU: extrato de semente de uva; I: inibição; R: restauração; pt: proteína. Os dados são reportados como média ± EPM (erro padrão da média). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Comparação com o grupo controle positivo. Teste U de Mann Whitney.

parênquima do córtex renal, o qual mostrou alterações glomerulares, necrose tubular e infiltrado inflamatório próximo aos túbulos necróticos. Estes resultados assemelham-se aos de desfechos anteriores baseados em modelos de nefrotoxicidade da gentamicina, onde a morte de células tubulares foi reconhecida como o evento primário devido à entrada do AMG nas mesmas, enquanto a infiltração de células inflamatórias e alterações glomerulares são consideradas eventos secundários promovidos por disfunção tubular<sup>32,33</sup>.

Como esperado, o ESU, utilizado como substância de referência, preveniu de forma marcante e significativa o aumento das concentrações séricas de ácido úrico e ureia induzidas pela canamicina. Da mesma forma, o ESU reduziu significativamente os danos histopatológicos das estruturas renais, em comparação com o grupo controle positivo, de acordo com relatórios anteriores<sup>34</sup>.

Levando em consideração o aumento nos parâmetros bioquímicos e as alterações histopatológicas de estruturas renais encontrados no grupo controle positivo, que são ambos típicos de LRA, e que o ESU, utilizado como substância de referência, preveniu as alterações induzidas pela canamicina, o modelo de rato utilizado e os resultados obtidos em nossas condições experimentais são validados.

No presente trabalho, foi demonstrado que o D-005 restaurou parcialmente a taxa de filtração glomerular, uma vez que diminuiu as concentrações séricas de ácido úrico e ureia. A dose mínima eficaz de D-005 em ambos os parâmetros foi de 100 mg/kg. A proteção da função renal foi acompanhada pela preservação das estruturas do parênquima renal observadas no estudo histopatológico, embora a proteção morfológica tenha sido evidenciada a partir da dose mínima de D-005 (25 mg/kg).

Foi demonstrado que o tratamento nefrotóxico com gentamicina causa um aumento de COX-2 em ratos e camundongos, que pode ser revertido após a administração de agentes anti-inflamatórios como a hesperidina, o ácido alfa-linolênico e um extrato de *Hypericum perforatum*<sup>35-37</sup>. Estudos adicionais elucidarão se o efeito anti-inflamatório do D-005, histopatologicamente comprovado neste estudo, pela diminuição da infiltração de células inflamatórias no parênquima renal, está associado, ao menos parcialmente, à sua dupla capacidade inibitória nas enzimas 5-LOX e COX-2, semelhante ao flavocóxido<sup>16,38</sup>.

O acúmulo renal de AMGs, como a canamicina, causa efeitos tóxicos diretos nas células tubulares,

acompanhados por inflamação microvascular e isquemia, que promovem a geração de ERO. Além disso, a biotransformação desses medicamentos no rim é realizada por enzimas renais como o citocromo P-450, que também induz a geração de ERO. Assim, os AMGs induzem peroxidação lipídica e disfunção renal mediada pelo aumento de ERO, bem como a liberação de ferro das mitocôndrias de células tubulares corticais<sup>39</sup>. Isto explica os resultados obtidos no presente estudo em termos de concentrações aumentadas de MDA e grupos SH, bem como a depleção da atividade de CAT tanto no plasma quanto no homogenato renal no grupo controle positivo.

O ESU protegeu do dano oxidativo induzido por canamicina, diminuindo as concentrações de MDA e grupos SH e restaurando parcialmente a atividade de CAT, tanto no plasma quanto no homogenato renal. Os efeitos nefroprotetores do ESU já foram comprovados antes em modelos de nefrotoxicidade induzida por outros AMGs, como amicacina e gentamicina, em relação a suas propriedades antiapoptóticas e antioxidantes<sup>34,40</sup>. A utilidade do ESU como uma substância de referência é comprovada aqui usando o modelo de LRA induzida por canamicina.

Os antioxidantes são os agentes protetores mais estudados em modelos animais de nefrotoxicidade e têm demonstrado ser a estratégia preventiva mais valiosa contra a LRA induzida por AMG. Neste sentido, os melhores resultados de proteção têm sido obtidos com extratos antioxidantes de plantas, sendo administrados concomitantemente com o AMG, seja simultaneamente ou como um pré-tratamento no mesmo dia<sup>10</sup>. Exemplos disso são os extratos antioxidantes de duas espécies de *Arecaceae* (*Cocos nucifera* e *Phoenix dactylifera*) exibindo efeitos protetores contra a LRA, que foram administrados concomitantemente com gentamicina<sup>11,12</sup>.

Portanto, os efeitos protetores do D-005 na LRA verificados neste estudo também podem ser atribuídos, pelo menos parcialmente, às suas propriedades antioxidantes, o que é apoiado pela diminuição da peroxidação lipídica e da oxidação proteica, demonstrada com a redução de MDA e grupos SH respectivamente, e o aumento dos antioxidantes endógenos, pela restauração da atividade de CAT.

Os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do D-005 podem ser atribuídos ao seu conteúdo de ácidos graxos como ácido láurico, ácido oleico e ácido mirístico, que mostraram esses efeitos anteriormente<sup>41,42</sup>. Além disso, o ácido mirístico



revelou um efeito nefroprotetor ao reduzir a necrose tubular em um modelo experimental de LRA<sup>43</sup>. Finalmente, o fato de que extratos obtidos de Cocos nucifera e Phoenix dactylifera, palmeiras com composições de ácidos graxos similares ao D-005, têm demonstrado proteção contra a nefrotoxicidade induzida por gentamicina, suporta nossa hipótese<sup>11,12</sup>.

Neste contexto, este estudo constitui a primeira evidência da eficácia nefroprotetora desta mistura de ácidos graxos obtidos da *Acrocomia crispera* Cubana sobre danos renais induzidos por aminoglicosídeos. Além disso, estava de acordo com resultados anteriores na prevenção de danos renais induzidos por isquemia/reperfusão<sup>15</sup>, e estudos adicionais irão esclarecer os mecanismos pelos quais o D-005 exerce seu efeito nefroprotetor em ambos os modelos de LRA.

Em geral, podemos sugerir que o D-005 é uma nova substância com benefício potencial considerável sobre a LRA, seja como um suplemento antioxidante ou como um tratamento para esta patologia.

Em conclusão, a administração de doses orais repetidas de D-005, concomitantemente com a canamicina, protegeu significativamente os ratos contra a LRA, o que poderia estar relacionado às ações antioxidantes e anti-inflamatórias deste extrato vegetal.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores leram e aprovaram o artigo. Sandra Rodríguez-Salgueiro: desenho do protocolo de pesquisa, coleta e análise de dados, preparação do manuscrito. Leyanis Ocaña-Nápoles: coleta, análise e interpretação de dados. Ambar Oyarzábal-Yera: revisão do protocolo, coleta e análise de dados, revisão crítica do manuscrito. Lucía González-Núñez: interpretação dos dados, revisão crítica do manuscrito. Giselle Breña Betancourt e María Flavia Pérez Pino: procedimentos experimentais, coleta de dados. José Alberto Medina-Pérez: procedimentos experimentais e processamento de amostras histológicas. S. Jiménez-Despaigne: procedimentos experimentais, processamento de amostras e coleta de dados. V. Molina-Cuevas: aprovação do protocolo, revisão crítica do manuscrito e aprovação final da versão final.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não ter conflitos de interesse relacionados com a publicação deste manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- Nie S, Tang L, Zhang W, Feng Z, Chen X. Are there modifiable risk factors to improve AKI?. *BioMed Res Int*. 2017;2017:5605634.
- Santos RPD, Carvalho ARDS, Peres LAB, Delfino VDA, Grion CMC. Non-recovery of renal function is a strong independent risk factor associated with mortality in AKI patients. *Braz J Nephrol*. 2020;42(3):290-9.
- Khalili H, Bairami S, Kargar M. Antibiotics induced acute kidney injury: incidence, risk factors, onset time and outcome. *Acta Med Iran*. 2013;51(12):871-8.
- Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int*. 2011 Jan;79(1):33-45.
- Karasawa T, Steyger PS. Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity. *Integrat Biol (Camb)*. 2011 Sep;3(9):879-86.
- Alexandridis G, Liberopoulos E, Elisaf M. Aminoglycoside-induced reversible tubular dysfunction. *Pharmacology*. 2013 Mar;67(3):118-20.
- Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed tubule recovery, AKI-CKD transition, and kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Aug;26(8):1765-76.
- Vicente-Vicente L, Casanova AG, Hernández-Sánchez MT, Pescador M, López-Hernández FJ, Morales AI. A systematic meta-analysis of the efficacy of pre-clinically tested nephroprotectants at preventing aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicology*. 2017 Feb;377:14-24.
- Mahi-Birjand M, Yaghoubi S, Abdollahpour-Alitappeh M, Keshtkaran Z, Bagheri N, Pirouzi A, et al. Protective effects of pharmacological agents against aminoglycoside-induced nephrotoxicity: a systematic review. *Expert Opin Drug Saf*. 2020 Feb;19(2):167-86.
- Casanova AG, Vicente-Vicente L, Hernández-Sánchez MT, Pescador M, Prieto M, Martínez-Salgado C, et al. Key role of oxidative stress in animal models of aminoglycoside nephrotoxicity revealed by a systematic analysis of the antioxidant-to-nephroprotective correlation. *Toxicology*. 2017 Jun;385:10-7.
- Jose SP, Asha S, Krishnakumar IM, Ratheesh M, Savitha S, Sandya S, et al. Nephro-protective effect of a novel formulation of unopened coconut inflorescence sap powder on gentamicin induced renal damage by modulating oxidative stress and inflammatory markers. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jan;85:128-35.
- Celik OY, Irak K. Protective effect of date extract on rat nephrotoxicity induced by gentamicin, clinical, histological and antioxidant evidences. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)*. 2018 Nov;64(14):108-13.
- González VL, Sierra R, Mas R, Pérez Y, Oyarzábal A, Rodríguez E, et al; inventor. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC); assignee. Compounds from the fruits of *Acrocomia crispera* and *Acrocomia aculeata* for use against oxidative stress and inflammation. Patent CU WO2013/189467 A2. 2015 Mar 16.
- Sierra-Pérez RC, González-Canavieles VL, Rodríguez-Leyes EA, Marrero-Delange D, Vicente-Murillo R, Morales-Rico CL. Estudio fitoquímico de los frutos de *Acrocomia crispera*, palma endémica cubana. *Rev CENIC Cienc Quím*. 2014;45:41-7.
- Oyarzábal-Yera A, Rodríguez-Salgueiro S, Merino-García N, Ocaña-Nápoles L, González-Núñez L, Mena-Valdés L, et al. Protective effects of D-005, a lipid extract from *Acrocomia crispera* fruits, against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats. *Kidney Res Clin Pract*. 2019;38(4):462-71.
- Pérez Y, Oyarzábal A, Sierra R, Mas R, Molina V, Jiménez S, et al. Inhibition of cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) by D-005 (a lipid extract of *Acrocomia crispera* fruits). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2017;16(3):319-28.
- Mena L, Sierra R, Valle M, Molina V, Rodríguez S, Merino N, et al. *Acrocomia crispera* fruits lipid extract prevents LPS-induced acute lung injury in mice. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2019;18(1):16-26.
- Yera AO, Cuevas VM, Ferreiro RM, Despaigne SJ, Sánchez DC. Effects of D-002, a grape seed extract and their combined therapy on oxidative markers in rats. *REDVET - Rev Electrónica Vet*. 2012;13:1-13.
- Abdel-Hafez SMN, Rifaai RA, Elzaher WYA. Mechanism of grape seeds extract protection against paracetamol renal cortical damage in male Albino rats. *Bratisl Med J*. 2017;118(4):233-42.

20. Gao Z, Liu G, Hu Z, Li X, Yang X, Jiang BEI, et al. Grape seed proanthocyanidin extract protects from cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Molecular Med Rep.* 2014;9(3):801-7.
21. Salem NA, Salem EA. Renoprotective effect of grape seed extract against oxidative stress induced by gentamicin and hypercholesterolemia in rats. *Renal Fail.* 2011;33(8):824-32.
22. Salama AD, Cook HT. The renal biopsy. In: Taal MW, Chertow GM, Marsden PA, Sckorecki K, Yu A SL, eds. *Brenner and rector's the kidney.* 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2011. p. 2962.
23. Ohkawa O, Ohishi I, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979 Jun;95(2):351-8.
24. Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert N. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytic Biochem.* 1978 Jun;87(1):206-10.
25. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994;233:380-2.
26. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974. p. 673-80.
27. Kilany OE, Abdou RH, El-Beltagy MA, Mohammad HM. Protective effects of Tribulus terrestris against gentamicin mediated nephrotoxicity, oxidative damage and apoptosis in male rats. *Egyptian Academic J Biol Sci B. Zool.* 2020;12(1):41-58.
28. González-Núñez L, Rodríguez-Salgueiro S, Ocaña-Nápoles L, Oyarzábal-Yera A, Medina-Pérez JA, Pentón-Rodríguez O, et al. Histopathological changes in two models of acute kidney injury. *Microsc Microanal.* 2020 Apr;26(Suppl 1):S73-S4.
29. Kaushik M, Choo JCJ. Serum uric acid and AKI: is it time?. *Clin Kidney J.* 2016 Feb;9(1):48-50.
30. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED, Bagshaw SM, et al. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute disease quality initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nature Rev Nephrol.* 2017 Feb;13:241-57.
31. Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zool Res.* 2018 Mar;39(2):72-86.
32. Randjelovic P, Veljkovic S, Stojilkovic N, Sokolovic D, Ilic I. Gentamicin nephrotoxicity in animals: current knowledge and future perspectives. *EXCLI J.* 2017;16:388-99.
33. Yang X, Zhong H, Xu C, Xu G. Spotlights on antibiotic-induced acute kidney injury: the evidence to date. *Iran J Kidney Dis.* 2019 Jan;13(1):10-20.
34. El-Ashmawy IM, El-Nahas AF, Salama OM. Grape seed extract prevents gentamicin-induced nephrotoxicity and genotoxicity in bone marrow cells of mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;99(3):230-6.
35. Subramanian P, Anandan R, Jayapalan JJ, Hashim OH. Hesperidin protects gentamicin-induced nephrotoxicity via Nrf2/HO-1 signaling and inhibits inflammation mediated by NF- $\kappa$ B in rats. *J Funct Foods.* 2015;13:89-99.
36. Kaplan HM, Izol V, Aridogan IA, Olgan E, Yegani AA, Pazarci P, et al. Protective effect of alpha-linolenic acid on gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Int J Pharmacol.* 2016;12(5):562-66.
37. Kaplan HM, Izol V, Aridogan IA, Olgan E, Yegani AA, Pazarci P, et al. Protective effect of Hypericum perforatum extract on gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Int J Pharmacol.* 2016;12:663-8.
38. El-Kashef DH, El-Kenawi AE, Suddek GM, Salem HA. Flavocoxid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015 Dec;388(12):1305-15.
39. Dennis JM, Witting PK. Protective role for antioxidants in acute kidney disease. *Nutrients.* 2017 Jul;9(7):718.
40. Ulusoy S, Ozkan G, Ersoz S, Orem A, Alkanat M, Yucesan FB, et al. The effect of grape seed proanthocyanidin extract in preventing amikacin-induced nephropathy. *Renal Fail.* 2012 Jan;34(2):227-34.
41. Marineli RS, Marques AC, Furlan CPB, Maróstica MR. Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague-Dawley rats. *Food Res Int.* 2012;49(1):487-93.
42. Morais SM, Nascimento JET, Silva AAS, Junior JERH, Pinheiro DCSN, Oliveira RV. Fatty acid profile and anti-inflammatory activity of fixed plant oils. *Acta Sci Vet.* 2017;45:1-8.
43. Monserrat AJ, Cutrin JC, Coll C. Protective effect of myristic acid on renal necrosis occurring in rats fed a methyl-deficient diet. *Res Exp Med (Berl).* 2000 Feb;199(4):195-206.