

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE

MARIA LUIZA FIDELIS DA SILVA

Avaliação do efeito nefroprotetor do óleo de jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*) em modelo experimental de rabdomiólise induzido por glicerol em ratos

Dourados-MS

2024

MARIA LUIZA FIDELIS DA SILVA

Avaliação do efeito nefroprotetor do óleo de jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*) em modelo experimental de rabdomiólise induzido por glicerol em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

Área de concentração: Alimentos, Nutrição e Saúde

Linha de Pesquisa: Alimentos e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros

Coorientador: Prof. Dra. Virginia Demarchi Kappel Trichez

Dourados-MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586a Silva, Maria Luiza Fidelis Da

Avaliação do efeito nefroprotetor do óleo de jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*) em modelo experimental de rabdomiólise induzido por glicerol em ratos [recurso eletrônico] / Maria Luiza Fidelis Da Silva. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Marcio Eduardo de Barros.

Coorientadora: Virginia Demarchi Kappel Trichez.

Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

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

1. Lesão renal aguda. 2. Necrose tubular aguda. 3. Mioglobínúria. 4. Suplemento dietético.
5. Nutracêuticos. I. Barros, Marcio Eduardo De. II. Trichez, Virginia Demarchi Kappel. III.
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.



Ministério da Educação
**Universidade Federal da
Grande Dourados**



PROPP - Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR MARIA LUIZA FIDELIS DA SILVA, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE".

Aos onze dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e quatro, às oito horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"Avaliação do efeito nefroprotetor do óleo de jacaré do Pantanal (Caiman yacare) em modelo experimental de rabdomiólise induzido por glicerol em ratos"**, apresentada pela mestrandia Maria Luiza Fidelis da Silva, do Programa de Pós-graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros/UFGD (presidente/orientador), Prof.^a Dr.^a Flavia Andreia Marin/UFGD (membro titular interno), Prof.^a Dr.^a Ariany Carvalho dos Santos/UFGD (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata

APROVADA

considerada . A Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 11 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente
MARCIO EDUARDO DE BARROS
Data: 11/03/2024 12:26:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
FLAVIA ANDREIA MARIN
Data: 11/03/2024 12:21:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
ARIANY CARVALHO DOS SANTOS
Data: 11/03/2024 11:04:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros
Presidente/orientador
(Participação Remota)
Prof.^a Dr.^a Flavia Andreia Marin
Membro Titular Interno
(Participação Remota)

PROPP)

Prof.^a Dr.^a Ariany Carvalho dos Santos
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

(PARA USO EXCLUSIVO DA

ATA HOMOLOGADA EM: , PELA PROPP/ UFGD.

Pg. 1 de 1

ATA HOMOLOGADA PELA PROPP/ UFGD

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me sustentar e capacitar, me dando forças para concluir mais uma etapa da minha vida, pois sem Ele nada sou e não teria chegado até aqui.

Aos meus pais, que não mediram esforços para me ajudar, sempre me apoiando nos melhores e piores momentos dessa caminhada. Obrigada por me incentivarem e mostrarem que eu sou capaz, mesmo eu não acreditando, sem o amor de vocês nada seria possível.

Aos meus irmãos, que mesmo distantes, se fazem presentes. Obrigada por todo apoio e carinho.

Aos meus amigos e familiares por acreditarem em mim e alegrarem os meus dias, fazendo com que tudo ficasse mais leve.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros e a minha coorientadora Prof. Dra. Virginia Demarchi Kappel Trichez, pelo aprendizado e incentivos conferidos a mim nesses dois anos de parceria, além de toda atenção dispensada. Com certeza saio dessa jornada, com uma bagagem cheia de conhecimentos e principalmente experiências vividas.

Aos meus parceiros e amigos de laboratório, Aline Marques, Aline Martins, Gabriela, Karyne, Luana, Luciane, esse trabalho com certeza não seria possível sem a ajuda de vocês, obrigada por me ajudarem quando eu mais precisei e obrigada por deixarem meus dias mais leves e divertidos. Ao Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, obrigada por toda ajuda dispensada e por disponibilizar toda estrutura do laboratório, para que meu trabalho pudesse ser realizado.

A todos que estiveram comigo nesse tempo, pois de alguma forma me ajudaram e me ensinaram a crescer e ser uma pessoa melhor.

Agradeço a CAPES pelo apoio e por possibilitar o financiamento desta pesquisa. Muito obrigada!

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação tem como propósito demonstrar o efeito protetor do óleo de jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*) no sistema renal. Foram utilizados ratos Wistar, com o intuito de assimilar as condições fisiológicas encontradas em humanos. A pesquisa se encontra concluída e para o seu desenvolvimento foram feitas as seguintes análises: avaliação da função renal e averiguação dos possíveis efeitos sistêmicos na utilização do óleo.

Este documento está estruturado de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução nº. 239, de 21 de novembro de 2019, que dispõe sobre o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados. O arquivo é constituído de elementos pré-textuais, introdução, revisão da literatura, objetivo geral, objetivos específicos, metodologia e o artigo científico, o qual apresenta dados sobre os resultados e a discussão da pesquisa. O artigo está de acordo com as normas da revista Nutrição, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares, na qual será submetido.

Avaliação do efeito nefroprotetor do óleo de jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*) em modelo experimental de rabdomiólise induzido por glicerol em ratos

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada por uma abrupta perda de função renal, apresentando cerca de 12–13 milhões de casos anualmente, com aproximadamente 1,7 milhões de mortes por ano. O tratamento da LRA representa um importante intensificador de custos para os sistemas de saúde, devido a fatores como tratamento farmacológico, gravidade da LRA, necessidade de terapia renal substitutiva e a falta de recuperação renal. A LRA induzida por rabdomiólise é um dos modelos experimentais

mais frequentemente utilizados, com administração de uma única injeção intramuscular de glicerol em ratos. Diante disso, este estudo tem por objetivo avaliar o efeito nefroprotetor do óleo de jacaré (*Caiman yacare*) sobre a LRA induzida por glicerol em ratos. Os efeitos nefroprotetores do óleo de jacaré (OJ) foram avaliados em um modelo de LRA (10 ml/kg glicerol, intramuscular) em ratos Wistar. Diferentes doses de OJ (19, 56 e 168 mg/kg) foram administradas por via oral durante 7 dias antes da indução da LRA. Os parâmetros urinários foram mensurados durante o tratamento com OJ, os parâmetros bioquímicos através da coleta de sangue, foram mensurados após o tratamento com OJ. Parâmetros eletrocardiográficos, hemodinâmicos, reatividade vascular renal, e alterações histopatológicas foram medidas após o tratamento com OJ. A partir das análises, foi possível observar que o modelo utilizado demonstrou danos histopatológicos, reduções na excreção urinária de 24h nos grupos experimentais, alterações nos parâmetros eletrocardiográficos, bioquímicos e de reatividade vascular renal. Entretanto, o tratamento com óleo de jacaré (*Caiman yacare*) não influenciou nenhum parâmetro analisado, indicando que a ingesta de óleo de jacaré durante o período estudado não demonstrou efeito nefroprotetor contra LRA induzida por rhabdomiólise em ratos.

Palavras-chave: Lesão renal aguda; Necrose tubular aguda; Mioglobínúria; Suplemento dietético; Nutracêuticos.

Evaluation of the nephroprotective effect of Pantanal alligator oil (*Caiman yacare*) in an experimental model of glycerol-induced rhabdomyolysis in rats

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is characterized by an abrupt loss of kidney function, with approximately 12–13 million cases annually, resulting in approximately 1.7 million deaths per year. The treatment of AKI represents a major cost burden for health systems, attributable to factors such as pharmacological treatment, severity of AKI, need for renal replacement therapy, and the lack of renal recovery. Rhabdomyolysis-induced AKI is one of the most frequently used experimental models, involving the administration of a single intramuscular injection of glycerol in rats. Therefore, this study aims to evaluate the nephroprotective effect of alligator oil (*Caiman yacare*) on glycerol-induced AKI in rats. The nephroprotective effects of alligator oil (OJ) were evaluated in a model of AKI (10 ml/kg glycerol, intramuscular) in Wistar rats. Different doses of OJ (19, 56 and 168 mg/kg) were administered orally for 7 days prior to AKI induction. Urinary parameters

were measured during OJ treatment, biochemical parameters were assessed through blood collection were measured after OJ treatment. Electrocardiographic and hemodynamic parameters, renal vascular reactivity, and histopathological changes were measured after OJ treatment. The analyses revealed histopathological damage in the model used, reductions in 24-hour urinary excretion in the experimental groups, as well as alterations in electrocardiographic, biochemical and renal vascular reactivity parameters. However, treatment with alligator oil (*Caiman yacare*) did not influence any of the parameters analyzed, indicating that the intake of alligator oil during the study period did not demonstrate a nephroprotective effect against rhabdomyolysis-induced AKI in rats.

Keywords: Acute kidney injury; Acute tubular necrosis; Myoglobinuria; Dietary supplement; Nutraceuticals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cadeia produtiva do jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*)25

Figura 2: Desenho experimental

.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKIN Acute Kidney Injury Network (Sociedade de Lesão Renal Aguda) CG

Cromatografia Gasosa

DAMPs Damage-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Danos)

DCV Doenças Cardiovasculares

DRC Doença Renal Crônica

DRCT Doença Renal Crônica Terminal

IL-18 Interleucina 18

IL-1 β Interleucina-1 β

KDIGO Kidney Disease: Improving Global Outcomes(Doença Renal: Melhorando os Resultados Globais)

LRA Lesão Renal Aguda

LRA-AS Lesão Renal Aguda Associada a Sepsis

MB Mioglobina

NF κ B Nuclear Factor Kappa-B (Fator Nuclear Kappa B)

NLRP-3 Protein 3 Inflammasome (Inflamassoma da Proteína 3) NTA

Necrose Tubular Aguda

PAMPs Pathogen Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PUFA Poly Unsaturated Fatty Acids (Ácidos Graxos Poliinsaturados)

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)

ROS Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio) TGF Taxa de Filtração Glomerular

TLRs Toll-like Receptors (Receptores Toll-like)

TRS Terapia Renal Substitutiva

UTI Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12 2
REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Lesão Renal Aguda	15
2.2 Lesão renal aguda e sua interface com as doenças cardiovasculares.....	17
2.3 Modelos animais de LRA	18
2.4 Modelo experimental de LRA induzida por glicerol	20
2.5 Produtos animais como possível forma de tratamento	22
2.6 Jacaré do Pantanal (<i>Caiman yacare</i>).....	23
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 GERAL	27
3.2 ESPECÍFICOS:.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Coleta e extração do óleo de jacaré.....	28
4.3 Cálculo das doses do óleo de jacaré.....	28
4.4 Desenho experimental.....	29
4.5 Coleta do sangue e análises bioquímicas.....	31
4.6 Avaliação da função renal.....	32
4.7 Reatividade vascular renal	32
4.8 Análise histopatológica.....	33
4.9 Avaliação de parâmetros eletrocardiográficos.....	33
4.10 Avaliação de parâmetros hemodinâmicos	33
4.11 Análise estatística.....	34
5. ARTIGO.....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	

.....	60
ANEXOS.....	69
Anexo 1. Aprovação do projeto de pesquisa na Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde – CP/FCS/UFGD	69
Anexo 2 – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comissão de Ética no Uso de Animais–CEUA/UFGD.....	71
Anexo 3 – ICMBio - Autorização para atividades com finalidade científica	72
	12

1. INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada por uma abrupta perda de função renal (ZAGER, 2015). Diversas condições de saúde são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de LRA, abrangendo desde diabetes até problemas hepáticos, pulmonares e cardiovasculares (HSU et al., 2008). Clinicamente, a LRA se manifesta através de hiperperfusão renal, obstrução do fluxo urinário, resultando em uma rápida redução da função excretora renal, lesões no tecido renal e acúmulo de metabólitos de nitrogênio (CHAWLA et al., 2014). A análise epidemiológica global, revelou que anualmente são relatados cerca de 12–13 milhões de casos de LRA, com aumento significativo na mortalidade ao longo dos últimos 50 anos. A mortalidade associada à LRA é de aproximadamente 1,7 milhões de mortes por ano (ALFIERI et al., 2021), afetando até 20% dos pacientes hospitalizados e até 50% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (NEYRA; CHAWLA, 2021).

O tratamento da LRA representa um importante intensificador de custos para os sistemas de saúde, devido a fatores como intervenção farmacológica, gravidade da LRA, necessidade de terapia renal substitutiva e a falta de recuperação renal. Mesmo os casos de sobrevivência à LRA, esses custos persistem devido a necessidade de acompanhamento, considerando a possibilidade de progressão da doença renal. Portanto, torna-se evidente a importância da realização de pesquisas contínuas para melhorar o manejo da doença e reduzir seu impacto na saúde dos pacientes (COLLISTER et al., 2017).

A LRA induzida por rabdomiólise, é um dos modelos experimentais mais frequentemente utilizados, com administração de uma única injeção intramuscular de glicerol em ratos (BELLOMO et al., 2004). A LRA é caracterizada por mioglobínúria, um dos principais fatores de dano renal na rabdomiólise. A rabdomiólise é uma

condição causada por lesão muscular esquelética “síndrome de esmagamento”, que leva à liberação de mioglobina muscular, proteínas sarcoplasmáticas (creatina cinase, lactato desidrogenase, aldolase, alanina e aspartato aminotransferases) e eletrólitos no espaço extracelular e na circulação (STANLEY et al., 2023). A liberação da mioglobina pelas células, provoca a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS),

13

desencadeando inflamação, apoptose por meio da superativação de fator nuclear kappa B (NFkB) e disfunção mitocondrial (JESUS et al., 2007; HOMSI et al., 2006; HOMSI et al., 2011).

A utilização de produtos derivados de animais na terapêutica é uma prática comum em diversas culturas (ALVES et al., 2009; ALVES et al., 2013; GHOSH; MAITI, 1996), incluindo os óleos extraídos da gordura de crocodilianos, frequentemente mencionados como tratamento para diversas doenças (ALVES et al., 2008; BARROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010; SOUTO et al., 2011). Os dados do etnoconhecimento desempenham um papel fundamental em estudos bioprospectivos, que buscam descobertas farmacológicas, alinhando-se com os interesses das áreas econômicas e biológicas, em sintonia com as demandas do mercado consumidor (EFFERTH et al., 2016; FERREIRA et al., 2014; SACCARO, 2011).

Os óleos de origem animal têm sido objeto de estudo devido a sua utilidade na área farmacológica e nutricional, investigando seus possíveis efeitos e benefícios. Esses óleos ricos em ácidos graxos, podem ser encontrados em diversos animais, incluindo peixes, aves e répteis. Entre os répteis, a espécie, *Caiman yacare* (Daudin, 1802), popularmente conhecida como jacaré-do-Pantanal, Caiman-do-Pantanal, jacaré-do-paraguai, jacaré, jacaré-tinga, são encontradas em diversas regiões, despertando interesse comercial devido à sua carne, couro e especialmente, sua gordura.

Um estudo realizado por Azevedo et al. (2020), identificou e quantificou a presença de nove ácidos graxos do óleo de *Caiman yacare*. Dentre esses ácidos graxos podemos destacar os saturados (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido heptadecanóico e ácido esteárico), monoinsaturados (ácido palmitoleico, ácido oleico e ácido elaídico) e poliinsaturados (ácido linoleico e ácido araquidônico). Os ácidos palmitoleico, oleico e linoleico, mais conhecidos como ômega, podem atuar como antioxidantes, regulando a via de sinalização antioxidante (OPPREDISANO et al., 2020; SAKAI et al., 2017), além de desempenhar um papel na modulação de processos inflamatórios (CALDER, 2020; OPPREDISANO et al., 2020).

Nesse sentido, ao examinar os dados disponíveis, verifica-se a necessidade de se

investigar o óleo de *Caiman yacare* para fins farmacológicos na medicina, tornando uma alternativa eficiente e viável a fim de agregar valor à espécie e reduzir descartes já existentes no meio ambiente (AZEVEDO et al., 2020). Embora os estudos demonstrem que este óleo possui propriedades anti-inflamatórias, não há pesquisas sobre o uso do óleo

14

de jacaré para o tratamento da LRA, implicando na necessidade de mais estudos para confirmar sua eficácia. Diante disso, o objetivo do trabalho é investigar o efeito do óleo de jacaré (*Caiman yacare*) como nefroprotetor em ratos com LRA induzida por glicerol.

15

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesão Renal Aguda

A LRA, é uma doença clinicamente heterogênea e bastante comum, caracterizada por uma súbita perda da função renal excretora. As causas mais comuns incluem lesão por esmagamento, exposição a substâncias nefrotóxicas, lesão de isquemia-reperfusão ou sepse. Esses fatores resultam no acúmulo de produtos finais metabólicos nitrogenados (creatinina e nitrogênio ureico) e/ou na diminuição da produção de urina (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012). Do ponto de vista patológico, a LRA apresenta características como disfunção vascular, inflamação, estresse oxidativo e danos às células epiteliais tubulares renais, esses danos são causados por padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (PICKKERS et al., 2021).

Aproximadamente 12–13 milhões de casos de LRA são relatados anualmente, com mortalidade elevada nos últimos 50 anos. A mortalidade associada à LRA é de cerca de 1,7 milhões de mortes por ano (ALFIERI et al., 2021). Durante um episódio hospitalar, a LRA afeta até 20% dos pacientes hospitalizados e até 50% dos pacientes internados na UTI, o que consequentemente acarreta elevados custos com cuidados de saúde (NEYRA; CHAWLA, 2021).

A etiologia da LRA é categorizada de acordo com o princípio fisiopatológico em três tipos principais: LRA pré-renal, renal e pós-renal. A lesão pré-renal está relacionada

a uma perfusão renal prejudicada, e seus principais fatores desencadeantes incluem hipotensão arterial e hipovolemia, que podem ser causados por eventos como hemorragias, diarreias e queimaduras. A LRA renal, é caracterizada principalmente pela necrose tubular aguda (NTA), outras causas dessa condição incluem nefrites tubulo intersticiais (drogas, infecções), pielonefrites, glomerulonefrites e necrose cortical. As causas pós-renais estão mais associadas a obstrução do trato urinário, como obstrução por cálculos, traumas, coágulos, tumores e fibrose retroperitoneal (PETEJOVA et al 2019; KELLUM et al, 2021).

16

Várias definições de consensos foram desenvolvidas para fornecer critérios de classificações e estadiamentos para o diagnóstico de LRA. Segundo Machado et al. (2014), a classificação 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, organiza a lesão renal aguda em cinco estágios: Risco: caracterizado por um aumento de 1,5 vezes da creatinina sérica ou uma diminuição de 25% na taxa de filtração glomerular (TFG); Lesão: aumento de 2,0 vezes da creatinina sérica ou diminuição de 50% da TFG; Falha: aumento de 3,0 vezes da creatinina sérica ou diminuição de 75% da TFG ou quando a creatinina sérica é ≥ 4 mg/dL com um aumento agudo mínimo de 0,5 mg/dL; Perda: perda completa da função renal, necessitando de terapia renal substitutiva (TRS) por mais de 4 semanas; e Doença Renal Terminal: falha completa necessitando de TRS por mais de 3 meses.

Outra classificação é a AKIN (Acute Kidney Injury Network) (2007), sigla em inglês para Sociedade de Lesão Renal Aguda, é baseada em alterações no subsídio urinário e na creatinina sérica, utilizando apenas três estágios de lesão renal: Estágio 1 (risco): aumento da creatinina sérica $\geq 0,3$ mg/dL ou $\geq 150\%$ a 200% (1,5 a 2,0 vezes) em relação ao valor basal (dentro de 48 horas); Estágio 2 (lesão): aumento da creatinina sérica para mais de 200 a 300% (> 2 a 3 vezes) em relação ao valor basal; Estágios 3 (falência): aumento da creatinina sérica para mais de 300% (> 3 vezes) em relação ao valor basal ou creatinina sérica $\geq 4,0$ mg/dL com aumento agudo de pelo menos 0,5 mg/dL ou início de terapia renal substitutiva (MACHADO; NAKAZONE; MAIA, 2014).

A classificação mais atual e utilizada é segundo a KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) (2012), sigla em inglês para Doença Renal: Melhorando os Resultados Globais, baseada em critérios específicos de creatinina sérica e débito urinário. Essa classificação possui três estágios: Estágio 1 (risco): Aumento da creatinina sérica $\geq 0,3$ mg/dL dentro de 48 horas ou aumento da creatinina sérica de 1,5

a 1,9 vezes o valor basal, ocorridos nos últimos 7 dias; Estágio 2 (lesão): aumento da creatinina sérica para 2,0 a 2,9 vezes o valor basal; e Estágio 3 (falência): aumento da creatinina sérica para 3,0 vezes o valor basal ou aumento da creatinina sérica $\geq 4,0$ mg/dL ou início de terapia renal substitutiva (KIM et al., 2017).

Uma consequência preocupante da LRA é que muitos sobreviventes acabam desenvolvendo doença renal crônica (DRC) ou sua forma terminal (DRCT), resultando em alta morbidade e mortalidade, especialmente quando estratégias terapêuticas não são

17

eficazes (NEYRA; CHAWLA, 2021). Estudos observacionais têm apontado um risco dez vezes maior de DRC após um episódio de LRA (COCA; SINGANAMALA; PARIKH, 2012; HEUNG et al., 2016). É importante ressaltar que a DRCT resultante de LRA está associada a um risco de mortalidade em seis meses, maior do que a DRCT relacionada a outras causas. Portanto, é crucial identificar precocemente a LRA e avaliar o risco, a fim de implementar intervenções oportunas que possam reduzir os danos renais e as complicações decorrentes da LRA (NEYRA; LEAF, 2018).

O tratamento da LRA varia de acordo com a gravidade da lesão renal. Algumas das intervenções de primeira linha para interromper a progressão da LRA incluem, o uso de inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), inibidores mineralocorticóides, controle da pressão arterial e terapia de reposição de fluidos (SIEW et al., 2020; VAARA et al., 2021). No caso de LRA grave, a abordagem terapêutica envolve a TRS combinada com suporte extracorpóreo (LI et al., 2021). É importante mencionar que ainda existem controvérsias em relação à eficácia terapêutica dos tratamentos convencionais disponíveis (DONDESKI; BEDNARSKI; MANITIUS, 2020).

2.2 Lesão renal aguda e sua interface com as doenças cardiovasculares

A LRA está correlacionada com o aumento da incidência de problemas cardiovasculares no decorrer do tempo (LEGRAND; ROSSIGNOL, 2020). Uma análise sistemática realizada indicou que a LRA estava vinculada a um aumento de 86% no risco de morte cardiovascular, além de um aumento de 38% no risco de eventos cardiovasculares maiores, como o desenvolvimento de insuficiência cardíaca crônica, acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio (ODUTAYO et al., 2017).

A relação entre problemas renais e cardíacos é abrangida pelo termo síndrome

cardiorrenal (RONCO; HOUSE; HAAPIO, 2008). Tanto na lesão renal aguda quanto na DRC, há um aumento na incidência de DCV, devido a vários fatores intrinsecamente ligados. Esses fatores incluem a ativação de mecanismos neuro-humorais, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona, o sistema simpático, sistema nervoso e secreção de vasopressina, capaz de causar mudanças estruturais e funcionais no coração (QUIROGA et al., 2013; IKIZLER et al., 2021). Além disso, certos elementos como hipertensão

18

arterial, equilíbrio ácido-base, sobrecarga hídrica, toxinas urêmicas, inflamação ou distúrbios do metabolismo mineral, coexistem em ambas as condições, aumentando os efeitos prejudiciais no sistema renal e cardíaco (ALLON, 2013; GOICOECHEA et al., 2012; LEKAWANVIJIT; KRUM, 2014).

A ligação entre a LRA e DCV foi evidenciada em diversos estudos. Em uma análise retrospectiva de veteranos dos EUA, Chawla et al. (2014), observaram um aumento no risco de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou insuficiência cardíaca (HR= 1,24, IC 95% 1,18-1,30), em pacientes com LRA. Em uma coorte de 4.742 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, o risco de infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral aumentou de forma significativa em pacientes com LRA durante um acompanhamento de 5 anos (HR= 1,37, IC 95% 1,05-1,80). Além disso, a LRA foi associada a um aumento na taxa de mortalidade a curto e longo prazo (HANSEN et al., 2015). Wu et al. (2014), demonstraram uma taxa de incidência de eventos coronarianos de 19,8/1.000 pessoas por ano (HR= 1,67, IC 95% 1,36-2,04) independentemente da progressão para DRC.

O risco de DCV aumenta proporcionalmente à gravidade da LRA (LEE et al., 2019; PARIKH et al., 2017). Um estudo realizado por Lee et al. (2019), observou que pacientes com LRA que necessitaram de diálise, apresentaram uma incidência mais elevada de eventos cardiovasculares (HR= 1,97, IC 95% 1,75-2,23) e esse risco permaneceu elevado mesmo em pacientes que recuperaram a função renal (HR= 1,73, IC 95% 1,54-1,95). Além disso, até mesmo pequenas alterações na função renal têm sido associadas ao aumento do risco de eventos cardiovasculares (GOLDBERG et al., 2009).

Em resumo, muitos pacientes com disfunção renal apresentam modificações nas estruturas e funções cardíacas que impactam negativamente em seu prognóstico e a detecção precoce dessas alterações permitiria uma estratificação mais precisa do risco (LEVIN et al., 2001; QUIROGA et al., 2013).

2.3 Tratamentos da Lesão Renal Aguda

19

O tratamento da LRA varia conforme a causa subjacente da condição e envolve a implementação de medidas e suporte destinados a prevenir complicações futuras, além disso, alguns medicamentos antioxidantes e anti-inflamatórios também demonstraram ser eficazes na proteção renal (LI et al., 2020). Contudo, em pacientes com LRA grave decorrente de distúrbio eletrolítico e sobrecarga de volume, o tratamento disponível é a TRS (CRUZ; BAGSHAW, 2011)

A redução do volume sanguíneo pode levar a várias causas de LRA, portanto, a atenção à hidratação do paciente é fundamental no tratamento dessa condição (KELLUM et al., 2021). O controle de volume e da estabilidade hemodinâmica deve ser realizado por meio de administração de fluidos intravenosos. Além disso, outro aspecto importante no manejo da doença é a suspensão do uso de qualquer medicamento nefrotóxico (MOORE; HSU; LIU, 2018).

Outras abordagens terapêuticas para LRA incluem o uso de diuréticos para controlar o volume e controle nutricional rigoroso para reduzir o hipercatabolismo (MOORE; HSU; LIU, 2018). Em determinados casos, como na glomerulonefrite aguda, a terapia medicamentosa pode ser preferida, com a prescrição de imunossupressores e corticosteroides (LEVEY; JAMES, 2017).

Para casos graves, a TRS é recomendada, especialmente quando o paciente apresenta distúrbios refratários e potencialmente fatais nos fluidos, eletrólitos e no equilíbrio ácido-base, os quais requerem correção imediata. Quando há instabilidade no estado clínico do paciente, a diálise contínua é preferível, sendo que, à medida que o paciente apresenta estabilidade, esquemas intermitentes são adotados (KELLUM et al., 2021)

2.4 Modelos animais de LRA

Modelos animais têm sido amplamente utilizados para esclarecer a patogênese e os mecanismos envolvidos na LRA, entre estes modelos, camundongos e ratos são os mais comumente utilizados. Recentemente, foram discutidas algumas revisões dos modelos disponíveis, incluindo suas vantagens e desvantagens, dentre esses modelos

atuais, podemos citar os induzidos por sepse, isquemia-reperfusão, obstrução ureteral e toxinas (BAO et al., 2018).

20

A LRA associada à sepse (LRA-AS) é caracterizada por complicações inflamatórias graves e alta taxa de morbimortalidade (SWAMINATHAN et al., 2015). Os modelos experimentais frequentemente empregados para simular a LRA-AS podem ser classificados em dois tipos principais: (1) administração de bactérias ou toxinas endógenas (como o LPS) no peritônio ou na corrente sanguínea; e (2) indução de peritonite por ligadura e punção do ceco ou por estenose do cólon ascendente para liberar excretas intestinais (LIU et al., 2015; XU et al., 2014).

O modelo de isquemia-reperfusão utiliza o clampeamento da artéria e da veia renal por um período de tempo variável, com o objetivo de induzir diferentes graus de lesão renal. Esse processo desencadeia necrose e apoptose de células tubulares, inflamação e estresse oxidativo, o qual pode levar a uma deterioração na função renal, conforme indicado pelos níveis de ureia e creatinina sérica (ROVCANIN et al., 2016; SANZ et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

A obstrução ureteral unilateral é um modelo relativamente simples. Os animais machos, recomendados neste modelo, são submetidos a uma incisão abdominal na linha média sob anestesia, onde o ureter esquerdo é ligado com fio de seda 4-0. Após 24 horas, a obstrução do ureter é removida (BANDER et al., 1985). Esse modelo pode resultar em hidronefrose, alterações no fluxo sanguíneo, isquemia, hipóxia e estresse oxidativo (DENDOOVEN et al., 2011), contribuindo para a morte celular tubular, seguida de inflamação intersticial. Além disso, os fibroblastos transformados, podem interagir com a deposição de matriz extracelular levando à fibrose renal (XIAO et al., 2016; ZHOU et al., 2014).

Drogas exógenas ou toxinas endógenas são empregadas para induzir a LRA por meio de seus efeitos adversos ou propriedades tóxicas. Dentro desses modelos, doses de 6 a 20 mg/kg de cisplatina podem causar lesão tubular aguda em 72 horas, enquanto a administração de 40 a 200 mg/kg de gentamicina em ratos por 4 a 10 dias pode levar à insuficiência renal aguda. O ácido aristolóquico e o ácido fólico em altas doses são frequentemente utilizados para investigar a transição da LRA para a DRC, além de modelos de LRA induzidos por varfarina e glicerol (BAO et al., 2018).

2.5 Modelo experimental de LRA induzida por glicerol

21

A rabdomiólise é uma condição patológica caracterizada pela degeneração e necrose das células musculares esqueléticas, levando à liberação de conteúdo intracelular na corrente sanguínea, incluindo creatina quinase, lactato desidrogenase, aldolase, alanina e aspartato aminotransferase (STANLEY et al., 2023). Essa condição pode ser desencadeada por vários fatores físicos ou químicos, incluindo lesão traumática direta ou compressão muscular, exercício intenso ou imobilização prolongada, isquemia muscular, infecções, distúrbios eletrolíticos e metabólicos, doenças genéticas, toxinas, drogas e hipertermia maligna (EFSTRATIADIS et al., 2007; GIANNOGLOU; CHATZIZISIS; MISIRLI, 2007). A complicação mais comum e potencialmente fatal da rabdomiólise é a LRA, com uma incidência variando de 10 a 55% e acompanhada por um mau prognóstico, especialmente na presença de falência de múltiplos órgãos (GUPTA et al., 2021; JINDAL; NAYAK, 2015).

Vários métodos experimentais foram propostos para avaliar a lesão renal aguda em animais de laboratório. O método experimental amplamente utilizado é o modelo de glicerol, que simula o desenvolvimento de insuficiência renal aguda decorrente de trauma ou lesão muscular em humanos (KORRAPATI; SHANER; SCHNELLMANN, 2012; GYURÁSZOVÁ et al., 2019). A injeção intramuscular de glicerol em animais provoca rabdomiólise, levando à lise das células musculares e dos glóbulos vermelhos e a liberação de proteínas ricas em ferro (MOUSLEH; LAHAM; AL-MANADILI, 2018). Essas proteínas se depositam nos túbulos renais, resultando em danos aos túbulos proximais e distais complexos no córtex renal, prejudicando assim a função renal (ZUROVSKY, 1993). Diversas pesquisas apontam que a toxicidade renal induzida pela mioglobina desempenha um papel fundamental na LRA associada à rabdomiólise, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo, inflamação, disfunção endotelial, contração vascular e apoptose (PANIZO et al., 2015).

A mioglobina (Mb) é uma pequena hemoproteína citoplasmática monomérica, composta de cadeias α -globina e β -globina, bem como um grupo heme (OSTERMANN et al., 2000). Ela é principalmente expressa no músculo cardíaco e esquelético de vertebrados, desempenhando um papel fundamental na ligação, armazenamento e transporte de oxigênio para as mitocôndrias (KOCH et al., 2016; WITTENBERG; WITTENBERG, 1989). Estudos anteriores indicam que a proporção entre Mb (mg) e peso úmido do tecido (g) é de aproximadamente 2,5 no miocárdio, e cerca de 4,0 no músculo esquelético (VAN NIEUWENHOVEN et al., 1995). A Mb atua como um fator

pela obstrução tubular; lesão oxidante devido a dissociação do ferro na Mb; e liberação de radicais livres (ZIMMERMAN; SHEN, 2013).

Na rabdomiólise, a mioglobina é liberada dos músculos para a corrente sanguínea e posteriormente filtrada pelos glomérulos. A mioglobina é então depositada nas células tubulares renais proximais, desencadeando estresse oxidativo devido à presença do ferro (PANIZO et al., 2015). Além disso, as moléculas com capacidade imunoestimulatória, liberadas pelos músculos lesionados, ativam diversas vias inflamatórias, incluindo os receptores toll-like (TLRs), o NF- κ B e inflamassoma da proteína 3 do receptor tipo NOD (NLRP-3), resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e inflamação renal, que desempenha papel significativo na patologia da doença (KIM et al., 2019; KOMADA et al., 2015; PANIZO et al., 2015). O inflamassoma NLRP-3 também ativa o caspase-1 (PANIZO et al., 2015) que, por sua vez, promove a ativação proteolítica da interleucina 1 β (IL-1 β) e IL-18, agravando ainda mais a inflamação e a lesão renal (KIM et al., 2019).

A supressão dessas vias inflamatórias com o bloqueio da liberação de citocinas inflamatórias, representa uma abordagem promissora para melhorar a LRA associada a rabdomiólise, pois de acordo com um estudo realizado por Di Paola et al. (2013), a inibição das reações inflamatórias renais iniciais pode melhorar a lesão renal através da diminuição da infiltração celular inflamatória e da produção de citocinas, assim como a minimização e proteção da lesão renal induzida por mioglobulinúria através da administração de antioxidantes (BOSCH; POCH; GRAU, 2009; WU et al., 2017).

2.6 Nutracêuticos

Muitos estudos tem surgido com o objetivo de avaliar os alimentos quanto à sua capacidade de proteção contra várias doenças (SANTINI et al., 2018). Os nutracêuticos podem ser definidos como um alimento ou qualquer componente do alimento, que ofereça benefícios médicos, como prevenção ou cura de qualquer doença. Os nutracêuticos podem ser categorizados em 3 classes principais que consistem em nutrientes (ácidos graxos, vitaminas, aminoácidos, etc.), ervas (alho, grama de trigo, *aloe vera*, açafrão,

gengibre, etc.) e suplementos dietéticos (óleos de peixe, probióticos, etc.) (CHOPRA et al., 2022).

De acordo com estudos recentes, os nutracêuticos agem na prevenção e tratamento de várias doenças, como lesão renal aguda, doença renal crônica, diabetes, distúrbios cardiovasculares, insuficiência hepática, entre outras (DALIU; SANTINI; NOVELLINO, 2019). Portanto, os mesmos podem ser usados tanto como uma forma de tratamento isolado, quanto como terapia adjuvante para reduzir os efeitos adversos ou aumentar a eficácia das terapias convencionais (DARE; CHANNA; NADAR, 2021; LAFUENTE et al., 2019).

Alimentos e gorduras ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) apresentam uma grande procura pelos consumidores, devido à sua relação benéfica à saúde. O óleo de peixe é o mais utilizado pela população e apresenta uma fonte rica em ácidos graxos ômega 3 de cadeia longa, um grupo de gorduras poliinsaturadas que inclui principalmente o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico, sendo reconhecido por apresentar redução da incidência de doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias (SIMOPOULOS, 2016).

O óleo de crocodilianos é aplicado em diversas culturas como tratamento de doenças de pele, cura de queimaduras, no alívio de tosse e alergias, e até mesmo em condições mais sérias como a asma (SHIM-PRYDON; CAMACHO-BARRETO, 2007). Além disso, pesquisas demonstram que o óleo melhora a cicatrização de feridas (LI et al., 2012), é antimicrobiano, anti-inflamatório (BUTHELEZI et al., 2012) e reduz a peroxidação lipídica no fígado de ratos, revelando um potencial na desintoxicação hepática (SANTATIVONGCHAI et al., 2022).

2.7 Jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*)

O Pantanal é uma das maiores áreas úmidas interiores do mundo, cobrindo uma área de aproximadamente 200.000 km² durante a estação das cheias. Situado no centro oeste do Brasil, sudeste da Bolívia e uma porção menor do nordeste do Paraguai, o Pantanal se destaca por seu ciclo sazonal de enchentes e secas, fator determinante para interações ecológicas intrínsecas e ocorrência de alta biodiversidade (JUNK et al., 2006; ALHO; SABINO, 2011).

A espécie *Caiman yacare*, popularmente conhecido como jacaré do Pantanal, é uma espécie que ocupa diversas regiões. Sua presença é notável nas planícies do norte e leste da Bolívia, oeste do Brasil ao longo dos rios Guaporé, Madeira, Paraná e Paraguai, e norte do Argentina, o que evidencia uma ampla adaptação ambiental da espécie

(CAMPOS et al. 2010). Nos ambientes pantaneiros brasileiros, os jacarés são naturalmente abundantes, com densidades que superam 100 indivíduos/km² distribuídos ao longo das várzeas (FARIAS et al. 2013), o que certamente permitiu o desenvolvimento da exploração comercial de jacarés selvagens por empresas e agricultores. A cadeia produtiva de jacarés criados em cativeiro vem crescendo no Brasil desde 1990, quando o IBAMA regulamentou o uso de jacarés de criação para fins comerciais (PORTARIA nº 126 de 1990).

A prática de criação de jacarés tem sido desenvolvida gradualmente ao longo dos anos no Brasil, demonstrando ser uma atividade economicamente promissora, especialmente na região do Pantanal (CANTO, et al., 2012). A principal finalidade da criação é a produção de couros de qualidade, altamente valorizados no mercado internacional (VIEIRA et al., 2012). No entanto, a comercialização da carne de jacaré também se tornou uma atividade rentável e complementar, impulsionada pelo interesse crescente por carnes exóticas, sendo apreciada por seu bom perfil nutricional, caracterizado por baixo teor de gordura, alto teor de proteína bruta, aminoácidos essenciais, ácidos graxos e minerais (DOMÍNGUEZ et al., 2019).

O processo de abatimento de jacarés resulta em um rendimento de carcaça de aproximadamente 65%, dos quais 30 a 40% correspondem a carne comestível (HOFFMAN; CAWTHORN, 2012). Assim como no processamento de peixes, o tratamento da carcaça de jacarés gera uma quantidade significativa de resíduos que normalmente são direcionados para a alimentação animal. Contudo, eles também podem ser aproveitados ao consumo humano (STEVANATO et al., 2007; FRANCO et al., 2009; PETENUCI et al., 2010; GODOY et al., 2013), incluindo-os em diversos produtos alimentícios.

De acordo com Zylbersztajn et al. (2000), o termo “cadeia produtiva” refere-se a um conjunto de operações interdependentes com o propósito de produzir, modificar e distribuir um produto. No contexto do jacaré do Pantanal, Coutinho (2006) relata que a cadeia produtiva mais bem estruturada está localizada no Estado do Mato Grosso. Segundo Aleixo (2000), a criação racional de jacarés é uma atividade em expansão, cujo objetivo principal é a obtenção de peles com maior qualidade, sendo a carne considerada

25

um subproduto, contudo Pyran (2010), destaca que a partir de 2003, a carne passou a ser um produto tão forte quanto à pele em termos de comercialização. A Figura 1 ilustra a representação da cadeia produtiva do jacaré do Pantanal de acordo com a Coocrija (2010).

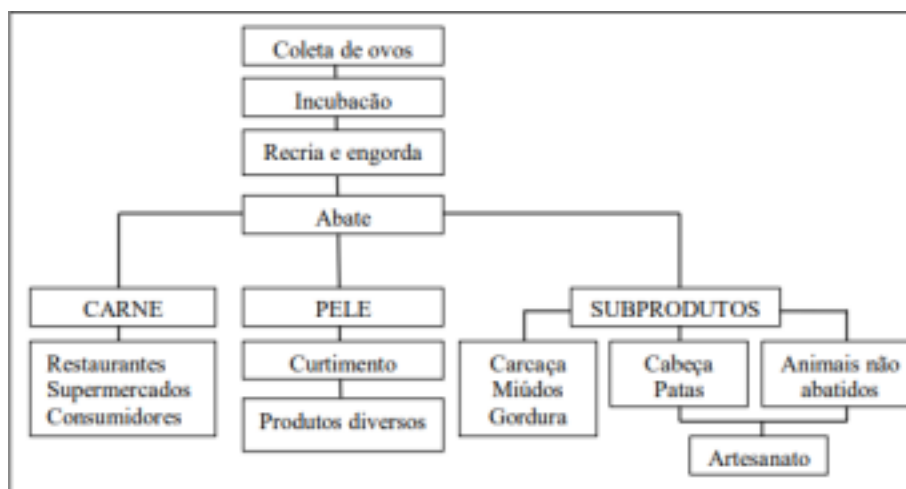


Figura 1: Cadeia produtiva do jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*)

Fonte: Coocrijapan (2010)

A otimização da utilização de produtos originários de animais exóticos pode não apenas aumentar a eficácia na produção animal, mas também garantir que essa eficácia seja alcançada de maneira sustentável. Além disso, essa abordagem pode potencialmente criar novas perspectivas de mercado e agregar valor à questão da espécie (MORAIS, et al., 2013).

A utilização de produtos derivados de animais na prática terapêutica é uma característica presente em muitas culturas (ALVES, et al., 2009; ALVES, et al., 2013; GHOSH; MAITI, 1996), incluindo os óleos extraídos da gordura do crocodiliano, frequentemente mencionados como tratamento para diversas doenças (ALVES, et al., 2008; BARROS, et al., 2012; OLIVEIRA, et al., 2010; SOUTO, et al., 2011). Por isso, os dados do etnoconhecimento desempenham um papel precursor em estudos bioprospectivos, que buscam descobertas farmacológicas, alinhando-se com as áreas econômicas e biológicas, promovidas pelo mercado consumidor (EFFERTH, et al., 2016; FERREIRA, et al., 2014; SACCARO, 2011).

Um estudo realizado por Azevedo, et al. (2020), identificou e quantificou a presença de nove ácidos graxos do óleo de *Caiman yacare* através de cromatografia

26

gasosa (CG). Os ácidos graxos saturados (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido heptadecanóico e ácido esteárico) correspondem a 42,95 % do óleo, e os ácidos graxos insaturados correspondem a 43,74 % do mesmo, sendo 34,65 % monoinsaturados (ácido palmitoleico, ácido oleico e ácido elaídico) e 9 % poliinsaturados (ácido linoleico e ácido araquidônico). Os ácidos palmitoleico, oleico e linoleico, mais conhecidos como ômega, podem atuar como antioxidantes, regulando a via de sinalização antioxidante (OPPEDISANO et al., 2020; SAKAI et al., 2017) e podem também atuar modulando

processos inflamatórios (CALDER, 2020; OPPEDISANO et al., 2020).

Considerando que não existe estudos na literatura sobre a utilização do óleo de jacaré em modelos de LRA, e analisando as possíveis propriedades que o mesmo apresenta, verifica-se a necessidade de se investigar o óleo de *Caiman yacare* para fins farmacológicos no tratamento da LRA.

27

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Investigar o efeito do óleo de jacaré (*Caiman yacare*) como nefroprotetor em ratos com LRA induzida por glicerol.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Induzir a LRA em ratos através da administração de glicerol;
- Realizar o pré-tratamento com óleo de jacaré por 7 dias pela via oral, antes da indução da LRA;
- Avaliar e comparar o efeito entre as diferentes doses do óleo de jacaré, sobre a LRA desenvolvida por rhabdomiólise;
- Avaliar o efeito da ingestão do óleo de jacaré sobre os parâmetros bioquímicos de creatinina, ureia, AST e ALT;
- Avaliar a função renal de ratos com lesão renal aguda após o tratamento com óleo de jacaré;
- Avaliar o efeito da ingestão do óleo de jacaré sobre o padrão de reatividade vascular renal mediante a LRA induzida por glicerol.
- Avaliar o efeito da ingestão do óleo de jacaré sobre a morfologia renal (histologia) dos animais submetidos ao modelo de LRA induzido por glicerol; • Avaliar o efeito da ingestão do óleo de jacaré sobre o padrão eletrocardiográfico e pressão arterial dos animais submetidos ao modelo de LRA induzido por glicerol;

28

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Quarenta e oito ratos machos (250–300 g) foram adquiridos no biotério da UFGD e alojados em ambiente controlado de umidade, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12h/12h. Comida e água serão fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFGD sob o protocolo de nº 23019.

4.2 Coleta e extração do óleo de jacaré

A gordura visceral foi obtida a partir de tecido adiposo encapsulado na face caudolateral direita do fígado, aqui denominado “corpo adiposo”. As vísceras utilizadas neste estudo pertenciam a dez jacarés com idade superior a dois anos e meio. De uma amostra de 854,9 g de gordura corporal, o óleo foi extraído pelo método Soxhlet, refluxado por seis horas contínuas em solvente extrator hexânico a 65°C , por um período de cinco dias contínuos. Posteriormente o óleo foi concentrado por evaporação do solvente a 65°C por rotaevaporador acoplado ao sistema de vácuo (AZEVEDO, et al., 2020). O óleo de jacaré foi fornecido pelo professor Dr. Fabrício Rios Santos, docente da Universidade Federal de Mato Grosso localizada em Cuiabá-MT (SISBIO nº 58681-1).

4.3 Cálculo das doses do óleo de jacaré

As doses do óleo de jacaré foram determinadas por extrapolação alométrica a partir da dose diária do óleo de peixe utilizado em pacientes humanos (1g/dia) (SISCOVICK et al., 2017). Considerando um peso corporal médio de 70 kg para humanos, isso resulta em uma dose de 14,28 mg/kg. Para os ratos utilizados no estudo, o peso corporal médio foi de 300 g. Portanto, a dose média obtida para ratos foi de 56 mg/kg, com base na extrapolação alométrica. Como medida de segurança, foram consideradas outras duas doses, uma três vezes maior, totalizando 168 mg/kg, e outra três

vezes menor, aproximadamente 19 mg/kg. Os cálculos utilizados para a extrapolação alométrica estão apresentados abaixo, de acordo com Nair e Jacob (2016).

TME do animal-referência (TME_{ref} - humano)

$$TME_{alvo} = k \times m^{-0,25} = 70 \times 70^{-0,25} = 24$$

TME do animal-alvo (TME_{alvo} - rato)

$$TME_{ref} = k \times m^{-0,25} = 70 \times 0,3^{-0,25} = 95$$

Dose animal referência (mg/kg) / TME_{ref}

$$14,28/24 = 0,59$$

Dose animal referência (mg/kg) / $TME_{ref} \times TME_{alvo}$

$$0,59 \times 95 = 56 \text{ mg/kg}$$

Dose média de 56 mg/kg

Onde: TME: taxa metabólica específica; k: constante dos grandes grupos taxonômicos (mamíferos placentários = 70); m: massa corporal.

4.4 Desenho experimental

Para este protocolo, ratos machos foram divididos em diferentes grupos experimentais ($n = 8$) e tratados diariamente da maneira descrita abaixo:

1) Naive ($n = 8$): ratos tratados com o veículo (água filtrada; 1 ml/kg) por gavagem (7 dias) e administração por via intramuscular de 10 ml/kg de NaCl a 0,9% (dose única).

2) Controle negativo ($n = 8$): ratos tratados com Tween (1 ml/kg) por gavagem (7 dias), e administração por via intramuscular de 10 ml/kg de solução de glicerol a 25% (dose única).

3) Controle positivo ($n = 8$): ratos tratados com Alopurinol (17 mg/kg) por gavagem (7 dias), e administração por via intramuscular de 10 ml/kg de solução de glicerol a 25% (dose única).

30

4) OJ 19 ($n = 8$): ratos tratados com o óleo de jacaré (19 mg/kg) por gavagem (7 dias), e administração por via intramuscular de 10 ml/kg de solução de glicerol a 25% (dose única).

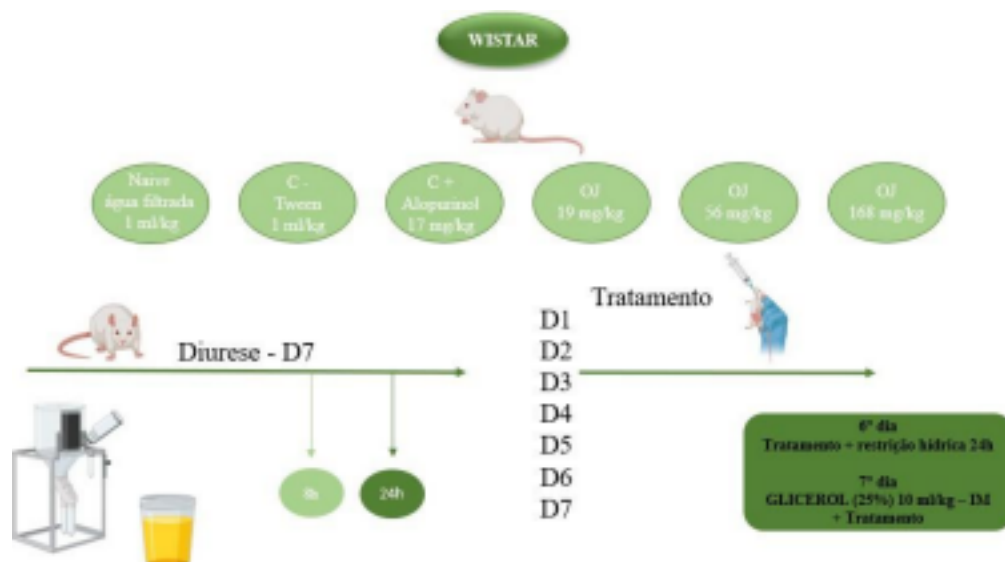
5) OJ 56 ($n = 8$): ratos tratados com o óleo de jacaré (56 mg/kg) por gavagem (7 dias), e administração por via intramuscular de 10 ml/kg de solução de glicerol a 25% (dose

única).

6) OJ 168 (n = 8): ratos tratados com o óleo de jacaré (168 mg/kg) por gavagem (7 dias), e administração por via intramuscular de 10 ml/kg de solução de glicerol a 25% (dose única).

Os efeitos nefroprotetores do óleo de jacaré foram avaliados de acordo com o protocolo estabelecido por Moreno, et al. (2021), com pequenas modificações (figura 2). Após a divisão, os grupos foram tratados por 7 dias via oral (gavagem), com seus respectivos tratamentos. No dia 6, todos os animais foram submetidos a uma restrição hídrica de 24 horas. No dia 7, os animais (controle negativo, controle positivo e óleo de jacaré) receberam por via intramuscular 10 ml/kg de solução de glicerol a 25%, o volume total administrado foi dividido em duas partes iguais para cada região femoral. O grupo Naive recebeu por via intramuscular 10 ml/kg de NaCl a 0,9%. No dia 8 todos os grupos foram submetidos a um descanso e no dia 9 foi realizado a eutanásia dos mesmos.

31



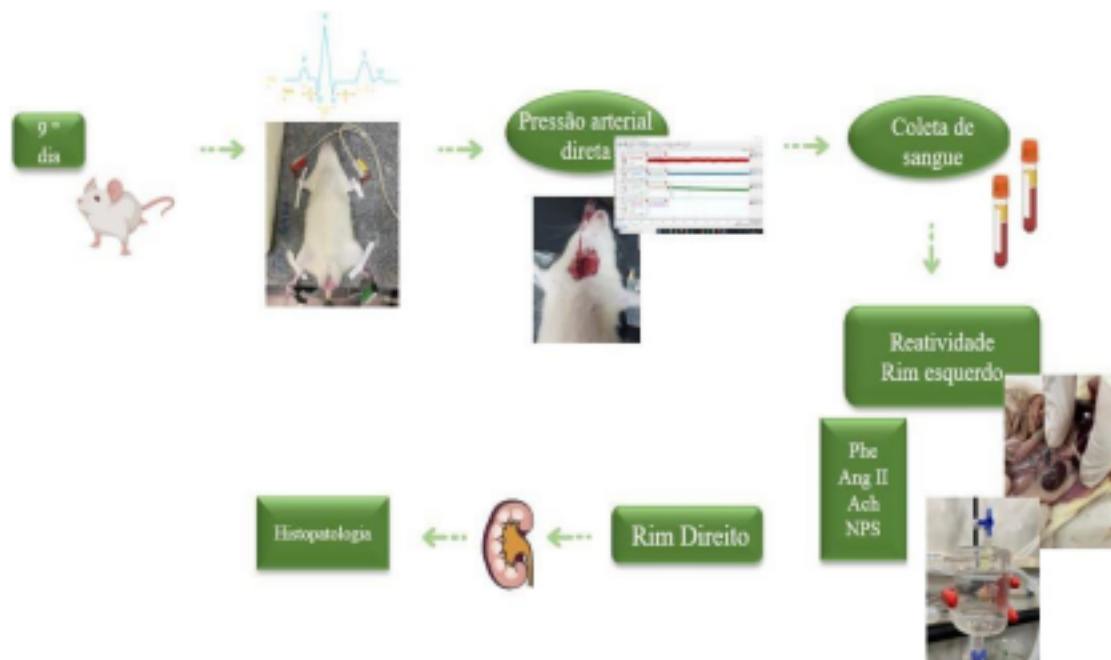


Figura 2: Desenho experimental

Fonte: A autora

4.5 Coleta do sangue e análises bioquímicas

Após o registro dos parâmetros hemodinâmicos, uma amostra de 5 ml de sangue arterial foi coletada da artéria carótida previamente canulada. O soro foi obtido por centrifugação (1500 x g por 10 minutos). Os níveis séricos de alanina

32

aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina, foram mensurados através de um analisador bioquímico automatizado (Roche Cobas Integra 400 Plus).

4.6 Avaliação da função renal

A função renal foi avaliada utilizando a metodologia de Gasparotto Junior, et al. (2009). A fim de promover a uniformidade corporal de sal e água, todos os animais receberam uma solução de cloreto de sódio (NaCl) à 0,9% (5 mL/100g) uma hora antes do início dos experimentos. Para cada rato, a urina produzida após 8 e 24 horas (no dia 7) foi coletada, com auxílio de gaiolas metabólicas, em cilindros graduados. Do volume total de urina excretada, o pH, a densidade e as concentrações urinárias de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-) e creatinina foram medidos usando um analisador bioquímico automático.

4.7 Reatividade vascular renal

Após a medição da pressão arterial e enquanto os animais ainda estavam sob anestesia, a artéria renal esquerda foi canulada e cuidadosamente lavada com solução de PSS (119 mM de NaCl; 4,7 mM de KCl; 2,4 mM de CaCl₂; 1,2 mM de MgSO₄; 25,0 mM de NaHCO₃; 1,2 mM de KH₂PO₄; 11,1 mM de dextrose e 0,03 mM EDTA; pH 7,4). O rim esquerdo foi então removido e acondicionado em cubas de vidro, mantidos a 37°C, aerados com carbogênio (95% O₂ /5% CO₂) e perfundidos a um fluxo constante de 4 ml/min com uma solução de PSS com auxílio de uma bomba peristáltica. O registro da pressão de perfusão foi feito através de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão, interligado a um polígrafo computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Austrália).

Após um período de estabilização de 15 min em ~28 mmHg, curvas dose-resposta de fenilefrina (3, 10, 30 e 100 nmol) e angiotensina II (10, 30, 100 e 300 pmol) foram geradas. As preparações foram então submetidas a um aumento na pressão de perfusão (~90 mmHg) por infusão de PSS que continha 10 µM de fenilefrina. Após o período de estabilização, curvas dose-resposta de acetilcolina (0,3, 1, 3 e 10 nmol) e nitroprussiato de sódio (30, 100, 300 pmol e 1 nmol) também foram geradas. Ao final dos

33

procedimentos, todos os animais foram eutanasiados por anestesia profunda com isoflurano em câmara de saturação, de acordo com as Diretrizes Práticas de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

4.8 Análise histopatológica

Após a eutanásia o rim direito de cada animal foi retirado, pesado e fracionado para exame histopatológico. Para histopatologia, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As amostras foram então seccionadas (5 µm), coradas com hematoxilina e as imagens foram obtidas com o auxílio de câmera fotomicrográfica Intervision 12 MP acoplada ao microscópio óptico. Foi avaliado a integridade do tecido renal observando a presença de dano celular reversível

(degeneração), alterações irreversíveis (necrose e apoptose), inflamação, congestão, hemorragia e fibrose.

4.9 Avaliação de parâmetros eletrocardiográficos

Após a anestesia, todos os animais foram mantidos em decúbito dorsal. Quatro eletrodos (RL, RA, LL e LA) foram posicionados em ambos os pulsos e tornozelos. Uma pequena quantidade de gel condutor foi aplicada em cada interface dos eletrodos para melhor condutância elétrica. Um período de aclimatização de 5 minutos foi aguardado e, em seguida, as ondas eletrocardiográficas foram registradas por 5 minutos através de um eletrocardiógrafo (WinCardio, Micromed, Brasília, Brasil).

4.10 Avaliação de parâmetros hemodinâmicos

34

Após a eletrocardiografia, uma injeção subcutânea de heparina (20 UI) foi administrada em bolus em todos os animais. Posteriormente, a artéria carótida esquerda foi isolada, canulada e conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de gravação computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Austrália) onde os dados de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca foram mensurados e gravados. Após 15 minutos necessários para a estabilização da pressão arterial, os valores das pressões sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca foram registrados por 5 minutos.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni, quando aplicável. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas e os gráficos gerados no software GraphPad Prism 8.0.

35

5. ARTIGO

Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases

<https://www.sciencedirect.com/journal/nutrition-metabolism-and-cardiovascular-diseases/publish/guide-for-authors>

Evaluation of the nephroprotective effect of Pantanal alligator oil (Caiman yacare) in an experimental model of rhabdomyolysis induced by glycerol in rats

Maria Luiza Fidelis da Silva¹, Aline Andrade Martins³, Aline Aparecida Macedo Marques², Ariany Carvalho dos Santos⁴, Arquimedes Gasparotto Junior², Fabricio Rios Santos⁶, Felipe Bittencourt⁷, Gabriela Pereira da Silva², Luana Ale Bertoncello Pael², Luciane Barbosa Pessoa², Karyne Garcia Tafarelo Moreno², Katiana Simões Lopes², Roosevelt Isaias Carvalho Souza⁴, Virginia Demarchi Kappel Trichez⁵ and Marcio Eduardo de Barros¹.

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

²*Laboratory of Cardiovascular Pharmacology (LAFAC), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, MS, Brazil.*

³*Research Group in Molecular Biology and Microorganisms, Federal University of Grande Dourados, MS, Brazil.*

⁴*Histology Laboratory, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, MS, Brazil*

⁵*Laboratory of Physiometabolic Studies (LEFIME), Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, MS, Brazil*

⁶*Postgraduate Program in Health Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.*

⁷*Clinical Analysis School Laboratory, UNIGRAN, Centro Universitário da Grande Dourados, MS, Brazil*

* Corresponding author:

Dr. Marcio Eduardo de Barros. Urinalysis Laboratory, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12, 79.804-970 Dourados, MS, Brazil. Telephone: +55 (67) 3410-2348. Email: marciobarros@ufgd.edu.br.

Background and Aims

Acute kidney injury (AKI) is characterized by an abrupt loss of kidney function, with approximately 12 to 13 million cases annually worldwide, resulting in approximately 1.7 million deaths per year. AKI induced by rhabdomyolysis is one of the most frequently used experimental models, involving the administration of a single intramuscular injection of glycerol in rats. AKI treatment represents a significant increase in costs for health systems, due to factors such as pharmacological treatment, severity of AKI, need for renal replacement therapy and lack of renal recovery. Therefore, this study aims to investigate the effect of alligator oil (Caiman yacare) as a nephroprotector in rats with glycerol-induced AKI.

Methods and Results

The nephroprotective effects of alligator oil (JO) were evaluated in an AKI model (10 ml/kg glycerol, intramuscular) in Wistar rats. Different doses of orange juice (19, 56 and 168 mg/kg) were administered orally for 7 days before AKI induction. Urinary parameters were measured during treatment with OJ, while biochemical parameters were assessed through blood collection after treatment with OJ. Electrocardiographic and hemodynamic parameters, renal vascular reactivity and histopathological changes were evaluated after OJ treatment. The analyses revealed that the model used exhibited histopathological damage, reductions in 24-hour urinary excretion in the experimental groups, and alterations in electrocardiographic, biochemical and renal vascular reactivity parameters. **Conclusions**

However, treatment with alligator oil (Caiman yacare) did not influence any of the parameter analyzed, indicating that the ingestion of alligator oil during the study period did not demonstrate a nephroprotective effect against AKI induced by rhabdomyolysis in rats.

Keywords: Acute kidney injury; Acute tubular necrosis; Myoglobinuria; Dietary supplement; Nutraceuticals.

1. Introdução

Acute kidney injury (AKI) is characterized by an abrupt loss of kidney function (1). Several health conditions are considered risk factors for the development of AKI, ranging from diabetes to liver, lung and cardiovascular problems (2). Clinically, AKI manifests through renal hyperperfusion, interference with urinary flow, resulting in a rapid reduction in renal excretory function, lesions in renal tissue and accumulation of nitrogen metabolites (3). A global epidemiological analysis revealed that approximately 12–13 million cases of AKI are reported annually, with a significant increase in mortality over the last 50 years. Mortality associated with AKI is approximately 1.7 million deaths per year (4), affecting up to 20% of hospitalized patients and up to 50% of patients admitted to intensive care units (ICU) (5).

AKI induced by rhabdomyolysis is one of the most frequently used experimental models, involving the administration of a single intramuscular injection of glycerol in rats. AKI is characterized by myoglobinuria, which is one of the main factors contributing to kidney damage in rhabdomyolysis. Rhabdomyolysis is a condition caused by skeletal muscle injury known as “crush syndrome,” which results in the release of muscle myoglobin, sarcoplasmic proteins (creatine kinase, lactate dehydrogenase, aldolase, alanine, and aspartate aminotransferases), and electrolytes into the extracellular space and circulation (6). The release of myoglobin by cells leads to excessive production of reactive oxygen species (ROS), triggering inflammation, apoptosis through overactivation of nuclear factor kappa B (NFkB) and mitochondrial dysfunction (7–9).

AKI treatment represents a important cost burden for health systems, attributed to factors such as pharmacological intervention, the severity of AKI, the need for renal replacement therapy and the lack of renal recovery. Even in cases of AKI survival, these costs persist due to the need for monitoring, considering the possibility of progression of kidney disease. Therefore, the importance of conducting continuous research to improve the management of the disease and reduce its impact on patients' health becomes evidente (10).

Among the treatment options, the use of animal-derived products in therapy is a common practice in several cultures (11), including oils extracted from the fat of crocodilians, frequently mentioned as a treatment for various diseases (12–15). According to a previous study, alligator oil contains significant amounts of omega 6 and

omega 9 fatty acids (16), which can act as antioxidants, regulating the antioxidant signaling pathway (17,18), in addition to playing a role in modulating inflammatory processes (17,19). Therefore, the objective of the present study is to investigate the effect of alligator oil (*Caiman yacare*) as a nephroprotector in rats with glycerol-induced AKI.

2. Methods

2.1 Obtaining *C. yacare* visceral fat oil

Visceral fat was obtained from adipose tissue encapsulated in the right caudolateral aspect of the liver, referred to as the “adipose body”. The viscera used in this study belonged to ten alligators aged over two and a half years. From a sample of 854.9 g of body fat, the oil was extracted using the Soxhlet method, refluxed continuously for six hours in hexane extracting solvent at 65 °C, over a period of five consecutive days. Subsequently, the oil was concentrated by evaporation the solvent at 65 °C using a rotary evaporator coupled to the vacuum system (16). The alligator oil was supplied by professor Dr. Fabrício Rios Santos, professor at the Federal University of Mato Grosso located in Cuiabá-MT.

2.2 Selecting the dosage of *C. yacare* fat oil

The doses of alligator oil were determined using allometric extrapolation from the daily dose of fish oil typically used in human patients (1g/day) (20). Considering an average body weight of 70 kg for humans, this results in a dose of 14.28 mg/kg. For the rats used in the study, with an average body weight of 300 g, the calculated average dose was 56 mg/kg, based on allometric extrapolation. As a safety measure, two additional doses were considered, one three times higher, totaling 168 mg/kg, and another three times lower, approximately 19 mg/kg.

2.3 Animals

Forty-eight male rats weighing 250–300 g were obtained from the UFGD vivarium and housed in a controlled environment with humidity, temperature (22°C ± 1°C) and a 12-hour light/12-hour dark cycle. Food and water were provided ad libitum. All procedures conducted in this study were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of UFGD under protocol number 23019.

2.4 Experimental design

The experimental study was conducted following a pre-established protocol (21). After randomization, the animals were divided into six experimental groups (n = 8/group). The Naive group received oral treatment with vehicle (filtered water; 1 mL/kg) for 7 days and intramuscular injection of 10 mL/kg of 0.9% NaCl. Three different groups received daily oral administration of alligator oil (OJ) at doses of 19, 56 and 168 mg/kg for 7 days. Control animals were administered Tween (negative control; 1 mL/kg) or Allopurinol (17 mg/kg) via gavage. Allopurinol was chosen as the positive control due to its known role in combating oxidative stress in rhabdomyolysis (22). On day 6, all animals were deprived of water for 24 hours. On day 7, the animals (negative control, positive control and alligator oil) received intramuscularly of 10 mL/kg of 25% glycerol solution. The total volume administered was divided equally between the two femoral region. On day 8, all groups rested and on day 9, they were euthanized.

2.5 Blood collection and biochemical analyses

After recording hemodynamic parameters, a 5 ml sample of arterial blood was collected from the previously cannulated carotid artery. Serum was obtained by centrifugation the blood sample at 1500 x g for 10 minutes. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea and creatinine were measured using an automated biochemical analyzer (Roche Cobas Integra 400 Plus).

2.6 Renal function

Renal function was assessed using a previously established methodology (23). To ensure uniformity of salt and water balance in the body, all animals received a 0.9% sodium chloride (NaCl) solution (5 mL/100g) one hour before the start of the experiments. Urine produced after 8 and 24 hours (on day 7) was collected from each rat

40

using metabolic cages and transferred to graduated cylinders. From the total urine volume excreted, pH, density and urinary concentrations of sodium (Na⁺), potassium (K⁺), chloride (Cl⁻) and creatinine were measured using an automatic biochemical analyzer.

2.7 Renal vascular reactivity

After measuring blood pressure and while the animals were still under

anesthesia, the left renal artery was cannulated and carefully washed with a PSS solution, containing 119 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 2.4 mM CaCl₂; 1.2 mM MgSO₄; 25.0 mM NaHCO₃; 1.2 mM KH₂PO₄. The left kidney was then removed and placed in glass vats, maintained at 37°C, and aerated with carbogen (95% O₂ /5% CO₂). The kidney was perfused at a constant flow rate of 4 ml/min with a PSS solution using a peristaltic pump. The perfusion pressure was recorded using a pressure transducer coupled to the perfusion system, which was connected to a computerized polygraph (Chart v7.00 ADI Instruments, Australia).

After a 15-minute stabilization period at approximately 28 mmHg, dose-response curves of phenylephrine (3, 10, 30 and 100 nmol) and angiotensin II (10, 30, 100 and 300 pmol) were generated. The preparations were then subjected to an increase in perfusion pressure (~90 mmHg) by infusion of PSS containing 10 µM phenylephrine. Following another stabilization period, dose-response curves of acetylcholine (0.3, 1, 3 and 10 nmol) and sodium nitroprusside (30, 100, 300 pmol and 1 nmol) were generated. At the conclusion of the experimental procedures, all animals were euthanized by deep anesthesia with isoflurane in a saturation chamber, following the Euthanasia Practical Guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and resolution 1000/2012 of the Federal Council of Veterinary Medicine (CFMV).

2.8 Histopathological analysis

After euthanasia, the right kidney of each animal was removed, weighed and fractionated for histopathological examination. For histopathology, tissue samples were fixed in 10% buffered formalina, dehydrated in alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin. The samples were then sectioned into 5 µm slices, stained with hematoxylin and images were obtained using an Intervision 12 MP photomicrographic camera coupled to an optical microscope. The integrity of the kidney tissue was assessed by observing the

41

presence of reversible cellular damage (degeneration), irreversible changes (necrosis and apoptosis), inflammation, congestion, hemorrhage and fibrosis.

2.9 Electrocardiography

After anesthesia, all animals were placed in the supine position. Four electrodes (RL, RA, LL and LA) were positioned on both wrists and ankles. A small amount of

conductive gel was applied to each electrode interface to enhance electrical conductance. Following a 5-minute acclimatization period, electrocardiographic waves were recorded for 5 minutes using an electrocardiograph (WinCardio, Micromed, Brasília, Brazil).

2.10 Hemodynamic parameters

After electrocardiography, a subcutaneous injection of heparin (20 IU) was administered as a bolus to all animals. Subsequently, the left carotid artery was isolated, cannulated and connected to a pressure transducer coupled to a computerized recording system (Chart v7.00 ADI Instruments, Australia), where systolic, diastolic, mean blood pressure as well as heart rate data, were measured and recorded. After 15-minute period required for blood pressure stabilization, systolic, diastolic, mean pressure and heart rate values were recorded for 5 minutes.

2.11 Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analyzes were conducted using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni test, when applicable. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. All analyzes and graphs were generated using the GraphPad Prism 8.0 software.

3. Results

3.1 Serum biochemical analysis

42

Animals in the negative control group, Allopurinol, OJ 19 mg/kg and OJ 56 mg/kg exhibited an increase in AST and ALT parameters compared to the Naïve group, suggesting possible liver changes. In contrast, the OJ 168 mg/kg group showed a decrease in AST parameter compared to Allopurinol, however, although statistically reduced, the value did not return to clinical normal levels. Creatinine levels were higher in the negative control, Allopurinol, OJ 56 mg/kg and OJ 168 mg/kg groups compared to Naïve, as were urea levels in the negative control and Allopurinol groups, indicating inadequate kidney function (Table 1).

3.2 Renal function

The urinary parameters excreted by the various experimental groups over 8 hours on the 7th day are presented in Table 2. There was a difference in urinary volume between the experimental groups. However, density increased in all groups compared to the Naïve group. Urinary excretion of chloride, potassium, sodium and creatinine decreased in the negative control and OJ 19 mg/kg groups compared to the Naïve group. In contrast, the OJ 168 mg/kg group showed an increase compared to the negative control and OJ 19 mg/kg groups. Potassium excretion in the Allopurinol group increased compared to the negative control and OJ 19 mg/kg group.

The 24-hour urine volume excreted is shown in Table 3. The negative control group exhibited a reduction compared to the Naïve group, while the Allopurinol group showed an increase compared to the negative control. The OJ 56 mg/kg group exhibited a reduction compared to both the Naïve and Allopurinol groups. Additionally, urinary excretion of chloride, potassium, sodium and creatinine decreased in the negative control group compared to the Naïve group. However, both the Allopurinol and OJ 168 mg/kg groups showed an increase compared to the negative control.

3.3 Renal vascular reactivity

The renal vascular reactivity in the various experimental groups is summarized in Table 4. Infusion of 3, 10 and 30 nmol of phenylephrine (Phe) induced vasoconstriction in the OJ 56 mg/kg, negative control and OJ 168 mg/kg groups, compared to animals in the Naïve group. Similarly, the dose of 10 pmol of angiotensin II (Ang II) elicited

43

vasoconstriction in the OJ 19 mg/kg group compared to the Naïve group, and in the OJ 56 mg/kg group compared to both the Naïve and negative control groups.

The vasodilatory response to acetylcholine (Ach) at doses of 1, 3 and 10 nmol was greater in the Allopurinol, OJ 56 mg/kg and OJ 168 mg/kg groups compared to the Naïve group. Additionally, the Allopurinol and OJ 56 mg/kg groups exhibited increased responses compared to the negative control at doses of 3 and 10 nmol, as well as compared to the OJ 19 mg/kg group at a dose of 3 nmol. Furthermore, animals treated with 56 mg/kg of OJ demonstrated a greater vasodilatory response to sodium

nitroprusside (NPS) at a dose of 300 pmol, compared to the negative control and OJ 19 mg/kg groups.

3.4 Relative kidney weight and histopathological analysis

The relative kidney weight did not vary between the experimental groups (Table 5). The renal histopathological findings of animals subjected to AKI induced by rhabdomyolysis are also presented in Table 5 and Figure 1. None of the animals in the Naïve group showed histopathological changes. However, rats in the negative control group, Allopurinol, OJ 19 mg/kg, OJ 56 mg/kg and OJ 168 mg/kg groups exhibited marked degeneration and/or necrosis of the renal convoluted tubules.

3.5 Electrocardiography

The electrocardiographic parameters in the various experimental groups are summarized in Table 6. In the PR segment, the OJ 56 mg/kg group exhibited an increase compared to the Naïve and negative control groups. Similarly, the OJ 168 mg/kg group showed an increase compared to the Naïve, negative control, Allopurinol and OJ 19 mg/kg groups. In relation to the QRS segment, the OJ 19 mg/kg group demonstrated an increase compared to the Naïve and Allopurinol groups. Moreover, the negative control, Allopurinol, OJ 19 mg/kg and OJ 168 mg/kg groups exhibited an increase in the QT segment, compared to the Naïve group. Conversely, the OJ 56 mg/kg group showed a decrease compared to the negative control. For the QTC segment, the negative control and Allopurinol groups demonstrated an increase compared to the Naïve group. However, the Allopurinol, OJ 19 mg/kg, OJ 56 mg/kg and OJ 168 mg/kg groups showed a reduction

44

compared to the negative control. Regarding the P, Q, R and S waves, there was no variation observed between the experimental groups.

3.6 Blood pressure and heart rate

The OJ 19 mg/kg group exhibited higher systolic blood pressure (SBP) compared to the negative control and Allopurinol groups. Regarding the heart rate parameter, the negative control, Allopurinol, OJ 19 mg/kg and OJ 56 mg/kg groups demonstrated a reduction compared to the Naïve group (Table 7).

4. Discussion

AKI represents a severe complication of rhabdomyolysis, with the glycerol induced AKI model being widely employed to assess novel therapeutic approaches. Intramuscular injection of glycerol leads to muscle cell breakdown, resulting in the release of myoglobin, electrolytes and sarcoplasmic proteins into the bloodstream. The accumulation of these compounds poses significant toxicity to the kidneys, triggering oxidative stress and release of inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, and adhesion molecules within renal tissue (24,25).

The present study utilized a model involving intramuscular administration of 10 mL/kg of 25% glycerol solution, mimicking conditions seen in human AKI. *Caiaman yacare* oil was employed as a treatment to assess its possible effect on kidney function. Following 7 days of treatment and induction of the injury, the model revealed significant histopathological changes, including degeneration and/or necrosis of the renal convoluted tubules. Additionally, deposition of hyaline material in the tubular lumen and focal degeneration of renal glomeruli, were observed, confirming the induction of the injury.

An intriguing discovery from the study pertained to the serum biochemical analyses, notably observed in the highest dose of OJ treatment, where values approached those of the Naïve group. This indicated a reduction in these parameters, albeit not reaching clinical normalcy. Additionally, noteworthy was the observation regarding serum creatinine levels in the OJ 19 mg/kg group. While the value did not return to normal clinically, it's essential to recognize that even the lowest dose of alligator oil was capable

45

of serum creatinine levels as a crucial marker of AKI, suggesting that the restoration to baseline levels or improvement in the condition may signify nephroprotection (26–28).

Urine volume and renal electrolyte excretion, as presented in Table 2 and 3, are closely associated with renal function. The study revealed a reduction in 24-hour urinary volume in the experimental groups, along with alterations in electrolyte excretion. Notably, the group treated with the highest dose of OJ exhibited levels of chloride, potassium and sodium excretion similar to those of the Naïve group. Oliguria, although considered an indicator of AKI, can be a controversial biomarker, as it may not be immediately apparent. In reality, urine volume more accurately reflects glomerular

filtration rate (GFR), and oliguria may only become evident when GFR decreases significantly (29). The data from this study indicated differences in urinary volume among animals treated with different doses of alligator oil (OJ) compared to those in the Naïve group and those treated with the reference drug. Therefore, OJ did not demonstrate a protective effect against oliguria in animals subjected to acute kidney injury.

A previous study highlighted that alligator oil is abundant in linoleic acid (omega 6) and oleic acid (omega 9) (16). These compounds possess antioxidant Properties and serve as primary precursors for numerous lipid mediators crucial in the inflammatory process, including vascular contraction, chemotaxis, adhesion, transmigration and cell activation (30). Additionally, arachidonic acid (n-6) and its metabolites play essential roles in various events during wound healing, such as cell growth, angiogenesis, and extracellular matrix synthesis (31). However, despite the known properties of alligator oil, the findings, particularly in the analysis of renal vascular reactivity (Table 4), revealed alterations in renal vascular reactivity in the AKI model employed. Interestingly, alligator oil did not exhibit the potential to modulate renal vascular reactivity, suggesting potential limitations in its efficacy in this aspect.

The renal histopathological changes induced by rhabdomyolysis are primarily attributed to myoglobin. Which exerts renal toxicity Leading to oxidative injury, inflammation, vasoconstriction and subsequent necrosis (25,32). In the present study, although the relative kidney weight did not differ significantly between the groups (Table 5), animals administered glycerol exhibited varying degrees of histopathological lesions, including necrosis of the renal convoluted tubules and focal degeneration of renal glomeruli. Despite treatment with different doses of alligator oil, a nephroprotective effect against these renal histopathological lesions was not observed.

46

An important finding in the study pertained to the hemodynamic parameters (Table 6 and 7), where an increase in the PR segment, QRS interval and a decrease in heart rate were noted, indicating cardiac alterations (33). The observed prolongation of QT and corrected QTC intervals is associated with delay ventricular repolarization and may predispose to potentially fatal arrhythmias (34). These changes may be attributed to the correlation between AKI and an increased incidence of cardiovascular problems over time (33), due to several interconnected factors contribute to structural and functional changes in the heart (35,36), including uremic toxins, inflammation, and mineral metabolism disorders, which are prevalent in both AKI cardiac complications (37–39). Despite treatment with different doses of alligator oil, the study did not

demonstrate an attenuation of the cardiac changes observed, underscoring the complexity of addressing cardiac alterations in the context of AKI.

An important limitation of this study was the inability to conduct prolonged treatment, which would have allowed for the assessment of potential nephroprotective effects of OJ in animals with AKI induced by rhabdomyolysis.

5. Conclusion

The present study demonstrated that acute treatment with alligator oil (Caiman yacare) did not confer nephroprotective effects against AKI induced by rhabdomyolysis in rats.

Financing

This research was funded by the Foundation for the Support of the Development of Teaching, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil; nº 83/013.186/2023), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil; nº 305742 /2022-1) and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil; process number 88887.910272/2023-00).

Conflicts of interest

There were no conflicts of interest.

47

REFERÊNCIAS:

1. Zager RA. Marked protection against acute renal and hepatic injury after nitrited myoglobin + tin protoporphyrin administration. *Transl Res.* novembro de 2015;166(5):485–501.
2. Hsu C, Ordoñez J, Chertow G, Fan D, McCulloch C, Go A. The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* julho de 2008;74(1):101–7.
3. Chawla LS, Amdur RL, Shaw AD, Faselis C, Palant CE, Kimmel PL. Association between AKI and Long-Term Renal and Cardiovascular Outcomes in United States Veterans. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 7 de março de 2014;9(3):448–56.
4. Alfieri F, Ancona A, Tripepi G, Crosetto D, Randazzo V, Paviglianiti A, et al. A deep learning model to continuously predict severe acute kidney injury based on urine output changes in critically ill patients. *J Nephrol.* 1º de dezembro de 2021;34(6):1875–86.
5. Neyra JA, Chawla LS. Acute Kidney Disease to Chronic Kidney Disease. *Crit Care Clin.* abril

de 2021;37(2):453–74.

6. Stanley M, Chippa V, Aeddula NR, Quintanilla Rodriguez BS, Adigun R. Rhabdomyolysis. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 6 de setembro de 2023]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448168/>

7. de Jesus Soares T, Volpini RA, Francescato HDC, Costa RS, da Silva CGA, Coimbra TM. Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury. *Life Sci.* 2 de agosto de 2007;81(8):647–56.

8. Homsí E, Janino P, Faria JBL de. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 2 de abril de 2006;69(8):1385–92.

9. Homsí E, Mota da Silva Jr Sérgio, Machado de Brito S, Bouçáda Inácio Peixoto E, Butori Lopes de Faria J, Janino P. p53-Mediated Oxidative Stress and Tubular Injury in Rats with Glycerol-Induced Acute Kidney Injury. *Am J Nephrol.* 17 de dezembro de 2010;33(1):49–59.

10. Collister D, Pannu N, Ye F, James M, Hemmelgarn B, Chui B, et al. Health Care Costs Associated with AKI. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 7 de novembro de 2017;12(11):1733–43.

11. Alves RRN, Oliveira TPR, Rosa IL. Wild Animals Used as Food Medicine in Brazil. *Evid Based Complement Altern Med ECAM.* 2013;2013:670352.

12. Alves R, Vieira W, Santana G. Reptiles used in traditional folk medicine: conservation implications. *Biodivers Conserv.* 1º de janeiro de 2008;17:2037–49.

13. Barros FB, Varela SA, Pereira HM, Vicente L. Medicinal use of fauna by a traditional community in the Brazilian Amazonia. *J Ethnobiol Ethnomedicine.* 27 de setembro de 2012;8(1):37.

48

14. Oliveira ES, Torres DF, Brooks SE, Alves RRN. The medicinal animal markets in the metropolitan region of Natal City, northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 6 de julho de 2010;130(1):54–60.

15. Souto WMS, Mourão JS, Barboza RRD, Alves RRN. Parallels between zootherapeutic practices in ethnoveterinary and human complementary medicine in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 12 de abril de 2011;134(3):753–67.

16. Azevedo LP, dos Santos Ferraz RH, de Magalhães MRL, Oliveira AP, Cogliati B, Lemos LMS, et al. Healing potential of Caiman yacare (Daudin, 1802) visceral fat oil. *Wound Med.* 1º de dezembro de 2020;31:100195.

17. Oppedisano F, Macrì R, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, et al. The Anti Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. *Biomedicines.* setembro de 2020;8(9):306.

18. Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, et al. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PLOS ONE.* 9 de novembro de 2017;12(11):e0187934.

19. Calder PC. n -3 PUFA and inflammation: from membrane to nucleus and from bench to bedside. *Proc Nutr Soc.* novembro de 2020;79(4):404–16.

20. Siscovick DS, Barringer TA, Fretts AM, Wu JHY, Lichtenstein AH, Costello RB, et al. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease. *Circulation.* 11 de abril de 2017;135(15):e867–84.

21. Moreno KGT, Gasparotto Junior A, Dos Santos AC, Palozi RAC, Guarnier LP, Marques

AAM, et al. Nephroprotective and antilithiatic activities of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.: Ethnopharmacological investigation of a species from the Dourados region, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 10 de fevereiro de 2021;266:113409.

22. Gois PHF, Canale D, Volpini RA, Ferreira D, Veras MM, Andrade-Oliveira V, et al. Allopurinol attenuates rhabdomyolysis-associated acute kidney injury: Renal and muscular protection. *Free Radic Biol Med.* dezembro de 2016;101:176–89.

23. Gasparotto A, Boffo MA, Lourenço ELB, Stefanello MEA, Kassuya CAL, Marques MCA. Efeitos natriuréticos e diuréticos de *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) em ratos. *J Ethnopharmacol.* 21 de abril de 2009;122(3):517–22.

24. Panizo N, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Egido J, Moreno JA. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40(5):520–32.

25. Wu J, Pan X, Fu H, Zheng Y, Dai Y, Yin Y, et al. Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats. *Sci Rep.* 31 de agosto de 2017;7(1):10114.

26. Al Asmari AK, Al Sadoon KT, Obaid AA, Yesunayagam D, Tariq M. Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. *BMC Nephrol.* 28 de janeiro de 2017;18(1):41.

27. Bellomo R. Defining, quantifying, and classifying acute renal failure. *Crit Care Clin.* abril de 2005;21(2):223–37.

49

28. Shi Y, Xu L, Tang J, Fang L, Ma S, Ma X, et al. Inhibition of HDAC6 protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 1º de março de 2017;312(3):F502–15.

29. Lehner GF, Forni LG, Joannidis M. Oliguria and Biomarkers of Acute Kidney Injury: Star Struck Lovers or Strangers in the Night? *Nephron.* 10 de agosto de 2016;134(3):183–90.

30. Ribeiro Barros Cardoso C, Aparecida Souza M, Amália Vieira Ferro E, Favoreto JR S, Deolina Oliveira Pena J. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* abril de 2004;12(2):235–43.

31. Savla U, Appel HJ, Sporn PHS, Waters CM. Prostaglandin E2 regulates wound closure in airway epithelium. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* março de 2001;280(3):L421–31.

32. Al-Brakati A, Alsharif KF, Alzahrani KJ, Kabrah S, Al-Amer O, Oyouni AA, et al. Using Green Biosynthesized Lycopene-Coated Selenium Nanoparticles to Rescue Renal Damage in Glycerol-Induced Acute Kidney Injury in Rats. *Int J Nanomedicine.* 29 de junho de 2021;16(null):4335–49.

33. Legrand M, Rossignol P. Cardiovascular Consequences of Acute Kidney Injury. *N Engl J Med.* 4 de junho de 2020;382(23):2238–47.

34. Farzanegan B, Hosseinpour Z, Baniasadi S, Seyyedi SR, Rajabi M. An Observational Study of QTc Prolongation in Critically Ill Patients: Identification of Incidence and Predictors. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med.* abril de 2020;24(4):270–5.

35. Quiroga B, Villaverde M, Abad S, Vega A, Reque J, López-Gómez JM. Diastolic Dysfunction and High Levels of New Cardiac Biomarkers as Risk Factors for Cardiovascular Events and Mortality in Hemodialysis Patients. *Blood Purif.* 14 de setembro de 2013;36(2):98–106.

36. Ikizler TA, Parikh CR, Himmelfarb J, Chinchilli VM, Liu KD, Coca SG, et al. A prospective

cohort study of acute kidney injury and kidney outcomes, cardiovascular events, and death. *Kidney Int.* fevereiro de 2021;99(2):456–65.

37. Allon M. Evidence-Based Cardiology in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol JASN.* dezembro de 2013;24(12):1934–43.

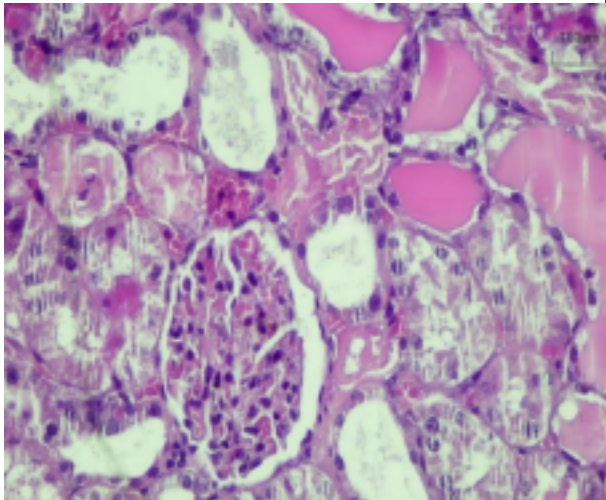
38. Goicoechea M, Quiroga B, García de Vinuesa S, Verdalles Ú, Reque J, Panizo N, et al. Intraindividual Interleukin-6 Variations on the Cardiovascular Prognosis of Patients with Chronic Renal Disease. *Ren Fail.* 1º de setembro de 2012;34(8):1002–9.

39. Lekawanvijit S, Krum H. Cardiorenal syndrome: acute kidney injury secondary to cardiovascular disease and role of protein-bound uraemic toxins. *J Physiol.* 2014;592(18):3969–83.

Legend to figures

Figure 1. Histopathological findings in the renal cortex of rats with acute kidney injury induced by rhabdomyolysis in the Naïve, Negative Control, Allopurinol and OJ groups (19, 56 and 168 mg/kg). Black arrows show degeneration and/or necrosis of the renal convoluted tubules. Asterisks show deposition of hyaline casts in the tubular lumen in the cortical region. (HE; 40X).

51

Naïve	Negative Control	
		
OJ 19 mg/kg	OJ 56 mg/kg	

	 *	*
---	---	---

52

Table 1: Effect of oral treatment with three different doses of OJ (19, 56 and 168 mg/kg), vehicle and Allopurinol on biochemical parameters.

Parameters *Naïve* *Negative Control*

Allopurinol OJ 19 mg OJ 56 mg OJ 168 mg

AST (U/L) 105,1 ± 21,63 269,9 ± 77,25^a 299,9 ± 91,27^a 238,9 ± 58,00^a 253,3 ± 39,78^a 189,8 ± 39,18^c

ALT (U/L) 47,20 ± 9,69 76,95 ± 17,49^a 85,28 ± 17,90^a 74,50 ± 15,17^a 60,93 ± 14,29 61,67 ± 16,66

Creatinine (mg/dL) 0,38 ± 0,064 1,03 ± 0,535^a 1,33 ± 0,344^a 0,88 ± 0,147 1,00 ± 0,291^a 1,05 ± 0,314^a

Urea (mg/dL) 53,73 ± 2,20 93,70 ± 28,48^a 90,58 ± 15,74^a 81,43 ± 8,86 82,40 ± 30,27 69,17 ± 12,34

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Data are expressed as mean ± standard deviation. at p ≤ 0.05 when compared to the naïve group; b when compared to the negative control group; c p ≤ 0.05 when compared to the Allopurinol group; OJ: alligator oil (Caiman yacare).

53

Table 2: Renal parameters of 8 h urine samples on the 7th day of treatment with three different doses of OJ (19, 56 and 168 mg/kg), vehicle and Allopurinol.

Parameters *Naïve* *Negative Control* *Allopurinol OJ 19 mg OJ 56 mg OJ 168 mg*

Urinary volume (mL/100g/8h) 4,32 ± 0,49 3,13 ± 0,63 3,87 ± 0,57 3,27 ± 0,32 3,37 ± 0,83 3,85 ±

1,03 pH 8,20 ± 0,47 7,88 ± 0,49 7,85 ± 0,59 7,58 ± 0,59 7,80 ± 0,40 7,49 ± 0,59 Density 1012 ± 2,53

1028 ± 3,45^a 1026 ± 4,46^a 1027 ± 7,00^a 1028 ± 7,31^a 1022 ± 1,96^a

Chloride (mmol/L) 147,2 ± 16,5 110,5 ± 12,3^a 129,8 ± 15,7 109,5 ± 10,2^a 122,77 ± 19,4 146,3 ±

14,2^{bd} Potassium (mmol/L) 35,3 ± 5,2 20,1 ± 5,3^a 37,1 ± 4,6^{bd} 19,7 ± 4,8^a 25,1 ± 8,2 36,4 ± 6,2^{bd}

Sodium (mmol/L) 118,3 ± 6,1 92,3 ± 7,2^a 106,1 ± 7,4 96,9 ± 7,1^a 107,3 ± 9,2 110,3 ± 6,7^{bd} Creatinine

(mg/100g/8h) 2.46 ± 0.24 1.71 ± 0.22^a 2.02 ± 0.27 1.56 ± 0.29^a 1.91 ± 0.33 2.51 ± 0.30^{bd}

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. at $p \leq 0.05$ when compared to the Naïve group; b when compared to the negative control group; c $p \leq 0.05$ when compared to the Allopurinol group; d $p \leq 0.05$ when compared to the OJ 19 mg group; OJ: alligator oil (Caiman yacare).

54

Table 3. Renal parameters of 24 h urine samples on the 7th day of treatment with three different doses of OJ (19, 56 and 168 mg/kg), vehicle and Allopurinol.

Parameters Naïve Negative

Control Allopurinol OJ 19 mg OJ 56 mg OJ 168 mg

Urinary volume (mL/100g/24h) 10,80 $\pm$ 1,92 6,25 $\pm$ 0,94^a 10,39 $\pm$ 1,38^b 8,39 $\pm$ 2,22 5,78 $\pm$ 0,78^{a,c} 7,87 $\pm$ 1,11 pH 8,54 $\pm$ 0,48 8,63 $\pm$ 0,30 8,29 $\pm$ 0,89 7,83 $\pm$ 1,11 8,61 $\pm$ 0,24 8,24 $\pm$ 0,62 Density 1019 $\pm$ 6,02 1028 $\pm$ 4,27 1025 $\pm$ 5,25 1025 $\pm$ 4,14 1027 $\pm$ 6,07 1026 $\pm$ 4,96

Chloride (mmol/L) 152,5 $\pm$ 21,3 107,1 $\pm$ 12,7^a 147,5 $\pm$ 15,4^b 128,6 $\pm$ 17,9 126,9 $\pm$ 22,4 155,9 $\pm$ 20,3^b

Potassium (mmol/L) 38,1 $\pm$ 6,4 18,7 $\pm$ 6,6^a 35,6 $\pm$ 6,2^b 25,9 $\pm$ 8,2 27,6 $\pm$ 9,7 39,3 $\pm$ 7,2^b Sodium (mmol/L) 125,8 $\pm$ 8,7 88,2 $\pm$ 8,9^a 117,8 $\pm$ 7,9^b 102,6 $\pm$ 10,7 105,9 $\pm$ 11,6 120,6 $\pm$ 7,9^b Creatinine (mg/100g/24h) 2.11 $\pm$ 0.21 1.53 $\pm$ 0.18^a 2.07 $\pm$ 0.23^b 1.78 $\pm$ 0.22 1.82 $\pm$ 0.19 2.15 $\pm$ 0.23^b

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni test. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. ^a $p \leq 0.05$ when compared to the naïve group; ^b $p \leq 0.05$ when compared to the negative control group; ^c $p \leq 0.05$ when compared to the Allopurinol group; OJ: alligator oil (Caiman yacare).

55

Table 4: Effect of oral treatment with three different doses of OJ (19, 56 and 168 mg/kg), vehicle and Allopurinol on renal vascular reactivity.

Allopurinol OJ 19 mg OJ 56 mg OJ 168 mg

Parameters Naïve Negative Control

Phe (nmol)

3 8,85 $\pm$ 5,03 31,07 $\pm$ 23,11 24,53 $\pm$ 10,74 46,80 $\pm$ 30,90 56,47 $\pm$ 32,55^a 18,03 $\pm$ 18,28 10 42,17 $\pm$ 36,41 155,8 $\pm$ 61,09^a 102,7 $\pm$ 40,49 124,1 $\pm$ 38,81 92,11 $\pm$ 57,30 128,1 $\pm$ 73,85 30 102,0 $\pm$ 56,42 185,2 $\pm$ 33,17^a 157,0 $\pm$ 16,65 152,9 $\pm$ 15,66 131,1 $\pm$ 16,18 174,7 $\pm$ 32,91^a 100 116,6 $\pm$ 48,01 180,8 $\pm$ 39,75 169,4 $\pm$ 32,96 186,7 $\pm$ 21,55 173,6 $\pm$ 43,06 185,9 $\pm$ 16,01 Ang II (pmol)

10 14,72 $\pm$ 10,69 17,88 $\pm$ 10,26 45,25 $\pm$ 13,64 47,11 $\pm$ 19,17^a 46,63 $\pm$ 16,72^{ab} 40,80 $\pm$ 19,82 30 22,95 $\pm$ 13,89 29,36 $\pm$ 12,85 50,80 $\pm$ 16,65 46,77 $\pm$ 16,77 56,56 $\pm$ 19,96^a 42,00 $\pm$ 11,02 100 21,34 $\pm$ 10,48 34,86 $\pm$ 15,25 41,03 $\pm$ 8,03 34,34 $\pm$ 11,90 38,45 $\pm$ 28,52 44,21 $\pm$ 21,35 300 17,86 $\pm$ 10,52 30,45 $\pm$ 11,74 30,39 $\pm$ 14,03 26,10 $\pm$ 11,60 48,45 $\pm$ 25,50 38,23 $\pm$ 12,53 Ach (nmol)

300 pmol -3,84 $\pm$ 2,18 -8,11 $\pm$ 5,22 -8,89 $\pm$ 10,71 -9,53 $\pm$ 5,06 -12,16 $\pm$ 11,43 -10,20 $\pm$ 0,97 1 -6,98 $\pm$ 11,09 -9,40 $\pm$ 4,34 -30,28 $\pm$ 12,08^a -24,53 $\pm$ 15,13 -30,22 $\pm$ 12,75^a -12,61 $\pm$ 6,26 3 -3,44 $\pm$ 3,57 -10,64 $\pm$ 5,72 -38,76 $\pm$ 14,35^{ab} -17,33 $\pm$ 7,36^c -26,43 $\pm$ 15,40^a -25,38 $\pm$ 4,00^a 10 -3,37 $\pm$ 2,58 -14,54 $\pm$ 9,36 -53,59 $\pm$ 25,69^{ab} -37,49 $\pm$ 25,19 -58,45 $\pm$ 22,74^{ab} -32,86 $\pm$ 11,64 NPS (pmol) 30 -3,35 $\pm$ 8,22 -4,86 $\pm$ 3,45 -3,32 $\pm$ 0,78 -5,33 $\pm$ 3,57 -2,43 $\pm$ 0,81 -7,36 $\pm$ 3,18 100 -5,92 $\pm$ 4,20 -5,57 $\pm$ 2,69 -6,50 $\pm$ 4,34 -9,80 $\pm$ 5,37 -8,92 $\pm$ 7,13 -7,59 $\pm$ 3,30 300 -7,89 $\pm$ 8,23 -2,61 $\pm$ 1,45 -5,98 $\pm$ 1,90 -2,11 $\pm$ 1,17 -14,03 $\pm$ 7,49^{bd} -11,61 $\pm$ 4,57

1 nmol -10,59 $\pm$ 7,13 -4,89 $\pm$ 3,20 -12,00 $\pm$ 2,74 -13,36 $\pm$ 3,23 -8,37 $\pm$ 7,54 -12,12 $\pm$ 5,19 Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. at $p \leq 0.05$ when compared to the naïve group; b when compared to the negative control group; c $p \leq 0.05$ when compared to the Allopurinol group; d $p \leq 0.05$ when compared to the O.J 19 mg group. OJ: alligator oil (Caiman yacare); ACh: acetylcholine; Phe: phenylephrine; NPS: sodium nitroprusside.

56

Table 5. Effect of oral treatment with three different doses of OJ(19, 56 and 168 mg/kg), vehicle and Allopurinol on the relative weight of organs and histopathological findings.

Parameters	<i>Naïve</i>	<i>Negative Control</i>	<i>Allopurinol</i>	<i>OJ 19 mg</i>	<i>OJ 56 mg</i>	<i>OJ 168 mg</i>
Kidney (%)	0,29 ± 0,035	0,34 ± 0,024	0,34 ± 0,027	0,31 ± 0,037	0,35 ± 0,028	0,35 ± 0,045
Histopathological findings			+++	+++	+++	+++

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Data are expressed as mean ± standard deviation. Histopathological findings: + slight degeneration; ++ moderate degeneration; +++ marked degeneration; OJ: alligator oil (Caiman yacare).

57

Table 6. Effect of oral treatment with three different doses of OJ (19, 56 and 168 mg/kg), vehicle and Allopurinol on electrocardiographic parameters.

Parameters	<i>Naïve</i>	<i>Negative Control</i>	<i>Allopurinol</i>	<i>OJ 19 mg</i>	<i>OJ 56 mg</i>	<i>OJ 168 mg</i>	Segments (ms)
P	31,00 ± 3,60	31,43 ± 1,81	33,13 ± 3,60	33,67 ± 1,96	35,33 ± 2,42	35,17 ± 2,04	PR 36,00 ± 2,30
	36,50 ± 2,25	39,71 ± 2,87	38,63 ± 2,82	42,67 ± 2,94 ^{ab}	44,14 ± 1,95 ^{abcd}	44,14 ± 1,95 ^{abcd}	QRS 38,71 ± 1,70
	38,43 ± 1,61	42,29 ± 2,36 ^{ac}	39,88 ± 1,55	40,50 ± 1,77	41,14 ± 1,86	41,14 ± 1,86	38,43 ± 1,61
	42,29 ± 2,36 ^{ac}	39,88 ± 1,55	40,50 ± 1,77	41,14 ± 1,86	41,14 ± 1,86	41,14 ± 1,86	75,17 ± 1,83 ^a
	73,14 ± 2,26 ^b	75,86 ± 2,34 ^a	172,3 ± 7,94	231,2 ± 22,75 ^a	198,7 ± 19,26 ^{ab}	191,2 ± 6,26 ^b	188,0 ± 7,09 ^b
	190,4 ± 9,96 ^b						Waves (mV)
P	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	Q -0,01 ± 0,01
	-0,01 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,24 ± 0,02
	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,03	S -0,02 ± 0,02	-0,02 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	-0,04 ± 0,02

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Data are expressed as mean ± standard deviation. at p ≤ 0.05 when compared to the naïve group; b when compared to the negative control group; c p ≤ 0.05 when compared to the Allopurinol group; d p ≤ 0.05 when compared to the O.J 19 mg group. OJ: alligator oil (Caiman yacare).

58

Table 7. Effect of oral treatment with three different doses of OJ (19.56 and 168 mg/kg), vehicle and Allopurinol on blood pressure and heart rate values

Parameters	<i>Naïve</i>	<i>Negative Control</i>	<i>Allopurinol</i>	<i>OJ 19 mg</i>	<i>OJ 56 mg</i>	<i>OJ 168 mg</i>
SBP	117,9 ± 9,62	110,5 ± 7,57	104,7 ± 5,11	130,9 ± 15,95 ^{bc}	116,4 ± 9,70	114,9 ± 7,27
DBP	63,52 ± 9,03	57,27 ± 6,13	51,19 ± 9,98	62,58 ± 4,04	60,53 ± 17,76	46,48 ± 10,10
MAP	92,07 ± 8,31	86,45 ± 6,17	80,54 ± 2,61	93,39 ± 7,19	87,44 ± 11,66	85,49 ± 5,27
HR	427,0 ± 18,06	381,3 ± 21,24 ^a	372,7 ± 24,16 ^a	382,3 ± 12,03 ^a	365,7 ± 33,24 ^a	393,3 ± 13,89

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Data are expressed as mean ± standard deviation. at p ≤ 0.05 when compared to the Naïve group. b p ≤ 0.05 when compared to the negative control group; c p ≤ 0.05 when compared to the Allopurinol group; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HR: heart rate; OJ:

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que o modelo de indução de LRA através da injeção de glicerol foi eficaz considerando as alterações histopatológicas observadas no estudo. Em relação a investigação da atividade nefroprotetora do OJ, ficou constatado que o tratamento não protegeu contra a oligúria após a injeção de glicerol, já que os resultados da excreção urinária dos animais tratados com o óleo, diferiram dos animais que não receberam a injeção de glicerol, além do mais, o OJ não apresentou melhora na excreção urinária de eletrólitos e creatinina em animais submetidos a LRA.

Os níveis de creatinina sérica foram maiores nos grupos que receberam a injeção de glicerol, contudo, o grupo tratado com 19 mg/kg de OJ, foi o que apresentou o menor nível de creatinina, embora clinicamente o valor não tenha retornado à normalidade. O tratamento com as diferentes doses de OJ, não apresentou potencial para modular as alterações encontradas na reatividade vascular renal, assim como não apresentou proteção em relação as lesões histopatológicas causadas pela LRA.

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, observamos que a indução da LRA causou alterações nos padrões eletrocardiográficos, ademais, o tratamento com OJ não ajudou a atenuar as alterações cardíacas apresentadas no presente estudo.

Portanto, podemos concluir que o tratamento agudo com óleo de jacaré (*Caiman yacare*) não apresentou efeito nefroprotetor contra LRA induzida por rabdomiólise em ratos.

60

REFERÊNCIAS

ALEIXO, V.M. Efeitos do uso de farelo de soja e de sistemas de alimentação sobre o desempenho de filhotes de jacaré-do-Pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802). 92p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

ALFIERI, F. et al. A deep-learning model to continuously predict severe acute kidney injury based on urine output changes in critically ill patients. **Journal of Nephrology**, v. 34, n. 6, p. 1875–1886, 1 dez. 2021.

ALHO, C.J.R.; SABINO, J. A conservation agenda for the Pantanal's biodiversity. **Braz. J. Biol.**, 71, pp. 327-335, 2011.

ALLON, M. Evidence-Based Cardiology in Hemodialysis Patients. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 24, n. 12, p. 1934–1943, dez. 2013.

- ALVES, R. R. N.; NETO, N. A. L.; BROOKS, S.E.; ALBUQUERQUE, U.P. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi arid region of Northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, 124, pp. 600-608, 2009.
- ALVES, R. R. N.; OLIVEIRA, T. P. R.; ROSA, I.L. Wild animals used as food medicine in Brazil. *Evid. Complement. Alternat. Med.*, Article 670352, 2013.
- ALVES, R. R. N.; VIEIRA, W. L. S.; SANTANA, G. C. Reptiles used in traditional folk medicine: conservation implications. **Biodivers. Conserv.**, 17, pp. 2037-2049, 2008.
- AZEVEDO, L. P. et al. Healing potential of Caiman yacare (Daudin, 1802) visceral fat oil. **Wound Medicine**, v. 31, p. 100195, 1 dez. 2020.
- BANDER, S. J. et al. Long-term effects of 24-hr unilateral ureteral obstruction on renal function in the rat. **Kidney International**, v. 28, n. 4, p. 614–620, 1 out. 1985.
- BAO, Y.-W. et al. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. **Zoological Research**, v. 39, n. 2, p. 72–86, 18 mar. 2018.
- BARROS, B. F.; VARELA, S. A. M.; PEREIRA, H. M.; VICENTE, L. Medicinal use of fauna by a traditional community in the Brazilian Amazonia medicinal use of fauna by a traditional community in the Brazilian Amazonia. **Ethnobiol. Ethnomedicine.**, 8, pp. 1-19, 2012.
- BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **The Lancet**, v. 380, n. 9843, p. 756–766, ago. 2012.
- 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.
- BOSCH, X.; POCH, E.; GRAU, J. M. Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 1, p. 62–72, 2 jul. 2009.
- BUTHELEZI, S. et al. An investigation of the antimicrobial and anti-inflammatory activities of crocodile oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 325–330, ago. 2012.
- CALDER, P. C. *n* -3 PUFA and inflammation: from membrane to nucleus and from bench to bedside. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 79, n. 4, p. 404–416, nov. 2020.
- CAMPOS, Z.; LLOBET, A.Q.; PIÑA, C.I.; MAGNUSSON, W.E. Yacare Caiman Caiman yacare. In: Manolis SC and C Stevenson C. (Eds) Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. Crocodile Specialist Group: Darwin, p. 23-28, 2010.
- CANTO, A.C.V.C.S.; LIMA, B.R.C.C.; CRUZ, A.G.; LÁZARO, C.A.; FREITAS, D.G.C.; FARIA, J.A. *et al.* Efeito da alta pressão hidrostática nos parâmetros de cor e textura da carne da cauda de jacaré (*Caiman crocodilus yacare*) refrigerada. **Meat Sci** 9 : 255 – 260 (2012).

CHAWLA, L. S.; EGGERS, P. W.; STAR, R. A.; KIMMEL, P. L. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes, *N. Engl. J. Med.* 371 (1); 58– 66, 2014.

CHOPRA, A. S. et al. The current use and evolving landscape of nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 175, p. 106001, jan. 2022.

COCA, S. G.; SINGANAMALA, S.; PARIKH, C. R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Kidney International**, v. 81, n. 5, p. 442–448, mar. 2012.

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.

COOCRIJAPAN. Cooperativa de Criadores de Jacaré do Pantanal. Cáceres, Mato Grosso, 2010.

COUTINHO, M.; CAMPOS, Z. Sistema de Criação e Recria de Jacaré, Caiman *crocodilus yacare*, no Pantanal. Comunicado técnico n. 53, mar. 2006.

CRUZ, D. N.; BAGSHAW, S. M. Does continuous renal replacement therapy have a role in the treatment of rhabdomyolysis complicated by acute kidney injury? **Seminars in Dialysis**, v. 24, n. 4, p. 417–420, 2011.

DALIU, P.; SANTINI, A.; NOVELLINO, E. From pharmaceuticals to nutraceuticals: bridging disease prevention and management. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2 jan. 2019.

62

DARE, A.; CHANNA, M. L.; NADAR, A. L-ergothioneine and its combination with metformin attenuates renal dysfunction in type-2 diabetic rat model by activating Nrf2 antioxidant pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111921, set. 2021.

DE JESUS, S. T.; VOLPINI, R. A.; FRANCESCATO, H. D.; COSTA, R. S.; DA SILVA, C. G.; COIMBRA, T. M. Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury. **Life sciences**. 81(8):647–56, 2007.

DENDOOVEN, A. et al. Oxidative stress in obstructive nephropathy. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, n. 3, p. 202–210, 2011.

DI PAOLA, R. et al. The renal injury and inflammation caused by ischemia–reperfusion are reduced by genetic inhibition of TNF- α R1: A comparison with infliximab treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 700, n. 1–3, p. 134–146, jan. 2013.

DOMÍNGUEZ, R.; PATEIRO, M.; MUNEKATA, P.E.; GAGAOUA, M.; BARBA, F.J.; LORENZO J.M. Exotic Meats: An Alternative Food Source. Em *Mais do que carne bovina, suína e de frango – a produção, o processamento e as características de qualidade de outras fontes de carne para a dieta humana*. **Springer, Cham**, pp. 385 – 408, 2019.

DONDESKI, R. Ł.; BEDNARSKI, R.; MANITIUS, J. Controversy over renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) inhibitors treatment in nephrology and

cardiovascular diseases. **Arterial Hypertension**, v. 24, n. 2, p. 45–55, 2020.

EFFERTH, T.; BANERJEE, M.; PAUL, N. W.; ABDELFAH, S.; AREND, J.; ELHASSAN, G, et al. Biopiracy of natural products and good bioprospecting practice. **Phytomedicine**, 23, pp. 166-173, 2016.

EFSTRATIADIS, G. et al. Rhabdomyolysis updated. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 129–137, 2007.

FARIAS, I.P.; MARIONI, B.; VERDADE, L.M.; BASSETTI, L.; COUTINHO, M.E.; MENDONÇA, S.H.S.T.; VIEIRA, T.Q.; MAGNUSSON, W.E.; CAMPOS, Z. Avaliação do risco de extinção do jacaré-do-Pantanal Caiman yacare (Daudin, 1802) no Brasil. **Biodivers Bras** 3(1): 21-30, 2013.

FERREIRA, F.S.; BRITO, S. V.; SALES, D. L.; MENEZES, I. R.A.; COUTINHO, H. D. M.; SOUZA, E. P.; ALMEIDA, W. O.; ALVES, R. R. N. Anti-inflammatory potential of zootherapeutics derived from animals used in Brazilian traditional medicine. **Pharm. Biol.**, 52, pp. 1403-1410, 2014.

FRANCO, M. L. R. S.; GODOY, L. C.; SOUZA, N. E.; STEVANATO, F. B.; FRANCO, N. P.; VISENTAINER, J. V. Aproveitamento de carcaças de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Aquicultura & Pesca**, 39, 52-58, 2009.

GASPAROTTO, A.; BOFFO, M.A.; LOURENÇO, E.L.B.; STEFANELLO, M.E.A.; KASSUYA, C.A.L.; MARQUES, M.C.A. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. **J. Ethnopharmacol.**, 122, pp. 517-522, 2009.

GHOSH, A. K.; MAITI, P. K. Investigation of some animal drugs (mammals) used by the tribal people in India. **Ethnobiol. Hum. Welf.** pp. 200-202, 1996.

63

GIANNOGLOU, G. D.; CHATZIZISIS, Y. S.; MISIRLI, G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. **European Journal of Internal Medicine**, v. 18, n. 2, p. 90–100, 1 mar. 2007.

GODOY, L. C.; FRANCO, M. L. R. S.; SOUZA, N. E.; STEVANATO, F. B.; VISENTAINER, J. V. Development, preservation, and chemical and fatty acid profiles of Nile tilapia carcass flour for human feeding. **Journal of Food Processing and Preservation**, 37(2), 93-99, 2013.

GOICOECHEA, M. et al. Intraindividual Interleukin-6 Variations on the Cardiovascular Prognosis of Patients with Chronic Renal Disease. **Renal Failure**, v. 34, n. 8, p. 1002–1009, 1 set. 2012.

GOLDBERG, A. et al. The impact of transient and persistent acute kidney injury on long term outcomes after acute myocardial infarction. **Kidney International**, v. 76, n. 8, p. 900–906, 2 out. 2009.

GUPTA, A. et al. Rhabdomyolysis: Revisited. **The Ulster Medical Journal**, v. 90, n. 2, p. 61–69, maio 2021.

GYURÁSZOVÁ, M. et al. Oxidative Stress in Animal Models of Acute and Chronic Renal Failure. **Disease Markers**, v, p. 1–10, 11 fev. 2019.

HANSEN, M. K. et al. Acute Kidney Injury and Long-term Risk of Cardiovascular Events After Cardiac Surgery: A Population-Based Cohort Study. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 29, n. 3, p. 617–625, 1 jun. 2015.

HEUNG, M. et al. Acute Kidney Injury Recovery Pattern and Subsequent Risk of CKD: An Analysis of Veterans Health Administration Data. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 67, n. 5, p. 742–752, maio 2016.

HOFFMAN, L. C.; CAWTHORN, D. M. What is the role and contribution of meat from wildlife in providing high quality protein for consumption. **Animal frontiers**, 2(4), 40–53, 2012.

HOMSI, E.; DASILVA, S. M. J.; BRITO, S. M.; PEIXOTO, E. B. I.; FARIA, J. B. L.; JANINO, P. p53-Mediated oxidative stress and tubular injury in rats with glycerol induced acute kidney injury. **American journal of nephrology**. 33(1):49–59, 2011.

HOMSI, E.; JANINO, P.; DE FARIA, J. B. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney international**.69(8):1385– 92, 2006.

HSU, C. Y.; ORDÓÑEZ, J. D.; CHERTOW, G. M.; FAN, D.; MCCULLOCH, C. E.; GO, A.S. The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. **Kidney Int.** 74 (1); 101–107, 2008.

64

IKIZLER, T.A.; PARIKH, C.R.; HIMMELFARB, J.; CHINCHILLI, V.M.; LIU, K.D.; COCA, S.G., et al. A prospective cohort study of acute kidney injury and kidney outcomes, cardiovascular events, and death. **Kidney Int.** 99:456–65, 2021. JINDAL, A.; NAYAK, S. Myoglobinuria and Acute Kidney Injury. **Journal of Integrative Nephrology and Andrology**, v. 2, n. 2, p. 50, 2015.

JUNK, W.J. *et al.* Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquat. Sci.*, 68 (2006), pp. 278–309.

KDIGO. Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Kidney International Supplements**, v. 2, n. 1, 2012.

KELLUM, J.A. et al. Acute kidney injury. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2021.

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.

KIM, Y. G. et al. The Role of Inflammasome-Dependent and Inflammasome-Independent NLRP3 in the Kidney. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1389, nov. 2019.

KOCH, J. et al. Unusual Diversity of Myoglobin Genes in the Lungfish. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 12, p. 3033–3041, 1 dez. 2016.

KOMADA, T. et al. Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10901, 5 jun. 2015.

KORRAPATI, M.C.; SHANER, B. E.; SCHNELLMANN, R. G. Recovery from glycerol-induced acute kidney injury is accelerated by suramin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, n. 1, p.126–136, 2012.

LAFUENTE, M. et al. Three-year outcomes in a randomized single-blind controlled trial of intravitreal ranibizumab and oral supplementation with docosahexaenoic acid and antioxidants for diabetic macular edema. **Retina (Philadelphia, Pa.)**, v. 39, n. 6, p. 1083– 1090, jun. 2019.

LEE, S. et al. Postdischarge long-term cardiovascular outcomes of intensive care unit survivors who developed dialysis-requiring acute kidney injury after cardiac surgery. **Journal of Critical Care**, v. 50, p. 92–98, 1 abr. 2019.

LEKAWANVIJIT, S.; KRUM, H. Cardiorenal syndrome: acute kidney injury secondary to cardiovascular disease and role of protein-bound uraemic toxins. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 18, p. 3969–3983, 2014.

LEVEY, A. S.; JAMES, M. T. Acute Kidney Injury. **Annals of Internal Medicine**, v. 167, n. 9, p. ITC66–ITC80, 7 nov. 2017.

65

LEVIN, A. et al. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: Getting to the heart of the matter. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, n. 6, p. 1398–1407, 1 dez. 2001.

LI, F. et al. Efficacy of Three Renal Replacement Therapy Modalities for the Treatment of Acute Kidney Injury Caused by Wasp Sting. **Blood Purification**, v. 51, n. 4, p. 365–375, 28 out. 2021.

LI, H.-L. et al. Crocodile Oil Enhances Cutaneous Burn Wound Healing and Reduces Scar Formation in Rats. **Academic Emergency Medicine**, v. 19, n. 3, p. 265–273, mar. 2012.

LI, N. et al. Emerging medical therapies in crush syndrome – progress report from basic sciences and potential future avenues. **Renal Failure**, v. 42, n. 1, p. 656–666, 1 jan. 2020.

LIU, J. et al. Role of surfactant proteins A and D in sepsis-induced acute kidney injury. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 43, n. 1, p. 31–38, jan. 2015.

MACHADO, M. N.; NAKAZONE, M. A.; MAIA, L. N. Acute kidney injury based on KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) criteria in patients with elevated baseline serum creatinine undergoing cardiac surgery. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular: órgão oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 29, n. 3, p. 299–307, 2014.

MOORE, P. K.; HSU, R. K.; LIU, K. D. Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 72, n. 1, p. 136–148, jul. 2018.

MORENO, et al. Nephroprotective and antilithiatic activities of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.: Ethnopharmacological investigation of a species from the Dourados region, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 266, 2021.

MOUSLEH, R.; LAHAM, S. A.; AL-MANADILI, A. The Preventive Role of Pioglitazone in Glycerol-Induced Acute Kidney Injury in Rats during Two Different Treatment Periods. v. 43, n. 2, 2018.

NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27–31, mar. 2016.

NEYRA, J. A.; CHAWLA, L. S. Acute Kidney Disease to Chronic Kidney Disease. **Critical Care Clinics**, v. 37, n. 2, p. 453–474, abr. 2021.

NEYRA, J. A.; LEAF, D. E. Risk Prediction Models for Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients: Opus in Progressu. **Nephron**, v. 140, n. 2, p. 99–104, 2018.

ODUTAYO, A. et al. AKI and Long-Term Risk for Cardiovascular Events and Mortality. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 28, n. 1, p. 377–387, jan. 2017.

66

OLIVEIRA, E. S.; TORRES, D. F.; BROOKS, S. E.; ALVES, R. R. N. The medicinal animal markets in the metropolitan region of Natal City, northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, 130, pp. 54-60, 2010.

OPPEDISANO, F. et al. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. **Biomedicines**, v. 8, n. 9, p. 306, set. 2020.

OSTERMANN, A. et al. Ligand binding and conformational motions in myoglobin. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 205–208, mar. 2000.

PANIZO, N. et al. 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.

PARIKH, C. R. et al. Relationship of Kidney Injury Biomarkers with Long-Term Cardiovascular Outcomes after Cardiac Surgery. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 28, n. 12, p. 3699–3707, dez. 2017.

PETEJOVA, N. et al. Acute toxic kidney injury. **Renal failure**, v. 41, n. 1, p. 576-594, 2019.

PETENUCCI, M. E.; STEVANATO, F. B.; MORAIS, D. R.; SANTOS, L. P.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Composição e estabilidade lipídica da farinha de espinhaço de tilapia. **Ciência e Agrotecnologia**, 34(5), 1279-1284, 2010.

PICKKERS, P. et al. Acute kidney injury in the critically ill: an updated review on pathophysiology and management. **Intensive Care Medicine**, v. 47, n. 8, p. 835–850, 1 ago. 2021.

PYRAN, C. Propostas para a gestão da qualidade e da segurança do alimento da unidade processadora de carne de jacaré da COOCRIJAPAN. 155p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

QUIROGA, B.; VERDALLES, Ú.; REQUE, J.; GARCÍA DE VINUESA, S.; GOICOECHEA, M.; LUÑO, J. Cardiovascular events and mortality in chronic kidney disease (stages I-IV). **Nefrologia**. 33:539–45, 2013.

RONCO, C.; HOUSE, A. A.; HAAPIO, M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. **Intensive Care Medicine**, v. 34, n. 5, p. 957–962, 1 maio 2008.

ROVCANIN, B.; MEDIC, B.; KOCIC, G.; CEBOVIC, T.; RISTIC, M.; PROSTRAN, M. Molecular dissection of renal ischemia-reperfusion: oxidative stress and cellular events. *Current Medicinal Chemistry*. 23(19):1965–1980, 2016.

SACCARO, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: Disputas dentro e fora do Brasil. **Ambient. e Soc.**, 14, pp. 229-244, 2011.

67

SAKAI, C. et al. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress induced DNA damage in vascular endothelial cells. **Plos one**, v. 12, n. 11, p. e0187934, 9 nov. 2017.

SANTATIVONGCHAI, P. et al. Effects of Crocodile Oil (*Crocodylus siamensis*) on Liver Enzymes: Cytochrome P450 and Glutathione S-Transferase Activities in High-fat DietFed Rats. **Veterinary Medicine International**, v. 2022, p. 1–8, 22 nov. 2022.

SANTINI, A. et al. Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 659–672, 2018.

SANZ, A.B.; SANCHEZ-NIÑO, M.D.; MARTIN-CLEARY, C.; ORTIZ, A.; RAMOS, A.M. Progress in the development of animal models of acute kidney injury and its impact on drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 8(7):879–895, 2013.

SHIM-PRYDON, G.; CAMACHO-BARRETO, H. Novos produtos de origem animal: Novos usos e mercados para subprodutos e coprodutos de crocodilo, emu, cabra, canguru e coelho. **Jornal da Corporação de Pesquisa e Desenvolvimento de Indústrias Rurais**, 6, 1–65, 2007.

SIEW, E. D. et al. Improving Care for Patients after Hospitalization with AKI. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 31, n. 10, p. 2237–2241, out. 2020.

SIMOPOULOS, A. P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 128, mar. 2016.

SISCOVICK, D. S. et al. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 135, n. 15, p. e867–e884, 11 abr. 2017.

SOUTO, W. M. S.; MOURÃO, J. S.; BARBOZA, R. R. D.; ALVES, R. R. N. Parallels between zootherapeutic practices in ethnoveterinary and human complementary medicine in northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, 134, pp. 753-767, 2011.

STANLEY, M. et al. Rhabdomyolysis. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

STEVANATO, F. B.; PETENUCCI, M. E.; MATSUSHITA, M.; MESOMO, M. C.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. E. L.; ALMEIDA, V.; VISENTAINER, J. V. Avaliação química e sensorial da farinha de resíduo de tilápias na forma de sopa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(3), 567-571, 2007.

SWAMINATHAN, S.; ROSNER, M.H.; OKUSA, M.D. Emerging therapeutic targets of sepsis-associated acute kidney injury. *Seminars in Nephrology*.35(1):38–54, 2015.

VAARA, S. T. et al. Restrictive fluid management versus usual care in acute kidney injury (REVERSE-AKI): a pilot randomized controlled feasibility trial. **Intensive Care Medicine**, v. 47, n. 6, p. 665–673, 1 jun. 2021.

68

VAN NIEUWENHOVEN, F. A. et al. Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein. **Circulation**, v. 92, n. 10, p. 2848–2854, 15 nov. 1995.

VIEIRA, J. P.; SILVA, T. J. P.; FREITAS, M. Q.; FONTENELLE, G.; LINDOTE, H. C. F.; FREITAS, M. A. M. Caracterização do processo de rigor mortis do músculo Ilio ischiocaudalis de jacaré-do-Pantanal (*Caiman crocodilus yacare*) e maciez da carne. **Ciência Rural**, 42(3), 567-572, 2012.

WITTENBERG, B. A.; WITTENBERG, J. B. Transport of Oxygen in Muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, n. 1, p. 857–878, 1989.

WU, J. et al. Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10114, 31 ago. 2017.

WU, V. C. et al. Long-Term Risk of Coronary Events after AKI. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 25, n. 3, p. 595–605, mar. 2014.

XIAO, L. et al. Sustained Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Drives AKI to CKD Progression. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 27, n. 6, p. 1727–1740, jun. 2016.

XU, C. et al. TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. **Kidney International**, v. 85, n. 1, p. 72–81, 1 jan. 2014.

ZAGER, R. A. Marked protection against acute renal and hepatic injury after nitrited myoglobin + tin protoporphyrin administration, *Transl. Res.* 166 (5); 485–501, 2015.

ZIMMERMAN, J. L.; SHEN, M. C. Rhabdomyolysis. **Chest**, v. 144, n. 3, p. 1058–1065, 2015.

ZIMMERMAN, J. L.; SHEN, M. C. Rhabdomyolysis. **Chest**, v. 144, n. 3, p. 1058–1065, 1 set. 2013.

ZHOU, S.Q.; SUN, Y.Y.; ZHUANG, Y.G.; ZHAO, W.; CHEN, Y.Z.; JIANG, B.J.; GUO, C.F.; ZHANG, Z.L.; PENG, H.; CHEN, Y.Q. Effects of kallistatin on oxidative stress and inflammation on renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Current Vascular Pharmacology*.13(2):265–273, 2015.

ZHOU, X. et al. Curcumin Ameliorates Renal Fibrosis by Inhibiting Local Fibroblast Proliferation and Extracellular Matrix Deposition. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 126, n. 4, p. 344–350, 1 abr. 2014.

ZUROVSKY, Y. Models of glycerol-induced acute renal failure in rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**. v. 4, n. 3, p. 213–228, 1993.

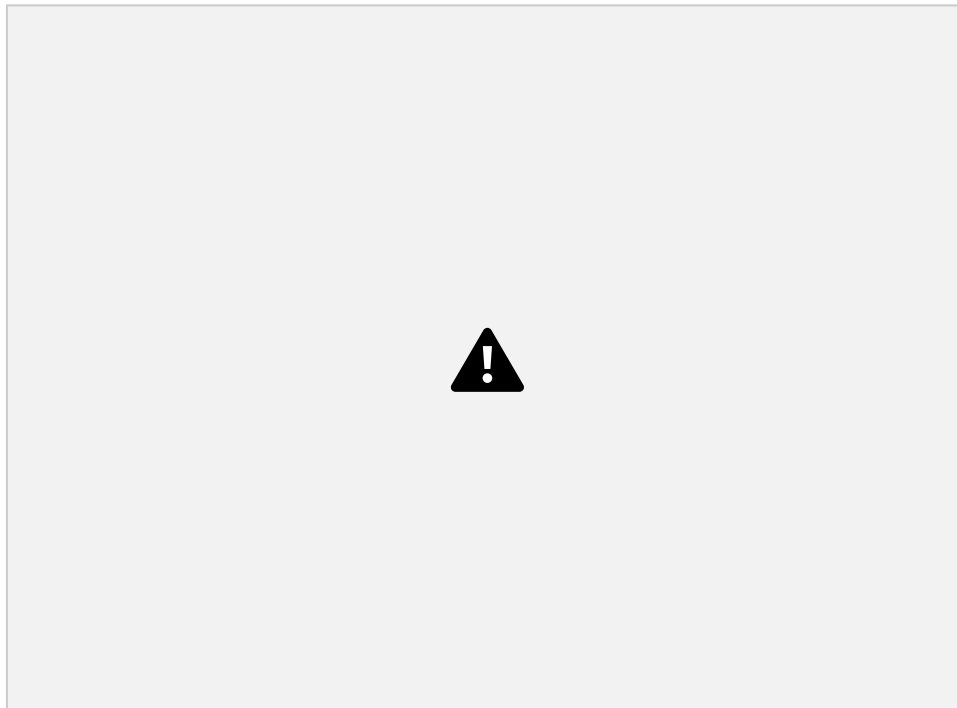
ZYLBERSZTAJN, D.; NEVES, M.F. (Org.). Economia & Gestão dos Negócios Agroalimentares. São Paulo: Pioneira, 428p, 2000.

69

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do projeto de pesquisa na Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde – CP/FCS/UFGD.





**Anexo 2 – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comissão de Ética no Uso deAnimais–
CEUA/UFGD.**







