

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Avaliação do efeito antilitiásico e nefroprotetor do sobrenadante etanólico  
do infuso de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.**

**KARYNE GARCIA TAFARELO MORENO**

**Dourados - MS  
2020**

KARYNE GARCIA TAFARELO MORENO

Avaliação do efeito antilitiásico e nefroprotetor do sobrenadante etanólico do infuso de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.

Área do CNPq: Etnofarmacologia

Exame de Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Eduardo de Barros

Dourados - MS  
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M843a Moreno, Karyne Garcia Tafarelo

Avaliação do efeito antilitiásico e nefroprotetor do sobrenadante etanólico do infuso de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. [recurso eletrônico] / Karyne Garcia Tafarelo Moreno. -- 2020.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Márcio Eduardo de Barros.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Nefropatias. 2. Plantas Medicinais. 3. Rabdomiólise. 4. Lesão Renal Aguda. 5. Nefrolitíase. I. Barros, Márcio Eduardo De. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



# UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR KARYNE GARCIA TAFARELO MORENO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Ao vigésimo primeiro dia do mês de fevereiro do ano de 2020, às 13h30min, em sessão pública, realizou-se, no(a) Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde – FCS, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD II, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação do efeito antilitiásico e nefroprotetor do sobrenadante etanólico do infuso de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw." apresentada pelo(a) mestrando(a) **KARYNE GARCIA TAFARELO MORENO**, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos(as) professores(as) Dr. Marcio Eduardo de Barros (Presidente/orientador(a)), Dr. Arquimedes Gasparotto Junior/UFGD (membro titular), Dr.<sup>a</sup> Ariany Carvalho dos Santos/UFGD (membro titular) . Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao(à) candidato(a) e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o(a) candidato(a) ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 20 até 30 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do(a) candidato(a), no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o(a) candidato(a) considerado(a) aprovada, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 21 de fevereiro de 2020 .

Dr. Marcio Eduardo de Barros \_\_\_\_\_

Dr. Arquimedes Gasparotto Junior \_\_\_\_\_

Dr.<sup>a</sup> Ariany Carvalho dos Santos \_\_\_\_\_

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família,  
por todo o apoio e amor que nunca me  
faltou.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me sustentar, capacitar e me dar a oportunidade de concluir esse trabalho; sabendo que muito pouco sou, e que menos ainda seria sem a Sua presença.

Aos meus pais Tercio e Erica que construíram a vida em prol da educação de seus filhos, e que nos ensinaram valores que nenhuma universidade no mundo seria capaz de ensinar com tanta maestria. Obrigada por nunca abrir mão daquilo que sonharam para nós.

Ao meu irmão Haran pelo companheirismo de nunca recusar uma visita à UFGD, mesmo aos domingos, para me ajudar. E aos meus avós, Zaira, Neuza, José, Francisco e Miguel (*in memoriam*) por todo o doce amor e cuidado que tem ou tiveram com minha vida.

Ao meu companheiro de batalhas diárias, Carlos Henrique, por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma, e por me amar mesmo em dias ruins.

Aos meus amigos por alegraram meus dias e serem capazes de incentivar e acreditar em mim de uma forma que eu mesma não poderia fazer.

Aos meus professores, desde aqueles me alfabetizaram em uma escola rural sem energia elétrica no interior de Rondônia, até os mestres e doutores da universidade que ao me inspirar, despertaram em mim o amor pela docência. Em especial agradeço ao meu orientador, professor Dr. Márcio Eduardo de Barros, pelo aprendizado e incentivos que conferiu a mim, de forma tão generosa, no decorrer de toda a graduação e do mestrado.

À equipe que compõe o LeFAC, esse trabalho não seria possível sem cada um de vocês, obrigada por me ensinarem e me ajudarem quando mais precisei, professor Dr. Arquimedes, Rhanany, Aline, Betânia, Lucas e Paulo. Que a nossa amizade permaneça!

Aos colaboradores desse trabalho: Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados, Profa. Dra. Ariany, Prof. Dr. Jonas, Dra. Cleide e aos técnicos da Faculdade de Ciências da Saúde.

Aos órgãos de fomento CAPES, Fundect e CNPq, por tornarem esse mestrado possível.

À Faculdade de Ciências da Saúde e à Universidade Federal da Grande Dourados que tem sido minha segunda casa desde 2013, onde me encontrei como profissional e onde vislumbrei possibilidades inimagináveis. Hoje o mundo é muito maior do que me parecera antes.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 – Relações entre Lesão Renal Aguda e Doença Renal crônica. Fonte: 15  
Adaptado de Chawla *et al.* (2017).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LRA	Lesão Renal Aguda
IRA	Insuficiência Renal Aguda
SEICS	Sobrenadante Etanólico do Infuso de <i>Costus spicatus</i>
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
DRC	Doença Renal Crônica
CrS	Creatinina Sérica
SUS	Sistema Único de Saúde
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, and End-Stage Renal Failure (Risco de disfunção renal, Injúria ao rim, Falência da função renal, Perda da função renal e Estágio Final da doença)
AKIN	Acute Kidney Injury Network (Sociedade de Lesão Renal Aguda)
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes (Doença Renal: Melhorando os Resultados Globais)
IMC	Índice de Massa Corporal
ATP	Adenosina Trifosfato
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio



## **Avaliação do efeito antilitiásico e nefroprotetor do sobrenadante etanólico do infuso de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.**

### **RESUMO**

A Lesão Renal Aguda (LRA) é um processo de etiologia variada, caracterizado pela perda abrupta da função renal. A nefrolitíase, por sua vez é a formação de pedras originárias da precipitação de sais pouco solúveis de urina concentrada. Com a intenção de aprimorar as pesquisas científicas e objetivando aumentar o conhecimento a respeito das nefropatias, foram desenvolvidos diversos modelos experimentais para o estudo das doenças, como o modelo de LRA por rabdomiólise induzida por glicerol em animais e a cristalização *in vitro* por precipitação de oxalato de cálcio, para estudos relacionados à nefrolitíase. Empregadas como substratos na indústria de medicamentos ou em seu uso popular e tradicional as plantas representam uma faceta importante no tratamento de doenças. A *Costus spicatus* (Jacq.) Sw., comumente chamada de “Cana-do-Brejo” é usada popularmente para doenças do aparelho urinário e como diurético e depurativo. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar investigação fitoquímica e farmacológica de *C. spicatus* em modelo de LRA em ratos Wistar machos e em modelo de cristalização *in vitro* para nefrolitíase. O material vegetal coletado na região de Dourados-MS foi seco e moído, a extração foi feita com água fervente, seguida de extração com etanol, para obtenção do Sobrenadante Etanólico do Infuso de *C. spicatus* (SEICS). Para determinar a composição fitoquímica do SEICS foi utilizada a cromatografia líquida ultra rápida acoplada a detector por arranjo de díodos e a espectrômetro de massas (LC-DAD-MS). Para a execução do experimento *in vivo*, foram utilizados 48 ratos Wistar, divididos em seis grupos (n=8). Durante cinco dias, três grupos receberam administração do SEICS (30, 100 e 300 mL/kg/dia); outro grupo recebeu ácido ascórbico (200 mg/kg) para controle positivo e outros dois grupos receberam solução salina. Subsequente ao tratamento, os animais receberam uma injeção intramuscular de glicerol a 25% na dose de 10 mL/kg. Após a indução de LRA foram aferidas a pressão arterial e a reatividade renal; realizou-se coletas de amostras de soro e os rins foram extirpados para análise histopatológica e avaliação do potencial antioxidante, por meio das análises das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), bem como os níveis de lipoperoxidação (LPO). As coletas de urina de 24 horas ocorreram nos dias 0, 3, 5 e 7. Outros 25 animais foram utilizados para investigação da atividade diurética aguda e prolongada do SEICS (30, 100 e 300 mL/kg/dia). Para a avaliação do efeito antilitiásico, utilizou-se amostras de urina de humanos. Três amostras receberam a adição do SEICS (0,05; 0,5 e 5 mg/mL) e passaram pelo processo de cristalização por precipitação de

oxalato de cálcio concomitantemente às amostras controle. Após a cristalização, foi calculado o Índice de Turbidez (IT) e estimados o número e tamanho dos cristais. Os resultados indicaram a presença 25 compostos fitoquímicos no SEICS, e as principais classes de metabólitos foram flavonóides, saponina esteróide e ácidos orgânicos. Houve uma redução significativa na excreção de ureia e creatinina urinárias no grupo com LRA sem tratamento, além de danos histopatológicos consideráveis (tumefação, vacuolização, necrose do epitélio tubular contorcido proximal e infiltrado inflamatório). Os animais com LRA sem tratamento apresentaram oligúria, o SEICS preveniu a ocorrência da oligúria nas diferentes dosagens. A dose de 30 mg/kg demonstrou efeito significativo de nefroproteção ao aumentar a excreção urinária de ureia, creatinina, sódio, cálcio e cloro após a indução da LRA. Os animais tratados com a dose de 300 mg/kg apresentaram lesões histopatológicas menos severas. O ácido ascórbico não apresentou efeito nefroprotetor nos parâmetros analisados. Identificou-se uma possível ação antioxidante do SEICS em detrimento do aumento de SOD (dose de 30 mg/kg) e CAT (doses de 100 e 300 mg/kg) nas amostras de rins. Os resultados não identificaram atividade diurética da planta. O SEICS foi capaz de reduzir significativamente a área dos cristais de oxalato de cálcio, além de reduzir a proporção dos cristais monohidratados e diminuir a agregação dos cristais 24 horas depois. Em suma, a dose de 30 mg/kg do SEICS apresentou efeito positivo sobre os parâmetros urinários, e as diferentes doses impediram a ocorrência da oligúria, além de demonstrarem efeito antioxidante nos rins; a *C. spicatus* também apresentou ação antilitiásica por reduzir significativamente o crescimento e a agregação dos cristais (*in vitro*), além de dificultar a formação dos cristais monohidratados, o que corrobora o uso popular da planta para doenças do trato urinário.

**Palavras-chave:** Nefropatias. Rabdomiólise. Plantas Medicinais. Lesão Renal Aguda. Nefrolitíase

## **Evaluation of the antilithiatic and nephroprotective effect of the ethanol-soluble fraction of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.**

### ***ABSTRACT***

Acute Kidney Injury (AKI) is a process of varied etiology, characterized by the abrupt loss of renal function. Nephrolithiasis, on the other hand, is the formation of stones originating from the precipitation of poorly soluble concentrated urine salts. With the intention of improving the scientific research and aiming to increase the knowledge about the nephropathies, several experimental models of diseases were developed, such as the glycerol-induced rhabdomyolysis model in animals and the *in vitro* crystallization by sodium oxalate precipitation, for studies related to nephrolithiasis. Used as substrates in the drug industry or in their popular and traditional use, plants represent an important and more accessible facet in the treatment of disease. *Costus spicatus* (Jacq.) Sw., commonly called "Cana do brejo" is popularly used for urinary tract diseases and as a diuretic and purifier. Therefore, the aim of this study was to investigate phytochemical and pharmacological effects of *C. spicatus* in an AKI model in male Wistars rats and upon an *in vitro* crystallization model for nephrolithiasis. The plant material was collected in Dourados-MS region, it was oven dried and ground, extraction was made with boiling water, followed by ethanol extraction, to obtain the ethanol-soluble fraction of *C. spicatus* (ESCS). To determine the phytochemical composition of ESCS, ultra-fast liquid chromatography coupled to a diode array detector and a mass spectrometer (LC-DAD-MS) was used. *In vivo* experiment used 48 Wistars rats, divided into six groups (n=8). During five days, three groups received ESCS administration (30, 100 and 300 mL/kg/day), another group received ascorbic acid (200 mg/kg) as positive control; two other groups received saline. Subsequent to treatment, the animals received an intramuscular injection of 25% glycerol (10 mL/kg). After AKI induction, blood pressure and renal reactivity were measured; serum samples were collected and the kidneys were excised for histopathological analysis and evaluation of the antioxidant potential, through the analysis of the enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), as well as the levels of lipoperoxidation (LPO); 24-hour urine collections were performed at days 0, 3, 5 and 7. Others 25 animals were used to investigate the ESCS acute and prolonged diuretic activity (30, 100 and 300 mL/kg/day). To evaluate the antilithiatic effect, human urine samples were used, three samples received the addition of ESCS (0.05, 0.5 and 5 mg/mL) and underwent the crystallization process by precipitation of sodium oxalate concurrently with the control samples. After crystallization, the turbidity index

(TI) was calculated and the number and size of crystals in each sample were estimated. The results show that 25 compounds were annotated from ESCS, and the main metabolite classes were flavonoids, steroidal saponin and organic acids. There was a significant reduction in urinary urea and creatinine excretion in the untreated AKI group and considerable histopathological damage (swelling, vacuolization, necrosis and inflammatory infiltrate). Animals with untreated AKI presented oliguria, ESCS prevented the occurrence of oliguria at different dosages. 30 mg/kg dose demonstrated a significant nephroprotection effect by increasing excretion of urea, creatinine, sodium, calcium and chlorine in the urine after AKI induction. 300 mg/kg dose presented the least severe histopathological lesions. Ascorbic acid had no nephroprotective effect on the analyzed parameters. A possible antioxidant action of ESCS was identified due to the increase in SOD (dose of 30 mg/kg) and CAT (doses of 100 and 300 mg/kg) in kidneys samples. Results did not identify the plant's diuretic activity. ESCS was able to reduce significantly the calcium oxalate crystals area; it also reduces the proportion of the monohydrate crystals and decreases the aggregation of the crystals 24 hours later. In conclusion the 30 mg/kg dose of ESCS had a positive effect on urinary parameters, and the different doses prevented the occurrence of oliguria, in addition to demonstrating an antioxidant effect on the kidneys. *C. spicatus* had an antilithiatic action by significantly reducing the growth and aggregation of crystals (*in vitro*), in addition to hindering the formation of monohydrate crystals; which corroborates the popular use of the plant for urinary tract diseases.

**Keywords:** Kidney Diseases. Rhabdomyolysis. Medicinal plants. Acute Kidney Injury. Nephrolithiasis.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Lesão Renal Aguda	13
2.2 Urolitíase	16
2.2.1 Formação dos cálculos	18
2.3 Modelo experimental de LRA	19
2.3.1 Patogênese da LRA induzida por rabdomiólise	20
2.4 Modelo experimental de urolitíase	22
2.5 Plantas Medicinais	22
2.6 <i>Costus spicatus</i> (Jacq.) Sw.	24
3 OBJETIVOS	27
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5 APÊNDICES	35
5.1 Artigo 1: Nephroprotective and antilithiatic activities of <i>Costus spicatus</i> (Jacq.) Sw.: Ethnopharmacological investigation of a species from the Dourados region, Mato Grosso do Sul State, Brazil	36
6 CONCLUSÃO	87
7 ANEXOS	88
7.1 Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	89
7.2 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	90

## 1 INTRODUÇÃO

A Lesão Renal Aguda (LRA), anteriormente denominada Insuficiência Renal Aguda (IRA), é um processo de etiologia variada, caracterizado pela perda abrupta da função renal, cursando por aumento acelerado da concentração de creatinina sérica (CrS), resíduos nitrogenados e incapacidade do rim em regular adequadamente a homeostase dos líquidos e eletrólitos (CHARLTON; PORTILLA; OKUSA, 2014). A incidência da LRA adquirida na comunidade é de 400 por 100.000 pessoas por ano e essa condição determina até 30% das internações em unidades de terapia intensiva (CHEUNG; PONNUSAMY; ANDERTON, 2008; HSU et al., 2007). Pacientes que sobrevivem à LRA devem ser acompanhados com o passar dos anos, pois está comprovado o possível declínio de suas funções renais, podendo até evoluir para a Doença Renal Crônica (DRC) (LAI et al., 2012).

Com a intenção de aprimorar as pesquisas científicas e objetivando aumentar o conhecimento a respeito da LRA, foram desenvolvidos diversos modelos animais de indução à LRA. Um modelo de indução de LRA bastante utilizado e de simples reprodução é a injeção intramuscular de glicerol, o que induz rabdomiólise (BELLOMO et al., 2004). A rabdomiólise é o rompimento das células musculares e consequente extravasamento de mioglobina para o meio extracelular, originando LRA por isquemia renal e nefrotoxicidade da mioglobina, resultando também em estresse oxidativo, peroxidação lipídica da célula tubular proximal e necrose tubular na área cortical (HOMSI; JANINO; DE FARIA, 2006).

Outra doença renal que afeta 10 a 12% dos homens e 5 a 6% das mulheres é a nefrolitíase, a qual não apresenta alto índice de mortalidade, no entanto, acarreta grandes custos à sociedade por intermédio do seu custo de tratamento, internações e afastamento de trabalho dos seus portadores (EDVARDSSON et al., 2013; GAMBARO et al., 2004). A nefrolitíase é a formação de pedras originárias da precipitação de sais pouco solúveis de urina concentrada (MOE, 2006).

Os tratamentos dessas doenças podem ser bastante onerosos aos sistemas de saúde, podendo cursar com tratamento farmacológico, internações, diálise e cirurgias; sendo assim, os estudos atuais objetivam principalmente aprimorar e identificar novas alternativas de tratamento e prevenção. Empregadas como substratos na indústria de medicamento ou em seu uso popular e tradicional as plantas representam uma especificidade importante no tratamento de doenças. Cerca de 85% dos habitantes de países em desenvolvimento fazem o uso de plantas ou práticas da medicina tradicional para seus cuidados de saúde (BRASIL, 2016).

Dentre a ampla variedade de espécies de plantas usadas para o tratamento de saúde está a *Costus spicatus*, comumente chamada de “Cana-do-Brejo”, “Canafístula” ou “Canarana” no Brasil; é encontrada em áreas tropicais e subtropicais, principalmente em ambientes úmidos. Segundo informações etnofarmacológicas, suas folhas, raízes e rizomas são utilizados para o tratamento de inflamações, infecções, úlceras cutâneas, nefrolitíase, diabetes, diarreia, infecções do trato urinário e como diurético e depurativo (DA SILVA; BERNARDO; PARENTE, 2000).

Diante do exposto o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito protetor da *C. spicatus* sobre a LRA induzida por glicerol em ratos Wistar e a litíase urinária em modelo *in vitro*, investigando assim as propriedades nefroprotetoras a ela atribuídas pelo uso popular.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Lesão Renal Aguda**

A LRA é um processo de etiologia variada caracterizado pela perda abrupta da função renal, cursando por aumento da concentração de CrS e resíduos nitrogenados e incapacidade do rim em regular adequadamente a homeostase dos líquidos e eletrólitos. Anteriormente dava-se a esse quadro o nome de IRA, no entanto, o termo lesão é mais adequado à fisiopatologia do quadro (AL ASMARI et al., 2017; CHARLTON; PORTILLA; OKUSA, 2014).

A incidência da LRA adquirida na comunidade é de 400 por 100.000 pessoas por ano e essa condição determina até 30% das internações em unidades de terapia intensiva; apesar da reversibilidade, a mortalidade dos pacientes com LRA pode chegar à 50% (CHEUNG; PONNUSAMY; ANDERTON, 2008; HSU et al., 2007; LIAÑO; PASCUAL, 1996).

A LRA pode ser desencadeada por diversas doenças ou situações como a desidratação, a falência cardíaca, cirurgias, isquemias, anestésias, sepse, uso de diuréticos, obstruções dos túbulos renais, traumas, hemorragias, uso de antibióticos, doenças hepáticas, rabdomiólise, entre outras. Em países em desenvolvimento, os fatores causais mais da LRA incluem diarreia com desidratação, doenças infecciosas, aborto séptico, contrastes radiológicos, medicamentos naturais e venenos de animais peçonhentos (HULTSTRÖM; BECIROVIC-AGIC; JÖNSSON, 2017; LOMBARDI et al., 2008).

No Brasil, entre agosto de 2018 e agosto de 2019, 127.061 internações foram registradas no Sistema Único de Saúde (SUS) motivadas por insuficiências renais (incluindo LRAs e insuficiências renais não especificadas), 8.132 delas na região Centro-Oeste e 267 especificamente na cidade de Dourados. O custo referente aos gastos hospitalares dessas

internações no Brasil chegou a R\$ 386.006.399,40. Nesse mesmo período foram registrados 15.838 óbitos por insuficiências renais no SUS (DATASUS, 2019).

A disfunção renal pode ser classificada em três níveis, segundo as características sugeridas pelo RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, and End-Stage Renal Failure) (2004), sigla em inglês para risco de disfunção renal, injúria ao rim, falência da função renal, perda da função renal e estágio final da doença, que seriam basicamente o risco, a injúria e a falha; e ainda existem duas classes de resultados: perda da função renal e doença renal terminal (BELLOMO et al., 2004).

Subsequentemente a essa classificação, outras duas formas de classificar a LRA foram propostas e são conhecidas como AKIN (Acute Kidney Injury Network) (2007), sigla em inglês para Sociedade de Lesão Renal Aguda e KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) (2014), sigla em inglês para Doença Renal: Melhorando os Resultados Globais; em ordem cronológica de criação. Essas novas classificações sugerem a categorização da LRA em estágios, considerando o nível de creatinina sérico, débito urinário e o recebimento de terapia renal substitutiva (KIM et al., 2017). Os critérios para a classificação de LRA segundo cada entidade supramencionadas estão detalhados na Tabela 01 (MACHADO et al., 2014)

As diretrizes propostas pelo KDIGO definem LRA como uma diminuição abrupta da função renal que ocorre durante um período de até sete dias, e a DRC é definida por anormalidades na estrutura ou função renal que persistem por mais de 90 dias (LEVEY et al., 2005). No entanto, os dados mais recentes sugerem que exista uma continuidade entre as doenças, já que pacientes que são acometidos por um episódio de LRA apresentam riscos aumentados para o desenvolvimento de DRC ou piora da DRC subjacente (CHAWLA et al., 2014).

Existe uma sobreposição entre os fatores de risco para LRA e DRC (idade, raça, hipertensão, diabetes, etc.), além disso os desfechos também podem ser semelhantes (eventos cardiovasculares e renais, estágio final de doença renal, morte). Sendo assim, existem alguns fatores modificadores de doença, como a severidade da lesão renal, o estágio da doença crônica, o número e duração dos episódios e o grau de proteinúria; que propiciam a continuidade entre as duas doenças como esquematizado na Figura 1.

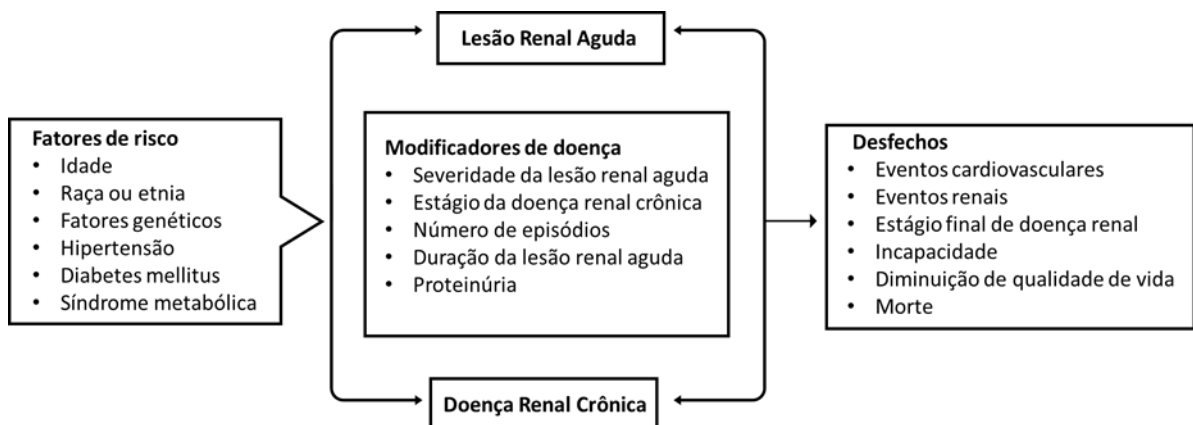


**Tabela 01** – Critérios para a classificação de LRA

Classificação	RIFLE CrS e TFG	Estágio	AKIN CrS	Estágio	KDIGO CrS
Risco	Aumento de CrS em 1,5 x ou diminuição >25% de TFG (dentro de 7 dias)	1	Aumento de CrS $\geq 0,3$ mg/dL ou $\geq 150\%$ a 200% do nível basal (dentro de 48 horas)	1	Aumento de CrS $\geq 3,0$ mg/dL dentro de 48 horas ou aumento de CrS entre 1,5 a 1,9 x do basal ocorrido dentro de um período de 7 dias
Injúria	Aumento de CrS em 2,0 x ou diminuição >50% de TFG	2	Aumento de CrS entre 200% e 300% do nível basal	2	Aumento de CrS entre 2,0 a 2,9 x do basal
Falência	Aumento de CrS em 3,0 x ou diminuição >75% de TFG ou CrS $\geq 4,0$ mg/dL ou aumento agudo $\geq 0,5$ mg/dL	3	Aumento de CrS maior que 300% do nível basal ou CrS $\geq 4,0$ mg/dL com aumento agudo de no mínimo 0,5 mg/dL ou início de terapia renal substitutiva	3	Aumento de CrS de 3,0 x do basal ou CrS $\geq 4,0$ mg/dL ou início de terapia renal substitutiva
Perda	Persistência da falência renal aguda = completa perda da função renal > 4 semanas				

Estágio Final Estágio final da doença da Doença renal (>3 meses) Renal

Fonte: Adaptado de Bellomo *et al.*, 2004 e Machado *et al.*, 2014. RIFLE: Risk, Injury, Failure, Loss, and End-Stage Renal Failure; AKIN: Acute Kidney Injury Network; KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Network; CrS: creatinina sérica; TFG: taxa de filtração glomerular



**Figura 1.** Relações entre Lesão Renal Aguda e Doença Renal crônica. Fonte: Adaptado de Chawla *et al.* (2017).

Já está esclarecido que existe um declínio estável das funções renais subsequente à lesão aguda, onde a taxa de filtração glomerular (TFG) pode declinar do nível basal até estágios avançados de DRC (LAI et al., 2012). Para tanto, recentemente foi proposta uma denominação para o quadro fisiopatológico de progressão de danos renais posteriores à LRA. Esse quadro enquadra o período entre o sétimo dia de LRA e o nonagésimo dia de persistência de danos renais, que delimita o mínimo de tempo para a caracterização da DRC. Essa doença seria conhecida como Doença Renal Aguda (DRA), entretanto ainda são escassas as pesquisas que propiciam a compreensão da epidemiologia, mecanismos e gestão da mesma (CHAWLA et al., 2017).

Os pacientes que sobrevivem à LRA devem ser acompanhados continuamente após a alta, visto que, mesmo após o reestabelecimento de suas funções renais, esse paciente pode desenvolver um declínio progressivo de função renal ao longo dos anos (LAI et al., 2012). Também existe a probabilidade aumentada desses pacientes desenvolverem eventos cardiovasculares adversos a longo prazo, como arritmia, isquemia miocárdica, insuficiência cardíaca e parada cardíaca (CHUASUWAN; KELLUM, 2012).

A LRA representa um importante intensificador dos custos relacionados ao cuidado de saúde em pacientes hospitalizados. Estão associados ao aumento significativo desses custos alguns fatores como a gravidade da LRA, a necessidade de terapia renal substitutiva e a falta de recuperação renal. Sendo que, em pacientes que sobrevivem à LRA, esses custos ainda persistem com a necessidade de acompanhamento mediante a possível progressão da doença renal. Estratégias para identificar, prevenir e facilitar a recuperação dos rins são necessárias (COLLISTER et al., 2017).

## **2.2 Urolitíase**

A formação de cálculos dentro do sistema coletor do rim (nefrolitíase) ou em outras localizações do sistema urinário (urolitíase), é uma condição clínica que afeta diversas populações mundialmente (YASUI et al., 2017). A formação desses cálculos depende de fatores geográficos, climáticos, étnicos, dietéticos, genéticos, sedentarismo, saturação e desequilíbrio de pH urinário (SHARMA; FILLER, 2010). A Tabela 02 define a classificação dos cálculos segundo sua etiologia.

Apesar de não apresentar alto índice de mortalidade, a urolitíase acarreta grandes custos à sociedade por intermédio do seu custo de tratamento, internações e afastamento de trabalho dos seus portadores (GAMBARO et al., 2004).

**Tabela 02** – Classificação de cálculos urinários segundo etiologia

Classificação	Constituição
Pedras na ausência de infecções	Oxalato de cálcio Fosfato de cálcio, incluindo bruchita e apatita de carbonato Ácido úrico
Pedras na presença de infecção	Fosfato de magnésio e amônio Apatita de carbonato Urato de amônio
Pedras de causas genéticas	Cistina Xantina 2,8-di-hidroxiadenina
Pedras causadas por drogas	Variada

Fonte: Adaptado de Türk *et al.*, 2016 (TÜRK *et al.*, 2016)

A nefrolitíase afeta cerca de 10 a 12% dos homens e 5 a 6% das mulheres e é mais frequente em adultos entre 40 e 50 anos (EDVARDSSON *et al.*, 2013; STAMATELOU *et al.*, 2003). No Brasil, foram relatadas 92.252 internações por urolitíase, o que acarretou um gasto total de R\$ 49.212.343,69 aos hospitais que atendem pelo SUS. Em Mato Grosso do Sul, foram relatadas 1.409 internações; 39 somente em Dourados, segundo pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde no último ano (DATASUS, 2019).

O cálculo é composto por uma parte orgânica constituída por proteínas (nefrocalcina, hemoglobina, osteoporina, entre outras), e outra parte inorgânica formada por sais de cálcio, ácido úrico, carbonato de amônio e magnésio, entre outros (MOE, 2006). Atualmente têm-se observado uma tendência no aumento de pedras formadas por ácido úrico (de 7% em 1980 para 15% em 2015), cujos portadores têm idade mais avançada, maiores Índices de Massa Corporal (IMCs) e menores pHs urinário, porém, 80% dos cálculos são formados por oxalato de cálcio (XU *et al.*, 2017; YASUI *et al.*, 2017).

A precipitação desses sais pouco solúveis é proveniente da produção de urina concentrada, o que ocorre naturalmente na fisiologia renal, no entanto, os cristais que não são excretados na urina, são os que originam a urolitíase ou nefrolitíase. As pedras menores de 5 mm geralmente são excretadas sem intervenção médica, pedras maiores podem necessitar de remoção (MOE, 2006).

Os estudos já sugeriam que a nefrolitíase era precursora da DRC em pacientes portadores de doenças raras, como cistinúria e hiperoxalúria primária, entretanto, recentemente as pesquisas apontam que os cálculos renais também são fatores de risco da DRC na população em geral, até mesmo casos de doença renal terminal (RULE et al., 2009; SIGURJONSDOTTIR et al., 2015)

O estudo de Alexander *et. al.* (2012) demonstrou que mesmo um único episódio de cálculo renal proporciona aumento significativo na piora do prognóstico renal, e ainda há evidências de que essa relação independa das comorbidades (ALEXANDER et al., 2012; SIGURJONSDOTTIR et al., 2015). Ademais, outros estudos sugerem que a nefrolitíase também interfira no aumento da prevalência de doenças metabólicas, como a obesidade, o diabetes e as doenças cardiovasculares (KOHJIMOTO et al., 2013; WEST et al., 2008).

Em relação ao tratamento, para boa parte dos tipos de pedras, modificações dietéticas como ingestão adequada de cálcio e restrição de sais de sódio, proteína e oxalato, e a adequação da ingestão de líquidos são as principais medidas de terapia. A terapia farmacológica também pode ser necessária, incluindo tiazidas, sais de citrato, sais alcalinos e medicamentos usados para diminuição dos níveis de ácido úrico. Quanto mais grave a doença, maiores os custos despendidos para seu tratamento, podendo incluir o tratamento cirúrgico, o que acarreta gastos consideráveis inerentes à internação (ZISMAN, 2017).

### **2.2.1 Formação dos cálculos**

A transformação de uma fase líquida para uma fase sólida em uma solução supersaturada é conhecida como nucleação. Esse processo dá início à formação do cálculo com a coalescência dos sais em aglomerados que podem aumentar de tamanho ou unirem-se a outros aglomerados ou outros componentes (BOSKEY, 1981). A nucleação pode acontecer de forma homogênea, que requer alto grau de saturação; ou heterogênea, que é o mecanismo mais provável na urina, pois ocorre na presença de proteínas, outros polímeros orgânicos, ou outros cristais revestidos com superfícies quimicamente ativas (KHAN et al., 2016).

Quando o núcleo de cristais atinge o tamanho ideal e a saturação urinária continua, inicia-se o processo de crescimento do cristal, o que é considerado um pré-requisito para a formação de cálculos (FINLAYSON; KHAN; HACKETT, 1984). Existem duas vias básicas para que esse crescimento aconteça: o mecanismo de partículas livres e o de partículas fixas. No mecanismo de partículas livres os cristais nucleados crescem e se agregam à urina nos túbulos renais, uma vez retidos nos rins, podem anexar-se ao epitélio tubular. Na presença da saturação os cristais podem ocluir o ducto coletor. O mecanismo de partículas fixas é a

formação de cálculos ligados a placas calcificadas na estrutura papilar, chamadas de placas de Randall. (KHAN et al., 2016).

O processo de união dos cristais para formar partículas maiores é conhecido como agregação, sendo esse, o processo definitivo para a formação dos cálculos, uma vez que o crescimento dos cristais é lento, o que impossibilitaria que um único cristal atingisse o tamanho necessário para ser retido no trato urinário. A agregação acontece pela ligação viscosa do cristal à outros compostos como a glicoproteína Tamm-Horsfall ou outras macromoléculas (TSUJIHATA, 2008).

Algumas substâncias são conhecidas por atuarem como promotores ou inibidores na formação dos cálculos. Os inibidores reduzem a formação dos cálculos por dificultarem a supersaturação, a nucleação, o crescimento, a agregação do cristal ou qualquer outra fase da formação do cálculo. Dentre os inibidores presentes na urina, podemos destacar pequenos ânions orgânicos como citrato, pequenos ânions inorgânicos como pirofosfatos, cátions metálicos multivalentes como magnésio ou macromoléculas como osteopontina, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, fragmento de protrombina urinária-1 e proteínas Tamm-Horsfall (ALELIGN; PETROS, 2018).

Os inibidores atuam de formas diferentes em cada organismo, podendo impedir a formação dos cálculos ou dificultar seu crescimento, o que também contribui para sua eliminação por meio da urina. Em contrapartida, os fatores promotores, facilitam a formação do cálculo, estes incluem os lipídios da membrana celular (fosfolipídios, colesterol e glicolipídios), oxalato, cálcio, sódio, cistina, volume diminuído de urina, entre outros. O desequilíbrio entre os fatores promotores e inibidores da formação dos cálculos é, geralmente o responsável pela urolitíase (ALELIGN; PETROS, 2018).

Os cristais de oxalato de cálcio presentes nos cálculos ou na urina podem ser de dois formatos morfológicos distintos: os monohidratados e os dihidratados. Os cristais monohidratados são mais comumente encontrados nos cálculos renais, enquanto que os cristais dihidratados são mais frequentemente excretados na urina. As características estruturais dos cristais podem explicar essa diferença; os cristais monohidratados supostamente atuam como núcleos para a formação dos cálculos e são mais facilmente retidos nos rins, enquanto que a estrutura dos cristais dihidratados dificultam a calculogênese. Sendo assim, a formação de cristais monohidratados propicia a patogênese da doença (THURGOOD et al., 2010).

### **2.3 Modelo experimental de LRA**

Ainda existe muito para se avançar no âmbito da LRA, portanto, houve aumento de pesquisas que objetivam prevenir e acelerar a recuperação nesses casos, o que inicia-se em pesquisas experimentais desenvolvidas por meio de modelos de indução de LRA (AL ASMARI et al., 2017). Os modelos que ocasionam LRA em animais podem ser basicamente classificados em três categorias: isquemia, toxinas e sepse, e cada categoria possui suas subclasses. São exemplos de modelos de isquemia: a isquemia a quente e rim isolado e perfundido. São exemplos de uso comum em modelos de toxinas a gentamicina, a cisplatina, o glicerol e a mioglobina; já as infusões bacterianas e a perfuração cecal são classes de modelos envolvendo a sepse (BELLOMO et al., 2004).

Um modelo bastante utilizado e de simples reprodução é o modelo de indução de LRA por rbdomiólise (BELLOMO et al., 2004). A rbdomiólise é o rompimento das células musculares e consequente extravasamento de eletrólitos, mioglobina e outras proteínas sarcoplasmáticas como a creatina quinase, aldolase, lactato desidrogenase, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase para o meio extracelular. Essa condição pode ser originária de traumas, esforço, hipóxia muscular, defeitos genéticos, mudanças de temperatura corporal, desordens metabólicas e eletrolíticas, fármacos, toxinas e algumas infecções; podendo ainda ser de origem idiopática (BOSCH; POCH; GRAU, 2009).

A prevalência de LRA induzida por rbdomiólise é de cerca de 10% entre as LRAs, o que se agrava em épocas de guerras e na ocorrência de desastres naturais. A incidência de LRA por rbdomiólise ainda é maior em pessoas que fazem uso de drogas ilícitas, abuso de álcool e portadores de doenças musculares; sendo particularmente maior em pessoas que apresentam mais de um fator causal (BOSCH; POCH; GRAU, 2009).

### **2.3.1 Patogênese da LRA induzida por rbdomiólise**

A patogênese da rbdomiólise pode estar embasada em três mecanismos: a) a lesão sarcolêmica, b) a depleção de Adenosina Trifosfato (ATP) no miócito, e c) um consequente aumento desregulado de cálcio intracelular, devido ao efluxo de cálcio prejudicado pela falta de ATP (BOSCH; POCH; GRAU, 2009). A alta concentração de cálcio intracelular persistente, ativa enzimas citolíticas como hidroxilases, proteases, nucleases e outras, o que compromete o funcionamento das organelas, progride a depleção de ATP e libera radicais livres que culminam no dano celular, e extravasamento do seu conteúdo para a corrente sanguínea (PETEJOVA; MARTINEK, 2014).

Ainda não é bem estabelecido o mecanismo que origina a LRA no contexto da rbdomiólise, mas entende-se que redução da filtração glomerular está relacionada à

vasoconstrição intra-renal, à lesão direta e isquêmica nos túbulos e à obstrução tubular; a nefrotoxicidade da mioglobina desempenha importante papel nesses eventos (BOSCH; POCH; GRAU, 2009). A citotoxicidade direta acontece principalmente nos túbulos proximais. Já os túbulos distais são mais susceptíveis à obstrução tubular uma vez que, na presença da urina ácida, da vasoconstrição renal e da diminuição do fluxo, a mioglobina se precipita quando interage com a proteína Tamm-Horsfall o que facilita a obstrução (ZAGER; GAMELIN, 1989).

A vasoconstrição, fator que também contribui para o desenvolvimento de LRA mediante a rabdomiólise pode estar relacionada à alguns mecanismos. O sequestro de fluidos ocasionado pelo dano muscular, por exemplo, estimula a ativação do sistema renina-angiotensina, vasopressina e do sistema nervoso simpático que promovem vasoconstrição. Também existem outros mediadores relacionados a vasoconstrição renal, como endotelina-1, tromboxano A<sub>2</sub>, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , F<sub>2</sub>-isoprostanos e um déficit no vasodilatador óxido nítrico (ZAGER; GAMELIN, 1989).

A mioglobina no meio extracelular induz estresse oxidativo e peroxidação lipídica da célula tubular proximal, o que por sua vez, desencadeia liberação de citocinas e quimiocinas e ativação de leucócitos que resultam na necrose tubular na área cortical (HOMSI; JANINO; DE FARIA, 2006).

Por ser uma proteína heme, a mioglobina contém ferro ferroso, que quando interage com o oxigênio, pode ser oxidado em ferro férrico, o que libera um radical hidroxila; dentro das células esse potencial oxidativo é neutralizado pelos antioxidantes intracelulares; no entanto, o extravasamento da mioglobina, desencadeia uma liberação desordenada de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e radicais livres que culminam em lesão celular (BOSCH; POCH; GRAU, 2009; ZARJOU et al., 2013).

Frente a lesão renal mediada por dano oxidativo, algumas terapêuticas baseadas no uso de antioxidantes têm sido pesquisadas, um exemplo é o uso de ácido ascórbico (vitamina C), por ser um potente antioxidante endógeno de baixo peso molecular. Estudos feitos em animais apontam efeitos positivos da suplementação de ácido ascórbico, tais como a diminuição de ureia e creatinina no soro, redução de dano tubular, melhora na depuração de creatinina, relaxamento da artéria renal e diminuição de proteinúria e da concentração de ferro (DENNIS; WITTING, 2017; KORKMAZ; KOLANKAYA, 2009; KOUL; KAUR; SINGH, 2015; USTUNDAG et al., 2008; ZHU et al., 2016).

O glicerol é um álcool que possui três hidroxilas, também conhecido como glicerina. Em modelos experimentais de indução de LRA por rabdomiólise, o glicerol é a principal droga utilizada, por surtir efeito rapidamente, ter baixo custo e fácil aplicabilidade. Quando injetado

intramuscularmente, essa substância provoca o extravasamento da mioglobina e de outros componentes da célula muscular para a circulação, o que ocasiona um quadro de rabdomiólise e posterior LRA. A complexa patogênese desse processo envolve a toxicidade da mioglobina, EROs, inflamação, apoptose e o ciclo redox do ferro, no entanto a profilaxia e intervenções terapêuticas podem promover a reversão do quadro (LI et al., 2019).

#### **2.4 Modelo experimental de urolitíase**

Os modelos experimentais para o estudo da urolitíase incluem estudos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* avaliam a interferência de medidas profiláticas nos processos de nucleação, crescimento e inibição da agregação de cristais urinários desenvolvidos. Tais protocolos fornecem informações sobre a fase inicial da doença e podem contribuir na identificação de medidas de prevenção, no entanto são incapazes simular todos os aspectos da patogênese da doença, incluindo as condições anatômicas e fisiológicas. Para tanto os modelos *in vitro* são comumente utilizados para a investigação de medidas profiláticas que diminuem a taxa formação dos cristais (KHAN, 2018).

O principal fator para a cristalização é a supersaturação (condição termodinâmica), na maior parte dos estudos *in vitro* a cristalização se inicia com a supersaturação, todavia outros fatores exercem influências consideráveis sobre as taxas de cristalização, como os fatores promotores ou inibidores e as condições termodinâmicas do protocolo, tais fatores influenciadores são conhecidos como fatores cinéticos. Portanto os modelos experimentais *in vitro* devem fornecer condições termodinâmicas e cinéticas adequadas para que a cristalização ocorra (ACHILLES, 1997).

Os modelos que utilizam animais, por sua vez, são predominantemente focados em reproduzir quadros de hipercalciúria e hiperossalúria. Os modelos incluem a indução exógena (injeção intraperitoneal ou consumo de água com oxalato de sódio, ácido glicólico e etilenoglicol), a modificação dietética, cirurgias (ressecção intestinal e *Bypass* gástrico) e modelos mistos (TZOU et al., 2016).

Os modelos *in vivo*, são incapazes de fornecer informações sobre a cristalização diretamente, e os mecanismos de deposição dos cristais ainda continua incerto. Sendo assim, ambos os métodos fornecem informações limitadas em determinados aspectos da patogênese da urolitíase, mas ainda são utilizados amplamente para o estudo da doença (KHAN, 2018).

#### **2.5 Plantas Medicinais**



O termo plantas medicinais refere-se a qualquer planta, que contenha substâncias que podem ser usadas para o fim terapêutico, ou que são precursoras para a síntese de drogas úteis. Usadas imemorialmente, ainda se apresentam como uma importante faceta nos cuidados a saúde de diversas populações. Sua importância comercial é crescente, o comércio global de plantas medicinais ultrapassou US\$ 100 bilhões por ano em 2013; e entre 2008 e 2013, as vendas de plantas medicinais dobraram na China, triplicaram na Índia e cresceram 25% na Europa (SOFOWORA; OGUNBODEDE; ONAYADE, 2013).

Segundo a Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2016), desde a década de 1970 no Brasil há incentivo para o uso de plantas medicinais. Embora o desenvolvimento da medicina moderna seja bem estabelecido, os países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional, principalmente na atenção primária, uma vez que 85% dos seus habitantes utilizam plantas ou práticas da medicina tradicional para seus cuidados de saúde (BRASIL, 2016).

Empregadas como substratos na indústria de medicamento ou em seu uso popular e tradicional as plantas representam uma especificidade importante no tratamento de doenças. Há estimativas de que 40% dos medicamentos disponíveis no mercado seja proveniente de recursos naturais (25% de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais) (CALIXTO et al., 2001).

A atividade medicinal de cada planta está correlacionada com a presença de compostos bioativos classificados entre metabólitos primários e secundários (BRISKIN, 2000). Os metabólitos primários estão relacionados a processos metabólicos da planta (fotossíntese e transporte de solutos), dentre os quais pode-se citar as proteínas, nucleotídeos, clorofila e polissacarídeos (BALANDRIN et al., 1985). Em relação aos metabólitos secundários, existem três classes principais: compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos. Tais compostos desempenham função na interação entre planta e meio ambiente, atuando como defensores químicos da planta, e como perpetuadores da espécie no papel de atrativos e polinizadores (BRISKIN, 2000).

O uso de plantas medicinais incorpora não apenas o tratamento de doenças, mas também a prevenção. Os cuidados em saúde englobam de forma proativa, a promoção de saúde, a prevenção de doenças e o manejo de doenças crônicas. São consideradas medidas de prevenção primária, a promoção de saúde e a prevenção de doenças; e são consideradas medidas de prevenção secundárias e terciárias aquelas que se concentram no rastreamento e diagnóstico precoce, e na prevenção de agravos e complicações, respectivamente (SOFOWORA; OGUNBODEDE; ONAYADE, 2013).

Com cerca de 60 mil espécies vegetais catalogadas, e a maior diversidade vegetal do planeta, o Brasil ainda tem muito o que avançar em pesquisas científicas, visto que aproximadamente 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Além da vasta biodiversidade, o país ainda conta com a diversidade cultural e étnica dos seus habitantes, o que resulta em grande acúmulo de conhecimentos e técnicas tradicionais (BRASIL, 2016).

Em estudo realizado na cidade de Dourados-MS, por meio de entrevistas a curandeiros tradicionais, 71 espécies de plantas foram citadas como medicinais, 20 dessas espécies foram citadas por sua utilização em doenças do trato urinário. As três espécies mais mencionadas pelos curandeiros da região de Grande Dourados foram a *Costus spicatus*, a *Curcuma zerdoaria* e o *Phyllanthus niruri*, usadas como diuréticos, hipotensores e hipolipemiantes (COELHO et al., 2019).

## 2.6 *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.

A ordem *Zingiberales*, engloba aproximadamente 2.500 espécies de plantas tropicais divididas em oito famílias (Musaceae, Lowiaceae, Strelitziaceae, Heliconiaceae, Zingiberaceae, Costaceae, Cannaceae e Marantaceae). A família Costaceae é constituída por sete gêneros (*Costus*, *Cheilocostus*, *Chamaecostus*, *Paracostus*, *Dimerocostus*, *Monocostus* e *Tapeinochilos*) e é costumeiramente usada como planta medicinal, ornamental e, em alguns casos, para o consumo. O gênero *Costus*, em particular, apresenta em torno de 109 espécies (ANDRÉ et al., 2016).

A espécie *Costus spicatus* pode ser encontrada no sul do México (Yucatan) Costa Rica, norte da Colômbia e no Brasil; é uma planta perene, rizomatosa, ereta, não ramificada, que pode apresentar de dois a três metros de altura. Suas folhas são alternas e cartáceas, com inflorescências terminais e grandes brácteas vermelhas, que protegem as flores amarelas (LORENZI; MATOS, 2002).

A *C. spicatus*, comumente chamada de “Cana-do-Brejo”, “Canafistula” ou “Canarana” no Brasil, é encontrada em áreas tropicais e subtropicais, principalmente em ambientes úmidos. Segundo informações etnobotânicas, suas folhas, raízes e rizomas são utilizados para o tratamento de inflamações, infecções, úlceras cutâneas, nefrolitíase, diabetes, diarreia, infecções do trato urinário e como diurético e depurativo (DA SILVA; BERNARDO; PARENTE, 2000; DE ALBUQUERQUE et al., 2007; KELLER et al., 2009).

Quanto à sua composição fitoquímica, a *C. spicatus* apresenta flavonoides, saponinas, taninos, alcalóides, triterpenos, polifenóis, dentre outros, que conferem à planta atividade antioxidante (AZEVEDO et al., 2014; PAES; MENDONÇA; CASAS, 2013).

O estudo de da Silva, Bernardo e Parente (2000) isolou e elucidou a estrutura de dois novos flavonoides diglicosídeos das folhas de *C. spicatus* chamados de tamarixetina 3-O-neohesperidina, campferida 3-O-neohesperidina os quais apresentaram função anti-inflamatória, bem como a já conhecida quercetina 3-O-neohesperidina, nesse estudo ficou evidente a ação inibitória desses flavonoides sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos ativadas. A quercetina 3-O-neohesperidina, ainda foi capaz de inibir a lesão tecidual endotelial por meio do estímulo à síntese de proteínas teciduais.

Devendran e Silvamani (2015) avaliaram a composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *C. spicatus*, e identificaram 14 constituintes químicos distribuídos entre as classes de alcalóides, flavonóides, glicosídeos, fenóis, saponinas, esteróis e taninos.

Pereira e Parente (2003) identificaram que as hastes da planta são constituídas em 99,5% por carboidratos e 0,5% por proteínas, os autores ainda identificaram que três desses glucanos, que foram investigados e demonstraram efeito sobre o sistema reticuloendotelial; apresentaram ação imunomoduladora devido ao estímulo à fagocitose; e ainda inibiram o aumento da permeabilidade vascular causada por ácido acético, o que reforça sua contribuição na proteção vascular.

Em sua pesquisa, Azhagumadhavan *et al.* (2019), realizaram análise fitoquímica de extratos do rizoma de *C. spicatus* e identificaram a presença de alcaloides, carboidratos, flavonoides, proteínas, aminoácidos, fenóis, taninos, glicosídeos e esteroides.

Estimulados pelo uso popular da planta, alguns estudos foram publicados atestando as atividades farmacológicas da *C. spicatus*. Um desses estudos confirmou sua função analgésica, ao identificar que o extrato metanólico das folhas da planta atenuou a dor induzida por formalina em camundongos, nas fases neurogênica (0-5 min) e inflamatória (15-30 min). O extrato também foi capaz de atenuar a contorção induzida por ácido acético, e estimulou significativa anti-nocicepção nos testes de placa quente e formalina. Tais efeitos, segundo os autores, podem estar relacionados à inibição da síntese de prostaglandinas bem como, por mecanismos inibitórios centrais (QUINTANS JÚNIOR *et al.*, 2010). Resultados parecidos também foram observados no estudo de Santos *et al.* (2014).

O estudo de Picanço *et al.* (2016), também demonstrou a atividade analgésica do extrato aquoso das folhas de *C. spicatus* frente à dor induzida pelo veneno da víbora *Bothrops atrox* em camundongos, nas fases neurogênica e inflamatória. O influxo de leucócitos também foi analisado por meio da contagem de células na lavagem peritoneal e o extrato da planta reduziu significativamente o número de leucócitos e o edema, mas não foi capaz de inibir a coagulação

provocada pelo veneno em amostras de sangue humano nem reduzir a ação da fosfolipase A2, que é um dos fatores responsáveis pelas lesões locais provenientes do envenenamento.

Outra pesquisa investigou a atividade farmacológica do extrato etanólico dos rizomas da planta em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina, e observou melhora significativa no peso corporal, glicemia e insulina plasmática dos animais diabéticos tratados com o extrato em relação aos animais diabéticos não tratados; além de mostrar efeito protetor contra a necrose nos hepatócitos, vacuolização e alterações estruturais causadas pela diabetes (MADHAVAN et al., 2019).

Por outro lado, um estudo utilizando camundongos obesos, não identificou atividade farmacológica hipoglicemiante significativa no chá de *C. spicatus*. Os animais geneticamente obesos não apresentaram redução da glicemia ou melhora na resistência à insulina causada pela obesidade, quando tratados com o chá em concentrações de consumo crescente no decorrer de dez semanas. Em discussão, os autores relataram dificuldades em encontrar uma concentração ideal do chá para o modelo animal, e também apontaram a severidade da resistência à insulina do modelo utilizado como um dos fatores que podem ter causado a não confirmação da atividade hipoglicemiante. Os resultados farmacológicos não confirmaram o uso popular frequente (segunda planta mais relatada) para o tratamento de diabetes pela população de dominicanos que vivem em Nova York, informação essa, que também foi identificada no mesmo estudo (KELLER et al., 2009).

Para avaliar a atividade antifúngica da planta contra cinco tipos de dermatófitos, um mesmo estudo realizou três experimentos independentes em duplicata. Os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram que o extrato aquoso de *C. spicatus* apresentava grande quantidade de flavonoides e que este, exibiu atividade antifúngica para todos os dermatófitos estudados (SILVA et al., 2008).

Em pesquisa *in vitro*, foi identificado importante efeito antimicrobiano da planta (folhas e caule) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, bem como forte atividade antioxidante, ambos os efeitos foram correlacionados a presença de flavonoides e fenóis (ULIANA et al., 2015). Outro estudo avaliou a interferência do extrato metanólico da planta na inibição da enzima lipase pancreática *in vitro*, e identificou que a planta possui uma ação inibitória, o que sugere a necessidades de estudos mais aprofundados para avaliar um potencial efeito adjuvante no tratamento da obesidade e dislipidemias, (SOUZA et al., 2012).

Não existem estudos que avaliaram os efeitos de *C. spicatus* em humanos, bem como, estudos que identifiquem com clareza sua relação com as doenças renais. Também existem

divergências quanto às partes da planta utilizadas popularmente, sendo assim há uma grande lacuna nas pesquisas neste âmbito.

### 3 OBJETIVOS

#### GERAL

Avaliar o efeito protetor do Sobrenadante Etanólico do Infuso de *Costus spicatus* (SEICS) sobre a LRA induzida por glicerol em ratos Wistar e a litíase urinária em modelo *in vitro*.

#### ESPECÍFICOS

Realizar a caracterização fitoquímica do SEICS;

Comparar a diferença entre os efeitos de diferentes doses do SEICS;

Avaliar o efeito da injeção intramuscular de glicerol sobre a função renal de ratos Wistar por meio de exames bioquímicos e análises histológicas;

Avaliar e comparar os efeitos de cada dose do SEICS, sobre os exames bioquímicos e análises histológicas de ratos Wistar com LRA desenvolvida por rabdomiólise;

Avaliar a reatividade vascular renal mediante a LRA induzida por glicerol;

Identificar a ação antioxidante do SEICS nos rins dos animais com LRA induzida por glicerol;

Identificar o potencial diurético e natriurético do SEICS;

Avaliar o efeito do SEICS no tamanho e número dos cristais formados em modelo de cristalização *in vitro* por precipitação de oxalato de cálcio;

Avaliar o efeito do SEICS no índice de turbidez das amostras de urina em modelo de cristalização *in vitro* por precipitação de oxalato de cálcio;

Avaliar o efeito do SEICS na formação de cristais monohidratados e dihidratados nas amostras de urina em modelo de cristalização *in vitro* por precipitação de oxalato de cálcio;

Identificar qualitativamente o efeito do SEICS sobre a agregação dos cristais 24 horas após a cristalização *in vitro*.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHILLES, W. In vitro crystallization systems for the study of urinary stone formation. **World Journal of Urology**, v. 15, n. 4, p. 244–251, 1 ago. 1997.
- AL ASMARI, A. K.; AL SADOON, K. T.; OBAID, A. A.; YESUNAYAGAM, D.; TARIQ, M. Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. **BMC Nephrology**, v. 18, 28 jan. 2017.
- ALELIGN, T.; PETROS, B. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts. **Advances in Urology**, v. 2018, p. 3068365, 2018.
- ALEXANDER, R. T.; HEMMELGARN, B. R.; WIEBE, N.; BELLO, A.; MORGAN, C.; SAMUEL, S.; KLARENBACH, S. W.; CURHAN, G. C.; TONELLI, M. Kidney Disease Network. Kidney stones and kidney function loss: a cohort study. **British Medical Journal**, v. 345, p. e5287, 30 ago. 2012.
- ANDRÉ, T.; SALZMAN, A. S.; WENDT, B. T.; SPECH C. Speciation dynamics and biogeography of Neotropical spiral gingers (Costaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 103, p. 55–63, 2016.
- AZEVEDO, L. F. P.; FARIA, T.S.A.; PESSANHA, F.F.; ARAUJO, M.F.; LEMOS, G.C.S. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 209–215, jun. 2014.
- AZHAGUMADHAVAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; PADMA, M.; SASIKALA, P.; JAYASEELAN, T.; GANESAN, S. A Study on Establishment of Phytochemical Analysis of Quality Parameters and Fluorescence Analysis of *Costus spicatus*- rhizome extract Medicinal Plants a Well Known Tropical Folklore Medicine. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 1- s, p. 240–243, 15 fev. 2019.
- BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; HUGHBOLLINGER, W. M. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science** (New York, N.Y.), v. 228, n. 4704, p. 1154–1160, 7 jun. 1985.
- BARROS, M. E.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. **Urological Research**, v. 30, n. 6, p. 374–379, fev. 2003.
- BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A.; MEHTA, R. L.; PALEVSKY, P. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R204–R212, 2004.
- BENJUMEA, D.; ABDALA, S.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; PÉREZ-PAZ, P.; MARTÍN-HERRERA, D. Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic Canary species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 205–209, 22 ago. 2005.
- BOSCH, X.; POCH, E.; GRAU, J. M. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 1, p. 62–72, 2 jul. 2009.
- BOSKEY, A. L. Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 157, p. 225–257, jun. 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 189 p, 2016.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 507–514, out. 2000.

CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 6, n. 2, p. 261–279, out. 2001.

CHARLTON, J. R.; PORTILLA, D.; OKUSA, M. D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, v. 29, n. 7, p. 1301–1311, jul. 2014.

CHAWLA, L. S.; EGGERS, P.; STAR, R.; KIMMEL, P. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 1, p. 58–66, 2014.

CHAWLA, L. S.; BELLOMO, R.; BIHORAC, A.; GOLDSTEIN, S.; SIEW, E.; BAGSHAW, S.; BITTLEMAN, D.; CRUZ, D.; ENDRE, Z.; FITZGERALD, R.; FORNI, L.; KANE-GILL, S.; HOSTE, E.; KOYNER, J.; LIU, K.; MACEDO, E.; MEHTA, R.; MURRAY, P.; NADIM, M.; KELLUM, J. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 4, p. 241–257, abr. 2017.

CHEUNG, C. M.; PONNUSAMY, A.; ANDERTON, J. G. Management of acute renal failure in the elderly patient: a clinician's guide. **Drugs & Aging**, v. 25, n. 6, p. 455–476, 2008.

CHUASUWAN, A.; KELLUM, J. A. Cardio-renal syndrome type 3: epidemiology, pathophysiology, and treatment. **Seminars in Nephrology**, v. 32, n. 1, p. 31–39, jan. 2012.

COELHO, F. C.; TIRLONI, C.; MARQUES, A.; GASPAROTTO, F.; LÍVERO, F.; GASPAROTTO JR, A. Traditional Plants Used by Remaining Healers from the Region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Religion and Health**, v. 58, n. 2, p. 572–588, 1 abr. 2019.

COLLISTER, D.; PANNU, N.; YE, F.; JAMES, M.; HEMMELGARN, B.; CHUI, B.; MANNS, B.; KLARENBACH, S. Health Care Costs Associated with AKI. **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 12, n. 11, p. 1733–1743, 7 nov. 2017.

DA SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 87–92, jan. 2000.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS. Informações em saúde, epidemiológicas e de morbidade: banco de dados. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?%20area=0203>>. Acesso em: 16 out. 2019.

DE ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J.; RAMOS, M.; AMORIM, E. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91, 1 mar. 2007.

- DENNIS, J. M.; WITTING, P. K. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 7, 7 jul. 2017.
- DEVENDRAN, G.; SIVAMANI, G. Phytochemical analysis of leaf extract of plant *Costus spicatus* by gcms method. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, p. 24–26, 15 jul. 2015.
- EDVARDSSON, V. O.; INDRIDASON, O.; HARALDSSON, G.; KJARTANSSON, O.; PALSSON, R. Temporal trends in the incidence of kidney stone disease. **Kidney International**, v. 83, n. 1, p. 146–152, jan. 2013.
- FINLAYSON, B.; KHAN, S. R.; HACKETT, R. L. Mechanisms of stone formation--an overview. **Scanning electron microscopy**, n. Pt 3, p. 1419–1425, 1984.
- GAMBARO, G. D'ANGELO, A.; FABRIS, A.; TOSETTO, E.; ANGLANI, F.; LUPO, A. Crystals, Randall's plaques and renal stones: do bone and atherosclerosis teach us something? **Journal of Nephrology**, v. 17, n. 6, p. 774–777, dez. 2004.
- HOMSI, E.; JANINO, P.; DE FARIA, J. B. L. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney International**, v. 69, n. 8, p. 1385–1392, abr. 2006.
- HSU, C.-Y. MCCULLOCH, C.E.; FAN, D.; ORDOÑEZ, J.D.; CHERTOW, G.M.; GO, A.S. Community-based incidence of acute renal failure. **Kidney International**, v. 72, n. 2, p. 208–212, jul. 2007.
- HULTSTRÖM, M.; BECIROVIC-AGIC, M.; JÖNSSON, S. Comparison of acute kidney injury of different etiology reveals in-common mechanisms of tissue damage. **Physiological Genomics**, v. 50, n. 3, p. 127–141, 20 dez. 2017.
- KAU, S. T.; KEDDIE, J. R.; ANDREWS, D. A method for screening diuretic agents in the rat. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 11, n. 1, p. 67–75, mar. 1984.
- KELLER, A. C. ANDEBROEK, I.; LIU, Y.; BALICK, M.; KRONENBERG, F.; KENNELLY, E.; BRILLANTES, A. *Costus spicatus* tea failed to improve diabetic progression in C57BLKS/J db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 248–254, 21 jan. 2009.
- KHAN, A. In vitro and in vivo models for the study of urolithiasis. **Urologia Journal**, v. 85, n. 4, p. 145–149, 20 abr. 2018.
- KHAN, S. R. MARGARET, S. P.; ROBERTSON, W.G.; GAMBARO, G.; CANALES, B. K.; DOIZI, E.; TRAXER, O.; TISELIUS, H. Kidney stones. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16008, 25 fev. 2016.
- KIM, J. H.; YOUNG, S.; CHOI, M.; KIM, Y.; YOON, S.; KIM, J.; MOON, I.; CHOI, B.; PARK, C.; YANG, C.; KIM, Y.; CHUNG, B. Prediction of clinical outcomes after kidney transplantation from deceased donors with acute kidney injury: a comparison of the KDIGO and AKIN criteria. **BMC Nephrology**, v. 18, 27 jan. 2017.
- KOHJIMOTO, Y. SASAKI, Y.; IGUCHI, M.; MATSUMURA, N.; INAGAKI, T.; HARA, I. Association of metabolic syndrome traits and severity of kidney stones: results from a nationwide survey on urolithiasis in Japan. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 61, n. 6, p. 923–929, jun. 2013.
- KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. **Renal Failure**, v. 31, n. 1, p. 36–43, 2009.



- KOUL, V.; KAUR, A.; SINGH, A. P. Investigation of the role of nitric oxide/soluble guanylyl cyclase pathway in ascorbic acid-mediated protection against acute kidney injury in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 406, n. 1–2, p. 1–7, ago. 2015.
- LAI, C.-F. WU, V.; HUANG, T.; YEH, Y.; WANG, K.; HAN, Y.; LIN, Y.; JHUANG, Y.; CHAO, C.; SHIAO, C.; TSAI, P.; HU, F.; CHOU, N.; KO, W.; WU, K. Kidney function decline after a non-dialysis-requiring acute kidney injury is associated with higher long-term mortality in critically ill survivors. **Critical Care (London, England)**, v. 16, n. 4, p. R123, 12 jul. 2012.
- LEHNER, G. F.; FORNI, L. G.; JOANNIDIS, M. Oliguria and Biomarkers of Acute Kidney Injury: Star Struck Lovers or Strangers in the Night? **Nephron**, v. 134, n. 3, p. 183–190, 2016.
- LEVEY, A. S. CKARDT, K.; TSUKAMOTO, Y.; LEVIN, A.; CORESH, J.; ROSSERT, J.; ZEEUW, D.; HOSTETTER, T.; LAMEIRE, N.; EKNOYAN, G. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney International**, v. 67, n. 6, p. 2089–2100, 1 jun. 2005.
- LI, Y. XU, B.; AN, RAN D.; XIN-FANG Y.; KUN S.; JIA-HUA Z.; GUO-HONG W.; WEI A.; LI-PING W. Protective effect of anisodamine in rats with glycerol-induced acute kidney injury. **BMC Nephrology**, v. 20, n. 1, p. 223, 17 jun. 2019.
- LIAÑO, F.; PASCUAL, J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. **Kidney International**, v. 50, n. 3, p. 811–818, set. 1996.
- LOMBARDI, R. YU, L.; YOUNES-IBRAHIM, M.; SCHOR, N.; BURDMANN, E. Epidemiology of acute kidney injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 320–329, jul. 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. de ABREU. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MACHADO, M. N. NAKAZONE, M.; MAIA, L. Acute kidney injury based on KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) criteria in patients with elevated baseline serum creatinine undergoing cardiac surgery. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 29, n. 3, p. 299–307, set. 2014.
- MADHAVAN, S. A. SENTHILKUMAR, S.; ANDREWS, S.; GANESAN, S. Anti-diabetic effect of ethanol extract of *Costus spicatus* jacq. in rhizome extract in streptozotocin-induced diabetic rats – Histological study. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 4- s, p. 483–487, 15 ago. 2019.
- MARTIM, E. C. DE O. PINTO, C.; WATANABE, M.; VATTIMO, M. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 3, p. 292–296, set. 2007.
- MOE, O. W. Kidney stones: pathophysiology and medical management. **Lancet (London, England)**, v. 367, n. 9507, p. 333–344, 28 jan. 2006.
- PAES, L. S.; MENDONÇA, M. S.; CASAS, L. L. Aspectos Estruturais e Fitoquímicos de partes vegetativas de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 380–390, 2013.
- PANIZO, N. RUBIO-NAVARRO, A.; AMARO-VILLALOBOS, J.; EGIDO, J.; MORENO, J. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 40, n. 5, p. 520–532, 2015.

PEREIRA, DA S.; PARENTE, P. J. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 3, p. 239–242, 15 fev. 2003.

PETEJOVA, N.; MARTINEK, A. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis and renal replacement therapy: a critical review. **Critical Care**, v. 18, n. 3, p. 224, 2014.

PICANÇO, L. C. DOS S. BITTENCOURT, J.; HENRIQUES, S.; SILVA, J.; OLIVEIRA, J.; RIBEIRO, J.; ANTONY-BABU, S.; CARVALHO, J. C. STIEN, D.; SILVA, J. Pharmacological activity of *Costus spicatus* in experimental Bothrops atrox envenomation. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 10, p. 2103–2110, 2 out. 2016.

PUNURU, P. DODOALA, S.; KUMARI, B.; CHARISMA, V. Evaluation of aqueous extract of *Murraya koenigii* in unilateral renal ischemia reperfusion injury in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 171–175, 2014.

QUINTANS JÚNIOR, L. J. SANTANA, M.; MELO, M.; SOUSA, D.; SANTOS, I.; SIQUEIRA, R.; CARDOSO, T.; SILVEIRA, G.; ANTONIOLLI, A.; RIBEIRO, L.; SANTOS, M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 10, p. 1097–1102, out. 2010.

REZ, P. What does the crystallography of stones tell us about their formation? **Urolithiasis**, v. 45, n. 1, p. 11–18, 1 fev. 2017.

RULE, A. D. BERGSTRALH, E. J.; MELTON, L. J.; LI, X.; WEAVER, A. L.; LIESKE, J. C. Kidney Stones and the Risk for Chronic Kidney Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 4, n. 4, p. 804–811, abr. 2009.

SANTOS, I. S. BITTENCOURT, J.; HENRIQUES, S.; SILVA, J.; OLIVEIRA, J.; RIBEIRO, J.; ANTONY-BABU, S.; CARVALHO, J. C.; STIEN, D.; SILVA, A. Phytochemical and pharmacological evaluation from leaves of *Costus spicatus* Swartz. (Costaceae). **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.1, p.1-8, 2014.

SAVIC, V. VLAHOVIC, P.; DJORDJEVIC, V.; MITIC-ZLATKOVIC, M.; AVRAMOVIC, V.; STEFANOVIC, V. Nephroprotective effects of pentoxifylline in experimental myoglobinuric acute renal failure. **Pathologie Biologie**, v. 50, n. 10, p. 599–607, 1 dez. 2002.

SHARMA, A. P.; FILLER, G. Epidemiology of pediatric urolithiasis. **Indian Journal of Urology**, v. 26, n. 4, p. 516–522, 2010.

SHI, Y.; XU, L.; TANG, J.; FANG, L.; MA, S.; MA, X.; NIE, J.; PI, X.; QIU, A.; ZHUANG S.; LIU, N. Inhibition of HDAC6 protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 312, n. 3, p. F502–F515, 01 2017.

SIGURJONSDOTTIR, V. K. RUNOLFSDOTTIR, H. L.; INDRIDASON, O. S.; PALSSON, R.; EDVARDSSON, V.O. Impact of nephrolithiasis on kidney function. **BMC Nephrology**, v. 16, p. 149, 28 ago. 2015.

SILVA, D. N.; GONÇALVES, M.; AMARAL, M. T.; BATISTA, M.T. Antifungal activity of a flavonoid-rich fraction from *Costus spicatus* leaves against dermatophytes. **Planta Medica**, v. 74, n. 9, p. 961–961, 2008.

SOFOWORA, A.; OGUNBODEDE, E.; ONAYADE, A. The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 10, n. 5, p. 210–229, 12 ago. 2013.

SOUSA, C. M.; SOUSA, M.; ROCHA, H.; VIEIRA, J.; GERARDO, M.; CRUZ, M.; AYRES, C.; COSTA, C.; COSTA, D.; ARAÚJO, L.; CARLOS, D.; CAVALCANTE, L.; ELCIO, D.; BARROS, P.; BREITNER, B.; DE ARAÚJO, M.; BRANDÃO, M.; HELENA, C. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, abr. 2007.

SOUZA, S. P.; PEREIRA, L.L.S.; SOUZA, A.A.; SANTOS, C.D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 643–648, 2012.

STAMATELOU, K. K.; FRANCIS, M. E.; JONES, C. A.; NYBERG, L. M.; CURHAN, G. C. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976–1994. See Editorial by Goldfarb, p. 1951. **Kidney International**, v. 63, n. 5, p. 1817–1823, 1 maio 2003.

STOJILJKOVIC, N.; STOJILJKOVIC, M.; RANDJELOVIC, P.; VELJKOVIC, S.; MIHAILOVIC, D. Cytoprotective effect of vitamin C against gentamicin-induced acute kidney injury in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 1, p. 69–74, 1 jan. 2012.

TAKHTFOOLADI, M. A.; TAKHTFOOLADI, H. A.; MOAYER, F.; KARIMI, P.; ASL H. A. Effect of *Otostegia persica* extraction on renal injury induced by hindlimb ischemia-reperfusion: A rat model. **International Journal of Surgery**, v. 13, p. 124–130, 1 jan. 2015.

THURGOOD, L. A.; COOK, A. F.; SØRENSEN, E. S.; RYALL, R. L. Face-specific incorporation of osteopontin into urinary and inorganic calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. **Urological Research**, v. 38, n. 5, p. 357–376, 1 out. 2010.

TIRLONI, C. A. S. PALOZI, R. A.; TOMAZETTO, T. A.; VASCONCELOS, P. C. P.; SOUZA, R.I.C.; DOS SANTOS, A.C.; DE ALMEIDA, V.P.; BUDEL, J.M.; DE SOUZA, L. M.; GASPAROTTO JR, A. Ethnopharmacological approaches to kidney disease-prospecting an indigenous species from Brazilian Pantanal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 47–57, 30 jan. 2018.

TSUJIHATA, M. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. **International Journal of Urology**, v. 15, n. 2, p. 115–120, 2008.

TÜRK, C.; PETŘÍK, A.; SARICA, K.; SEITZ, C.; SKOLARIKOS, A.; STRAUB, M.; KNOLL, T. EAU Guidelines on Diagnosis and Conservative Management of Urolithiasis. **European Urology**, v. 69, n. 3, p. 468–474, 1 mar. 2016.

TZOU, D. T.; TAGUCHI, K.; CHI, T.; STOLLER, M. Animal models of urinary stone disease. **International Journal of Surgery**, v. 36, p. 596–606, 1 dez. 2016.

ULIANA, M. P.; SILVA, A.; FRONZA, M.; SCHERER, R. In vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Costus spicatus* Swartz used in Folk Medicine for Urinary Tract Infection in Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 4, p. 766–772, 2015.

USTUNDAG, S.; YALCIN, O.; SEN, S.; CUKUR, Z.; CIFTCI, S.; DEMIRKAN, B. Experimental myoglobinuric acute renal failure: the effect of vitamin C. **Renal Failure**, v. 30, n. 7, p. 727–735, 2008.

WEST, B. LUKE, A.; DURAZO-ARVIZU, R.; CAO, G.; SHOHAM, D.; KRAMER, H. Metabolic syndrome and self-reported history of kidney stones: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) 1988-1994. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 51, n. 5, p. 741–747, maio 2008.

XU, L. H. R.; ADAMS-HUET, B.; POINDEXTER, J.; MAALOUF, N.; MOE, O.; SAKHAE, K. Temporal Changes in Kidney Stone Composition and in Risk Factors Predisposing to Stone Formation. **The Journal of Urology**, v. 197, n. 6, p. 1465–1471, jun. 2017.

YASUI, T., OKADA, A.; HAMAMOTO, S.; ANDO, R.; TAGUCHI, K.; TOZAWA, K.; KOHRI, K. Pathophysiology-based treatment of urolithiasis. **International Journal of Urology**, v. 24, n. 1, p. 32–38, 2017.

YOO, E. J.; LIM, S.; KANG, H.; PARK, H.; YOON, S.; NAM, D.; SANADA, S.; KWON, M.I.; LEE-KWON, W.; CHOI, S.; KWON, H. Transcriptional Regulator TonEBP Mediates Oxidative Damages in Ischemic Kidney Injury. **Cells**, v. 8, n. 10, 20 out. 2019.

ZAGER, R. A. Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury. **Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 60, n. 5, p. 619–629, maio 1989.

ZAGER, R. A.; GAMELIN, L. M. Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure. **The American Journal of Physiology**, v. 256, n. 3 Pt 2, p. F446-455, mar. 1989.

ZARJOU, A.; BOLISSETTY, S.; JOSEPH, R.; TRAYLOR, A.; APOSTOLOV, E.; AROSIO, P.; BALLA, J.; VERLANDER, J.; DARSHAN, D.; KÜHN, L.; AGARWAL, A. Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4423–4434, out. 2013.

ZHU, Y.-B.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, Y. Evaluation of Vitamin C Supplementation on Kidney Function and Vascular Reactivity Following Renal Ischemic Injury in Mice. **Kidney & Blood Pressure Research**, v. 41, n. 4, p. 460–470, 2016.

ZISMAN, A. L. Effectiveness of Treatment Modalities on Kidney Stone Recurrence. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 10, p. 1699–1708, 6 out. 2017.

## 5 APÊNDICES

**Artigo 1: Submetido à revista Journal of Ethnopharmacology (Qualis A2)**

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>

**Nephroprotective and antilithiatic activities of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.:  
Ethnopharmacological investigation of a species from the Dourados region, Mato  
Grosso do Sul State, Brazil**

Karyne Garcia Tafarelo Moreno<sup>1</sup>; Arquimedes Gasparotto Junior<sup>2\*</sup>; Ariany Carvalho dos Santos<sup>3</sup>; Rhanany Alan Calloi Palozi<sup>2</sup>; Lucas Pires Guarnier<sup>2</sup>; Aline Aparecida Macedo Marques<sup>2</sup>; Paulo Vitor Moreira Romão<sup>2</sup>; Bethânia Rosa Lorençone<sup>2</sup>; Nadla Soares Cassemiro<sup>4</sup>; Denise Brentan Silva<sup>4</sup>; Cleide Adriane Signor Tirloni<sup>2</sup>; Márcio Eduardo de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>**Laboratory of Urinalysis**, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.

<sup>2</sup>**Laboratory of Cardiovascular Pharmacology - LaFaC**, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.

<sup>3</sup>**Laboratory of Histopathology**, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.

<sup>4</sup>**Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM)**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

**\*Corresponding author:** Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O. Box 533, 79.804-970 Dourados, MS, Brazil. Phone: +55 (67) 3410-2333, Fax: +55 (67) 3410-2321.

E-mail: arquimedesjunior@ufgd.edu.br (A. Gasparotto Junior).

## Abstract

*Ethnopharmacological relevance:* *Costus spicatus* (Jacq.) Sw., also known as “cana-do-brejo,” is a species that is widely used in Brazilian traditional medicine for the treatment of kidney diseases. However, no studies have evaluated its nephroprotective and antilithiatic effects.

*Aim:* To investigate nephroprotective and antilithiatic effects of *C. spicatus* in a preclinical model of acute kidney injury (AKI) and *in vitro* nephrolithiasis.

*Materials and methods:* *C. spicatus* leaves were collected directly from the natural environment in the Dourados region, Mato Grosso do Sul State, Brazil. The ethanol-soluble fraction of *C. spicatus* (ESCS) was obtained by infusion. Phytochemical characterization was performed by liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometer (LC-DAD-MS). We assessed whether ESCS has acute or prolonged diuretic activity. The nephroprotective effects of ESCS were evaluated in a model of AKI that was induced by glycerol (10 ml/kg, intramuscularly) in Wistar rats. Different doses of ESCS (30, 100, and 300 mg/kg) were administered orally for 5 days before the induction of AKI. Urinary parameters were measured on days 1, 3, 5, and 7. Twenty-four hours after the last urine collection, blood samples were obtained for the biochemical analysis. Blood pressure levels, renal vascular reactivity, renal tissue redox status, and histopathological changes were measured. Antilithiatic effects were evaluated by *in vitro* crystallization. Calcium oxalate precipitation was induced by sodium oxalate in urine samples with ESCS at 0.05, 0.5, and 5 mg/ml.

*Results:* From LC-DAD-MS analyses, flavonoids, saponins and other phenolic compounds were determined in the composition of ESCS. Significant reductions of the excretion of urinary total protein, creatinine, sodium, and potassium were observed in the AKI group, with significant histopathological damage (swelling, vacuolization, necrosis, and inflammatory infiltration) in the proximal convoluted tubule. Treatment with ESCS exerted a significant nephroprotective effect by increasing the urinary excretion of total protein, urea, creatinine,

sodium, potassium, calcium, and chloride. All of the groups that were treated with ESCS exhibited a reduction of histopathological lesions and significant modulation of the tissue redox state. We also observed a concentration-dependent effect of ESCS on the crystallization of urinary crystals, with reductions of the size and proportion of monohydrated crystals.

*Conclusion:* The data suggest that *C. spicatus* has nephroprotective and antilithiatic effects, suggesting possible effectiveness in its traditional use.

**Keywords:** Acute kidney injury; Costaceae; nephrolithiasis; nephropathy; rhabdomyolysis.



**Abbreviations**

AKI: acute kidney injury; ANOVA: analysis of variance; CAT: catalase; CEUA: Ethics Committee on Animal Use; CFMV: Federal Council of Veterinary Medicine; COD: calcium oxalate dihydrate crystals; COM: calcium oxalate monohydrate crystals; CONCEA: National Council for Animal Control and Experimentation; DCT: distal convoluted tubules; DOB: main absorbance before precipitation; DOT: main absorbance after crystal precipitation; ER: excretion rate; ESCS: Ethanol-soluble fraction of *Costus spicatus*; GFR: glomerular filtration rate; HCTZ: hydrochlorothiazide; LPO: lipid peroxidation; NCG: negative control group; PCG: positive control group; PCT: proximal convoluted tubules; PSS: physiological saline solution; SCr: serum creatinine; SD: standard deviation; SOD: superoxide dismutase; TI: turbidity index; UFGD: Federal University of Grande Dourados.

## 1. Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a pathological process that is characterized by the abrupt loss of renal function, leading to an accelerated increase in serum creatinine (SCr) levels and nitrogenous waste (Charlton et al., 2014). The incidence of community-acquired AKI is 400 per 100,000 per year. This condition is responsible for up to 30% of admissions to intensive care units (Cheung et al., 2008; Hsu et al., 2007). Patients who survive AKI should be monitored for years because of the possibility of the continuous decline of kidney function, leading to chronic kidney disease (Lai et al., 2012).

Another kidney disease, affecting 10-12% of men and 5-6% of women, is nephrolithiasis. This disease is characterized by the formation of kidney stones that originate from the precipitation of poorly soluble salts in concentrated urine (Moe, 2006). Although it does not have a high mortality rate, nephrolithiasis is associated with costs to society in terms of treatment, hospitalization, and absence from work (Edvardsson et al., 2013; Gambaro et al., 2004). Treatments for kidney diseases can be quite costly to healthcare systems, including pharmacological treatment, hospitalization, dialysis, and surgery. Numerous studies have sought to identify new alternatives for their treatment and prevention. In developing countries, such as Brazil, an estimated 85% of the population uses traditional medicine for healthcare (Brazil, 2016). An ethnobotanical study that was performed in the Grande Dourados region, Mato Grosso do Sul State, Brazil, identified 71 plant species that are routinely used in traditional medicine (Coelho et al., 2019). *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae) was among the top three most cited species by healers in the Grande Dourados region, with popular usage reported for urinary tract diseases. Also called “cana-do-brejo,” “canafistula,” or “canarana,” this species is found in tropical and subtropical areas, especially in humid environments. Some studies also cite *C. spicatus* as a treatment for nephrolithiasis and urinary tract infections and as a diuretic and depurative (da Silva et al., 2000; Keller et al., 2009).

Phytochemical investigations have revealed the presence of flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, and triterpenes in *C. spicatus* extracts (Azevedo et al., 2014; Devendran and Sivamani, 2015; Paes et al., 2013). Silva et al. (2000) isolated and elucidated the structure of two new flavonol diglycosides (tamarixetin 3-*O*-neohesperidoside and kaempferide 3-*O*-neohesperidoside) in *C. spicatus* and showed the presence of seven other flavonoids. Previous pharmacological studies that used different preparations of *C. spicatus* have reported analgesic, antiinflammatory (Picanço et al., 2016; Quintans Júnior et al., 2010), and antidiabetic (Madhavan et al., 2019) effects. Antifungal and antimicrobial activities have also been reported (Silva et al., 2008; Souza et al., 2012).

Several ethnobotanical studies have suggested diuretic and renoprotective effects of *C. spicatus*, but no published data have validated this traditional use. Thus, the present study investigated the diuretic and nephroprotective effects of *C. spicatus* in Wistar rats and assessed its antilithiatic activity by *in vitro* crystallization.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Drugs and reagents*

Heparin was purchased from Hipolabor (Belo Horizonte, MG, Brazil). Xylazine and ketamine hydrochloride were obtained from Syntec (São Paulo, SP, Brazil). Phenylephrine, hydrochlorothiazide, acetylcholine chloride, sodium nitroprusside, angiotensin II, dextrose, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### *2.1. Preparation of the extract*

*Costus spicatus* leaves were collected directly from the natural environment in the Dourados region, Mato Grosso do Sul State, Brazil, at 430 m above sea level (22°12'02.7" S,

54°54'38.0" W). A specimen of *C. spicatus* was deposited in the herbarium of the Federal University of Grande Dourados (UFGD; no. DDMS 5645). Botanical identification was performed by Dr. Maria do Carmo Vieira. The plant name is according to The Plant List online database (<http://www.theplantlist.org/>; accessed November 30, 2019).

After cleaning in chlorinated water, the plant leaves were dried in an oven at 40°C for 3 days and then ground in a knife mill. Extraction was performed by an infusion of 60 g of the leaf powder per 1 L of boiling water. After the preparation reached room temperature, absolute ethanol (3:1; v:v) was added to precipitate proteins and polysaccharides. The resulting ethanol-soluble fraction (ESCS) was then concentrated using a rotary evaporator and then freeze-dried. ESCS was resuspended in filtered water immediately before administration (Azevedo et al., 2014).

## 2.2. Identification of the chemical composition by LC-DAD-MS

ESCS was solubilized in methanol and water deionized (7:3, v/v) at concentration 2 mg/mL. This solution was filtered (Millex 0.22 µm, PTFE, Millipore) and 8 µL was injected into the Shimadzu LC-20AD UFLC chromatograph coupled to diode array detector and a mass spectrometer ESI-QTOF microTOF III (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA). The analyses were monitored between 240-800 nm and acquired in negative and positive ion mode ( $m/z$  120-1200 and for MS/MS - collision energy 45-65 V). Kinetex C-18 chromatography column (Phenomenex, 2.6 µ, 150 x 2.1 mm) was used. The mobile phase was ultrapure water (Phase A) and acetonitrile (Phase B) both with 0.1% formic acid. The gradient elution profile applied was 0-2 min - 3% Phase B, 2-25 min - 3-25% Phase B, 25-40 min - 25-80% Phase B, 40-43 min - 80% B, followed by column washing and reconditioning (5 minutes). The flow rate was 0.3 mL/min and the temperature oven was 50 °C.

The data were processed by Data Analysis software version 4.2 (Bruker) and compounds were identified based on ultraviolet spectra, retention time, accurate mass and fragmentation profile in comparison with the data of literature. The molecular formulas were determined by accurate mass considering errors up  $\pm 5$  ppm and mSigma below 30.

### 2.3. Pharmacological studies

#### 2.3.1. Animals

All of the procedures that were used in this study were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of UFGD (no. 29.2018). Seventy-three male Wistar rats (250-300 g) were purchased from the UFGD vivarium and housed under controlled humidity (60-80%) and temperature ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and a 12 h/12 h light/dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*. At the end of the procedures, all of the animals were euthanized by deep anesthesia with isoflurane in a saturation chamber according to the Euthanasia Practice Guidelines of the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA, Brazil, 2013) and resolution 1000/2012 of the Federal Council of Veterinary Medicine (CFMV).

#### 2.3.2. Diuretic activity

Diuretic activity was evaluated according to Gasparotto et al. (2009). After randomization, 25 male Wistar rats were divided into five experimental groups ( $n = 5/\text{group}$ ): negative control (filtered water; 0.2 ml/100 g), hydrochlorothiazide (HCTZ; 25 mg/kg), and ESCS (30, 100, and 300 mg/kg). All of the animals initially received NaCl (5 ml/100 g body weight) by gavage to impose salt and water uniformity in the body. The animals were then treated once daily for 7 days with ESCS, HCTZ, or vehicle. Immediately after the first treatment, all of the animals were placed in metabolic cages. Urine was collected and measured (expressed as ml/100 g body weight) 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after treatment for the first 24 h

and then every 24 h on days 2, 3, 5, and 7. pH and density were determined in fresh urine samples using a digital pH meter (Q400MT; Quimis Instruments, Diadema, São Paulo, Brazil) and refractometer (NO107; Quimis Instruments, Diadema, São Paulo, Brazil), respectively. Aliquots of each urine sample were analyzed using a selective ion meter (COBAS INTEGRA 400 plus; Roche, Basel, Switzerland). The excretion rate was calculated by multiplying sodium, potassium, and chloride ions concentrations (mEq/L) by urine flow (ml/min). The results are expressed as  $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{ g}$  body weight.

### 2.3.3. Evaluation of nephroprotective effect

We evaluated the nephroprotective effects of ESCS according to the protocol that was established by Al Asmari et al. (2017), with minor modifications. After randomization, 48 male Wistar rats were divided into six experimental groups ( $n = 8/\text{group}$ ). Three different groups orally received ESCS (30, 100, and 300 mg/kg) daily for 5 days. The control animals received vehicle (negative control; 0.2 ml/100 g) or ascorbic acid (200 mg/kg) by gavage according to Martin et al. (2007) and Stojiljkovic et al. (2012). Ascorbic acid was used as the positive control because of the involvement of oxidative stress in rhabdomyolysis. On day 6, all of the animals were deprived of water for 24 h. In the morning on day 7, the animals intramuscularly received 10 ml/kg of 25% glycerol solution. The total volume that was administered was divided into two equal parts for each femoral region. A group of naive rats was orally treated for 5 days with vehicle (0.2 ml/100 g) and intramuscularly received 10 ml/kg of 0.9% NaCl (Table 1).

#### 2.3.3.1. Evaluation of renal function

The animals that were subjected to rhabdomyolysis-induced AKI were initially placed in pairs in metabolic cages 24 h before beginning the experiments for adaptation. Before the experiments, all of the animals received 0.9% NaCl (5 mL/100 g) by gavage to impose salt and

water balance. Urine was collected in graduated cylinders after 4, 8, 12, and 24 h. On days 0, 3, 5, and 7, urine samples were also collected for 24 h. Urinary volume is expressed as ml/100 g body weight. pH and density were determined in fresh urine samples using a digital pH meter (Q400MT; Quimis Instruments, Diadema, São Paulo, Brazil) and refractometer (NO107; Quimis Instruments, Diadema, São Paulo, Brazil), respectively. Urine levels of sodium, potassium, chloride, bicarbonate, urea, creatinine, total protein, and albumin were measured using an automatic biochemical analyzer (COBAS INTEGRA 400 plus; Roche, Basel, Switzerland).

#### 2.3.3.2. Heart rate, blood pressure, and serum biochemical analysis

Twenty-four hours after the last urine collection, rats that were subjected to rhabdomyolysis-induced AKI were intramuscularly anesthetized with ketamine (100 mg/kg) plus xylazine (20 mg/kg) and supplemented every 45-60 min when necessary. A subcutaneous injection of heparin (20 IU) was administered before the surgical procedure. Subsequently, the left carotid artery was isolated, cannulated, and connected to a pressure transducer that was coupled to a computerized recording system (PowerLab, Graph, v4 .1; ADI Instruments, Castle Hill, Australia). Systolic, diastolic, and mean arterial blood pressure and heart rate were recorded for 20 min. After recording the cardiovascular parameters, a 5 ml sample of arterial blood was collected from the previously cannulated carotid artery. The samples were centrifuged at  $1,500 \times g$  to obtain serum. Serum levels of uric acid, urea, creatinine, calcium, magnesium, sodium, potassium, and phosphorus were quantified using an automatic biochemical analyzer (COBAS INTEGRA 400 plus; Roche, Basel, Switzerland).

#### 2.3.3.3. Renal vascular reactivity

After the blood pressure measurement and while the animals were still under anesthesia, the right renal artery was cannulated and gently washed with physiological saline solution (PSS; 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 mM dextrose, and 0.03 mM EDTA; pH 7.4). The right kidney was then removed and placed in a jacked glass that was maintained at 37°C, aerated with carbogen (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), and perfused with PSS using a peristaltic pump at a constant flow rate at 4 ml/min. Changes in perfusion pressure were recorded by a force transducer that was connected to a signal amplifier and coupled to a recording system (PowerLab, Chart, v4 .1; ADI Instruments, Castle Hill, Australia). After a 15 min stabilization period at ~28 mmHg, dose-response curves of phenylephrine (1, 3, 10, and 30 nmol) and angiotensin II (3, 10, 30, and 100 pmol) were generated. The preparations were then subjected to an increase in perfusion pressure (~90 mmHg) by infusing PSS that contained 10 µM phenylephrine. After the stabilization period, dose-response curves of acetylcholine (0.3, 1, 3, and 10 pmol) and sodium nitroprusside (0.1, 0.3, 1, and 3 pmol) were also generated.

#### 2.3.3.4. Histopathological analysis and evaluation of renal redox state

The left kidney of each animal that was subjected to rhabdomyolysis-induced AKI was excised, weighed, and fractionated for the histopathological examination of tissue redox state. For histopathology, the samples were fixed in 10% buffered formalin. The tissue fragments were then dehydrated in ethanol, diaphanized in xylene, and embedded in paraffin. Sections were cut 4 mm thick and stained with hematoxylin-eosin (Gartner, 2017). We evaluated renal tissue integrity by observing the presence of reversible cell damage (degeneration), irreversible changes (necrosis and apoptosis), inflammation, congestion, hemorrhage, and fibrosis. Changes were classified as the following: mild (< 25% of the sample analyzed), moderate (25-50% of the sample analyzed), and severe (> 50% of the sample analyzed; Cunha et al., 2009).



To evaluate renal redox state, we used kidney samples from animals that were subjected to rhabdomyolysis-induced AKI. The analyses were performed to determine catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity, which is indicative of cellular redox state, and lipid peroxidation (LPO) levels. The kidney samples were homogenized and centrifuged at  $2,500 \times g$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the analyses. The experiments were performed according to previously established methods. Catalase activity was assessed according to Aebi (1984). Superoxide dismutase activity was assessed using the pyrogallol oxidation method. The LPO rate was measured using the FOX2 method as described by Jiang et al. (1992). The results are expressed as the amount of protein that was present in the homogenates (Sedlak and Lindsay, 1968). Protein concentrations were determined using the Bradford (1976) method.

#### 2.3.4. Antilithiatic effects

Antilithiatic effects were evaluated using the calcium oxalate crystallization method with urine samples that were obtained from healthy humans. All of the experiments were approved by the UFGD Research Ethics Committee (register no. 3020357). Urine samples were obtained from six healthy individuals (three men and three women) with no history of nephrolithiasis. All of the individuals voluntarily agreed to participate in the study and signed an informed consent form. The samples were mixed, homogenized, and centrifuged at  $1,500 \times g$  for 8 min. The supernatant was separated and filtered, and the pH was adjusted to 6 (Barros et al., 2003). Seven urine samples (4 ml each) were separated. Three samples received ESCS that was resuspended in distilled water at 0.05, 0.5, and 5 mg/ml and underwent the crystallization process. Three other samples received the same ESCS doses but were not subjected to crystallization. These latter three samples were used as a control for absorbance. A sample without the addition of ESCS was used as a control for the crystallization process.

Calcium oxalate precipitation was induced by adding 50  $\mu\text{l}$  of 0.1 M sodium oxalate per milliliter of urine every 30 min (i.e., 0, 30, 60, and 90 min) while stirring at 37°C. The samples were removed from the bath at 120 min. ESCS was added 30 min before beginning crystallization. Semiquantitative crystallization analyses were performed by means of turbidity. Absorbance was recorded in triplicate at 580 nm using a spectrophotometer. The Turbidity Index (TI) was calculated as the following:  $\text{TI} = (\text{DOT} \times \text{DOB}) / \text{DOB}$ , where DOT is absorbance after crystal precipitation, and DOB is absorbance before precipitation (Barros et al., 2003). The number and size of the crystals were measured under a light microscope with the aid of a Neubauer chamber. The crystal area was estimated using Motic Images Plus 2.0 software (Richmond, BC, Canada).

#### 2.4. Statistical analysis

The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. The analyses were performed, and the graphs were generated using GraphPad Prism 7.0 software.

### 3. Results

#### 3.1. Chemical composition by LC-DAD-MS

The extract ESCS was analyzed by LC-DAD-MS to determine its constituents. and Twenty-five compounds were annotated from ESCS (Table 2, Figure 1), and the main metabolite classes were flavonoids, steroidal saponin and organic acids.

The peaks **1** and **3** did not show UV absorption and they showed intense ions at  $m/z$  165.0399  $[\text{M}-\text{H}]^-$  and 191.0201  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , which were putatively identified as pentonic acid and citric acid, respectively (Tienaho et al., 2019). The compound **4** revealed two absorption bands

at the wavelength 299 and 325 nm in the UV spectrum, which suggested a chromophore like as caffeic acid (Dembogurski et al., 2018). It also exhibited an intense ion at  $m/z$  399.0924 [M-H]<sup>-</sup>, compatible to C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>, and it was annotated as caffeic acid derivative.

The metabolites **5-10** and **13** showed UV spectra with two absorption bands at  $\approx$  270 and 335 nm indicating flavones (Dembogurski et al., 2018). The compounds **5** and **13** presented the molecular formulas C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub> ( $m/z$  593.1509 [M-H]<sup>-</sup>) and C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub> ( $m/z$  577.1514 [M-H]<sup>-</sup>), respectively, and **6-10** presented the same molecular formula, C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub> ( $m/z$  563 [M-H]<sup>-</sup>), suggesting isomers. The subsequent losses of 90 and 120 *u* suggest *C*-hexosyl substituent, while the losses of 60 and 74 *u* are diagnostics to *C*-pentose and *C*-deoxyhexose, respectively. The product ions [aglycone+113]<sup>-</sup> and [aglycone+83]<sup>-</sup> are important to determine the aglycone (Qin et al., 2017, Neto et al., 2008). Thus, product ions of compound **5** ( $m/z$  503, 473, 413 and 353 yielded from consecutive losses of 90 and 120 *u*) suggested the presence of two *C*-hexosyl groups. In addition, the fragment ions  $m/z$  383 and 353 suggested the aglycone apigenin. From metabolites **6-10**, the losses of 90/120 *u* and 60/90 *u* confirmed the sugars hexose and pentose. Besides, **13** showed the products ions at  $m/z$  503 [M-H-74]<sup>-</sup> and 463 [M-H-114]<sup>-</sup>, which confirmed a *C*-deoxyhexose. Therefore, the compounds **5** and **6-10** were identified as 6,8-di-*C*-hexosyl apigenin and *C*-hexosyl *C*-pentosyl apigenin, respectively, while **13** was identified as *C*-hexosyl *C*-deoxyhexosyl apigenin.

The compounds **11**, **12**, **14**, **16**, and **18-21** revealed two intense absorption bands at the wavelengths  $\approx$  260 and 350 nm on UV spectra, suggesting flavonol chromophores (Dembogurski et al., 2018). The fragment ions at  $m/z$  300 and 314 [aglycone-H]<sup>•</sup>, and their product ions, confirmed the aglycones quercetin and *O*-methylquercetin, respectively. The losses of 162, 146 and 132 *u* confirmed the sugars *O*-hexose, *O*-deoxyhexose and *O*-pentose. Therefore, these compounds were identified rutin (**11**), *O*-hexosyl quercetin (**12**), *O*-pentosyl quercetin (**14**), *O*-hexosyl-deoxyhexosyl *O*-methylquercetin (**16**), *O*-deoxyhexosyl quercetin

(**18**), *O*-hexosyl-deoxyhexosyl *O*-methylquercetin (**19**), *O*-hexosyl *O*-methylquercetin (**20**) and *O*-pentosyl *O*-methylquercetin (**21**) (Qin et al., 2017, Ferreres et al. 2007).

Peaks **15**, **17** and **22** showed ions at  $m/z$  593.1494 [M-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  447.0915 [M-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  and  $m/z$  431.0973 [M-H]<sup>-</sup>, respectively. Their UV spectra, fragmentation profiles and fragment ions at  $m/z$  285 [aglycone-H]<sup>-</sup> confirmed the flavone aglycone luteolin (Dembogurski et al., 2018, Ferreres et al., 2007). The compound **15** exhibited a loss of 308 *u* that corresponds to *O*-hexosyl and *O*-deoxyhexosyl substituents. The compounds **17** and **22** showed losses of 162 *u* and 146 *u*, respectively, and they confirmed *O*-hexosyl and *O*-deoxyhexosyl groups. Thus, *O*-hexosyl-deoxyhexosyl luteolin (**15**), *O*-hexosyl luteolin (**17**) and *O*-deoxyhexosyl luteolin (**22**) were annotated (Ferreres et al., 2007).

The compounds **23** and **24** did not show absorption on UV and they exhibited  $m/z$  1047.5367 (C<sub>51</sub>H<sub>84</sub>O<sub>22</sub> [M-H]<sup>-</sup>) and  $m/z$  1033.5195 (C<sub>50</sub>H<sub>82</sub>O<sub>22</sub> [M-H]<sup>-</sup>), which were annotated steroidal saponins since they yielded the fragment ions of aglycone at  $m/z$  415 (C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>) (Wang et al., 2003).

### 3.2. Diuretic activity

Acute or prolonged administration of ESCS (30, 100, or 300 mg) did not significantly alter pH, density, urinary volume, or renal electrolyte excretion in healthy Wistar rats. As expected, animals that were treated with HCTZ exhibited a significant increase in urine volume and sodium excretion after acute treatment (Tables 3 and 4). After prolonged treatment, urinary elimination and electrolyte excretion values also increased compared with the negative control group (Table 5).

### 3.3. Nephroprotective effects on rhabdomyolysis-induced AKI

#### 3.3.1. Urinary parameters

Throughout the period before the challenge (day 7), no statistically significant changes were observed in urinary volume among any of the experimental groups. Twenty-four hours after the challenge (day 7), animals in the negative control group exhibited a significant reduction of the volume of excreted urine. All of the animals that received ESCS (30, 100, and 300 mg/kg) or ascorbic acid (positive control) exhibited a reversal of this change, presenting values that were similar to the naive group (Table 6). Urinary total protein, creatinine, sodium, and potassium excretion also significantly decreased in the negative control group compared with the naive group (Table 7). Pretreatment with ESCS (30 and 300 mg/kg) or ascorbic acid prevented these changes, keeping values of all urinary biochemical parameters similar to the naive group. Interestingly, animals that were treated with ESCS at a dose of 30 mg/kg exhibited significant increases in the urinary excretion of total protein, urea, creatinine, sodium, calcium, and chloride compared with the other experimental groups (Table 7).

### *3.3.2. Heart rate and blood pressure*

Systolic, diastolic, and mean arterial blood pressure did not significantly vary among the experimental groups. However, animals that received ESCS at a dose of 300 mg/kg exhibited a significant reduction of heart rate (Table 8).

### *3.3.3. Serum biochemical analyses*

Only animals in the positive control group exhibited a significant increase in serum urea levels compared with the ESCS groups (100 and 300 mg/kg) and negative control group. No differences in uric acid, calcium, creatinine, magnesium, phosphorus, sodium, or potassium levels were observed between groups (Table 9).

### *3.3.4. Renal vascular reactivity*

The mean kidney vascular pressure that was recorded at baseline did not differ between groups: naive ( $93.37 \pm 40.75$  mmHg), negative control ( $87.08 \pm 28.09$  mmHg), ascorbic acid ( $74.62 \pm 10.71$  mmHg), 30 mg/kg ESCS ( $87.23 \pm 9.68$  mmHg), 100 mg/kg ESCS ( $117.9 \pm 77.46$  mmHg), and 300 mg/kg ESCS ( $104.2 \pm 70.71$  mmHg).

The infusion of 3 nmol phenylephrine caused significant vasoconstriction in the 30 mg/kg ESCS group, in which the difference in perfusion pressure before and after phenylephrine administration was  $60.86 \pm 26.52$  mmHg. Similarly, the negative control group exhibited a significant increase in the vasoconstriction response, with a  $204.81 \pm 18.76$  mmHg change in perfusion pressure after the administration of 300 nmol phenylephrine (Table 10).

Animals that were treated with 300 mg/kg ESCS exhibited a significant increase in the vasoconstrictor response to angiotensin II (10 pmol; range:  $39.62 \pm 11.71$  mmHg) compared with the 30 mg/kg ESCS group, positive control group, and naive group (Table 10).

The vasodilator response to acetylcholine was not different between groups. However, animals that were treated with 300 mg/kg ESCS exhibited a significantly higher vasodilatory response to sodium nitroprusside (0.1 pmol) compared with the naive group (Table 10).

### *3.3.5. Histopathological findings*

The renal histopathological findings from animals that were subjected to rhabdomyolysis-induced AKI are shown in Fig. 2. None of the animals in the naive group presented any significant histopathological changes. Rats in the negative control group exhibited mild-to-moderate swelling and vacuolization in proximal convoluted tubule (PCT) cells, interstitial focal mononuclear inflammatory infiltrate in the cortex, and discrete amorphous eosinophilic material deposition. In 50% of these animals, we observed the random necrosis of PCT epithelial cells. Rats in the positive control group that were treated with

ascorbic acid presented similar findings, with the exception of PCT epithelial cell necrosis, which was present in only 25% of the animals.

Animals that were treated with 30 mg/kg ESCS also exhibited swelling and a mild-to-moderate vacuolated cytoplasm in PCT cells, discrete multifocal interstitial mononuclear inflammatory infiltrates in the cortical region, and the discrete deposition of amorphous eosinophilic material. Only 37.5% of the kidney samples presented necrotic PCT epithelial cells.

Half of the 100 mg/kg ESCS-treated animals exhibited discrete PCT epithelial cell necrosis. The other samples from the same group had multifocal areas of the mild swelling of cytoplasmatic PCT cells and the discrete deposition of amorphous eosinophilic material.

Only 37.5% of the animals that were treated with 300 mg/kg ESCS exhibited discrete necrosis in PCT epithelial cells. Moreover, in a few samples, these lesions were associated with discrete interstitial mononuclear inflammatory infiltrates in cortical regions. Surprisingly, one sample from the 300 mg/kg ESCS group did not present any injury in the histopathological analysis.

#### *3.3.6. Tissue redox state*

The tissue redox state in the kidneys in animals that were subjected to rhabdomyolysis-induced AKI and were treated with ESCS or ascorbic acid (positive control) are presented in Table 11. We observed a significant increase in SOD levels in the kidneys in rats that were treated with 30 mg/kg ESCS and a significant increase in CAT levels in animals that were treated with 100 and 300 mg/kg ESCS. No significant difference in LPO levels was found between groups.

#### *3.4. Antilithiatic effects*

The crystal areas in urine samples in the presence of ESCS concentration-dependently decreased compared with control urine. Calcium oxalate dihydrate (COD) crystals in control urine had an average area of  $28.63 \mu\text{m}^2$ , whereas crystals in urine samples with the addition of 0.05, 0.5, and 5 mg/ml ESCS had an average area of 18.88, 17.61, and  $7.10 \mu\text{m}^2$ , respectively (Fig. 3A). As expected, because of the significant reduction of size, a significant increase in the number of crystals was observed. Control urine had 51.691 calcium oxalate monohydrate (COM) and COD crystals per milliliter, whereas the number of crystals in urine samples was 51.415, 61.574, and 89.349 for 0.05, 0.5, and 5 mg/ml ESCS, respectively (Fig. 3B). The TI also increased in a manner that was directly proportional to the number of crystals in urine. This difference was particularly evident in urine with the addition of 5 mg/ml ESCS, with a mean TI of 1.402, which was significantly higher compared with the other ESCS doses (TI = 0.02567 at 0.05 mg/ml ESCS; TI = 0.04727 at 0.5 mg/ml ESCS) and control urine (TI = 0.005667; Fig. 3D).

The presence of ESCS at the higher dose (5 mg/ml) also modified the proportion of COM and COD. Fig. 4 shows the morphological difference between COM and COD. In control urine, ~88% of the crystals were COM. In urine with the addition of 5 mg/ml ESCS, 59% of the crystals were COM (Fig. 3C). In qualitative terms, we also found that the aggregation of crystals in the images of samples 24 h after the crystallization process was higher in control urine than in samples with the addition of ESCS (Fig. 5), and the crystal aggregation rate was inversely proportional to the ESCS concentration.

#### **4. Discussion**

The present study found that a species that is popularly used for the treatment of kidney disease in Brazil exerts significant renoprotective effects. Using a model of rhabdomyolysis-induced AKI in rats, we found that ESCS significantly mitigated AKI-induced kidney damage.



We also found that the extract significantly decreased the precipitation of crystals in urine from healthy participants.

The first part of our study investigated whether the purified infusion of *Costus spicatus* exerted a diuretic response in healthy rats. Infusions of *C. spicatus* are frequently used for the treatment of kidney diseases in Brazil (Coelho et al., 2019). We started the study on the premise that an increase in urinary volume would be observed, which is one of the main observations that is reported with traditional use. Surprisingly, the acute or prolonged administration of ESCS did not induce any significant diuretic responses, suggesting that the extract does not influence urinary volume or renal electrolyte elimination.

In the second part of our work, we investigated whether ESCS induces a nephroprotective response in an AKI model because some renoprotective drugs only exert clinically detectable effects in the presence of some degree of impairment of renal function. Thus, we used the rhabdomyolysis-induced AKI model in rats. Rhabdomyolysis can be readily induced by intramuscular glycerol administration (Bellomo et al., 2004). Studies by Shi et al. (2017) and Al Asmari et al. (2017) showed that the single-dose, intramuscular administration of 6 ml/kg of 50% glycerol or 10 ml/kg of 25% glycerol increased serum urea and creatinine levels, two important serum markers of AKI. Rhabdomyolysis reflects the rupture of muscle cells and consequent leakage of myoglobin into the extracellular space, causing AKI through renal ischemia and myoglobin nephrotoxicity. Moreover, rhabdomyolysis also causes increases in oxidative stress, lipid peroxidation, and tubular necrosis (Bosch et al., 2009; Homsy et al., 2006). In the present study, the intramuscular administration of 10 ml/kg of 25% glycerol solution did not significantly alter the different biochemical markers, but we observed a significant reduction of renal function and important histopathological changes.

One notable finding in the present study was the decrease in urinary volume. The 24-h urine volume in untreated AKI animals significantly decreased compared with days 0 and 7.

Oliguria is used as a parameter to evaluate AKI, but such a biomarker is controversial because although the ability to concentrate urine is disturbed, oliguria may not be initially apparent. In fact, urine flow reflects more the glomerular filtration rate (GFR), and oliguria may not be evident until the GFR declines significantly (Lehner et al., 2016). Our data indicated that animals that were treated with different doses of ESCS did not differ from naive animals with regard to the eliminated urinary volume. Thus, ESCS may exert a protective effect against oliguria in animals that are subjected to rhabdomyolysis-induced AKI.

Another interesting finding was related to the urinary biochemical parameters. Rats in the negative control group that were subjected to AKI had lower total protein, creatinine, sodium, and potassium urinary excretion compared with the naive group. Similarly, previous studies that utilized different AKI models reported that the significant reduction of urinary creatinine levels was an important marker of renal dysfunction (Punuru et al., 2014; Takhtfooladi et al., 2015). In the present study, all doses of ESCS exerted renoprotective effects in our model. Animals that were subjected to AKI and treated with 30 mg/kg ESCS had higher urine levels of total protein, urea, creatinine, sodium, potassium, calcium, and chloride. The absence of such an effect at higher doses of ESCS may be attributable to the specific characteristics of the crude extracts. Relatively high doses may influence the concentration and selectivity of the plant's secondary metabolites. Thus, several compounds likely act on different targets; in some cases, such multiple responses may antagonize each other (Tirloni et al., 2018).

Previous studies have shown that hemodynamic changes, including renal vasoconstriction, may occur up to hours after glycerol administration, with the possible normalization of kidney blood flow within 24 h. If kidney injury is irreversible, then persistent changes in renal vascular reactivity will likely be observed, with a consequent increase in systemic blood pressure. We evaluated various hemodynamic parameters 48 h after glycerol administration. Thus, it is expected that no significant pathophysiological changes would occur.

In fact, did we not detect any changes in heart rate or blood pressure in any of the experimental groups. In addition to proving the absence of significant hemodynamic changes, this finding also excludes the possibility of a hypotensive effect of ESCS. Additionally, the small changes in renal vascular reactivity were not attributable to the AKI model that was used herein. Such changes may reflect incidental variations that occurred in some preparations. In fact, the results showed no tendency toward persistent or dose-dependent hypo- or hypersensitivity to any of the vasoactive compounds that were tested herein.

The renal histopathological changes that were caused by rhabdomyolysis may be attributable to myoglobin. Direct cytotoxicity that is caused by myoglobin occurs mainly in PCTs, whereas distal convoluted tubules (DCTs) are more susceptible to tubular obstruction. In the presence of acidic urine and lower renal blood flow, myoglobin interacts with Tamm-Horsfall protein, which facilitates obstruction (Zager, 1989). Moreover, the acute reduction of renal blood flow may suppress many genes that are involved in cellular metabolism, leading to local oxidative stress and the lipid peroxidation of PCT cells (Yoo et al., 2019), which in turn triggers the release of cytokines and chemokines, resulting in an inflammatory response and tubular necrosis (Homsy et al., 2006; Panizo et al., 2015). In the present study, the animals that received glycerol exhibited varying degrees of histopathological lesions, such as the presence of swelling and vacuolization, inflammatory infiltrates, and necrosis in PCT cells. However, we did not observe a significant increase in lipid peroxidation among the different experimental groups, which may help at least partially explain the lower renoprotective effect of the classic antioxidant drug ascorbic acid. Interestingly, treatment with ESCS at different doses reduced all of the renal histopathological lesions. One limitation of the present study was that we were unable to identify the exact mechanism by which ESCS exerts its nephroprotective effects. Nonetheless, the significant increases in SOD and CAT in renal tissues may provide some

insights into its mechanism of action. Further studies will help elucidate the mechanism of action and the possible roles of secondary metabolites of ESCS in its renoprotective effects.

Finally, we evaluated the ability of ESCS to inhibit the formation of crystals in urine from healthy participants. Macromolecules that are present in urine can be determinants of the growth of crystals and consequently the formation of kidney stones. Chemical and physical processes can determine the amount and area of such crystals because the change in surface energy can prevent the addition of new ions (Rez, 2017). Kidney stones can consist of several crystal forms, but COM is the most prevalent and has higher affinity for cell membranes. Calcium oxalate monohydrate generally exhibits a diamond (hexagonal) morphology and an uneven outer surface, whereas COD has a bipyramidal shape and smooth outer surface. Therefore, COM is more conducive to aggregation and more strongly related to the pathogenesis of nephrolithiasis (Rez, 2017). The addition of ESCS to the urine samples resulted in significant and dose-dependent decreases in the formation and average areas of the crystals. Moreover, ESCS modified the proportion of the two types of crystals. An increase in the amount of COD was directly related to increasing ESCS doses. This suggests that the presence of ESCS promotes COD formation to the detriment of COM formation. These results may suggest that ESCS inhibits COM formation and reduces the aggregation of crystals, thereby directly reducing the formation of kidney stones. The possibility that such effects would be fully reproduced in complex living organisms is still speculative. If we consider that kidney stones are formed in newly produced urine, then we believe that ESCS has important preventive effects against this condition.

In our study, the compounds identified in ESCS were steroidal saponins and *O*-glycosylated and *C*-glycosylated flavonoids (flavones and flavonols). Flavonoids are phenolics widely distributed in vascular plants. They are associated with a broad spectrum of health-promoting effects, mainly related to their antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic,

vascular properties, as well as they have been shown free radical scavenging activity, and other medicinal properties linked to their capacity in modulation of essential cellular enzyme functions (Karak et al, 2019; Panche et al, 2016).

Several reports have showed antioxidant and anti-inflammatory potentials from phenolic compounds, such as flavonoids, and they are related to protective effects in various disorders, including renal (Ankita et al., 2015). These protective properties have been reported for quercetin and its derivatives (Kanter et al., 2012; Machha et al., 2007), as well as for extracts rich in flavonoids (rutin, epicatechin, luteolin, catechin and kaempferol), which reduced the plasma levels of creatinine, urea, uric acid, and antioxidant enzyme activities, repairing kidney damages (Tlili et al., 2016).

Steroidal saponins were also identified from ESCS. They are a group of naturally occurring plant glycosides and contain a hydrophobic part, composed by a steroid backbone and a hydrophilic part composed by several saccharide residues. They exhibit anti-inflammatory, hypoglycemic, anti-hyperlipidemic, anti-tumor, hepatoprotective and hemolytic effects (Barbosa 2014, Hierro et al., 2018). For example, the steroidal saponin ginsenoside Rg5 improved acute kidney damage by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis. Histopathological examination also confirmed the nephroprotective effect of Rg5 (Li et al., 2016).

## **5. Conclusion**

The present study showed that ESCS from *Costus spicatus* has important nephroprotective effects against rhabdomyolysis-induced AKI in rats. Moreover, the plant extract exerted a dose-dependent antilithiatic effect, reducing both crystal growth and aggregation in urine samples from healthy humans. The present data provide evidence that supports the traditional use of *C. spicatus* for the treatment of kidney diseases.

**Author's contributions**

All authors participated in the design, interpretation of the studies, analysis of the data and review of the manuscript; KGTM, RACP, LPG, AAMM, PVMR, BRL, and CAST conducted the experiments; NSC and DBS were involved with the chemical analysis of extract. ACS was responsible for histopathological analyses. KGTM, MEB and AGJ were responsible for data discussion and manuscript correction. AGJ and MEB were the senior researchers responsible for this work.

**Funding**

This work was supported by grants from the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil, 71/700.135/2018), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, 407685/2018-9), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

**Acknowledgements**

The authors are grateful to the University Hospital of the Universidade Federal da Grande Dourados for the biochemical, hematological and arterial blood gas analyzes.

**References**

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121–126.

Al Asmari, A.K., Al Sadoon, K.T., Obaid, A.A., Yesunayagam, D., Tariq, M., 2017. Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. *BMC Nephrol.* 18(41), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0450-8>

Ankita, P., Deepti, B., Nilam, M., 2015. Flavonoid rich fraction of *Punica granatum* improves early diabetic nephropathy by ameliorating proteinuria and disturbed glucose homeostasis in experimental animals. *Pharm. Biol.* 53, 61-71. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.910533>

Azevedo, L.F.P., Faria, T.S.A., Pessanha, F.F., Araujo, M.F., Lemos, G.C.S., 2014. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. *Rev. Bras. Pl. Med.* 16, 209–215. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000200007>

Barbosa, A. P., 2014. An overview on the biological and pharmacological activities of saponins. *Int J Pharm. Pharm. Sci.* 6, 47-50.

Barros, M.E., Schor, N., Boim, M.A., 2003. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urol. Res.* 30, 374–379. <https://doi.org/10.1007/s00240-002-0285-y>

Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J.A., Mehta, R.L., Palevsky, P., 2004. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit. Care* 8, R204–R212. <https://doi.org/10.1186/cc2872>

Bosch, X., Poch, E., Grau, J.M., 2009. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N. Engl. J. Med.* 361, 62–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801327>

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brazil. Ministry of Health. Secretariat of Science, Technology and Strategic Inputs. Department of Pharmaceutical Assistance and Strategic Inputs. National Policy of Medicinal Plants and Herbal Medicines. Brasilia: Ministry of Health, p 189, 2016.

Charlton, J.R., Portilla, D., Okusa, M.D., 2014. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, 1301–1311. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft510>

Cheung, C.M., Ponnusamy, A., Anderton, J.G., 2008. Management of acute renal failure in the elderly patient: a clinician's guide. *Drug. Aging* 25, 455–476. <https://doi.org/10.2165/00002512-200825060-00002>

Coelho, F.C., Tirloni, C.A.S., Marques, A.A.M., Gasparotto, F.M., Lívero, F.A. dos R., Gasparotto Junior, A., 2019. Traditional Plants Used by Remaining Healers from the Region of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *J. Relig. Health* 58, 572–588. <https://doi.org/10.1007/s10943-018-0713-0>

da Silva, B.P., Bernardo, R.R., Parente, J.P., 2000. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. *Phytochemistry* 53, 87–92.

Dembogurski, D.S.O., Trentin, D.S., Boaretto, A.G., Rigo, G.V., Silva, R.C., Tasca, T., Macedo, A.J., Carollo, C.A., Silva, D.B., 2018. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. *Food Res. Int.* 111, 661-673.



Devendran, G., Sivamani, G., 2015. Phytochemical analysis of leaf extract of plant *Costus spicatus* by gcms method. *J. Drug Delivery Therapeutics* 5(4), 24–26. <https://doi.org/10.22270/jddt.v5i4.1160>

Edvardsson, V.O., Indridason, O.S., Haraldsson, G., Kjartansson, O., Palsson, R., 2013. Temporal trends in the incidence of kidney stone disease. *Kidney Int.* 83, 146–152. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.320>

Ferreres, F., Sousa, C., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Izquierdo, A. G., 2007. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* Leaf Extract. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10187-10193.

Gambaro, G., D'Angelo, A., Fabris, A., Toretto, E., Anglani, F., Lupo, A., 2004. Crystals, Randall's plaques and renal stones: do bone and atherosclerosis teach us something? *J. Nephrol.* 17, 774–777.

Gartner, Leslie P. 2017 *Treaty of Histology*. 4th ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 672p

Gasparotto, A., Boffo, M.A., Lourenço, E.L.B., Stefanello, M.E.A., Kassuya, C.A.L., Marques, M.C.A., 2009. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *J. Ethnopharmacol.* 122, 517–522. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.021>

Hierro, J.N., Herrera, T., Fornari, T., Reglero, G., Martin, D., 2018. The gastrointestinal behavior of saponins and its significance for their bioavailability and bioactivities. *J. Funct. Foods* 40, 484-497.

Homsí, E., Janino, P., de Faria, J.B.L., 2006. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 69, 1385–1392. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000315>

Hsu, C.-Y., McCulloch, C.E., Fan, D., Ordoñez, J.D., Chertow, G.M., Go, A.S., 2007. Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney Int.* 72, 208–212. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002297>

Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.

Kanter, M., Aktas, C., Erboğa, M., 2012. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem, Toxicol.* 50, 719–725.

Karak, P., 2019. Biological activities of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 10, 1567–1574.

Keller, A.C., Vandebroek, I., Liu, Y., Balick, M.J., Kronenberg, F., Kennelly, E.J., Brillantes, A.-M.B., 2009. *Costus spicatus* tea failed to improve diabetic progression in C57BLKS/J db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 121, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.025>

Lai, C.-F., Wu, V.-C., Huang, T.-M., Yeh, Y.-C., Wang, K.-C., Han, Y.-Y., Lin, Y.-F., Jhuang, Y.-J., Chao, C.-T., Shiao, C.-C., Tsai, P.-R., Hu, F.-C., Chou, N.-K., Ko, W.-J., Wu, K.-D., National Taiwan University Hospital Study Group on Acute Renal Failure (NSARF), 2012. Kidney function decline after a non-dialysis-requiring acute kidney injury is associated with higher long-term mortality in critically ill survivors. *Crit. Care* 16(4), R123. <https://doi.org/10.1186/cc11419>

Lehner, G.F., Forni, L.G., Joannidis, M., 2016. Oliguria and Biomarkers of Acute Kidney Injury: Star Struck Lovers or Strangers in the Night? *NEF* 134, 183–190. <https://doi.org/10.1159/000447979>

Li, W., Yan, M.H., Liu, Y., Liu, Z., Wang, Z., Chen, C., Zhang, J., Sun, Y.S., 2016. Ginsenoside Rg5 Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Mice through Inhibition of Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis. *Nutrients* 8, 566. <https://doi.org/10.3390/nu8090566>

Machha, A., Achike, F.I, Mustafa, A.M, Mustafa, M.R., 2007. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rats aortas. *Nitric Oxide* 16, 442-447.

Madhavan, S.A., Senthilkumar, S., Andrews, S., Ganesan, S., 2019. Anti-diabetic effect of ethanol extract of *Costus spicatus* jacq. In rhizome extract in streptozotocin-induced diabetic rats –histological study. *J Drug Delivery Therapeutics* 9(4), 483–487. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i4-s.3359>

Martim, E.C. de O., Pinto, C.F., Watanabe, M., Vattimo, M. de F.F., 2007. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 19, 292–296. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2007000300004>

Moe, O.W., 2006. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet* 367, 333–344. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68071-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68071-9)

Neto, L.G., Lopes, N.P., 2008. Online Identification of Chlorogenic Acids, Sesquiterpene Lactones, and Flavonoids in the Brazilian Arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) Leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a Validated HPLC-DAD Method for Their Simultaneous Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1193-1204.

Panche, A.N., Diwan, A. D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5, 1-15.

Paes, L.S., Mendonça, M.S., Casas, L.L., 2013. Aspectos Estruturais e Fitoquímicos de partes vegetativas de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae). Rev. Bras. Pl. Med. 15, 380–390. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000300011>

Panizo, N., Rubio-Navarro, A., Amaro-Villalobos, J.M., Egido, J., Moreno, J.A., 2015. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. KBR 40, 520–532. <https://doi.org/10.1159/000368528>

Picanço, L.C. dos S., Bittencourt, J.A.H.M., Henriques, S.V.C., Silva, J.S. da, Oliveira, J.M. da S., Ribeiro, J.R., Sanjay, A.-B., Carvalho, J.C.T., Stien, D., Silva, J.O. da, 2016. Pharmacological activity of *Costus spicatus* in experimental Bothrops atrox envenomation. Pharm. Biol. 54, 2103–2110. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1145703>

Punuru, P., Sujatha, D., Kumari, B.P., Charisma, V.V.L., 2014. Evaluation of aqueous extract of *Murraya koenigii* in unilateral renal ischemia reperfusion injury in rats. Indian J. Pharmacol. 46, 171–175. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.129310>

Qin, Y., Gaob, B., Shic, H., Caoa, J., Yina, C., Luc, W., Yub, L., Cheng, Z. 2017. Characterization of flavonol mono-, di-, tri- and tetra-O-glycosides by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and its application for identification of flavonol glycosides in *Viola tianschanica*. J. Pharm. Biomed. Anal. 142, 113-124.

Quintans Júnior, L.J., Santana, M.T., Melo, M.S., de Sousa, D.P., Santos, I.S., Siqueira, R.S., Lima, T.C., Silveira, G.O., Antonioli, A.R., Ribeiro, L.A.A., Santos, M.R.V., 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. Pharm. Biol. 48, 1097–1102. <https://doi.org/10.3109/13880200903501822>

Rez, P., 2017. What does the crystallography of stones tell us about their formation? *Urolithiasis* 45, 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00240-016-0951-0>

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

Shi, Y., Xu, L., Tang, J., Fang, L., Ma, S., Ma, X., Nie, J., Pi, X., Qiu, A., Zhuang, S., Liu, N., 2017. Inhibition of HDAC6 protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 312, F502–F515. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00546.2016>

Silva, D., N., Gonçalves, M.J., Amoral, M.T., Batista, M.T., 2008. Antifungal activity of a flavonoid-rich fraction from *Costus spicatus* leaves against dermatophytes. *Planta Med.* 74, 961–961.

Souza, S.P., Pereira, L.L.S., Souza, A.A., Santos, C.D., 2012. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. *Rev. Bras. Pl. Med.* 14, 643–648. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400011>

Stojiljkovic, N., Stoiljkovic, M., Randjelovic, P., Veljkovic, S., Mihailovic, D., 2012. Cytoprotective effect of vitamin C against gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.06.008>

Takhtfooladi, M.A., Takhtfooladi, H.A., Moayer, F., Karimi, P., Asl, H.A., 2015. Effect of *Otostegia persica* extraction on renal injury induced by hindlimb ischemia-reperfusion: A rat model. *Int. J. Surg.* 13, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2014.11.047>

Tienaho, J., Karonen, M., Muilu-Mäkelä, R., Wähälä, K., Denegri, E.L., Franzén, R., Karp, M., Santala, V., Sarjala, T., 2019. Metabolic Profiling of Water-Soluble Compounds from the

Extracts of Dark Septate Endophytic Fungi (DSE) Isolated from Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Seedlings Using UPLC–Orbitrap–MS. *Molecules* 24, 2330. <https://doi.org/10.3390/molecules24122330>

Tirloni, C.A.S., Palozi, R.A.C., Tomazetto, T. de A., Vasconcelos, P.C. de P., Souza, R.I.C., dos Santos, A.C., de Almeida, V.P., Budel, J.M., de Souza, L.M., Gasparotto Junior, A., 2018. Ethnopharmacological approaches to kidney disease-prospecting an indigenous species from Brazilian Pantanal. *J. Ethnopharmacol.* 211, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.020>

Tlili, N., Ferianib, A., Saadoud, E., Nasria, N., Khaldid, A., 2016. *Capparis spinosa* leaves extract: Source of bioantioxidants with nephroprotective and hepatoprotective effects. *Biomed. Pharmacother.* 87, 171-179.

Yoo, E.J., Lim, S.W., Kang, H.J., Park, H., Yoon, S., Nam, D., Sanada, S., Kwon, M.J., Lee-Kwon, W., Choi, S.Y., Kwon, H.M., 2019. Transcriptional Regulator TonEBP Mediates Oxidative Damages in Ischemic Kidney Injury. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8101284>

Wang, M., Tadmor, Y., Wu, Q.L., Chin, C.K., Garrison, S.A., Simon, J.E., 2003. Quantification of protodioscin and rutin in *Asparagus* shoots by LC/MS and HPLC methods. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6132-6136.

Zager, R.A., 1989. Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury. *Lab. Invest.* 60, 619–629.

### Legend to figures

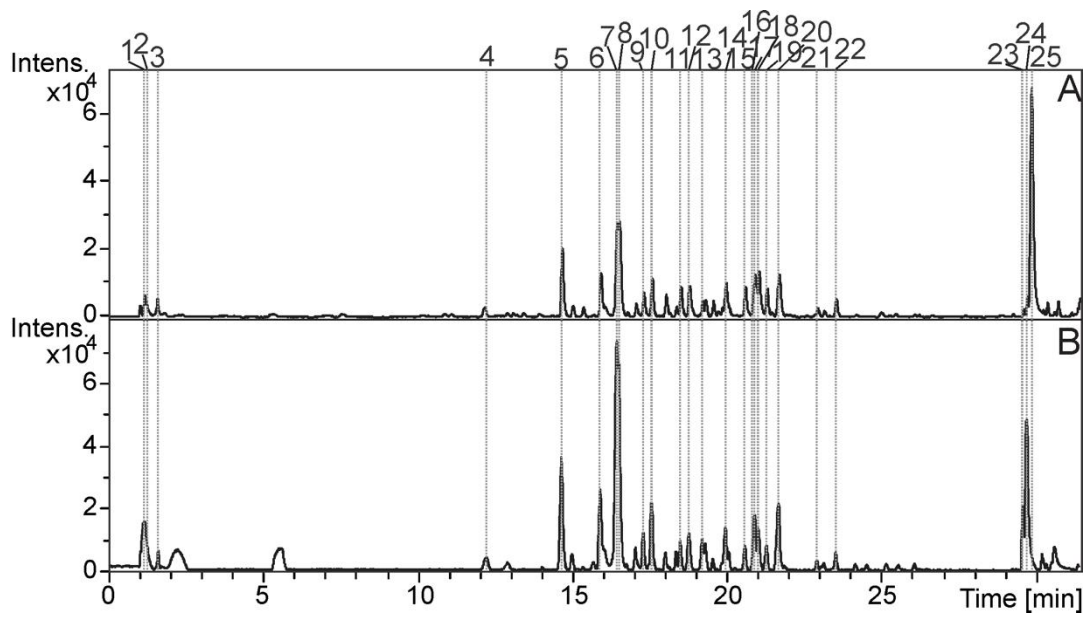
**Figure 1:** Base peak chromatograms obtained in negative (A) and positive ion modes (B) from ethanol-soluble fraction of *Costus spicatus* (ESCS)

**Figure 2: 40x view of hematoxylin and eosin (H&E) stained section showing histopathological findings in renal cortex from animals with rhabdomyolysis-induced AKI.** The black arrows show necrosis of individual epithelial cells. Empty-core arrows show the deposition of amorphous eosinophilic material. Empty arrowhead shows interstitial mononuclear inflammatory infiltrate. Black arrowhead shows swelling and vacuolization in the cytoplasm. DCT: distal convoluted tubules; PCT: proximal convoluted tubules. (hematoxylin and eosin stain; 40X).

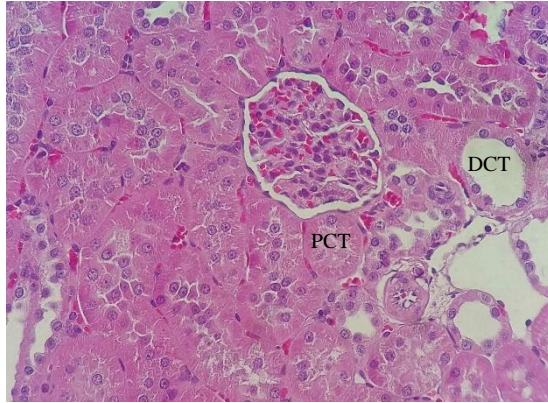
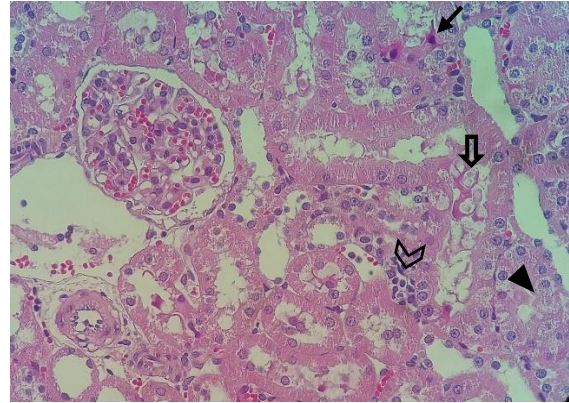
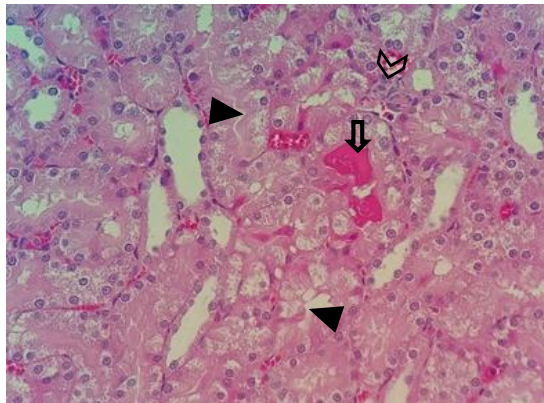
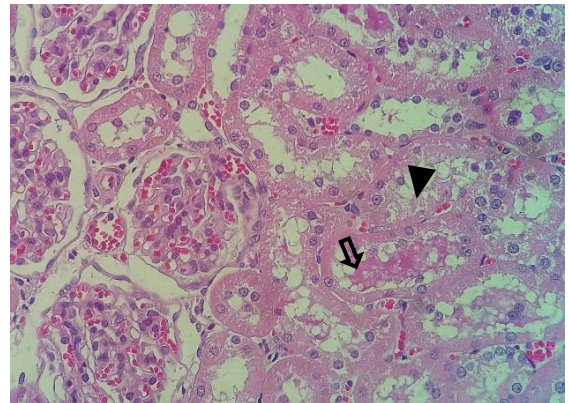
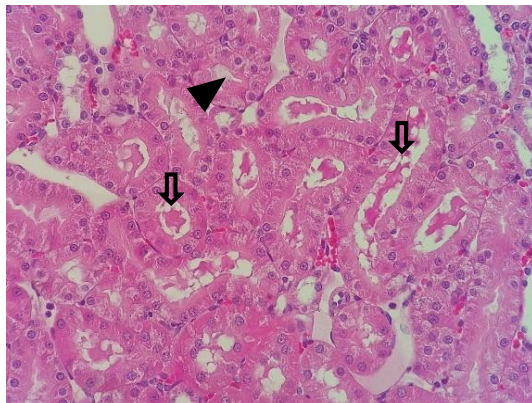
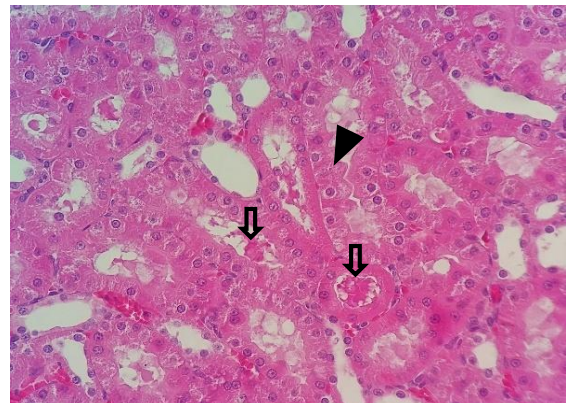
**Figure 3: Effects of ESCS (0.05, 0.5, and 5 mg/mL) on crystals area (A), crystals number (B), percentage of monohydrate crystals (C), and turbidity index (D) in crystallization *in vitro* protocol.** <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  when compared to control; <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  when compared to ESCS 0.05 mg/mL; <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  when compared to ESCS 0.5 mg/mL.

**Figure 4: Microscopic images (40x) of urine samples.** A: Calcium oxalate monohydrate crystals; B: Calcium oxalate dihydrate crystals.

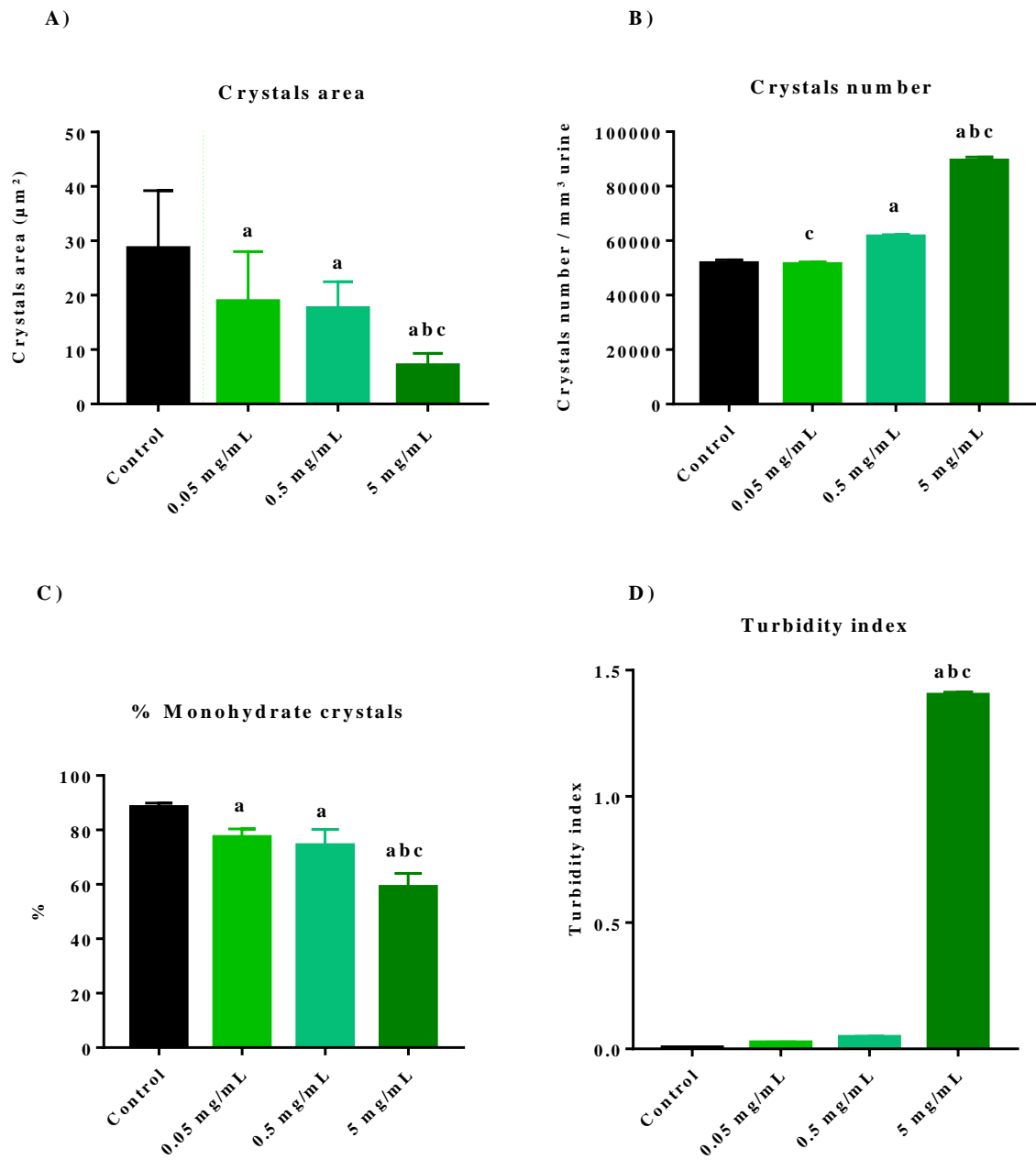
**Figure 5: Microscopic images (20x) of urine samples at the beginning and 24 hours after the crystallization process with the addition of ESCS 0.05 mg/mL (A and B), 0.5 mg/mL (C and D), 5 mg/mL (E and F), and urine control (G and H).**

**Figures****Figure 1****Moreno et al.**



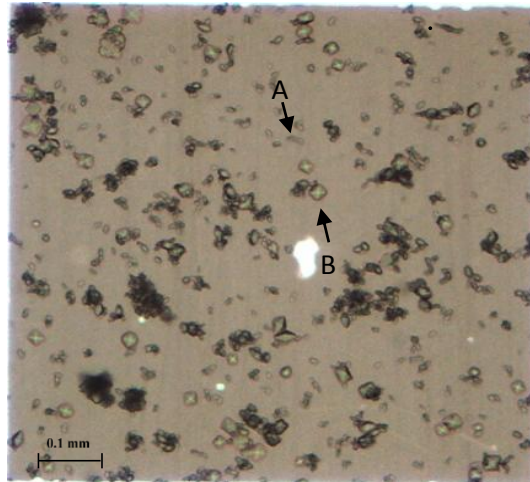
**A) Naïve****B) NCG****C) PCG****D) 30 mg/kg****E) 100 mg/kg****F) 300 mg/kg**

**Figure 2**  
**Moreno et al.**



**Figure 3**

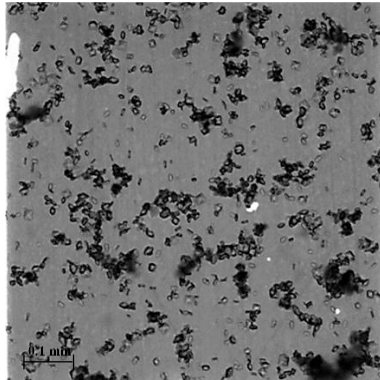
Moreno et al.



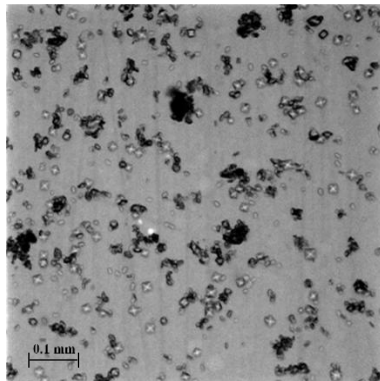
**Figure 4**  
**Moreno et al.**

**Immediately after crystallization**

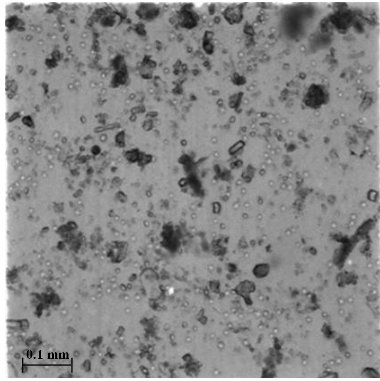
**A) ESCS 0.05 mg/mL**



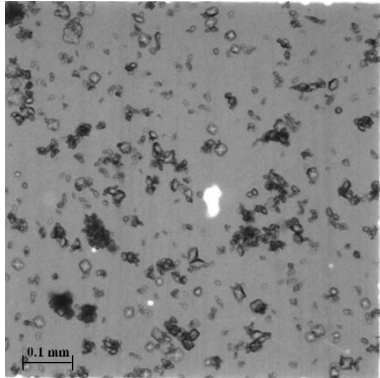
**C) ESCS 0.5 mg/mL**



**E) ESCS 5.0 mg/mL**

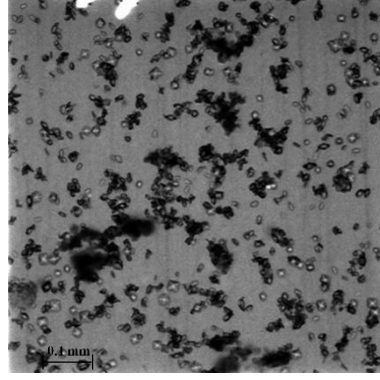


**G) Control urine**

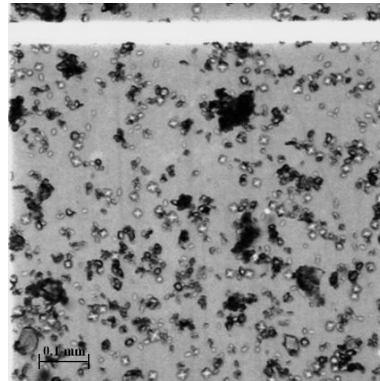


**24 hours after crystallization**

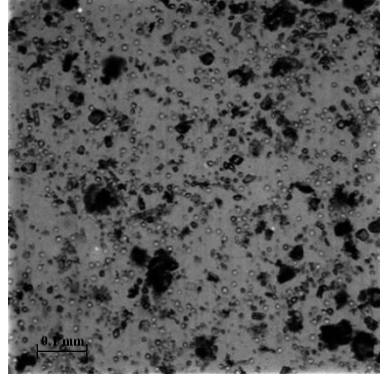
**B) ESCS 0.05 mg/mL**



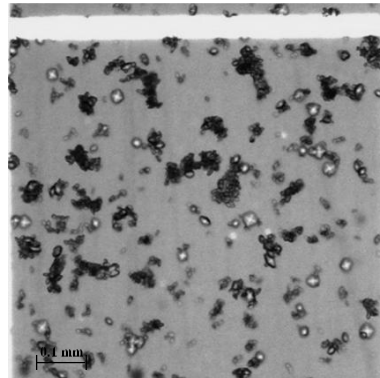
**D) ESCS 0.5 mg/mL**



**F) ESCS 5.0 mg/mL**



**H) Control urine**



**Figure 5**

**Moreno et al.**

## Tables

**Table 1**

Rhabdomyolysis-induced AKI experimental design

Groups	Day 1 to 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9
<i>Naïve</i>	Saline orally	Water deprivation	Saline (10 mL/kg) IM	Rest	Euthanasia
<i>NCG</i>	Saline orally	Water deprivation	Glycerol 25% (10 mL) IM	Rest	Euthanasia
<i>PCG</i>	200 mg/kg/day ascorbic acid orally	Water deprivation	Glycerol 25% (10 mL/kg) IM	Rest	Euthanasia
<i>ESCS 30</i>	30 mg/kg/day ESCS orally	Water deprivation	Glycerol 25% (10 mL/kg) IM	Rest	Euthanasia
<i>ESCS 100</i>	100 mg/kg/day ESCS orally	Water deprivation	Glycerol 25% (10 mL/kg) IM	Rest	Euthanasia
<i>ESCS 300</i>	300 mg/kg / day ESCS orally	Water deprivation	Glycerol 25% (10 mL/kg) IM	Rest	Euthanasia

**IM: intramuscular; NCG: negative control group; PCG: positive control group.**

**Table 2.** Compounds identified from ethanol-soluble fraction of *Costus spicatus* (ESCS) by LC-DAD-MS.

Peak	RT (min)	UV (nm)	MF	Negative ion mode (m/z)		Positive ion mode (m/z)		Compound
				MS [M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	MS [M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	
1	1.1	-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	165.0399	-	-	-	Pentonic acid
2	1.2	-	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	223.0449	-	-	-	Unknown
3	1.6	-	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191.0201	-	-	-	Citric acid
4	12.1	299, 325	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	399.0924		401.1090		Caffeic acid derivative
5	14.6	271, 334	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593.1509	503, 473, 413, 383, 353	595.1657	505, 475, 439, 421, 409, 391, 379, 355, 325, 295.	6,8-Di-C-hexosyl apigenin
6	15.9	271, 335	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563.1407	503, 473, 443, 425, 413, 407, 395, 383, 365, 353, 297	565.1568	475, 445, 409, 391, 379, 355, 349, 337, 325, 295.	C-hexosyl C-pentosyl apigenin
7	16.4	271, 335	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563.1397	503, 473, 443, 425, 413, 407, 395, 383, 365, 353	565.1560	475, 445, 409, 391, 379, 355, 349, 337, 325, 307, 295.	C-hexosyl C-pentosyl apigenin
8	16.5	271, 336	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563.1397	485, 473, 455, 443, 425, 413, 407, 395, 383, 365, 353	565.1569	493, 475, 445, 433, 409, 391, 379, 355, 349, 337, 325, 307, 295	C-hexosyl C-pentosyl apigenin
9	17.3	272, 338	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563.1399	-	565.1555	475, 445, 391, 379, 355, 337, 325, 307, 295.	C-hexosyl C-pentosyl apigenin
10	17.6	271, 336	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563.1397	485, 473, 455, 443, 425, 413, 395, 383, 365, 353	565.1573	475, 445, 433, 391, 379, 355, 325, 307, 295	C-hexosyl C-pentosyl apigenin
11	18.5	262, 352	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609.1444	300, 285, 271, 255, 243, 179	611.1619	303	Rutin <sup>st</sup>
12	18.8	262, 356	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.0871	300, 271, 255, 243, 227, 179	465.1051	303	O-hexosyl quercetin
13	19.2	270, 338	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	577.1514	503, 463	579.1728	507, 489, 459, 429, 423, 405, 379, 355,	C-hexosyl C-deoxyhexosyl apigenin

							359, 337, 325, 271	
14	20.0	263, 357	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	433.0757	300, 271, 255, 243, 211, 179	435.0936	303	<i>O</i> -pentosyl quercetin
15	20.6	263, 340	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593.1494	327, 285, 255, 239, 229, 227	595.1650	287	<i>O</i> -hexosyl- deoxyhexosyl luteolin
16	20.8	264, 350	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	623.1596	314, 299, 287, 285, 271, 243	625.1747	479, 317	<i>O</i> -hexosyl- deoxyhexosyl <i>O</i> - methylquercetin
17	20.9	265, 341	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0915	285, 255, 227, 211, 183	449.1073	287, 258, 241, 213, 165	<i>O</i> -hexosyl luteolin
18	21.0	264, 348	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0915	-	449.1077	303, 257, 229, 153	<i>O</i> -deoxyhexosyl quercetin
19	21.3	264, 352	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	623.1606	315, 299, 287, 269, 255, 243	625.1768	317, 302	<i>O</i> -hexosyl- deoxyhexosyl <i>O</i> - methylquercetin
20	21.6	262, 352	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	477.1026	314, 299, 285, 271, 257, 243, 227, 175	479.1198	317, 302, 285, 274, 257, 229, 153	<i>O</i> -hexosyl <i>O</i> - methylquercetin
21	22.9	269, 344	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0924	-	449.1063	317	<i>O</i> -pentosyl <i>O</i> - methylquercetin
22	23.5	265, 337	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.0973	-	433.140	287	<i>O</i> -deoxyhexosyl luteolin
23	29.6	-	C <sub>51</sub> H <sub>84</sub> O <sub>22</sub>	1047.5367		1031.5444 [M+H- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	869, 725, 415, 397, 293, 271, 253	Steroidal saponin
24	29.7	-	C <sub>50</sub> H <sub>82</sub> O <sub>22</sub>	1033.5195	-	1017.5296 [M+H- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	855, 835, 723, 711, 577, 415, 397, 379, 309, 271, 253, 157	Steroidal saponin
25	29.8	244, 273, 317	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	373.0570	337, 311, 299, 293, 283, 267, 255, 239, 229, 213, 199	-	-	Unknown

RT: retention time; MF: molecular formula; <sup>st</sup>: confirmed by injection of authentic standard.

**Table 3**

Effect of ESCS acute administration on urine volume, pH and density after 8 and 24 hours

Group	Urine volume (ml/100g/8h)		Urine volume (ml/100g/24hr)		pH (8 h)		pH (24h)		Density (8 h)		Density (24h)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
<i>NCG</i>	5.52	0.94	9.29	1.30	7.99	0.20	7.82	0.46	1017	3.05	1031	0.05
<i>HCTZ</i>	7.71 <sup>a</sup>	0.37	12.11 <sup>b</sup>	0.77	7.10 <sup>a</sup>	0.14	8.03	0.14	1018	0.88	1022	0.76
<i>ESCS 30</i>	4.88	0.35	10.16	1.27	7.73	0.04	8.03	0.10	1019	3.05	1029	6.11
<i>ESCS 100</i>	5.53	0.71	8.14	1.09	7.98	0.43	8.13	0.10	1014	4.00	1029	4.16
<i>ESCS 300</i>	7.71	0.37	9.69	1.12	8.14	0.40	8.36	0.18	1018	2.00	1029	6.42

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared to the all other groups; <sup>b</sup>  $p \leq 0.05$  when compared to ESCS 100 mg/kg.**HCTZ: hydrochlorothiazide; M: mean; NCG: negative control group; SD: standard deviation.**



**Table 4**

Effect of ESCS acute administration on electrolyte ER ( $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$ ) in 8- and 24-hour urine samples

Group	Na <sup>+</sup> ER		Na <sup>+</sup> ER		K <sup>+</sup> ER		K <sup>+</sup> ER		Cl <sup>-</sup> ER		Cl <sup>-</sup> ER	
	(8 h)		(24h)		(8 h)		(24h)		(8 h)		(24h)	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
<i>NCG</i>	1.65	0.11	0.91	0.16	0.75	0.02	1.02	0.23	1.88	0.07	2.69	0.45
<i>HCTZ</i>	2.80 <sup>a</sup>	0.12	3.12 <sup>a</sup>	0.18	0.99	0.04	1.12	0.07	2.10	0.33	2.99	0.30
<i>ESCS 30</i>	1.67	0.16	0.87	0.04	0.83	0.20	1.07	1.18	1.90	0.17	2.01	0.45
<i>ESCS 100</i>	1.40	0.39	0.73	0.09	0.69	0.20	0.86	0.22	1.68	0.44	2.15	0.42
<i>ESCS 300</i>	1.80	0.26	0.93	0.12	1.00	0.15	1.05	0.20	2.17	0.27	2.87	0.93

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared to the all other groups. ER: excretion rate; HCTZ: hydrochlorothiazide; M: mean; NCG: negative control group; SD: standard deviation.

**Table 5**

Effect of ESCS prolonged administration on urinary excretion (mL/100g) and electrolyte ER ( $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$ ) in 24 hours urine samples on days 3 and 7

Group	Urine volume (mL/100g)		Na <sup>+</sup> ER (24h)		K <sup>+</sup> ER (24h)		Cl <sup>-</sup> ER (24h)		
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	
Day 3	<i>NCG</i>	6.51	0.68	0.41	0.15	0.93	0.26	1.17	0.40
	<i>HCTZ</i>	23.12 <sup>a</sup>	1.78	5.12 <sup>a</sup>	0.26	6.12 <sup>a</sup>	0.34	7.88 <sup>a</sup>	0.45
	<i>ESCS 30</i>	6.31	1.6	0.42	0.05	0.92	0.08	1.06	0.16
	<i>ESCS 100</i>	6.85	0.57	0.34	0.04	0.77	0.14	0.85	0.14
	<i>ESCS 300</i>	5.97	1.35	0.34	0.16	0.81	0.17	1.02	0.39
Day 7	<i>NCG</i>	4.99	1.30	0.27	0.09	0.59	0.07	0.58	0.26
	<i>HCTZ</i>	40.22 <sup>a</sup>	3.12	9.14 <sup>a</sup>	0.55	15.31 <sup>a</sup>	0.87	18.77 <sup>a</sup>	0.98
	<i>ESCS 30</i>	6.47	1.98	0.24	0.005	0.60	0.03	0.47	0.04
	<i>ESCS 100</i>	6.18	1.40	0.26	0.13	0.66	0.28	0.61	0.31
	<i>ESCS 300</i>	6.49	2.20	0.19	0.12	0.53	0.33	0.38	0.27

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared to the all other groups. ER: excretion rate; HCTZ: hydrochlorothiazide; M: mean; NCG: negative control group; SD: standard deviation.

**Table 6**

24-hour urine volume in animals treated with ESCS or ascorbic acid (PCG) in rhabdomyolysis-induced AKI on days (D) 0, 3, 5 and 7

	<b>D0</b> (ml / 100 g)		<b>D3</b> (ml / 100 g)		<b>D5</b> (ml / 100 g)		<b>D7</b> (ml / 100 g)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Naïve</i>	11.34	4.10	9.23	3.04	7.39	1.59	7.60	1.57
<i>NCG</i>	10.62	3.81	8.77	2.07	8.88	2.08	5.48 <sup>a</sup>	1.07
<i>PCG</i>	9.96	3.63	9.66	1.61	8.77	1.51	7.96	1.24
<i>ESCS 30</i>	7.58	1.35	7.06	0.86	8.54	1.26	7.88	0.31
<i>ESCS 100</i>	8.45	2.34	9.73	2.94	8.54	1.53	7.88	2.34
<i>ESCS 300</i>	10.88	5.32	8.68	0.80	7.40	0.97	7.51	1.17

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared to T0. NCG: negative control group; PCG: positive control group; SD: standard deviation.

**Table 7**

24-hours urinary biochemical analysis in animals treated with ESCS or ascorbic acid (PCG) in rhabdomyolysis-induced AKI on day 7

	Naïve		NCG		PCG		30 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Albumin</i> (mg/L)	5.93	0.06	6.67	0.64	6.30	1.65	8.65	3.13	5.95	1.06	6.05	1.20
<i>Total protein</i> (mg/dL)	113.30 <sup>a</sup>	29.83	44.37	15.73	76.38	17.18	126.20 <sup>ac</sup>	25.00	55.10	32.24	99.10	53.74
<i>Urea</i> (mg/dL)	59.78	14.95	29.49	12.53	38.65	14.14	64.76 <sup>ac</sup>	18.05	31.53	17.60	57.52	16.74
<i>Creatinine</i> (mg/dL)	51.70 <sup>a</sup>	13.60	26.53	7.00	36.80	7.02	56.40 <sup>ac</sup>	7.43	28.30	9.33	45.15	9.12
<i>Sodium</i> (mmol/L)	117.97 <sup>ac</sup>	12.29	83.47	9.35	111.38	15.98	148.33 <sup>ac</sup>	26.27	66.65	3.75	121.80	26.16
<i>Potassium</i> (mmol/L)	207.67 <sup>ac</sup>	20.86	118.77	44.32	164.35	22.64	207.90 <sup>a</sup>	18.79	144.45	20.76	193.15	25.81
<i>Calcium</i> (mmol/L)	3.83	0.12	2.50	0.46	4.18	1.27	8.33 <sup>abcde</sup>	2.31	3.55	2.47	4.65	0.78
<i>Chloride</i> (mmol/L)	255.47	21.66	142.33	54.45	186.90	36.47	278.65 <sup>ac</sup>	57.52	153.15	47.12	233.30	60.81

<sup>a</sup>p ≤ 0.05 when compared to the NCG; <sup>b</sup>p ≤ 0.05 compared to ESCS 30 mg/kg; <sup>c</sup>p ≤ 0.05 compared to ESCS 100 mg/kg; <sup>d</sup>p ≤ 0.05 compared to ESCS 300 mg/kg; <sup>e</sup>p ≤ 0.05 compared to PCG. PCG, NCG, and naïve group. NCG: negative control group; PCG: positive control group; SD: standard deviation.

**Table 8**

Heart rate and blood pressure levels of animals treated with ESCS or ascorbic acid (PCG) in rhabdomyolysis-induced AKI

	SBP		DBP		MBP		HR	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Naïve</i>	119.51	20.83	75.53	14.21	96.64	17.43	295.62	49.62
<i>NCG</i>	114.72	14,15	70.12	10.23	89.46	10.94	211.73	45.79
<i>PCG</i>	112.23	9,364	73.51	10.45	92.13	13.52	223.61	54.89
<i>ESCS 30</i>	129.82	16,45	82.13	8,62	103.71	10.18	248.12	70.47
<i>ESCS 100</i>	124.32	18.09	74.64	10.10	97.34	12.92	23.120	57.41
<i>ESCS 300</i>	114.11	18.16	72.69	16.74	92.73	13.52	204.41 <sup>a</sup>	15.17

<sup>a</sup> $p \leq 0.05$  when compared to naïve group. DBP: diastolic blood pressure; HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; NCG: negative control group; PCG: positive control group; SBP: systolic blood pressure; SD: standard deviation.

**Table 9**

Serum biochemical analysis of animals treated with ESCS or ascorbic acid (PCG) in rhabdomyolysis-induced AKI

	Naïve		NCG		PCG		ESCS 30		ESCS 100		ESCS 300	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Urea</i> (mg/dL)	46.87	4.97	45.74	6.87	49.91 <sup>a</sup>	6.70	46.93	8.32	45.30	7.21	44.68	3.26
<i>Uric acid</i> (mg/dL)	0.34	0.03	0.44	0.11	0.35	0.06	0.33	0.03	0.34	0.05	0.31	0.04
<i>Calcium</i> (mg/dL)	10.85	0.25	10.50	0.24	10.52	0.20	10.77	0.52	10.55	0.39	10.48	0.50
<i>Creatinine</i> (mg/dL)	0.58	0.21	0.38	0.17	0.53	0.18	0.51	0.26	0.51	0.16	0.39	0.20
<i>Magnesium</i> (mg/dL)	2.47	0.27	2.36	0.26	2.45	0.28	2.27	0.15	2.30	0.24	2.34	0.16
<i>Phosphorus</i> (mg/dL)	8.43	0.63	7.88	0.72	8.21	0.74	7.88	0.85	7.68	0.66	7.81	0.67
<i>Sodium</i> (mmol/L)	136.63	3.02	135.50	2.62	135.13	2.47	135.50	2.62	135.13	2.03	134.86	1.07
<i>Potassium</i> (mmol/L)	5.04	0.48	4.71	0.84	5.28	0.61	4.68	0.43	4.80	0.75	4.84	0.61

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  when compared to ESCS 100 mg/kg, 300 mg/kg and NCG. NCG: negative control group; PCG: positive control group; SD: standard deviation.

**Table 10**

Renal vascular reactivity (mm Hg) to phenylephrine, angiotensin II, acetylcholine, and sodium nitroprusside of animals treated with ESCS or ascorbic acid (PCG) in rhabdomyolysis-induced AKI

	Naïve		NCG		PCG		ESCS 30		ESCS 100		ESCS 300	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<b><i>Phe</i></b>												
<i>1 nmol</i>	2.39	2.36	1.08	3.05	1.99	1.75	0.43	1.61	2.93	2.86	8.18	1.78
<i>3 nmol</i>	7.02	6.73	12.84	4.90	12.57	2.23	60.86 <sup>a</sup>	26.52	23.27	7.01	8.58	3.79
<i>10 nmol</i>	146.60	11.72	152.72	24.95	149.85	16.72	125.33	34.62	143.20	28.75	134.22	31.24
<i>30 nmol</i>	173.75	29.02	204.81 <sup>b</sup>	18.76	165.42	38.65	156.04	24.34	169.69	31.63	182.55	29.76
<b><i>Ang II</i></b>												
<i>3 pmol</i>	1.00	3.23	-0.70	1.33	2.83	2.33	0.74	2.16	2.83	1.90	2.16	2.76
<i>10 pmol</i>	15.59	6.80	18.46	10.54	13.51	5.86	17.54	3.67	26.36	7.22	39.62 <sup>c</sup>	11.71
<i>30 pmol</i>	37.31	17.19	53.45	19.94	33.45	3.62	47.88	11.05	48.02	8.83	47.95	11.04
<i>100 pmol</i>	49.46	13.02	54.67	10.54	63.88	9.83	55.48	6.41	64.15	30.11	60.92	11.78
<b><i>ACh</i></b>												
<i>0.3 nmol</i>	-19.48	8.64	-40.92	3.96	-23.59	9.28	-20.57	8.30	-18.98	9.89	-23.26	16.13
<i>1 nmol</i>	-33.96	13.95	-40.65	15.36	-38.63	15.75	-37.30	19.74	-28.86	14.80	-40.77	20.39
<i>3 nmol</i>	-37.33	15.68	-43.22	19.83	-43.70	16.44	-42.38	20.16	-39.00	16.35	-36.29	9.41
<i>10 nmol</i>	-50.63	23.24	-53.00	25.27	-67.21	17.35	-65.14	18.48	-53.02	18.43	-58.92	21.94
<b><i>NPS</i></b>												
<i>0.1 pmol</i>	-11.34	14.23	-4.21	9.84	-7.37	17.88	-8.23	10.17	-5.24	13.32	-4.64 <sup>d</sup>	5.05
<i>0.3 pmol</i>	-3.07	4.83	-0.73	6.46	-2.82	10.93	0.85	7.42	-1.01	2.41	-0.39	7.29
<i>1 pmol</i>	-7.71	9.97	-2.99	5.68	-0.29	5.93	3.36	5.09	-2.72	6.92	-1.05	2.14
<i>3 pmol</i>	0.72	3.20	-1.70	4.09	-0.60	7.46	-2.32	8.78	-0.22	6.73	3.81	7.06

<sup>a</sup> $p \leq 0.05$  when compared the ESCS 100 and 300 mg/kg, naïve, NCG and PCG; <sup>b</sup> $p \leq 0.05$  compared to ESCS 100 mg/kg and PCG; <sup>c</sup> $p \leq 0.05$  when compared to ESCS 30 mg/kg, naïve, and PCG; <sup>d</sup> $p \leq 0.05$  when compared to naïve group. ACh: acetylcholine; Ang II: angiotensin II; NCG: negative control group; NPS: sodium nitroprusside; Phe: phenylephrine; PCG: positive control group; SD: standard deviation.

**Table 11**

Kidney tecidual redox state of animals treated with ESCS or ascorbic acid (PCG) in rhabdomyolysis-induced AKI

Parameters	Naïve		NCG		PCG		ESCS 30		ESCS 100		ESCS 300	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
<i>SOD</i>	313.7	22.7	319.4	22.5	247.2	11.8	459.0 <sup>a</sup>	32.3	411.5	45.0	225.6	19.4
<i>CAT</i>	2.98	0.42	2.99	0.71	1.18	0.12	4.92	0.61	6.50 <sup>b</sup>	1.23	20.8 <sup>c</sup>	1.29
<i>LPO</i>	617.9	29.3	520.6	27.2	606.9	41.1	559.6	29.3	639.1	25.1	595.2	27.0

<sup>a</sup> $p \leq 0.05$  when compared to the naïve, NCG, PCG, and ESCS 300 mg/kg. <sup>b</sup> $p \leq 0.05$  when compared to the naïve, NCG, and PCG. <sup>c</sup> $p \leq 0.05$  when compared to the naïve, NCG, PCG, ESCS 30 and 100 mg/kg. *CAT*: catalase (mmol min/mg protein); *LPO*: lipoperoxides (mmol hydroperoxide/mg protein); *M*: mean; *NCG*: negative control group; *PCG*: positive control group; *SD*: standard deviation; *SOD*: superoxide dismutase (SOD U/mg of protein).



## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo identificou a presença 25 compostos fitoquímicos no SEICS, e as principais classes de metabólitos foram flavonóides, saponina esteróide e ácidos orgânicos. Quanto ao modelo de indução de LRA, identificou-se que os animais que receberam a injeção de glicerol apresentaram redução da excreção urinária de ureia, creatinina e eletrólitos, bem como do volume urinário; as lesões histopatológicas também evidenciaram a eficácia do modelo.

Em relação à investigação da atividade nefroprotetora da planta, ficou constatado efeito protetor do SEICS em relação à oligúria identificada após a injeção de glicerol, já que os resultados de excreção urinária dos animais tratados com o SEICS não diferiram dos animais que não receberam a injeção de glicerol. O SEICS também apresentou melhora na excreção urinária de eletrólitos, ureia e creatinina na dose de 30 mg/kg. A dose de 300 mg/kg foi a que apresentou maior proteção em relação às lesões histopatológicas causadas pela LRA induzida por rabdomiólise.

O efeito antioxidante do SEICS foi atestado na dose de 30 mg/kg com o aumento estatisticamente significativo de superóxido dismutase. Também houve um aumento significativo de catalase nas doses de 100 e 300 mg/kg em relação aos demais grupos.

O SEICS não apresentou ação diurética ou natriurética aguda e prolongada, bem como não interferiu na reatividade vascular renal mediante a infusão de fenilefrina, angiotensina II, acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

Quanto ao potencial antilitiásico, a presença do SEICS em modelo de cristalização *in vitro* foi capaz de reduzir significativamente a área dos cristais formados, além de reduzir a formação dos COMs em detrimento do aumento na formação de CODs. Em consequência da redução do tamanho dos cristais, houve um aumento do seu número e índice de turbidez das amostras com adição de SEICS. A planta também foi capaz de reduzir a agregação dos cristais 24 horas após o processo de cristalização. Todos os efeitos antilitiásicos identificados no presente trabalho atribuídos ao SEICS foram dose-dependente, validando assim as informações etnofarmacológicas atribuídas à planta em relação ao seu uso popular para o tratamento da nefrolitíase.

## 7 ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 25 de fevereiro de 2019.

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "***Avaliação do efeito antilitiásico e nefroprotetor do extrato de *Costus spicatus* sobre lesão renal aguda induzida por glicerol***", registrada sob o protocolo de nº 29/2018, sob a responsabilidade de Marcio Eduardo de Barros e Karyne Garcia Tafarelo Moreno – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 09/11/2018.

<i>Finalidade</i>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	01/06/2019 a 30/09/2019
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus - Wistar</i>
<i>Nº de animais</i>	64
<i>Peso/idade</i>	40 dias
<i>Sexo</i>	Machos
<i>Origem</i>	Biotério Central UFGD

*Melissa Negrão Sepulvida*

Melissa Negrão Sepulvida  
Coordenadora CEUA



UFGD - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS / UFGD-MS



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do efeito antilitiásico e nefroprotetor do extrato de *Costus spicatus* em ratos Wistar com lesão renal aguda induzida por glicerol

**Pesquisador:** Karyne Garcia Tafarelo Moreno

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 99855418.2.0000.5160

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.020.357

#### Apresentação do Projeto:

O presente estudo será apenas uma coletada amostras de urina de seis humanos voluntários, para servir de base para o experimento de cristalização *in vitro* com uso de oxalato de sódio. Será adicionado às amostras o extrato da planta para verificar se há redução na cristalização e conseqüente efeito antilitiásico.

Os participantes da pesquisa não sofrerão qualquer intervenção, serão apenas fornecedores da amostra de urina para o experimento. Fase *in vivo*:

será realizada com ratos wistar, será induzida lesão renal aguda por rbdomiólise com uso de glicerol, e os animais serão tratados com extrato de

*Costus spicatus* em diferentes doses para verificar se há nefroproteção.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito protetor do extrato de *Costus spicatus* sobre a lesão renal aguda induzida por glicerol em ratos Wistar e a litíase urinária em modelo *in vitro*.

Objetivo Secundário:

Comparar a diferença entre os efeitos do extrato das folhas e do rizoma de *Costus spicatus*; Avaliar o efeito da injeção intramuscular de glicerol sobre

**Endereço:** Rua Melvin Jones, 940

**Bairro:** Jardim América

**UF:** MS

**Município:** DOURADOS

**CEP:** 79.803-010

**Telefone:** (67)3410-2853

**E-mail:** cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.020.357

a função renal de ratos Wistar por meio de exames bioquímicos e análises histológicas; Avaliar e comparar os efeitos de cada extrato de *Costus spicatus*, sobre os exames bioquímicos, análises histológicas, peso corporal e peso renal ratos Wistar com LRA desenvolvida por rabiomíose; Avaliar o efeito antilítico dos extratos de *Costus spicatus* em cristalização *in vitro*;

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A pesquisa desta-se que os riscos envolvendo seres humanos envolvem o processo de coleta de mostra de urina, que pode gerar constrangimento aos participantes. Esse risco será minimizado com a realização da coleta em local privativo e feita pelo próprio participante, e entrega de recipiente para o armazenamento da amostra que impeça a exposição do material para terceiros. O sigilo e anonimato dos participantes será preservado durante toda a pesquisa.

Já quanto aos benefícios espera-se que a pesquisa identifique na *Costus spicatus* algum potencial nefroprotetor, sendo assim haverá a abertura de uma nova alternativa para novos estudos e a possibilidade de utilização da planta como um tratamento alternativo nas nefropatias. Se os resultados forem negativos, a pesquisa contribuirá para o esclarecimento das informações populares, que sugerem que a planta tenha potencial nefroprotetor. Portanto o voluntário participante da pesquisa estará contribuindo com esses achados e auxiliando no processo de pesquisa.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa de alta relevância social e científica e apresenta mínimos riscos éticos.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória constam no protocolo e atendem o que se pede a normatização vigente

#### **Recomendações:**

Como as amostras de urinas humanas, deste protocolo será base para pesquisa em animais, sugiro que a pesquisa seja também submetida ao comitê de pesquisa em animais.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após análise criteriosa deste protocolo, concluímos pela APROVAÇÃO da mesma.

**Endereço:** Rua Melvin Jones, 940

**Bairro:** Jardim América

**UF:** MS

**Município:** DOURADOS

**CEP:** 79.803-010

**Telefone:** (67)3410-2853

**E-mail:** cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.020.357

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1216907.pdf	30/09/2018 10:58:29		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	30/09/2018 10:45:43	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_compromisso_fcs.pdf	30/09/2018 10:44:54	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_compromisso.pdf	30/09/2018 10:43:52	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Demosntrativo_Infraestrutura.pdf	30/09/2018 10:42:46	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	30/09/2018 10:22:56	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	30/09/2018 10:20:30	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.pdf	30/09/2018 10:17:42	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Comissao_de_Pesquisa.pdf	30/09/2018 10:03:55	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_COMPLETO_Karyne.pdf	30/09/2018 10:02:31	Karyne Garcia Tafarelo Moreno	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Melvin Jones, 940

**Bairro:** Jardim América

**CEP:** 79.803-010

**UF:** MS

**Município:** DOURADOS

**Telefone:** (67)3410-2853

**E-mail:** cep@ufgd.edu.br



UFGD - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS / UFGD-MS



Continuação do Parecer: 3.020.357

DOURADOS, 14 de Novembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Leonardo Ribeiro Martins**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Melvin Jones, 940

**Bairro:** Jardim América

**UF:** MS

**Município:** DOURADOS

**CEP:** 79.803-010

**Telefone:** (67)3410-2853

**E-mail:** cep@ufgd.edu.br