

LA FICOCIANINA ACELERA LA RECUPERACIÓN DEL TEJIDO RENAL DAÑADO POR SOBREDOSIS DE KANAMICINA EN ROEDORES

L. González Núñez^{1*}, S. Rodríguez Salgueiro², D. García del Barco Herrera³, M. Matos Terrero², E. Santos Febles⁴, C. Plasencia Frómata², Y. Chávez Muñoz¹, J. Suárez Alba³

¹ Sección Microscopia Electrónica, Departamento de Patología, Instituto de Nefrología "Abelardo Buch", La Habana, Cuba

² Laboratorio de Microscopia Electrónica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

³ División Farmacéuticos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba

⁴ Departamento de Neurodesarrollo, Centro de Neurociencias de Cuba, La Habana, Cuba

*Autor de Correspondencia: Lucía González Núñez. Correo electrónico: lucia.glez@infomed.sld.cu

Recibido: Agosto 2012. Aprobado: Diciembre 2012.

Publicado: Diciembre 2012.

RESUMEN

La ficocianina presenta propiedades citoprotectoras estrechamente relacionadas con su actividad antioxidante. Los aminoglucósidos constituyen una familia de antibióticos ampliamente utilizados en la práctica clínica en humanos. Su utilización está limitada por la nefrotoxicidad que producen debido a la liberación de especies reactivas del oxígeno y la acumulación del antibiótico en el tejido renal. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la ficocianina sobre la morfología de los glomérulos, los túbulos proximales y el intersticio durante la fase recuperativa de riñones de ratones y ratas tratados con una sobredosis de kanamicina. Se utilizaron 15 ratones C57/BL6 y 13 ratas Wistar. Los animales se dividieron en 3 grupos sometidos a tratamientos crónicos con: PBS (grupo *Control*), kanamicina (grupo *Kanamicina*), kanamicina y ficocianina (grupo *Ficocianina*). Los animales se sacrificaron a las tres o seis semanas después de concluidos los tratamientos. Se seccionaron los riñones mediante un corte sagital, se fijaron en formol tamponado y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 3-4 µm de grosor, se colorearon con las tinciones de hematoxilina y eosina y ácido periódico de Schiff (PAS). Se evaluaron 10 campos histológicos por sección. Se cuantificaron las variables: daño glomerular, daño tubular, infiltrado inflamatorio y congestión vascular. En el grupo *Kanamicina* se observó daño glomerular, daño tubular y presencia de congestión vascular e infiltrado inflamatorio peritubulares. El tratamiento con *Ficocianina* produjo disminución de las lesiones renales en ratones y ratas. Esta es la primera vez que se describe el efecto beneficioso de la ficocianina de acelerar la regeneración de las células renales sometidas a daño por un antibiótico aminoglucósido.

Palabras clave: Ficocianina, nefrotoxicidad, kanamicina, recuperación, morfometría, roedores

PHYCOCYANIN ACCELERATES RECOVERY OF RENAL TISSUE DAMAGED BY KANAMYCIN OVERDOSE IN RODENTS

ABSTRACT

Phycocyanin has cytoprotective properties, closely related to its antioxidant activity. Aminoglycosides are a family of antibiotics widely used in human clinical practice. Their use is limited by nephrotoxicity that occur due to the release of reactive oxygen species and accumulation of antibiotic in the renal tissue. The aim of this study was to evaluate the effect of phycocyanin on the morphology of the glomeruli, proximal tubules and interstitium during the recuperative phase of the kidneys of mice and rats treated with an overdose of kanamycin. Fifteen C57/BL6 mice and thirteen Wistar rats were used. The animals were divided into 3 groups subjected to chronic treatment with: PBS (*Control* group), kanamycin (*Kanamycin* group), kanamycin and phycocyanin (*Phycocyanin* group). Animals were sacrificed three or six weeks after treatments. Kidney vertical hemisections were fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. Sections of 3-4 µm were stained with haematoxylin and eosin and Periodic acid-Schiff (PAS). The following variables: glomerular damage, tubular damage, inflammatory infiltrate and vascular congestion were evaluated in ten histological fields per section. In *Kanamycin* group glomerular and tubular damage and presence of peritubular vascular congestion and inflammatory infiltrate were observed. Phycocyanin treatment caused decreased of renal damage in mice and rats. This is the first time describing the beneficial effect of phycocyanin to accelerate the regeneration of renal cells submitted to damage by an aminoglycoside antibiotic.

Keywords: Phycocyanin, nephrotoxicity, kanamycin, recovery, morphometry, rodents

INTRODUCCIÓN

La ficocianina es una ficobiliproteína que se extrae de algas verde-azules, como *Spirulina máxima* y *S. platensis*. Esta proteína porta tres grupos cromógenos (tetrapirroles lineales) por unidad monomérica, que poseen una estructura muy similar a la bilirrubina, reconocido antioxidante endógeno. La ficocianina ejerce acción de eliminación de especies reactivas del oxígeno (ERO) que se ha demostrado en varios tejidos mediante modelos *in vitro* e *in vivo* [1,2].

Los aminoglucósidos constituyen una familia de antibióticos ampliamente utilizados en la práctica clínica por su actividad bactericida contra microorganismos gram negativos [3]. Estos antibióticos inducen nefrotoxicidad en 10-25% de los pacientes durante el tratamiento [4], afectando primariamente los túbulos proximales [5] y posteriormente los glomérulos [6] y la vasculatura renal [7].

Se han descrito varios mecanismos involucrados en la nefrotoxicidad de los aminoglucósidos. En estudios experimentales se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes protege del daño renal inducido por estos compuestos, por lo que se sugiere que las ERO son mediadores importantes de su efecto nocivo [8] [9] [10].

El efecto del tratamiento con aminoglucósidos en el riñón atraviesa dos fases: la primera fase es la de fallo renal agudo y en la segunda (fase recuperativa) la función renal se recupera hasta alcanzar valores cercanos a la normalidad y el riñón se hace refractivo [8].

Entre las diversas propiedades farmacológicas de la *Spirulina* [11] se ha reportado que esta ejerce efecto protector de la morfología renal [12] [13] [14] en ratas tratadas con el antibiótico aminoglucósido gentamicina durante la fase de daño agudo, contrarrestando la muerte celular apoptótica ocasionada por radicales libres [1].

La ficocianina se ha probado ante la nefrotoxicidad inducida por oxalato en ratas [15] [16] y en un modelo de inflamación y fibrosis inducida por obstrucción ureteral en ratones [17].

Hasta el momento no se ha establecido ningún método clínicamente eficiente para contrarrestar la nefrotoxicidad de los aminoglucósidos o acelerar la recuperación del tejido dañado [18].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la ficocianina sobre la morfología de los glomérulos, los túbulos proximales y el intersticio durante la fase recuperativa de riñones de ratones y ratas tratados con una sobredosis de kanamicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los ratones y las ratas procedían del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Los procedimientos se realizaron según las normas éticas y regulatorias nacionales y locales para el cuidado de los animales. Los animales se alimentaron con dieta estándar comercial y agua a libre demanda. Los ratones y las ratas se distribuyeron en 3 grupos: grupo *Control* (1 ml de PBS a concentración de 0,1 mol/L, pH 7,2-7,4); grupo *Kanamicina* (700 mg/kg de peso de sulfato de kanamicina, AICA, Cuba) y grupo *Ficocianina* (ficocianina-c 30% de pureza, Biodelta PTY, LTD) diluida en PBS estéril inmediatamente antes de su administración.

Modelo en ratones: Se utilizaron 15 ratones C57/BL6 hembras de aproximadamente 20 g. La ficocianina se empleó a la dosis de 10 mg/kg de peso. Los tratamientos se realizaron por vía intraperitoneal durante 15 días. La kanamicina se dividió en dos subdosis al día. El sacrificio se realizó a las 3 semanas de concluidos los tratamientos y se extrajeron los riñones para el estudio histológico.

Modelo en ratas: Se emplearon 13 ratas Wistar machos con un peso promedio de 350 g. La ficocianina se empleó a la dosis de 60 mg/kg de peso. Los tratamientos se realizaron por vía intraperitoneal una vez al día durante 9 días. El sacrificio se realizó a las 6 semanas de

concluidos los tratamientos y se extrajeron los riñones para el estudio histológico.

Procesamiento histológico

Se seccionaron los riñones mediante un corte sagital a través del hilio, se fijaron en una disolución de formol neutro tamponado al 10% en PBS y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 3 μm de grosor y se utilizaron las coloraciones hematoxilina y eosina y ácido periódico de Schiff (PAS).

Análisis morfológico y morfométrico

Se utilizó una lámina teñida con PAS por animal y se evaluaron 10 campos tomados aleatoriamente en la corteza externa desde el polo superior al inferior de cada hemisección renal. En todos los glomérulos observados en cada campo se determinó el daño glomerular (sinequias, congestión vascular y aumento del mesangio) a 200 X. En todos los túbulos proximales cortados transversalmente presentes en cada campo, se evaluó el daño tubular (denudación de la membrana basal tubular, presencia de células necróticas tanto en el epitelio como descamadas en la luz tubular y ausencia del ribete en cepillo) a 400 X. En el intersticio se evaluó la presencia de infiltrado inflamatorio y congestión vascular peritubulares a 400 X en cada campo histológico.

Se realizó una valoración del estado de cada variable, en la cual se consideró 0 la estructura histológica normal y 1 las condiciones patológicas. Para la cuantificación se utilizó el programa desarrollado para la plataforma .Net, utilizando el ambiente de desarrollo Visual Studio 2008, lenguaje c#. Se determinó el porciento de estructuras dañadas por campo [19].

Los estudios se realizaron en un microscopio óptico Nikon 50i y las imágenes se obtuvieron mediante una cámara digital de alta resolución DS-5M-U1 acoplada al microscopio.

Para el procesamiento estadístico se empleó el programa Graph Pad Prism versión 5.0 para Windows. Se

realizaron comparaciones entre grupos en cuanto al porciento de túbulos y glomérulos dañados por campo histológico, así como el porciento de campos histológicos que presentaron infiltrado inflamatorio y congestión vascular. Para el análisis de las diferencias entre grupos se realizó la prueba no paramétrica de comparación de porcentos de Fisher para un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Análisis morfológico

En el grupo *Control* (en ratas y ratones) se observó la estructura normal de los glomérulos y los túbulos proximales y ausencia de infiltrado inflamatorio y congestión vascular en el intersticio (Figuras 1A y 1C).

En el grupo *Kanamicina* (en ratas y ratones) se observaron glomérulos con mesangio ensanchado por aumento de la matriz mesangial, obliteración de las luces capilares de algunos lobulillos glomerulares y sinequias. En las ratas se apreció además dilatación irregular del espacio de Bowman e hiper celularidad mesangial (Figuras 1 B y 1 D).

En los túbulos proximales (en ratones y ratas) se apreciaron signos de necrosis y degeneración, células descamadas en la luz tubular, luces tubulares dilatadas y denudación de las membranas basales tubulares. En las ratas se encontraron túbulos degenerados con ensanchamiento de la luz tubular y pérdida del epitelio. El intersticio presentó abundante infiltrado inflamatorio y congestión vascular peritubulares (Figuras 1 B y 1 D).

Los cambios inducidos por kanamicina fueron focales, ya que las zonas dañadas se encontraron alternando con zonas aisladas de estructura normal. El daño fue menor en ratones que en ratas (Fig. 1).

En el grupo *Ficocianina* se observó conservación de la estructura de túbulos e intersticio en ratones y ratas, mientras que en los glomérulos se observó aumento del mesangio a expensas de mayor celularidad y disminución de las luces capilares glomerulares en ambos. De forma general la estructura tisular se observó mejor conservada

en ratones que en ratas (Figuras 2 A y B) en correspondencia con el daño inicial por kanamicina.

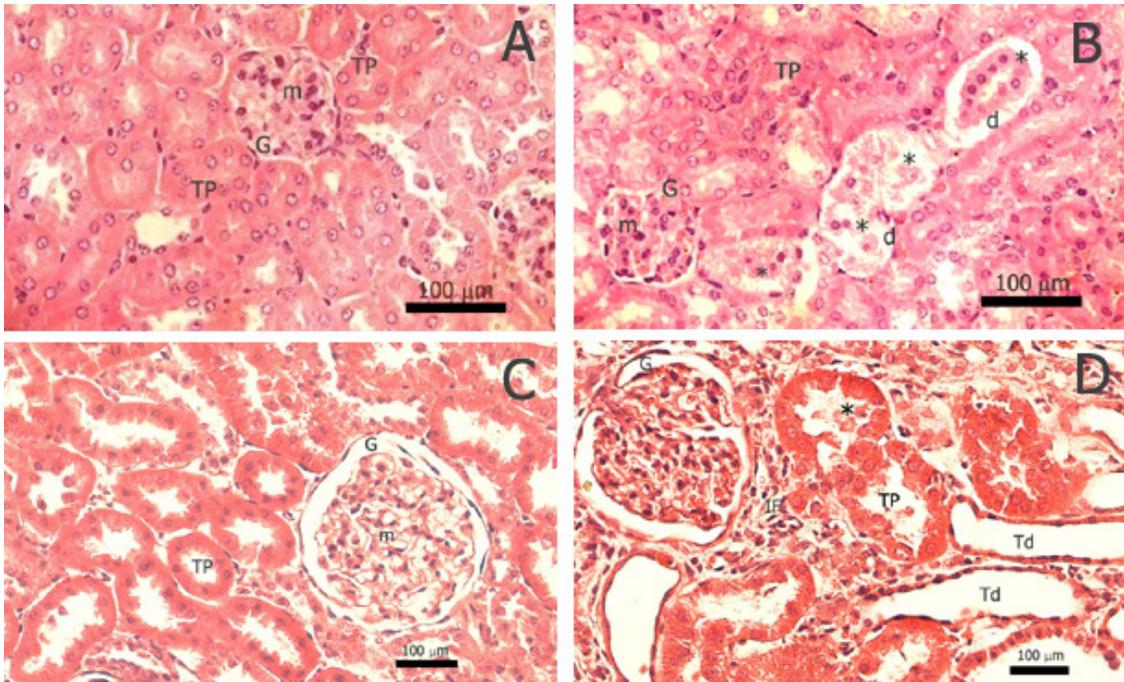


Fig. 1. Morfología de la corteza renal. Tinción de HE. A, C) grupo *Control*, B, D) grupo *Kanamicina*. A, B) ratón, C, D) rata. G-glomérulo, m- mesangio, TP- túbulo proximal, Td- túbulos degenerados (ensanchamiento de la luz tubular con pérdida del epitelio), *células descamadas en la luz tubular, IF-infiltrado inflamatorio peritubular, d-denudación de la membrana basal tubular.

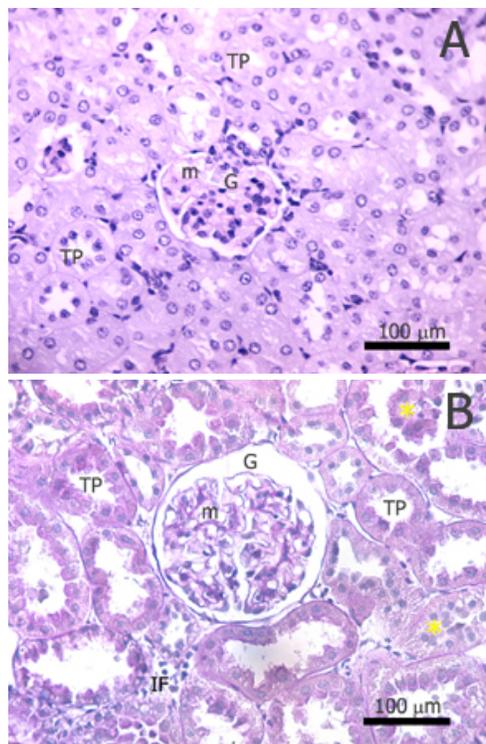


Fig. 2. Efecto de la ficocianina en la morfología de la corteza renal. Tinción de PAS. A) ratón, B) rata. G-glomérulo, m- mesangio, TP- túbulo proximal, *células descamadas en la luz tubular, IF-infiltrado inflamatorio peritubular.

Análisis morfométrico

En el grupo *Ficocianina* se observó disminución del daño tubular inducido por kanamicina en ratones y ratas: del infiltrado inflamatorio en ratones y de la congestión vascular en ratas (Fig. 3). En cuanto al daño glomerular, en el grupo *Ficocianina* no se observó recuperación en ratas ni en ratones (resultados no mostrados).

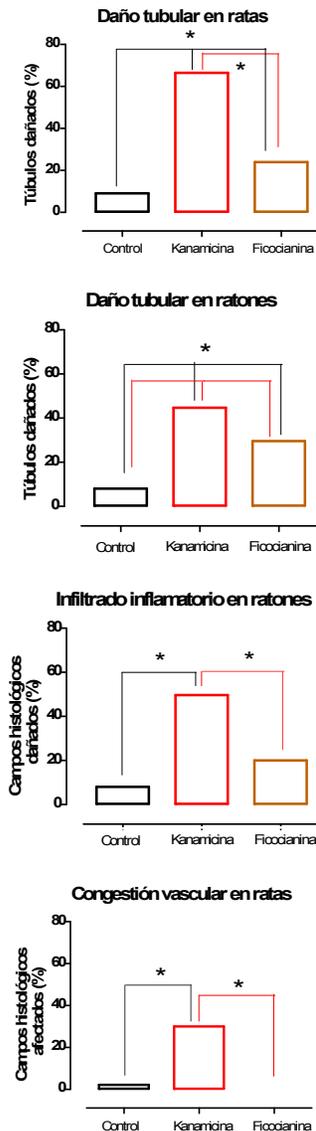


Fig. 3. Variables histológicas en las que hubo protección con ficocianina. **Ratones:** Control (n=5), Kanamicina (n=6), Ficocianina (n=4). **Ratas:** Control (n=6), Kanamicina (n=4), Ficocianina (n=3). Prueba χ^2 seguida de la prueba de Fisher, asteriscos: $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

En los ratones y ratas tratados con kanamicina los cambios en los glomérulos, los túbulos proximales y el intersticio tuvieron características de tipo focal, debido a la ocurrencia simultánea de necrosis y regeneración tubular [20,21], de manera similar a cuando se utilizan otros aminoglucósidos [22] [23].

El daño renal inducido por aminoglucósidos es debido principalmente a la generación de ERO en las células epiteliales, el endotelio de la microvasculatura y las células inflamatorias en la corteza [24]. La citotoxicidad de las células epiteliales de los túbulos proximales se debe a que éstas constituyen el principal sitio de acumulación de la droga. El daño tubular conduce a un proceso de reabsorción disfuncional que produce un suministro excesivo de agua y electrolitos a la parte distal de la nefrona, que a su vez activa el mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular [10].

La respuesta inflamatoria actúa como un mecanismo amplificador del daño. La infiltración de células inflamatorias se considera una lesión regenerativa y la reabsorción de las mismas ocurre paulatinamente después que cesa la noxa (administración de kanamicina), una vez concluida su función [10].

Esta es la primera vez que se describe el efecto beneficioso de la ficocianina de acelerar la regeneración de las células epiteliales de los túbulos proximales renales sometidas a daño por kanamicina

En los modelos que se presentan en este trabajo se encontró además reabsorción del infiltrado inflamatorio y disminución de la congestión vascular en los animales tratados con ficocianina.

Se conoce que la administración de ficocianina refuerza la actividad antioxidante, pues es capaz de secuestrar radicales hidroxilo y alcoxilo [2].

En trabajos de otros autores se demostró que la *Spirulina* ejerce protección contra el daño renal inducido por otro antibiótico aminoglucósido, la gentamicina, en ratas [12] [13] [14]. En esos trabajos, las muestras se tomaron

durante la fase aguda del daño renal, mientras que el presente estudio se realizó durante la fase recuperativa.

En trabajos experimentales se ha encontrado efecto protector de otros agentes antioxidantes en la fase aguda del daño renal inducido por aminoglucósidos. Por ejemplo, antioxidantes sintéticos como la vitamina E y la N-acetil cisteína [25], la sinvastatina [26] y antioxidantes de origen natural como el té verde [27], las semillas de uva [28], el eugenol [29], extractos florales de *Tecoma stans* [30] y extracto de ajo [31].

Resultados similares a los nuestros se han encontrado empleando aceite de sésamo (agente antioxidante natural), en la fase regenerativa del daño renal inducido por gentamicina en ratas [32].

Se ha sugerido que el efecto de los agentes antioxidantes frente a la nefrotoxicidad de los antibióticos aminoglucósidos pudiera estar relacionado con el debilitamiento de la citotoxicidad directa de estos agentes, la inhibición de la contracción vascular (que produciría dilatación y congestión vascular y mesangial) y la acción antiinflamatoria [10]. En cultivos de células tubulares se ha demostrado la efectividad de la protección antioxidante ante el daño apoptótico inducido por gentamicina [33].

La recuperación de varias estructuras de la morfología renal inducida por la administración de ficocianina, demostrada en este trabajo mediante la aplicación de métodos morfométricos, refuerzan la necesidad de realizar estudios bioquímicos y de función renal.

CONCLUSIONES

Durante la fase recuperativa de riñones de ratones y ratas tratados con una sobredosis de kanamicina, la ficocianina provocó disminución significativa del daño tubular, del infiltrado inflamatorio y de la congestión vascular.

Estos resultados sugieren la posibilidad de emplear la ficocianina, que se extrae de algas verde-azules, para acelerar la regeneración del tejido renal después del daño renal inducido por aminoglucósidos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura López y al Prof H. Gómez Barry, del Instituto de Nefrología Dr. Abelardo Buch por sus útiles consejos y recomendaciones.

REFERENCIAS

- [1] Chu W.L., Lim Y.W., Radhakrishnan A.K., Lim P.E. (2010) "Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals" *BMC Complement Altern Med* 10:53.
- [2] Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., Rimbau V. (2003) "C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects" *Curr Protein Pept Sci* 4:207-216.
- [3] Chen L.F., Kaye D. (2009) "Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides" *Infect Dis Clin North Am* 23:1053-1075.
- [4] Zappitelli M., Moffett B., Hyder A. (2011) "Acute kidney injury in non-critically ill children treated with aminoglycoside antibiotics in a tertiary healthcare centre: a retrospective cohort study" *Nephrol Dial Transplant* 26:144-150.
- [5] Quiros Y., Vicente-Vicente L., Morales A.I., Lopez-Novoa J.M., Lopez-Hernandez F.J. (2011) "An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin" *Toxicol Sci* 119:245-256.
- [6] Martinez-Salgado C., Lopez-Hernandez F.J., Lopez-Novoa J.M. (2007) "Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides" *Toxicol Appl Pharmacol* 223:86-98.
- [7] Morales A.I., Buitrago J.M., Santiago J.M., Fernandez-Tagarro M., Lopez-Novoa J.M., Perez-Barriocanal F. (2002) "Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity" *Antioxid Redox Signal* 4:893-898.
- [8] Nagai J., Takano M. (2004) "Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for

- preventing the nephrotoxicity" *Drug Metab Pharmacokinet* 19:159-170.
- [9] Ali B.H., Al Za'abi M., Blunden G., Nemmar A. (2011) "Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research" *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109:225-232.
- [10] López-Novoa J.M., Quiros Y., Vicente L., Morales A.I., López-Hernández F.J. (2011) "New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view" *Kidney Int.* 79.
- [11] Chamorro G., Salazar M., Araujo K.G., dos Santos C.P., Ceballos G., Castillo L.F. (2002) "[Update on the pharmacology of Spirulina (Arthrospira), an unconventional food]" *Arch Latinoam Nutr* 52:232-240.
- [12] Kuhad A., Tirkey N., Pilkhwai S. (2006) "Effect of Spirulina, a blue green algae, on gentamicin-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats" *Fundam Clin Pharmacol* 20:121-128.
- [13] Avdagić N., Cosović E., Nakas-Ićindić E., Mornjaković Z., Zaciragić A., Hadzović-Dzuvo A. (2008) "Spirulina platensis protects against renal injury in rats with gentamicin-induced acute tubular necrosis" *Bosn J Basic Med Sci* 8:331-336.
- [14] Karadeniz A., Yildirim A., Simsek N., Kalkan Y., Celebi F. (2008) "Spirulina platensis protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats" *Phytother Res* 22:1506-1510.
- [15] Farooq S.M., Asokan D., Sakthivel R., Kalaiselvi P., Varalakshmi P. (2004) "Salubrious effect of C-phycoerythrin against oxalate-mediated renal cell injury" *Clin Chim Acta* 348:199-205.
- [16] Farooq S.M., Ebrahim A.S., Subramhanya K.H., Sakthivel R., Rajesh N.G., Varalakshmi P. (2006) "Oxalate mediated nephron impairment and its inhibition by c-phycoerythrin: a study on urolithic rats" *Mol Cell Biochem* 284:95-101.
- [17] Chung S., Young Jeong J., Eun Choi D., Ryang Na K., Wook Lee K., Tai Shin Y. (2010) "C-phycoerythrin Attenuates Renal Inflammation and Fibrosis in UO Mice" *The Korean J Nephrol* 29:687-694
- [18] Balakumara P., Rohillab A., Thangathirupathia A. (2010) "Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it?" *Pharmacol Res* 62:179-186.
- [19] González L., Rodríguez S., Fernández A., Santos E., Gutiérrez N., López L., Galán L., Chávez Y., Calunga J.L. (2010) "Effects of ozone oxidative postconditioning on renal tubular epithelial cells against ischemia/reperfusion injury in rats" *Acta Microscopica* 19:264-270.
- [20] Cohen A. (2006) "Renal Anatomy and Basic Concepts and Methods in Renal Pathology. In: Fundamentals of Renal Pathology. New York: Springer Science Business Media, LLC".
- [21] Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M. (1999) "Aminoglycosides: activity and resistance" *Antimicrob Agents Chemother* 43:727-737.
- [22] Karakoyun B., Yuksel M., Turan P., Arbak S., Alican I. (2009) "Halofuginone has a Beneficial Effect on Gentamicin-induced Acute Nephrotoxicity in Rats" *Rev Drug Chem Toxicol* 32 312-318.
- [23] Zahid M., Kamal F., Qamar M., Bhatti S., Insari N. (2007) "Morphological Changes Produced by Aminoglycoside Induced Nephrotoxicity. An Experimental Study" *ANNAL* 13:234-237.
- [24] Kandeel M., Abdelaziz I., Elhabashy N., Hegazy H., Tolba Y. (2011) "Nephrotoxicity and oxidative stress of single large dose or two divided doses of gentamicin in rats" *Pak J Biol Sci* 14:627-633.
- [25] Patel Manali B., Deshpande S., Shah G. (2011) "Evaluation of efficacy of vitamin E and N-acetyl cysteine in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats" *Ren Fail* 33:341-347.
- [26] Jabbari M., Rostami Z., Jenabi A., Bahrami A., Mooraki A. (2011) "Simvastatin ameliorates

- gentamicin-induced renal injury in rats" *Saudi J Kidney Dis Transpl* 22:1181-1186.
- [27] Abdel-Raheem I.T., El-Sherbiny G.A., Taye A. (2010) "Green tea ameliorates renal oxidative damage induced by gentamicin in rats" *Pak J Pharm Sci* 23:21-28.
- [28] Ulusoy S., Ozkan G., Ersoz S., Orem A., Alkanat M., Yucesan F.B., Kaynar K., Al S. (2012) "The effect of grape seed proanthocyanidin extract in preventing amikacin-induced nephropathy" *Ren Fail* 34:227-234.
- [29] Said M.M. (2011) "The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney" *Fundam Clin Pharmacol* 25:708-716.
- [30] Raju S., Kavimani S., Maheshwara Rao V.U., Reddy K.S., Kumar G.V. (2011) "Floral extract of *Tecoma stans*: a potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity in vivo" *Asian Pac J Trop Med* 4:680-685.
- [31] Maldonado P.D., Barrera D., Medina-Campos O.N., Hernandez-Pando R., Ibarra-Rubio M.E., Pedraza-Chaverri J. (2003) "Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats" *Life Sci* 73:2543-2556.
- [32] Hsu D.Z., Liu C.T., Li Y.H., Chu P.Y., Liu M.Y. (2010) "Protective effect of daily sesame oil supplement on gentamicin-induced renal injury in rats" *Shock* 33:88-92.
- [33] Juan S.H., Chen C.H., Hsu Y.H., Hou C.C., Chen T.H., Lin H., Chu Y.L., Sue Y.M. (2007) "Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin" *Nephrol Dial Transplant* 22:732-739.