

**EXTRATO DE *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* APRESENTA EFEITO
RENOPROTETOR EM RATOS COM NEFROTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA PELA
CICLOFOSFAMIDA**

Fernando Eduardo Paulatti Frederico¹
Flávio Augusto Paulatti Frederico²
Edson Martin Vieira³
Edson Geronimo⁴
Paula Montanhini Favetta⁵
Wesley Alves Trindade⁶
Emerson Luiz Botelho⁷
Luciana Kazue Otutumi⁸
Andréia Assunção Soares⁹
Diego Lacir Froelich¹⁰
Ricardo de Melo Germano¹¹

FREDERICO, F. E. P.; FREDERICO, F. A. P.; VIEIRA, E. M.; GERONIMO, E.; FAVETTA, P. M.; TRINDADE, W. A.; BOTELHO, E. L.; OTUTUMI, L. K.; SOARES, A. A.; FROELICH, D. L.; GERMANO, R. de. M. Extrato de *Echinodorus grandiflorus* apresenta efeito renoprotetor em ratos com nefrotoxicidade aguda induzida pela ciclofosfamida **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Umuarama. v. 26, n. 3, p. 1398-1411, set./dez. 2022.

RESUMO: Pelas características anatômicas e fisiológicas dos rins, a lesão renal aguda tem sua origem nefrotóxica pela alta circulação local, o que favorece a alta concentração de substâncias tóxicas e seus metabólitos no tecido. A lesão renal aguda é uma complicação comum em internações hospitalares e principalmente em internações em unidades de terapia intensiva. A ciclofosfamida, um quimioterápico utilizado no tratamento de doenças autoimunes e neoplasias sólidas, pode causar nefrotoxicidade com disfunção glomerular e tubular. O uso de plantas medicinais, pelas suas potentes ações antioxidantes, tem sido usado para prevenção ou tratamento de lesões celulares induzidas pelo desequilíbrio entre enzimas antioxidantes e oxidantes. Por esse motivo, o objetivo do experimento foi avaliar o potencial efeito protetor da *Echinodorus grandiflorus* na prevenção da nefrotoxicidade induzida pela ciclofosfamida. Para isso, foi realizado o experimento com a utilização de 35 ratos machos, Wistar, divididos em seis grupos experimentais, sendo administrado a ciclofosfamida na dose de 150mg/kg nos grupos G2 a G6 e diferentes doses da *Echinodorus grandiflorus*, com posterior análise de parâmetros sanguíneos e histológicos. A administração de ciclofosfamida na dose de 150mg/kg de massa corporal, em dose única, foi capaz de induzir a nefrotoxicidade aguda em todos

DOI: [10.25110/arqsaude.v26i3.20228970](https://doi.org/10.25110/arqsaude.v26i3.20228970)

¹ Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: fernandofrederico@prof.unipar.br

² Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: flaviofrederico@prof.unipar.br

³ Graduada em Nutrição. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: edsonmartinv@gmail.com

⁴ Doutor em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: e.geronimo@edu.unipar.br

⁵ Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: nutripaulafavetta@gmail.com

⁶ Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: wesleyalvest@hotmail.com

⁷ Doutor em Farmacologia. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: emerson@prof.unipar.br

⁸ Doutora em Zootecnia. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: otutumi@prof.unipar.br

⁹ Doutora em Ciências Biológicas. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: andrea.assuncao@unipar.br

¹⁰ Mestre em Ciência Animal. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: diego.patovet@hotmail.com

¹¹ Doutor em Biologia das Interações Orgânicas (Biologia Comparada). Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: germano@prof.unipar.br

os ratos. O extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* apresentou potencial efeito renoprotetor ao uso da ciclofosfamida, na dose de 300mg/kg de massa corporal, sendo possível observar redução dos efeitos nefrotóxicos do quimioterápico, pela redução dos danos tubulares e pela diminuição dos espaços capsulas, nitidamente encontradas alterados no grupo que recebeu apenas ciclofosfamida, denotando resultados promissores para utilização desta planta medicinal na prevenção da nefrotoxicidade induzida pelo fármaco. Contudo, novos estudos dos efeitos renoprotetor do chapéu de couro, poderão elucidar os mecanismos envolvidos na ação do extrato bruto do chapéu de couro. A utilização de extrato bruto de plantas medicinais torna-se um adjuvante aos tratamentos pelo baixo custo e pela facilidade de acesso das diferentes populações as plantas desde que devidamente orientados pelos profissionais habilitados.

PALAVRAS-CHAVE: Chapéu de couro; Lesão renal aguda; Mesna; Quimioterápicos; Plantas medicinais.

EXTRACT OF *Echinodorus grandiflorus* PRESENTS RENOPROTETIC EFFECT ON RATS WITH ACUTE NEPHROTOXICITY INDUCED BY CYCLOPHOSPHAMID

ABSTRACT: Due to the anatomical and physiological characteristics of the kidneys, acute kidney injury has its nephrotoxic origin due to the high local circulation, which favors the high concentration of toxic substances and their metabolites in the tissue. Acute kidney injury is a common complication in hospital admissions and especially in intensive care unit admissions. Cyclophosphamide, a chemotherapy drug used in the treatment of autoimmune diseases and solid neoplasms, can cause nephrotoxicity with glomerular and tubular dysfunction. The use of medicinal plants, due to their potent antioxidant actions, has been used for the prevention or treatment of cellular injuries induced by the imbalance between antioxidant and oxidant enzymes. For this reason, the aim of the experiment was to evaluate the potential protective effect of *Echinodorus grandiflorus* in preventing cyclophosphamide-induced nephrotoxicity. For this, the experiment was carried out with the use of 35 male Wistar rats, divided into six experimental groups, being administered cyclophosphamide at a dose of 150mg/kg in groups G2 to G6 and different doses of *Echinodorus grandiflorus*, with subsequent analysis of parameters blood and histology. The administration of cyclophosphamide at a dose of 150mg/kg of body weight, in a single dose, was able to induce acute nephrotoxicity in all rats. The crude extract of *Echinodorus grandiflorus* showed a potential renoprotective effect with the use of cyclophosphamide, at a dose of 300mg/kg of body mass, and it was possible to observe a reduction in the nephrotoxic effects of the chemotherapy, due to the reduction of tubular damage and the reduction of capsule spaces, clearly found altered in the group that received only cyclophosphamide, showing promising results for the use of this medicinal plant in the prevention of drug-induced nephrotoxicity. However, further studies of the renoprotective effects of the leather hat may elucidate the mechanisms involved in the action of the crude extract of the leather hat. The use of raw extract of medicinal plants becomes an adjuvant to treatments due to the low cost and ease of access of different populations to plants, provided that they are properly guided by qualified professionals.

KEYWORDS: Leather hat; Acute kidney injury; Mesna; Chemotherapeutics; Medicinal plants.

EL EXTRACTO DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS TIENE UN EFECTO RENOPROTECTOR EN RATAS CON NEFROTOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR CICLOFOSFAMIDA

RESUMEN: Debido a las características anatómicas y fisiológicas de los riñones, la lesión renal aguda tiene su origen nefrotóxico por la elevada circulación local, que favorece la alta concentración de sustancias tóxicas y sus metabolitos en el tejido. La lesión renal aguda es una complicación frecuente en los ingresos hospitalarios y principalmente en las unidades de cuidados intensivos. La ciclofosfamida, un quimioterápico utilizado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y neoplasias sólidas, puede causar nefrotoxicidad con disfunción glomerular y tubular. El uso de plantas medicinales, debido a sus potentes acciones antioxidantes, se ha utilizado para la prevención o el

tratamiento de lesiones celulares inducidas por el desequilibrio entre enzimas antioxidantes y oxidantes. Por este motivo, el objetivo del experimento era evaluar el posible efecto protector del *Echinodorus grandiflorus* en la prevención de la nefrotoxicidad inducida por la ciclofosfamida. Para ello, se realizó el experimento utilizando 35 ratas Wistar macho, divididas en seis grupos experimentales, administrándoseles ciclofosfamida a una dosis de 150mg/kg en los grupos G2 a G6 y diferentes dosis de *Echinodorus grandiflorus*, con posterior análisis de sangre y parámetros histológicos. La administración de ciclofosfamida a una dosis de 150mg/kg de masa corporal, en dosis única, fue capaz de inducir nefrotoxicidad aguda en todas las ratas. El extracto crudo de *Echinodorus grandiflorus* presentó un potencial efecto renoprotector al uso de ciclofosfamida, a una dosis de 300mg/kg de masa corporal, siendo posible observar una reducción de los efectos nefrotóxicos de la quimioterapia, por la reducción del daño tubular y por la disminución de los espacios capsulares, encontrándose claramente alterados en el grupo que recibió solamente ciclofosfamida, denotando resultados promisorios para el uso de esta planta medicinal en la prevención de la nefrotoxicidad inducida por el fármaco. Sin embargo, nuevos estudios sobre los efectos renoprotectores del sombrero de cuero podrían dilucidar los mecanismos implicados en la acción del extracto crudo de sombrero de cuero. El uso de extractos crudos de plantas medicinales se convierte en un coadyuvante de los tratamientos por su bajo coste y la facilidad de acceso de las diferentes poblaciones a las plantas desde que son guiadas adecuadamente por profesionales cualificados.

PALABRAS CLAVE: Sombrero de cuero; Lesión renal aguda; Mesna; Quimioterapia; Plantas medicinales.

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia é caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas (NASCIMENTO *et al.*, 2014), sendo que os fitoterápicos são aqueles medicamentos cuja matéria prima é exclusivamente originária de vegetais (BRASIL, 2010).

No Brasil existem uma grande diversidade tanto na prática, como na forma de aplicação dos fitoterápicos, influenciadas pela regionalidade, cultura e crença da população de cada região (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005), porém, ainda são raros estudos que comprovem segurança e eficácia dos mesmos (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Segundo os autores, as características desejáveis das plantas medicinais são a eficácia, baixo risco, assim como a reprodutibilidade e constância da sua qualidade.

Pelas suas potentes ações antioxidantes, as plantas medicinais tem sido usadas, principalmente, em pesquisas experimentais para prevenção ou tratamento de lesões celulares induzidas pelo desequilíbrio entre enzimas antioxidantes e oxidantes (SILVEIRA, BANDEIRA, ARRAIA, 2008).

Há múltiplos usos da *Echinodorus grandiflorus* (*E. grandiflorus*) na medicina popular, sendo usada para uma gama de doenças nas várias regiões do país (MARQUES *et al.*, 2017). Suas principais ações são: depurativa (CORREA, 1984; SILVA-JUNIOR, 1994), anti-inflamatória (DUTRA *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2010), anti-hipertensiva (PRANDO *et al.*, 2016; TIBIRIÇÁ *et al.*, 2007), anti-artrite (GARCIA, 2016), agindo na cascata da inflamação (MARQUES *et al.*, 2017) e diurético (PRANDO *et al.*, 2016).

O extrato metanólico feito do rizoma tem potencial uso no manejo da dor e da inflamação (DUTRA et al., 2006), distúrbios renais (cálculos) e inflamação da bexiga (LORENZI; MATOS, 2002).

A literatura mostra um séria de casos em que o “chapéu de couro” tenha propriedades anti-inflamatórias contra a dor (DUTRA et al., 2006) e processos inflamatórios (GARCIA et al., 2010; GARCIA, 2014; GARCIA et al., 2016,a,b). Há na cascata da inflamação (MARQUES et al., 2017). Demonstrou-se que essa flavona atua inibindo a ruptura da barreira induzida por lipopolissacarídeos, reduzindo a expressão de células de adesão e suprime a migração de leucócitos, bem como a hiperpermeabilidade celular, inibindo vários fatores de inflamação, tais como TNF- α , e dessa forma diminuindo o processo de inflamação (LEE et al., 2014).

A atividade antioxidante associada aos bioativos que ocorrem naturalmente nas plantas, está relacionada à sua capacidade de neutralizar o radical livre de muitos compostos produzidos no organismo dos diferentes animais, e estão principalmente ligados a flavonóides glicosilados e a outros derivados fenólicos (MARQUES et al., 2017).

Observa-se na prática clínica que o uso de medicamentos frequentemente resulta em lesão de células renais, caracterizando o quadro de lesão renal aguda, que ocasiona rápido declínio da função renal (MEHTA et al., 2007).

A lesão renal aguda é uma complicação que ocorre em 5% das hospitalizações e até 30% das internações em unidade de terapia intensiva (HOSTE; SHURGERS, 2008). Estima-se que os medicamentos que apresentam potencial nefrotóxico são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de lesão renal aguda em pacientes críticos (DENNEN; DOUGLAS; ANDERSON, 2010), como exemplo incluem-se antimicrobianos, quimioterápicos, analgésicos e imunossupressores (PERAZELLA, 2009).

Com destaque, encontra-se o quimioterápico ciclofosfamida, um agente citostático, empregado no tratamento de doenças neoplásicas de tumores sólidos e linfomas e outras doenças não neoplásicas, como artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico. Esse medicamento e seus metabólitos podem causar nefrotoxicidade com disfunção glomerular e tubular (SINAGOGLU et al., 2012).

Considerando o efeito nefrotóxico da ciclofosfamida e sua indicação frequente para o tratamento de diversas neoplasias e em outras doenças, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito protetor do *Echinodorus grandiflorus* na lesão renal aguda induzida pela ciclofosfamida em ratos machos da linhagem *Wistar*.

2. METODOLOGIA

2.1 Material vegetal

O do extrato de *E. grandiflorus* (Chapéu de Couro) foi obtido a partir da coleta de suas folhas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR), *Campus 2* – Umuarama, Paraná-Brasil (S23°47'55-W53°18'48) no período de fevereiro de 2015 pela manhã.

2.2 Preparação do extrato hidroetanólico de *Echinodorus grandiflorus*

O material vegetal foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 37°C por cinco dias. Após a secagem, o material foi submetido a trituração. A pulverização foi realizada em trituradores industriais, e em seguida, o material foi acondicionado em sacos duplos, de polietileno na parte interna e de papel Kraft na parte externa, até o preparo dos extratos brutos.

O extrato aquoso foi obtido por infusão, segundo o que é preconizado pelo uso popular (LORENZI; MATOS, 2002), com pequenas modificações. O material vegetal seco e moído (100g) foi submetida ao processo de extração por infusão com 1L de água em pré-ebulição. A extração foi realizada até que o meio de extração atingisse a temperatura ambiente por aproximadamente cinco horas.

O resíduo foi separado por filtração e o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório até um volume de 200mL. O produto final obtido foi tratado com 600mL de etanol para precipitação das proteínas e polissacarídeos, obtendo-se um precipitado (PEI) e um sobrenadante etanólico do infuso (SEI). O SEI obtido foi liofilizado e armazenado em freezer (- 20°C) até sua utilização.

2.3 Fase experimental

Todos os procedimentos adotados na pesquisa tiveram aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense – UNIPAR, com o número de protocolo 34635/2018.

Foram utilizados 35 ratos machos, linhagem *Wistar*, adultos, com 90 dias de idade, e massa corporal média de 321g, oriundos do Biotério da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram mantidos com livres acesso a água e alimentos e permaneceram em condições térmicas (22°C±2), com ciclos alternados de 12 horas de claro e escuro no Biotério de Manutenção Animal do Laboratório de Pesquisa Pré-clínica de Produtos Naturais e Bioativos da Universidade Paranaense.

Os animais permaneceram nesta condição por um período de 20 dias para adaptação, e após esse período, foram divididos em grupos para realização do experimento. Para tanto os animais foram pesados, e a partir da média ±10% do peso corporal, foram distribuídos nos diferentes grupos de tratamento e controle.

Grupo 1 (G1 – controle negativo): n = 5, os animais receberam água filtrada por gavagem, 1x ao dia durante 15 dias, e no 15º dia foi administrado solução de NaCl 0,9 % intraperitoneal na dose de 1,5mL/kg em dose única.

Grupo 2 (G2 - Cy): n = 6, os animais receberam solução de NaCl 0,9 % por gavagem na dose de 1,5 mL/kg por 15 dias;

Grupo 3 (G3 - Cy + EGRA 1): n = 6, os animais receberam o extrato da planta por gavagem na dose de 30mg/kg uma vez ao dia durante 15 dias;

Grupo 4 (G4 - Cy + EGRA 2): n = 6, os animais receberam o extrato da planta por gavagem na dose de 100mg/kg uma vez ao dia por 15 dias;

Grupo 5 (G5 - Cy + EGRA 3): n = 6, os animais receberam o extrato da planta por gavagem na dose de 300mg/kg uma vez ao dia por 15 dias;

No 15º todos os animais dos grupos G2 a G5 receberam ciclofosfamida por via intraperitoneal na dose 150mg/kg dose única.

Grupo 6 (G6 - controle positivo): n = 6, os animais receberam solução de NaCl 0,9% por gavagem na dose de 1,5mL/kg por 15 dias, no 15º dia receberam ciclofosfamida por via intraperitoneal na dose de 150 mg/kg, dose única associado ao 2-mercaptoetanosulfonato sódico (MESNA), por via intraperitoneal na dose de 29,93mg/kg de peso corporal, em dose única. O cálculo da dose do MESNA foi realizado por extrapolação alométrica (PACHALY, 2006), baseada na dose diária de humanos que é de 600mg/kg/dia.

A gavagem foi realizada por meio da plicatura da pele na região dorso-cervical para contenção dos animais, e facilitação para introdução da cânula de administração do extrato, minimizando a falsa via que pode ocorrer durante o procedimento.

Durante as 48 horas após a administração da ciclofosfamida (G2 a G6) os animais foram monitorados para que se pudesse avaliar os seguintes parâmetros: grau de fechamento dos olhos, frequência respiratória e mobilidade (Adaptado de DORNELLES, 2013). Estes parâmetros serviram de subsídio para análise nociceptiva dos animais.

Ao final do período experimental os ratos foram anestesiados em câmara saturada com isoflurano 3%, com acompanhamento dos sinais vitais, os animais ficaram sob anestesia, sendo realizada uma incisão ventral na linha alba, para exposição da veia cava caudal para coleta do sangue. O procedimento foi necessário para que se pudesse colher volumes superiores a 3mL de sangue para realização de hemograma e exames bioquímicos dos animais, que foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranense (ROSSI-JESUS et al., 2015). Após a colheita do sangue os animais foram então mortos por hipersaturação ao anestésico.

Uma alíquota de sangue foi destinada para determinação da peroxidação lipídica. Os níveis de peroxidação lipídica no plasma dos ratos, foram determinados pelo método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) conforme descrito por Bhattacharya et al. (2003), com algumas modificações). Esta técnica quantifica moléculas de baixa massa molecular, predominantemente o dialdeído malônico (MDA), que reagem com o ácido tiobarbitúrico em meio

ácido. O composto MDA foi utilizado como curva padrão e os valores foram expressos por μmols MDA por mL de plasma.

O rim esquerdo foi escolhido para serem realizadas as análises histopatológicas. Após a evisceração dos animais cada rim foi pesado e então pela margem lateral foi seccionado no seu plano sagital e então imerso em formalina tamponado a 10% por um período de 48 horas.

Após esse período, o tecido renal foi acondicionado em álcool 70%. Na sequência foram submetidos as etapas histológicas de rotina de desidratação, diafanização e emblocamento em parafina, seguidos de cortes histológicos semi-seriados de $5\mu\text{m}$. A coloração do tecido renal foi realizada pelo método da hematoxilina-eosina.

A quantificação das alterações túbulo intersticiais foi realizada por meio da escala de Shih. As possíveis alterações tubulointersticiais foram definidas pela presença de necrose tubular, infiltrado inflamatório, dilatação tubular e atrofia tubular. As quantificações da lesão tubulointestinal foram graduadas na escala de 0 a 4, onde 0 = normal; 0,5 = pequenas áreas focais; 1 = envolvimento de menos de 10 % do córtex renal; 2 = envolvimento de 10-25% do córtex renal, 3 = envolvimento de 25-75% do córtex renal e 4 = envolvimento de mais de 75 % do córtex renal (SHIN, 1988; FRANCESCATO *et al.*, 2009).

As análises estatísticas foram realizadas e os resultados dos exames clínico laboratoriais e do TBARS, foram primeiramente analisados em relação a normalidade pelo teste de Lilliefors, então analisados pela ANOVA e quando significativos foram submetidos ao pós-teste de Tukey, foi adotado o nível de significância a 5%, sendo os dados expressos como média \pm erro padrão da média.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelas características anatômicas e fisiológicas dos rins a lesão renal aguda tem sua origem nefrotóxica principalmente pela alta circulação local, já que 25% do débito cardíaco são direcionados para o órgão e o fluxo sanguíneo renal favorece a alta concentração de substâncias tóxicas e seus metabólitos no tecido (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

A ação nefrotóxica da ciclofosfamida está relacionada principalmente com a liberação de metabólitos tóxicos pelo fígado, o citocromo P-450, em que há a conversão da ciclofosfamida em acroleína e cloroacetaldeído (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Estes metabólitos causam a morte das células do epitélio tubular renal, sendo os compostos nitrogenados e alquilantes responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio (SAYED-AHMED, 2010; KORMAZ *et al.* 2007). Segundo Brock *et al.* (1979) o efeito nefrotóxico da ciclofosfamida deve-se principalmente ao metabólito acroleína, confirmando os dados acima descritos.

Não foram observadas alterações significativas no peso dos rins nos diferentes grupos estudados, achados semelhantes foram descritos por Kim et al. (2014) e Sheth et al. (2018) em estudo de nefro e urotoxicidade induzida pela ciclofosfamida.

Quanto aos parâmetros sanguíneos verificou-se, após administração única de ciclofosfamida na dose de 150mg/kg, uma redução significativa no número total de leucócitos (leucopenia), em todos os ratos submetidos à administração do quimioterápico (G2 a G6), em relação ao controle G1 (Tabela 1).

A leucopenia encontrada no presente estudo, foi também descrita por Garcia et al. (2004) em ovinos no modelo de imunossupressão experimental. Segundo demonstrado por Hellman e Grate (1976) a ciclofosfamida mata grande parte das células precursoras na medula, além de diminuir o potencial eritropoiético das células restantes.

Verificou-se uma redução no número de hemácias e na hemoglobina dos ratos submetidos a administração da ciclofosfamida (G2 a G6), quando comparado ao G1, podendo ser indicativo de anemia, contudo, esta diferença não foi significativa (Tabela 1).

Tabela 1: Análise dos parâmetros sanguíneos após tratamento para avaliar o efeito renoprotetor do extrato de *Echinodorus grandiflorus*, em ratos, após tratamento para avaliar o efeito renoprotetor do extrato de *Echinodorus grandiflorus*, em ratos, 48 horas após administração da ciclofosfamida (150mg/kg/dose única) Os dados representam a média ± erro padrão da média de hemácias, hemoglobina e leucócitos de ratos *Wistar* do grupo controle (G1) e dos grupos tratados (G2 a G6).

Grupo	Hemácias (M)/ μ L	Hemoglobina g/dL	Leucócitos n./ μ L
Controle (G1)	8,105 \pm 0,224	14,67 \pm 0,14	6.465 \pm 630 ^a
Cy (G2)	7,175 \pm 0,147	13,15 \pm 0,18	2.598 \pm 337 ^b
Cy + Egra1 (G3)	7,280 \pm 0,203	13,17 \pm 0,12	1.843 \pm 154 ^b
Cy + Egra2 (G4)	7,305 \pm 0,131	13,35 \pm 0,29	1.760 \pm 568 ^b
Cy + Egra3 (G5)	7,102 \pm 0,338	13,00 \pm 0,61	2.570 \pm 571 ^b
Cy + Mesna (G6)	7,417 \pm 0,164	13,32 \pm 0,26	1.631 \pm 205 ^b

Cy – ciclofosfamida; Egra – *Echinodorus grandiflorus*. (M)/ μ L – Milhões por microlitro de sangue; g/dL – gramas por decilitro de sangue; n./ μ L – número/microlitro.

Letras diferentes na mesma coluna indicam que a diferença foi significativa ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

No experimento de Silva-Junior et al. (2013) a administração de ciclofosfamida, em camundongos, em dose única de 150 mg/kg, não foi capaz de provocar queda na concentração de hemoglobina e no hematócrito em relação ao grupo controle, no presente estudo também não foi encontrada a redução destes parâmetros (Tabela 1), demonstrando que estas observações podem ser encontradas em diferentes espécies animais.

Em todos os grupos estudados não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de ureia e creatinina (Tabela 2). Sheth et al. (2018) também não encontraram estas alterações em ratos. Este fato pode negligenciar o diagnóstico da lesão renal induzida pela ciclofosfamida, uma vez que a

creatinina plasmática é considerada um marcador confiável para o dano glomerular (SUGUMAR; KANAKASABAPAPHY; ABRAHAM, 2007).

Tabela 2: Análise dos parâmetros relacionados a ureia e creatinina, após tratamento para avaliar o efeito renoprotetor do extrato de *Echinodorus grandiflorus*, em ratos, 48 horas após administração da ciclofosfamida (150mg/kg/dose única). Os dados representam a média \pm erro padrão da média da ureia e creatinina dos animais do grupo controle (G1) e dos grupos experimentais (G2 a G6).

Grupo	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle (G1)	48,35 \pm 2,69	0,67 \pm 0,04
Cy (G2)	53,95 \pm 3,63	0,63 \pm 0,03
Cy + Egra1 (G3)	55,00 \pm 0,70	0,60 \pm 0,01
Cy + Egra2 (G4)	60,18 \pm 17,37	0,63 \pm 0,04
Cy + Egra3 (G5)	53,70 \pm 5,25	0,59 \pm 0,03
Cy + Mesna (G6)	44,65 \pm 3,50	0,58 \pm 0,03

Cy – ciclofosfamida; Egra – *Echinodorus grandiflorus*. mg/dL – miligramas por decilitro.

O TBARS plasmático não apresentou alterações significativas em nenhum grupo estudado conforme pode ser observado na Tabela 3. Segundo Singh et al. (2012) a peroxidação lipídica (Tabela 3), pode ser indicativo do processo inflamatório renal, devido a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROS), serão verificadas quando o processo inflamatório tecidual é intenso e crônico, o que talvez pudesse ser encontrado caso o período experimental fosse superior a 48 horas. No presente estudo a peroxidação lipídica (TBARS) nos níveis plasmáticos não foram significativas nos diferentes grupos estudados.

Tabela 3: Níveis de estresse oxidativo – Peroxidação Lipídica, no plasma de ratos que receberam dose única de ciclofosfamida e que foram previamente tratados com extrato de *Echinodorus grandiflorus*.

Grupo	TBARS (μ mol MDA/mL plasma)
Controle (G1)	0,019 \pm 0,0040
Cy (G2)	0,018 \pm 0,0031
Cy + Egra1 (G3)	0,016 \pm 0,0010
Cy + Egra2 (G4)	0,018 \pm 0,0020
Cy + Egra3 (G5)	0,016 \pm 0,0030
Cy + Mesna (G6)	0,015 \pm 0,0010

MDA/mL: malonaldeído padrão por mL de plasma. μ mol - micromol por decilitro. Cy – ciclofosfamida; Egra – *Echinodorus grandiflorus*.

Em relação aos parâmetros clínicos como nível de consciência, dor, frequência respiratória avaliadas previamente e após administração da ciclofosfamida, não houve alterações dignas de nota.

A avaliação macroscópica dos rins não demonstrou alterações, quanto ao peso dos órgãos, foi semelhante em todos os grupos, com média de 1,36g.

Nas análises microscópicas do grupo controle (G1) os rins apresentaram características anatômicas e teciduais sem alterações dignas de nota. No G2 e G3 verificou-se rins com necrose de

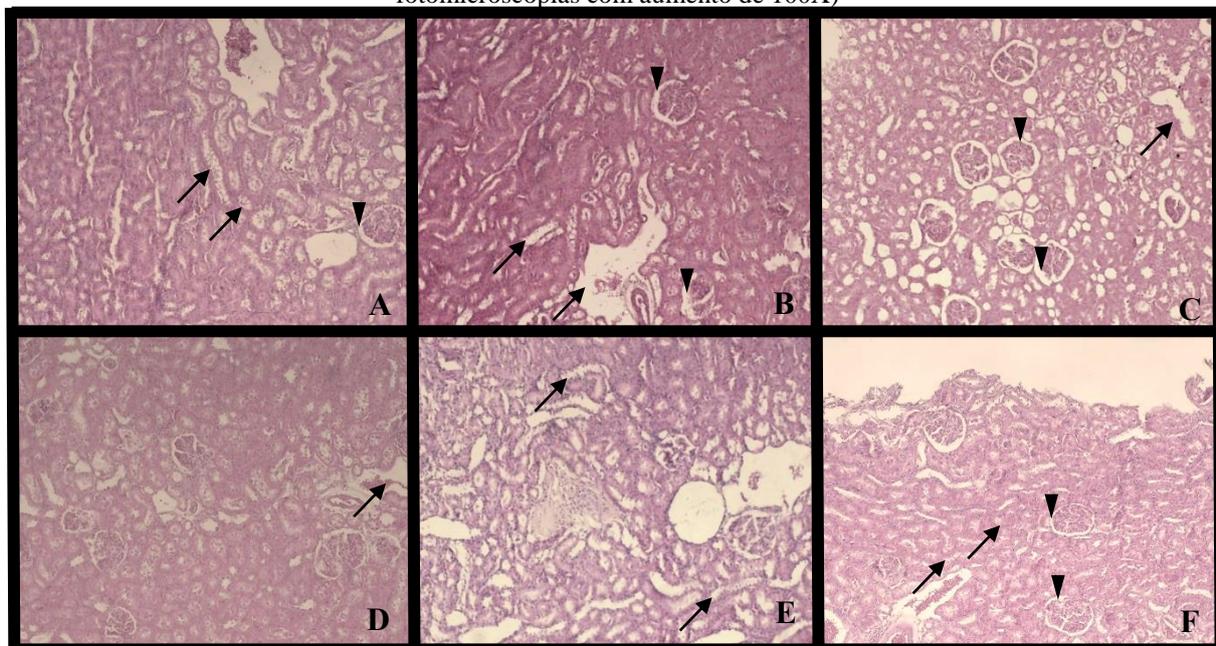
coagulação dos túbulos renais, multifocal acentuado e aumento do espaço capsular. No G4 verificou-se rins com degeneração tubular acentuada. No G5 os rins apresentaram degeneração tubular multifocal leve. No G6 rins sem lesões dignas de nota semelhantes aos achados no G1 (Figura 1).

A fisiopatologia da lesão aguda renal é composta por vários mecanismos como a disfunção da microvasculatura renal que reduz o ritmo de filtração glomerular, assim como a toxicidade tubular direta, que desencadeia intensa resposta inflamatória (SINGH et al., 2012).

Os danos tubulares encontrados nos animais, dos grupos G-2 a G-6 que receberam a ciclofosfamida, sugere o efeito deste quimioterápico sobre a cascata inflamatória, reforçando o o papel da lesão tubular e sua relação direta com a nefrotoxicidade, Sheth et al. (2018) comentam que esta lesão pode ser indicada pela observância de aumento do espaço capsular, o que foi observado no presente estudo.

Contudo, no G-5 os danos encontrados foram classificados como lesão tubular multifocal leve, indicando um potencial efeito protetor do extrato de *E. grandiflorus* na dose de 300mg/kg do peso corporal.

Figura 1: Fotomicroscopia do tecido renal, em A os rins, dos ratos do grupo G1 que apresentaram características anatômicas e histológicas normais, com destaque para a região tubular (seta) e capsular (cabeça de seta). Em G2(B) e G3 (C) necrose de coagulação dos túbulos renais multifocal acentuado (seta) e aumento do espaço capsular (cabeça de seta). No animais do G4 (D) foi encontrada degeneração tubular acentuada (seta). Nos rins dos animais do G5 foi encontrado degeneração tubular multifocal leve (seta). No grupo G6 rins com aspectos normais, sem alteração digna de nota na capsula glomerular (cabeça de seta) e túbulos renais (seta). (Material corado pela técnica de HE, fotomicroscopias com aumento de 100X)



Os principais compostos isolados da espécie da *E. grandiflorus* pertencem a dois grupos químicos: diterpenos e derivados fenólicos (MARQUES et al., 2017). Foi encontrado na espécie alcalóides, carboidratos, óleos essenciais, ácidos orgânicos, taninos e glicosídeos (CORREIA

JUNIOR; MING; SCHEFFE, 1994). Tanaka et al. (2000) relatou também uma variedade de diterpenos, ácidos graxos, triterpenos e esteroides.

Segundo Prando et al. (2016) o estrato etanólico da *E. grandiflorus* apresenta na sua composição flavonoides que levam a produção de óxido nítrico e prostaglandinas nos vasos presentes na microcirculação renal, exercendo um possível efeito anti-inflamatório.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a administração de ciclofosfamida na dose de 150mg/kg de massa corporal, em dose única, foi capaz de induzir a nefrotoxicidade aguda em todos os ratos. Foi observado o potencial efeito renoprotetor do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* ao uso da ciclofosfamida, na dose de 300mg/kg de massa corporal. O efeito foi observado pela redução dos danos tubulares e pela diminuição dos espaços capsulas, nitidamente encontradas alterados no grupo que recebeu apenas ciclofosfamida, denotando resultados promissores para utilização desta planta medicinal na prevenção da nefrotoxicidade induzida pelo fármaco. Contudo, novos estudos dos efeitos renoprotetor do chapéu de couro, poderão elucidar os mecanismos envolvidos na ação do extrato bruto do chapéu de couro. A utilização de extrato bruto de plantas medicinais torna-se um adjuvante aos tratamentos pelo baixo custo e pela facilidade de acesso das diferentes populações as plantas desde que devidamente orientados pelos profissionais habilitados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Paranaense que através da Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e Pós-graduação (DEGPP), apoiou o desenvolvimento desta pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ARNOUS, H.; SANTOS A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista Espaço para a Saúde*, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

BHATTACHARYA, A. et al. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone MZB/W female mice. *Journal the American College of Nutrition*, v. 22, n. 5, p. 388-399, 2003.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa, Brasília, 808p., 2010.

BROCK, N. et al. Acrolein, the causative fator of urotoxic side-effects of cyclophosphamide, ifosfamida, trofosfamida and sufosfamida. *Arzneimittelforschung*, v. 29, n. 4, p. 659-661, 1979.

CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. IBDF, Rio de Janeiro, 1984.

CORREIA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFE, R. M. C. Plantas Medicinais. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

DENNEN, P.; DOUGLAS, I. S.; ANDERSON, R. Acute Kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivists. *Critical Care Medical*, v. 38, n.1, p. 261-75, 2010.

DORNELLES, F. N. Participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 na cistite induzida por ciclofosfamida em ratos. 2013. 91 . Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

DUTRA, R. C. et al. Investigação das atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia, Juiz de Fora*, v. 16, n. 4, p. 469-474, 2006.

FRANCESCATO, H. D. C. et al. Treatment p 38 MAPK inhibitor attenuates cisplatin nephrotoxicity starting after beginning of renal damage. *Life Sciences*, v. 84, n.17-18, p. 590-597, 2009.

GARCIA, E. F. et al. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*, v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.

GARCIA, E. F. et al. Effect of the hydroethanolic extract from *Echinodorus grandiflorus* leaves and a fraction enriched in flavone-C-glycosides on anti-gen-induced arthritis in mice. *Planta Medica*, v. 82, n. 5, p. 407-413, 2016.

GARCIA, M. et al. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunodepressão experimental em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n. 3, p. 115-119, 2004.

HELLMAN, S.; GRATE, H. E. Effect of Cyclophosphamide on the Murine Hematopoietic Stem Cell Compartment as Measured by Different Assay Techniques. *Blood*, v. 38, n. 6, p.706-714, 1976.

HOSTE, E. A; SHURGERS, M. Epidemiology of acute Kidney injury: how big is the problem? *Critical Care Medical*, v. 36, n. 4 (suppl), p.146-51, 2008.

KIM, S.H. et al. Mechanism for the protective effect of diallyl disulfide against cyclophosphamide acute urotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 64, p. 110-118, 2014.

KORMAZ, A. *et al.* Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis: implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biology and Toxicology*, v. 23, n. 5, p. 302-12, 2007.

LEE, W. *et al.* Vascular Barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Vascular Pharmacology*, v. 62,n.1, p. 3-14, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. 2.ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.

MARQUES, A. M. *et al.* *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 1032-1047, 2017.

MEHTA, R. L. *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute Kidney injury. *Critical Care*, v. 11, n. 2, R 31, 2007.

NASCIMENTO, E. L. *et al.* Efeito renoprotetor do *Echinodorus macrophyllus* na lesão renal induzida. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 27, n.1, p. 12-7, 2014.

PERAZELLA, M. A. Renal Vulnerability to Drug Toxicity. *Clinical Journal of American Society Nephrology*, v. 4, n. 7, p. 1275-83, 2009.

SAYED-AHMED, M. M. Progression of cyclophosphamide-induced acute renal metabolic damage in carnitine-depleted rat model. *Clinical and Experimental Nephrology*, v. 14, n. 5, p. 418-426, 2010.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A.; ARRAIA, P. S. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 618-26, 2008.

PACHALY, J. R. Terapêutica por Extrapolação Alométrica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. 1.ed. São Paulo: Roca, 2006, p. 1215-1223.

PRANDO, T. B. L. *et al.* Involvement of bradykinin B2 and mucarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Charm. & Schtdl.) Micheli. *Phytomedicine*, v. 23, p. 1249-1258, 2016.

ROSSI-JESUS, D. *et al.* Ninety-day oral toxicity assessment of an alternative biopolymer for controlled release drug delivery systems obtained from cassava starch acetate. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v. 2015, p. 1-7, 2015.

SHETH V.G. *et al.* Effect of diethyldithiocarbamate in cyclophosphamide-induced nephrotoxicity: Immunohistochemical study of superoxide dismutase 1 in rat. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 50, n. 1, p. 4-11, 2018.

SILVA JUNIOR, A. A. *et al.* *Plantas medicinais, caracterização e cultivo*. Florianópolis: EPAGRI, 1994.

SINAGOGLU, O. *et al.* The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. *Urology*, v. 80, n. 6, p. 1392. e1-1392. e6, 2012.

SINGH, A. P. *et al.* Animal models of acute renal failure. *Pharmacological Reports*, v. 64, n. 1, p. 31-44, 2012.

SILVA-JUNIOR, R. N. C. et al. Caracterização do modelo inflamatório de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos swiss. *Revista de Ciências da Saúde*, v. 15, n. 1, p. 55-56, 2013.

SUGUMAR, E.; KANAKASABAPATHY, I.; ABRAHAM P. Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage na increased oxidative stress in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry*, v. 376, n. 1-2, p. 244-245, 2007.

TANAKA, C.M.A. Constituintes químicos de cinco espécies de *Echinodorus* e avaliação do beta-pineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados. 2000. 202 f. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

TIBIRIÇÁ, E. et al. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, n.1, p. 50-55, 2007.

Recebido em: 14/11/2022

Aceito em: 20/12/2022