

Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Ciências Fisiológicas
Laboratório de Farmacologia

RELATÓRIO FINAL PIBIC 2013-2014

PIB-S/0179/2013 - Avaliação da atividade de Zingiber zerumbet
(L.) Smith sobre a pressão arterial, função renal e remodelamento
vascular em ratos hipertensos renais 2R-1C

Orientando: Luã Portela Carvalho

Colaborador: Paulo Roberto Gonçalves Holanda

Orientador: Prof .Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa

Manaus, 23 de julho de 2014

Resumo

Sabe-se que a hipertensão apresenta um alto índice na população brasileira e que está frequentemente associada a graves complicações como alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos alvo tais como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, além de alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais. Considerando que o Brasil detém a maior biodiversidade mundial, cenário em que se destaca a região Amazônica, torna-se extremamente propício em nossa região a pesquisa de medicamentos a partir de matérias primas vegetais. Desta forma, desenvolveu-se esta pesquisa com o objetivo de avaliar a atividade do extrato de *Zingiber zerumbet*, planta pertencente à família da Zingiberaceae, sobre a pressão arterial, índices de hipertrofia cardíaca e renal e parâmetros metabólicos. **Métodos:** A hipertensão foi induzida em ratos Wistar (modelo 2R-1C) e os dados comparados a animais de mesma idade *sham* operados (2R). Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, sendo apenas um grupo hipertenso tratado por via oral com 500 mg/kg/dia do extrato aquoso liofilizado reconstituído em salina dos rizomas de *Z. zerumbet* por 21 dias. Foi determinada a pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda, avaliados parâmetros metabólicos como consumo de ração e água, fluxo urinário, além de calculados os índices de hipertrofia cardíaca e renal esquerda e direita. Os resultados não se apresentaram de forma positiva no que diz respeito à hipertensão induzida, visto que todos os grupos apresentaram pressão sistólica semelhante (2R, 2R-1C controle e 2R -1C tratado) e acima de 140 mmHg, o que impossibilita concluir neste momento sobre a atividade do extrato de *Z. zerumbet* nos parâmetros avaliados. Além disso, não foi observada alteração significativa no índice de hipertrofia cardíaca de ratos 2R-1C controle se comparados a 2R, apesar de havermos encontrado aumento e redução do índice de hipertrofia dos rins direito e esquerdo, respectivamente. O tratamento de ratos 2R-1C com *Z. Zerumbet* não modificou os parâmetros de hipertrofia nas condições em que estes foram avaliados. Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal, fluxo urinário, ingestão de água e consumo de ração entre animais 2R e 2R-1C tratados ou não. **Discussão:** Em vista dos resultados, não podemos ainda concluir sobre o efeito do tratamento de ratos hipertensos 2R-1C com *Z. zerumbet* sobre a pressão arterial, morfologia renal e metabolismo. Deste modo, para que seja possível a obtenção de dados conclusivos sobre o efeito de *Z. zerumbet* em modelos de hipertensão arterial será necessária a repetição dos experimentos ou a realização de maior número destes, além da reavaliação das condições experimentais.

Palavras-chave: 2R-1C, Hipertensão Arterial, Zingiber zerumbet

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivo Geral.....	5
2.2	Objetivos Específicos	5
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4	MATERIAIS E MÉTODOS	7
4.1	Tratamento Farmacológico.....	8
4.2	Determinação da pressão arterial sistólica.....	9
4.3	Determinação de parâmetros metabólicos	9
4.4	Cálculo do índice de hipertrofia cardíaca.....	9
4.5	Cálculo do índice de hipertrofia renal.....	9
4.6	Análise estatística.....	10
5	RESULTADOS	10
5.1	Determinação da pressão arterial sistólica	10
5.2	Determinação da parâmetros metabólicos.....	12
5.3	Avaliação do Índice de Hipertrofia Cardíaca.....	12
5.4	Avaliação do Índice de Hipertrofia Renal.....	13
6	DISCUSSÃO.....	14
7	CONCLUSÃO.....	17
8	REFERENCIAS	18

1 - Introdução

A hipertensão arterial pode ser definida como uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Representa um sério problema de saúde pública, com prevalência superior a 30% na população adulta e 50% em idosos (CESARINO, 2008). Está frequentemente associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos alvo tais como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, além de alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (MALTA, 2009).

No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares (LOTUFO, 2005). Em 2007, 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório foram registrados (MALTA, 2009), tendo como causa principal o acidente vascular cerebral. Sendo assim, no país, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte e as responsáveis pela alta frequência de internações e custos socioeconômicos e médicos elevados.

A hipertensão arterial primária não tem cura, mas o tratamento previne as complicações (MIO JR, 2002). Atualmente, são utilizados medicamentos anti-hipertensivos com objetivo principal de reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovasculares (KANNEL, 1996). Com o passar dos anos, modalidades alternativas ganharam destaque às drogas comumente utilizadas. Como exemplo, podemos citar o uso crescente de medicamentos fitoterápicos. Esta prática é de grande relevância para a saúde pública (MORAES, 2001) e se destaca como fonte potencial de identificação de novas moléculas para o tratamento de diversas doenças, entre elas a hipertensão arterial (CALIXTO, 2005).

Diante do alto índice de hipertensão na população brasileira e seus efeitos deletérios na saúde e nos gastos públicos e, levando em consideração que o país detém a maior biodiversidade mundial, cenário em que se destaca a região Amazônica (MENDONÇA *et al.*, 1998), vê-se que o Brasil é um local propício e extremamente promissor para pesquisas de identificação e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Neste cenário, o laboratório de Farmacologia de produtos naturais do INPA, sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro, tem realizado coleta e processamento de diversas matérias primas vegetais. Dentre as diversas plantas em estudo, têm se destacado plantas da família Zingiberaceae. As espécies do gênero *Zingiber* pertencente à família da Zingiberaceae são consideradas como ervas e estão representadas por aproximadamente 141 espécies

distribuídas principalmente na região asiática. Este gênero de plantas está presente em grande parte nos trópicos da Ásia, Malásia e ilhas do Pacífico (BURKILL, 1966).

A espécie *Zingiber zerumbet* (L.) Smith é uma planta herbácea e pode ser caracterizada pela presença de um pulvino entre a base do pecíolo e a lígula (SABU, 2003). É um gengibre selvagem comestível, com talos de aproximadamente 1-2 m de altura, eretos, oblíquos, redondos, anuais e investidos pelas bainhas lisas das folhas. As folhas e inflorescência do gengibre brotam de um rizoma nodoso grosso ou do talo subterrâneo que cresce logo abaixo da superfície do solo. Os rizomas de *Z. zerumbet*, em particular, tem sido utilizados tradicionalmente na medicina herbácea em tradições populares chinesas, indianas, japonesa e árabes desde os tempos remotos. Apesar de seu uso regular como condimento e aperitivo em pratos malásios e indianos, os rizomas de *Z. zerumbet* tem sido utilizados na medicina folclórica como cura para várias indisposições (ELLIOTT; BRIMACOMBE, 1987).

Zingiber zerumbet, uma das plantas da família Zingiberaceae vem sendo utilizada na medicina tradicional asiática há 2 mil anos. No Japão, os rizomas são utilizados em conserva e na arte culinária, principalmente na comida por seus efeitos medicinais no tratamento de doenças dos rins e fígado. Os rizomas de *Z. zerumbet* são também utilizados especialmente para temperar sushi. Os rizomas de *Z. zerumbet* secos e os óleos essenciais são utilizados para dar aromas e sabores a bolos, biscoitos, molhos e bebidas leves (LE COINTE, 1947).

2 - Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a atividade biológica do extrato aquoso dos rizomas de *Zingiber zerumbet* na pressão arterial, parâmetros metabólicos e índices de hipertrofia cardíaca e renal de ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliação do potencial anti-hipertensivo dos extratos aquosos de *Zingiber zerumbet* através de técnicas de medida indireta da pressão arterial.
- Avaliação da atividade do extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* sobre parâmetros metabólicos (fluxo urinário e consumo de água e ração).

- Avaliação da atividade do extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* sobre os índices de hipertrofia cardíaca e renal direita e esquerda.

3 - Revisão bibliográfica

Vários estudos têm revelado diferentes potenciais farmacológicos de *Zingiber zerumbet* em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os rizomas de *Z. zerumbet*, em particular, têm demonstrado possuir atividades anti-inflamatórias (ZAKARIA *et al*, 2010), antinociceptivas e antipiréticas (SOMCHIT, 2005), antiulcerosas, anticancerígenas (HUANG *et al*, 2005), antimicrobianas (TUSHAR *et al.*, 2010), anti-hiperglicêmicas, antialérgicas, antioxidantes e hepatoprotetoras (CHAUNG *et al*, 2008) em diferentes doses/concentrações.

A atividade anti-inflamatória, além de atividade antinociceptiva a partir do rizoma, está provavelmente relacionada à inibição da bradicinina, prostaglandinas e histamina (ZAKARIA *et al*, 2010).

Dados da literatura relatam que seu frequente consumo tem sido associado à diminuição do risco de doença coronária, câncer, hipertensão e derrame cerebral. Os rizomas da *Zingiber zerumbet* apresentam uma série de compostos, entre eles sesquiterpenóides, flavonóides, compostos aromáticos, vanilina, kaempferol e outros compostos polifenólicos (JANG *et al*, 2004). Relata-se que compostos polifenólicos possuem múltiplos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. (NAG; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2013). *Z. zerumbet* é apontada como a fonte mais rica de flavonóide kaempferol (240 mg/100g) se comparada a outras espécies da família Zingiberaceae (YOB *et al*, 2011).

A atividade antioxidante pode refletir em benefícios para o tratamento da hipertensão e suas consequências, já que esta condição está associada à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Sabe-se que o estresse oxidativo é indutor de lesão em órgãos alvo, entre eles os rins e vasos. Isto pode contribuir para o aparecimento de proteinúria (um dos primeiros sinais de lesão renal), além de remodelamento (hipertrofia e fibrose) vascular e renal (TZENG *et al*, 2013).

O estudo da planta *Zingiber zerumbet* vem sendo realizado sistematicamente em diversos modelos de condições patológicas, mas seu potencial sobre o sistema cardiovascular e renal, ainda que provável se considerarmos resultados obtidos com outras espécies da família Zingiberaceae e seus efeitos antioxidantes, permanece desconhecido. Além disso,

ainda são desconhecidos os mecanismos pelos quais as plantas da família Zingiberaceae produzem efeitos redutores de pressão arterial, principalmente em modelos de hipertensão arterial experimental.

Uma vez que a lesão renal resultante da hipertensão arterial pode desencadear proteinúria e remodelamento renovascular, com acúmulo de colágeno (fibrose) e hipertrofia, e sabendo que *Zingiber zerumbet* apresentou potencial de inibição de respostas inflamatórias e de estresse oxidativo, além de informações obtidas da literatura científica de que diversas plantas da família Zingiberaceae possuem efeitos anti-hipertensivos, pretendemos com este estudo avaliar a atividade de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith sobre a pressão arterial, parâmetros metabólicos e de hipertrofia/atrofia de órgãos alvo como o coração e os rins em ratos normotensos e hipertensos renais 2R-1C.

4 - Material e Métodos

Os extratos dos rizomas de *Zingiber zerumbet* foram cedidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Prof. Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro), responsáveis pela coleta do material vegetal, identificação e processamento dos extratos.

Este projeto está de acordo com as recomendações da legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Amazonas sob o número CEEA 020/2013.

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 180 a 220g. Os animais foram obtidos do biotério Central do INPA, mantidos em gaiolas sob condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água.

Os experimentos foram realizados nas salas de experimentação do Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Para a obtenção de ratos com hipertensão renal do tipo 2R-1C foi utilizada a técnica descrita por Goldblatt *et al.*, (1934) e adaptada por Schaffenburg (1959). Os ratos, sob anestesia com quetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.), foram submetidos à laparotomia mediana para exposição do pedículo renal e implante de um clipe de prata (0,2 x 1,5 cm) com 0,2 mm de abertura, na artéria renal esquerda (grupo 2R-1C). Os ratos controle foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem o implante do clipe (grupo 2R). Após a

cirurgia, os animais receberam tratamento com antibiótico em dose única (terramicina 0,2g/Kg) por via intramuscular (1 mL/Kg).

Os animais tiveram sua pressão arterial sistólica registrada semanalmente, em três dias diferentes, ao longo de seis semanas após a cirurgia de indução da hipertensão para determinação da pressão arterial sistólica média em cada semana. Após 3 semanas de cirurgia, foram considerados hipertensos os animais que apresentaram pressão arterial sistólica superior a 140mmHg, quando os animais foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos (conforme descrito a seguir).

Após a determinação da pressão arterial e tratamento dos animais por 21 dias, os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.). Foi realizada laparotomia mediana para abertura da cavidade torácica, expondo o coração ainda pulsando. Foi realizada punção intracardíaca para coleta de sangue (5mL) para futura determinação de parâmetros bioquímicos, seguida de perfusão do animal com solução salina e formol a 10% para fixação dos tecidos. O coração foi rapidamente retirado. O excesso de umidade foi removido com o auxílio de papel de filtro. O mesmo foi feito com os rins direito e esquerdo. Os órgãos sólidos foram pesados e mantidos em formol a 10% até a sua inclusão em parafina para futura análise histológica morfométrica. Realizou-se a remoção da tíbia direita de todos os animais e seu comprimento foi aferido com o auxílio de um paquímetro.

4.1 - Tratamento farmacológico

Os animais experimentais receberam durante 21 dias (a partir da 3ª semana após a cirurgia do implante do clipe) 500 mg/kg/dia do extrato aquoso liofilizado reconstituído em salina dos rizomas de *Zingiber zerumbet* por gavagem. O volume máximo administrado foi de 5mL/kg (LAPA *et al.* 2007). Animais controle receberam o mesmo volume de veículo (máximo de 1 mL/kg/dia, v.o.).

Foram utilizados 21 ratos, distribuídos de acordo com os grupos descritos abaixo:

- Grupo 2R controle - 11 ratos normotensos que receberão solução salina (NaCl 0,9%, máximo de 5mL/Kg/dia) por 21 dias.
- Grupo 2R-1C controle - 6 ratos hipertensos renais que receberão solução salina (NaCl 0,9%, máximo de 5mL/Kg/dia) por 21 dias.
- Grupo 2R-1C tratado – 4 ratos hipertensos renais tratados com 500 mg/kg/dia do extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith por gavagem durante 21 dias.

A dose utilizada foi baseada em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa que demonstrou efeito anti-inflamatório do extrato aquoso de *Z. zerumbet in vivo*. O volume administrado correspondeu a 0,1mL para cada 100g de peso corporal.

4.2 - Determinação da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica foi determinada por pletismografia de cauda (“tail-cuff”) acoplado a um medidor de pressão digital modelo LE 501 (Lettica PanLab, Barcelona, Espanha). A pressão arterial caudal foi determinada semanalmente, antes e ao longo de 6 semanas após a cirurgia de implante do clip na artéria renal, com 3 medidas repetidas dentro da mesma semana. Para cada determinação, o animal foi previamente aquecido em ambiente entre 40° e 45° C durante 10 minutos. As aferições foram feitas dez vezes para determinação da média de pressão arterial sistólica do dia. Foi calculada a média aritmética das três determinações realizadas na mesma semana para o estabelecido do valor semanal de pressão sistólica por animal. Antes de se iniciarem as aferições, os animais passaram por um treinamento de 4 dias para adaptação ao método.

4.3 - Avaliação de parâmetros metabólicos

Os ratos foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas durante quatro dias consecutivos ao final do período de tratamento. O primeiro dia para adaptação dos animais às gaiolas e os dias seguintes para avaliar os parâmetros metabólicos. As variáveis avaliadas foram: peso do animal, consumo de ração, consumo de água e fluxo urinário.

4.4 - Cálculo do índice de hipertrofia cardíaca

A partir do peso do coração e da determinação do comprimento da tibia (realizados no dia da coleta), foi calculado o índice de hipertrofia cardíaca (IHC) como descrito a seguir:

$$\text{IHC} = \text{peso do coração(g)} \times 100 / \text{comprimento da tibia (mm)}$$

4.5 - Cálculo do índice de hipertrofia renal

A partir do peso dos rins e da determinação do comprimento da tibia (realizados no dia da coleta), foi calculado o índice de hipertrofia renal (IHR) como descrito a seguir:

$$\text{IHR} = \text{peso do rim(g)} \times 100 / \text{comprimento da tibia (mm)}$$

4.6 - Análise estatística

Após a coleta, os dados obtidos foram tabelados em planilhas do Excel e devidamente analisados por teste T ou análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste utilizando o método de Newman-Keuls quando adequados. Foi adotado nível de significância de 5% para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas. A análise estatística e síntese de gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.0.

5 – Resultados

Os resultados são apresentados como média \pm EPM.

5.1 – Determinação da pressão arterial sistólica

Realizada a aferição pressórica sistólica por método indireto dos animais disponibilizados pelo Biotério do INPA, constatou-se que o valor médio de pressão arterial sistólica (PAS) antes de qualquer procedimento cirúrgico foi de 135 ± 3 mmHg (n=21), conforme pode ser observado no Gráfico 1. Nesta semana os animais pesavam em média 205 ± 3 g.

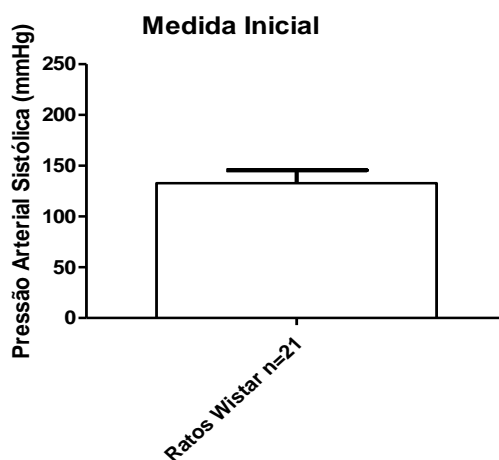


Gráfico 1 – Pressão arterial sistólica antes do procedimento cirúrgico em ratos Wistar

Após o procedimento cirúrgico para indução da hipertensão, ratos 2R apresentaram PAS de 144 ± 1 mmHg (n=11) e os animais 2R-1C apresentaram PAS de 161 ± 6 mmHg (n=10), não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos. Como seria esperado, a PAS de 2R-1C foi superior a 140 mmHg. Entretanto, a PAS de ratos 2R também se apresentou superior a esse valor, quando o esperado seria de aproximadamente 110 a 120mmHg. Os resultados obtidos são demonstrados no Gráfico 2:

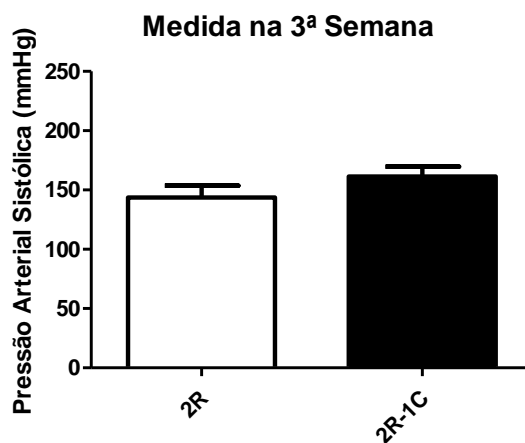


Gráfico 2 - Aferição da pressão arterial sistólica de ratos 2R e 2R-1C três semanas após o procedimento cirúrgico

Os valores médios de PAS ao final do período de tratamento foram: 2R $161 \pm 0,5$ mmHg (n=11); 2R-1C Controle – 175 ± 8 mmHg (n=6) e 2R-1C Tratado – 179 ± 1 mmHg (n=4). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Tais resultados podem ser observados no Gráfico 3:

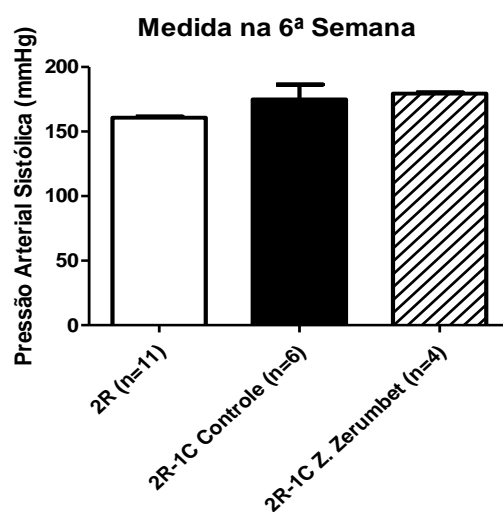


Gráfico 3 – Aferição da pressão arterial sistólica de ratos 2R e 2R-1C controle e ratos 2R-1C tratado por 21 dias com o extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* 6 semanas após a cirurgia

5.2 – Determinação de parâmetros metabólicos

Os resultados do efeito do extrato de *Zingiber zerumbet* sobre o peso corporal, fluxo urinário, consumo de água e ração podem ser visualizados na tabela 1:

	2R (n=11)	2R-1C Controle (n=6)	2R 1C Tratado (n=4)
Consumo de água (mL/Kg/24h)	0,01 ± 0,84	0,09 ± 0,24	0,12 ± 0,68
Consumo de ração (g/Kg/24h)	22,39 ± 0,65	22,36 ± 2,22	21,19 ± 2,22
Peso (g)	449,5 ± 8,84	434,6 ± 11,65	424,6 ± 11,83
Fluxo Urinário (ml/kg/24h)	80,77 ± 15,02	54,32 ± 1,91	91,76 ± 21,11

Tabela 1 – Parâmetros metabólicos de ratos de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) controle e tratados com o extrato aquoso de *Zingiber zerumbet*

Como observado, não foram detectadas diferenças significativas nos parâmetros metabólicos avaliados entre os grupos estudados após realização de análises estatísticas.

5.3 – Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca

O índice de hipertrofia cardíaca de ratos 2R-1C Controle não foi diferente de ratos 2R (39 ± 2 , n=6 vs $36,80 \pm 1,74$, n=11). O tratamento de ratos 2R-1C com o extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* também não modificou o índice de hipertrofia cardíaca desses animais (40 ± 1 , n=4). Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 4.

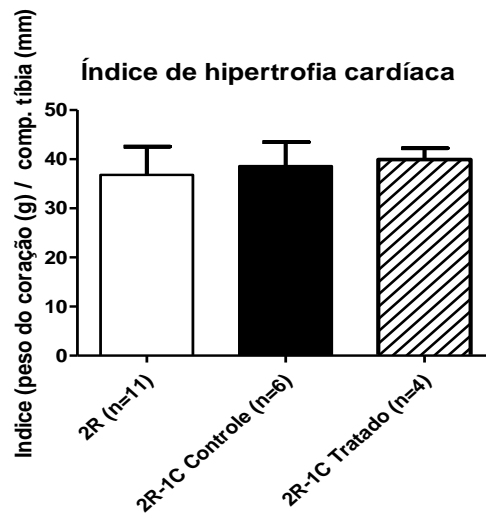


Gráfico 4 – Índice de hipertrofia cardíaca em ratos 2R e 2R-1C controle e ratos 2R-1C tratado por 21 dias com o extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* 6 semanas após a cirurgia

5.4 – Avaliação do índice de hipertrofia renal

O índice de hipertrofia renal direita de ratos 2R-1C controle não foi diferente de ratos 2R ($5,1 \pm 6$, $n=6$ vs $4,5 \pm 2$, $n=11$). Porém, observou-se aumento ($p<0,05$) no índice de hipertrofia renal direita de ratos 2R-1C tratado com o extrato de *Zingiber zerumbet* se comparados a ratos 2R controle ($6,5 \pm 3$, $n=4$ vs $4,5 \pm 2$, $n=11$) e ratos 2R-1C controle ($6,5 \pm 3$, $n=4$ vs $5,1 \pm 6$, $n=6$). Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 5.

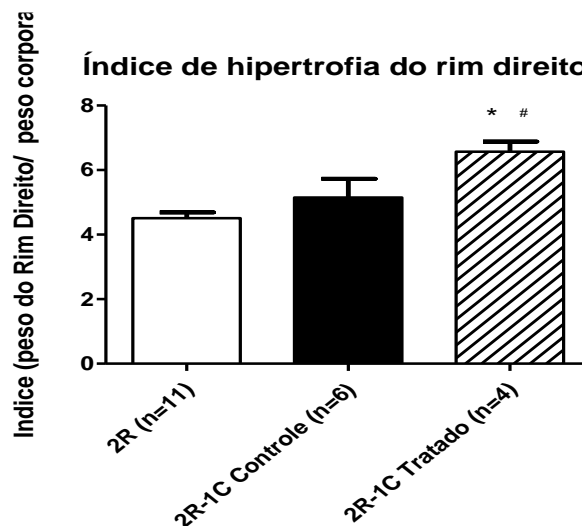


Gráfico 5 – Índice de hipertrofia renal direita em ratos 2R e 2R-1C controle e ratos 2R-1C tratado por 21 dias com o extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* 6 semanas após a cirurgia.

* $p<0,05$ vs 2R; # $P<0,05$ vs 2R-1C Controle.

Observou-se redução do índice de hipertrofia renal esquerda em ratos 2R-1C controle quando comparados a ratos 2R controle ($2,2 \pm 6$, $n=6$ vs $3,8 \pm 3$, $n=11$, $P<0,05$) indicando atrofia renal esquerda classicamente observada neste modelo. O tratamento de ratos 2R-1C com o extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* não modificou o índice de hipertrofia renal esquerda quando comparados a grupo 2R-1C controle ($1,3 \pm 5$, $n=4$ vs $2,2 \pm 6$, $n=6$).

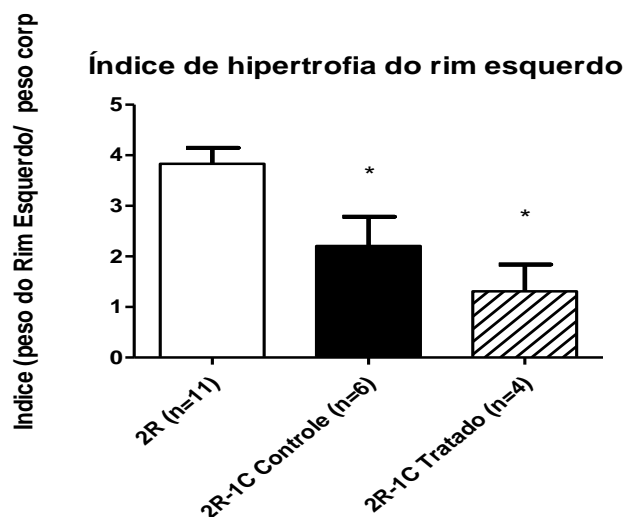


Gráfico 6 – Índice de hipertrofia renal esquerda em ratos 2R e 2R-1C controle e ratos 2R-1C tratado por 21 dias com o extrato aquoso de *Zingiber zerumbet* 6 semanas após a cirurgia.
* $p<0,05$ vs 2R.

6 - Discussão

Este trabalho avaliou a pressão arterial sistólica, os índices de hipertrofia cardíaca e renal e parâmetros metabólicos de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) controle além de ratos 2R-1C tratados com o extrato aquoso das raízes de *Zingiber zerumbet*.

Não foi avaliado o efeito do extrato de *Zingiber zerumbet* sobre ratos 2R devido à dificuldades na obtenção de animais, além da limitação na quantidade de extrato disponível para os tratamentos.

A pressão arterial média dos ratos Wistar encontrada antes da cirurgia de clipagem da artéria renal foi de 135 ± 3 $n=21$ mmHg, que se mostrou dentro da média observada em outros trabalhos para essa linhagem de animais, aproximadamente 116 ± 2 mmHg, $n=20$ (SANTOS, MRV *et al* 2010)

Após a cirurgia de indução da hipertensão, ratos 2R-1C e 2R não apresentaram diferenças significativas em suas pressões sistólicas. Dados da literatura mostram que os

valores de pressão sistólica podem ser semelhantes em animais hipertensos 2R-1C três semanas após a cirurgia (BOONLA, 2013). Ressalta-se, entretanto, que os valores de pressão dos animais 2R estavam mais elevados na terceira semana em relação ao período pré-cirurgia ($p<0,05$). Cabe aqui salientar que o estresse emocional do animal durante o procedimento de aferição da pressão também influencia na variabilidade das medidas (BRUDER-NASCIMENTO, T. 2013). Tal situação pode explicar ao menos em parte o aumento inesperado na pressão sistólica observado em ratos 2R na 3ª semana após a cirurgia.

Após o tratamento com o extrato aquoso dos rizomas de *Zingiber zerumbet* não foi observada redução da pressão arterial, apesar do provável potencial de substâncias anti-hipertensivas presentes nesta planta (JANG *et al*, 2004). O fato de não observarmos efeito do tratamento pode estar relacionado a não termos sido capazes de observar diferenças na pressão sistólica de animais 2R e 2R-1C (conforme demonstrado no gráfico 2). Por outro lado, o fato de termos utilizado o extrato aquoso bruto e liofilizado de *Z. zerumbet* em uma única dose em preferência a frações isoladas, além do número reduzido de animais incluído no grupo 2R-1C tratado pode ter contribuído para estes resultados inconclusivos. Além disso, podemos atribuir este desfecho à necessária, mas também considerável variedade de pesquisadores envolvidos na manipulação dos animais de nosso estudo, devido ao tamanho da amostra e ao tempo exigido para realização das aferições, o que pode refletir em maior estresse desses animais devido a diferenças no manuseio de cada pesquisador. Sabe-se que ratos expostos a situações de estresse têm seus níveis de pressão arterial sistólica elevados (BRUDER-NASCIMENTO, T. 2013). A divisão dos trabalhos entre os alunos foi necessária, tanto pelo número de animais utilizados e tempo na aquisição das medidas como pela extensa carga horária de todos os colaboradores discentes em seu curso de graduação.

Quanto aos parâmetros metabólicos após o tratamento, o consumo de água não foi diferente entre os grupos estudados, o que contrasta com resultados da literatura que afirmam que ratos hipertensos 2R-1C possuem um maior consumo de água (SANTOS, C.M *et al*, 2005). Não foram observadas alterações no fluxo urinário de ratos 2R-1C na ausência ou presença do tratamento com *Zingiber zerumbet*. Dados da literatura relatam fluxo urinário reduzido em animais 2R-1C (BÜRGELOVÁ *et al*, 2005). A redução de fluxo urinário talvez seja componente fundamental para o desenvolvimento da hipertensão neste modelo experimental, o que justificaria o fato de não havermos observado diferenças na PAS entre ratos 2R e 2R-1C em nosso estudo. O peso corporal e o consumo de ração não foi diferente

entre os grupos experimentais, o que indica que o tratamento com o extrato aquoso de *Z. zerumbet* não influencia o comportamento alimentar.

O índice de hipertrofia cardíaca não apresentou diferenças entre os grupos. Outros estudos, inclusive resultados de nosso grupo, demonstram aumento do índice de hipertrofia cardíaca nos animais hipertensos (CORRÊA, JWN 2011; YU, TING TING 2013). Caso os animais 2R-1C em nosso estudo estivessem realmente hipertensos, esses resultados poderiam ser demonstrados por técnicas mais fidedignas, como a morfometria com quantificação da parede livre dos ventrículos e septo interventricular, além da análise do diâmetro do cardiomiócito. Portanto, este estudo ainda não pode concluir sobre o efeito do extrato da planta sobre a morfologia cardíaca.

Em relação ao índice de hipertrofia renal direita, os resultados não demonstraram diferença estatística de ratos 2R-1C controle quando comparados a ratos 2R, contrastando com resultados presentes na literatura a qual relata o desenvolvimento de hipertrofia compensatória no rim contralateral ao rim que sofre cirurgia de clipagem (PEREIRA, T. 2005). Porém, houve aumento no índice de hipertrofia renal direita de ratos 2R-1C tratado com o extrato de *Zingiber zerumbet* quando comparados a ratos 2R-1C controle. Desta forma, nosso estudo aponta para uma aparente piora na hipertrofia renal associada ao tratamento com *Zingiber zerumbet*. Entretanto, diante do reduzido número de animais incluídos neste grupo, nosso estudo não consegue concluir sobre este efeito, principalmente pelo fato de não termos sido capazes de observar as diferenças esperadas neste índice entre os grupos controle (2R VS. 2R-1C).

Foi possível observar neste estudo redução no índice de hipertrofia renal esquerda em ratos 2R-1C controle quando comparados a ratos 2R. Tal alteração é característica deste modelo de hipertensão e está associada à diminuição do fluxo sanguíneo para o rim em decorrência da clipagem da artéria renal (YU, TING TING 2013). Não observamos diferenças no índice de hipertrofia renal esquerda entre ratos 2R-1C tratado e 2R-1C controle. Tais resultados podem indicar ausência de efeitos protetores sobre a atrofia renal esquerda observada neste modelo associada ao tratamento com *Zingiber zerumbet*. Entretanto, diante do reduzido número de animais incluídos no grupo tratado, ainda não podemos concluir sobre este efeito.

Os índices de peso de órgãos sólidos em relação ao comprimento da tíbia (que apresenta crescimento linear de acordo com a idade do animal) fornecem uma estimativa não

muito precisa a respeito dos órgãos analisados. Faz-se necessária a avaliação por métodos mais fidedignos, como a análise morfométrica histológica. Esta não foi realizada em nosso estudo devido a dificuldades relacionadas à greve dos servidores técnico-administrativos da UFAM.

7 - Conclusão

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto aos níveis pressóricos entre os grupos de ratos normotensos (2R), hipertensos renais controle (2R-1C) e hipertensos renais tratados (2R-1C tratado) ao fim do experimento, contrastando com resultados de estudos presentes na literatura utilizada como referência, pressupomos que alguns fatores podem ter prejudicado as análises presentes neste trabalho, dentre eles incluímos: necessidade de diferentes pessoas no manuseio dos animais e nas aferições, utilização do extrato em dose única (diferentes doses precisam ser testadas) e baixo número de animais 2R-1C incluídos no estudo (elevada taxa de mortalidade em ratos operados). Por tratar-se de um trabalho inicial, certamente muitas dificuldades surgiram. Cumpre ressaltar que todo o trabalho foi iniciado na UFAM e precisou ser interrompido e reiniciado no INPA após o descredenciamento de nosso biotério do CONCEA. Independentemente das dificuldades, diversos cuidados foram tomados no sentido de padronizar os métodos e medidas. Entretanto, maiores esforços ainda são necessários.

Em vista dos resultados ora apresentados, não podemos ainda concluir sobre o efeito do tratamento de ratos hipertensos 2R-1C com o extrato aquoso das raízes de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith sobre a pressão arterial, morfologia cardio-renal e metabolismo. Para tal, deverão ser incluídos um maior número de animais nos grupos experimentais e deverão ser realizadas aferições da pressão arterial de maneira ainda mais padronizada (executadas por um único experimentador). Precisamos também verificar a expressão de marcadores genéticos nos ratos Wistar disponíveis para nossa utilização no estado do Amazonas. Há a possibilidade de que os animais, em virtude de seu isolamento, tenham perdido características genótípicas e fenotípicas de seus ancestrais. Outra possibilidade seria utilizar animais com hipertensão estabelecida (mais que três semanas após a cirurgia), uma vez que é difícil prever que um rato 2R-1C que apresente pressão arterial sistólica superior a 140mmHg após 3 semanas da cirurgia será um rato com hipertensão arterial estabelecida após 6 semanas (PAS de aproximadamente 210mmHg conforme dados prévios de nosso grupo).

8 - Referências Bibliográficas

BURKILL, I. H. A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula. Kuala Lumpur, 1996. Ministry of Agriculture and Co-operatives.

BOONLA, Orachorn, *et al.* Curcumin Attenuates Blood Pressure and Oxidative Stress in 2K-1C Renovascular Hypertensive Rats. ศรีนครินทร์ เวช สาร Srinagarind Medical Journal, 2013. 215-218p.

BRUDER-NASCIMENTO, Thiago, *et al.* Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. Arq Bras Endocrinol Metab. São Paulo, 2013. V. 57, n. 8.

CALIXTO, J.B. Journal of Ethnopharmacology 100: 131-134, 2005.

CESARINO, C.B.; CIPULLO, J.P.; MARTIN, J.F.V.; CIORLIA, L.A.; GODOY, M.R.P.; CORDEIRO, J.A.; RODRIGUES, I.C. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. Arq Bras Card, 2008. 31-35p.

CORRÊA, José Wilson do Nascimento. Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-hipertensivo e anti-hipertrofico cardíaco do duplo bloqueio do sistema renina-angiotensina em ratos hipertensos renais 2R-1C. 2011. 152f. Tese (Doutor em Ciência)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.

CHAUNG, H. C.; HO, C. T.; HUANG, T. C. Anti-hypersensitive and anti-inflammatory activities of water extract of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, Food and Agricultural Immunology, 2008. Vol. 19, no. 2, 117–129p.

EBRAHIMI, Behzad, *et al.* "Evolution of cardiac and renal impairment detected by high-field cardiovascular magnetic resonance in mice with renal artery stenosis." Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance, 2013. Vol 15.1: 98p.

ELLIOTT S.; BRIMACOMBE, J.; The medicinal plants of GunungLeuser National Park, Indonesia. J. Ethno Pharmacol, 1987. 19: 285-317p.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZEL, R.; SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension I the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. Journal Experimental Medicine, 1934. 347-379p.

HUANG, G.C.; CHIEN, T.Y.; CHEN, L.G.; WANG, C.C. Antitumor effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* in P-388D cells in vitro and in vivo. Planta Medica, 2005. 71:219–224p.

JANG D.; HAN A.; PARK G.; JHON G.; SEO E. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. Archives of Pharmacal Research April 2004, Volume 27, Issue 4, 386-389p.

KANNEL, W.B. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA*, 1996. 273: 1571–1576p.

LAPA, A.J.; BORGES, R.M.; CYSNEIROS, T.C.M.; DE LIMA, C.S.; LIMA-LANDMAN, A.C.R. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine*, 2007. V. 14, 314– 320p.

LE COINTE, P. Amazônia Brasileira III. Árvores e Plantas Úteis (Índigenas e Aclimatadas). São Paulo: Companhia Editorial Nacional, 1947. 560p.

LOTUFO, P. A. Why Brazil does not have an epidemic of chronic diseases: some answers from cardiovascular diseases. *São Paulo Medical Journal*, São Paulo, v. 123, n. 2, p. 47-48, Março 2005.

MALTA, D.C.; MOURA, L.; SOUZA, F.M.; ROCHA, F.M.; FERNANDES, F.M. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006 in *Saúde Brasil 2008*. Ministério da Saúde. Brasília, 2009. 337–362p.

MENDONÇA, R.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E.N. 1998. Flora vascular do Cerrado. In: S. Sano & S. Almeida (eds.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina, EMBRAPA-CPAC. 287-556p.

MION, JR, *et al.* Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia e Sociedade Brasileira de Nefrologia. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 03 de Fevereiro de 2002

MORAES, M.E.A.; SANTANA, G.S.M. Aroeira-dosertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. *Funcap*, 2001. (3): 5-6p.

PEREIRA, T.M.C. Angiotensina II intra-renal modula a expressão da óxido nítrico sintase neuronal na hipertensão renovascular 2R1C. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – ES, 2005.

NAG, A.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Antioxidant Activities and Cytotoxicity of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith Rhizome. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013; 2 (3): 102-108p.

SABU, M.; P.E. SREEJITH, ALFRED JOE,; A.K. PRADEEP. *Zingiber neotruncatum* (Zingiberaceae): A new distributional record for India. Department of Botany, University of Calicut, 2013. Vol. 23(1) 46-49p.

SANTOS, C. M., *et al.* Water intake during the development of renal hypertension (2K-1C) in mice. *Physiology & behavior*, 2005. 85.4: 512-516p.

SCHAFFENBURG, C.A. Device to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.101, p.676-7, Aug-Sep 1959.

- SOMCHIT, M.N.; SHUKRIYAH, M.H.N.; BUSTAMAM, A.A.; ZURAINI, Anti-pyretic and Analgesic Activity of *Zingiber zerumbet* .Inter Jour of Pharm,2005. 1 (3):277-280p.
- TUSHAR, B.S.; SARMA, G.C.; RANGAN, L. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. Journal of Ethnopharmacology,2010. 132:286–296p.
- TZENG T.; LIOU S.; CHANG C.; LIU I. The Ethanol Extract of *Zingiber zerumbet* Attenuates Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy in Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicin, 2013. Volume 2013. Article ID 340645.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; SILVA, M. A. M.; GOMES, A. C. M. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. Rev Bras Hipertens, 2007. 14(4). 269-274p.
- YOB, N.J.; S. MOHD. JOFRY; M. M. R. MEOR. MOHD. AFFANDI; L. K. TEH; M. Z. SALLEH and Z. A. ZAKARIA. *Zingiber zerumbet* (L.) Smith: A Review of Its Ethnomedicinal, Chemical, and Pharmacological Uses. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011. Volume 2011. Article ID 543216.
- YU, T., *et al.* Effects of traditional Chinese medicine Xin-Ji-Er-Kang formula on 2K1C hypertensive rats: role of oxidative stress and endothelial dysfunction. BMC complementary and alternative medicine, 2013. 13.1: 173p.
- ZAKARIA, Z.A.; MOHAMAD, A.S.; CHEAR, C.T.; WONG, Y.Y.; ISRAF, D.A.; SULAIMAN, M.R. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Zingiber zerumbet* methanol extract in experimental model systems. Medical Principles and Practice, 2010. 19:287–294p.