

A Diferença de Média de Hiperplasia Miointimal em Modelo Experimental de Aterosclerose Tratados com Óleo Essencial da *Alpinia Zerumbet*¹

ANA CAROLINA NASCIMENTO CALLES

Doutora em Biotecnologia pelo Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). Universidade Federal de Alagoas – UFAL

GUILHERME BENJAMIN BRANDÃO PITTA

Professor Associado da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) orientador de doutorado RENORBIO - Rede Nordeste de Biotecnologia e mestrado e doutorado orientador em Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

ALDEMAR ARAÚJO DE CASTRO

Professor assistente da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) e Cirurgião Vascular Hospital Geral do Estado Oswaldo Brandão Vilela

ROSANE PEREIRA DOS REIS

Doutora em Biotecnologia pelo Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO). Universidade Federal de Alagoas – UFAL

DANIELE GONÇALVES BEZERRA

Professora Assistente da Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Doutora em Biologia Humana e Experimental. Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ
Brasil

Resumo

*A aterosclerose é resultante de uma série de respostas celulares moleculares altamente específicas, que tem como mecanismo uma resposta inflamatória e fibroproliferativa no endotélio de um vaso sanguíneo, que surge por resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima (hiperplasia miointimal). Nesta patologia é comum encontrar vasos arteriais comprometidos como a aorta, carótidas, renais, ilíacas e femorais. O objetivo desse estudo é determinar a diferença de média de hiperplasia miointimal em modelo experimental de aterosclerose tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* comparados com aqueles que não a usaram. Trata-se de um ensaio clínico randomizado com animais de experimentação, com animais de experimentação, com 12 semanas de seguimento, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Tiradentes,*

¹ The Mean Difference of Myointimal Hyperplasia in an Experimental Model of Atherosclerosis Treated with Zerumbet *Alpinia* Essential Oil

Maceió, sob o número 61-A (anexo). O presente estudo foi realizado no Centro de cirurgia experimental e biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Maceió – Alagoas, em parceria com o Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, na cidade de Aracaju – Sergipe. Conclui-se que a diferença da média de hiperplasia miointimal em modelo experimental de aterosclerose tratados com óleo essencial da Alpinia zerumbet comparados com aqueles que não a usaram é de 27,86%.

Palavras-Chave: Alpinia, Hiperplasia. Miointimal, Aterosclerose.

Abstract

Atherosclerosis is the result of a series of highly specific molecular cellular responses, which has as a mechanism an inflammatory and fibroproliferative response in the endothelium of a blood vessel, which arises in response to endothelial aggression, affecting mainly the intimal layer (myointimal hyperplasia). In this pathology it is common to find compromised arterial vessels such as the aorta, carotid, reinal, iliac and femoral vessels. The aim of this study is to determine the mean difference of myointimal hyperplasia in an experimental model of atherosclerosis treated with alpinia zerumbet essential oil compared to those who did not use it. This is a randomized clinical trial with experimental animals, with experimental animals, with 12 weeks of follow-up, approved by the Ethics Committee on Animal Research of Tiradentes University, Maceió, under number 61-A (annex). The present study was carried out at the Center for experimental surgery and bioterium of the State University of Health Sciences of Alagoas, Maceió - Alagoas, in partnership with the Institute of Technology and Research - ITP, in the city of Aracaju - Sergipe. It was concluded that the difference between the mean myointimal hyperplasia in an experimental model of atherosclerosis treated with alpinia zerumbet essential oil compared to those who did not use it is 27.86%.

Key words: Alpinia, Hyperplasia. Myointimal, atherosclerosis.

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é resultante de uma série de respostas celulares moleculares altamente específicas, que tem como mecanismo uma resposta inflamatória e fibroproliferativa no endotélio de um vaso sanguíneo, que surge por resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima (hiperplasia miointimal). Nesta patologia é comum encontrar vasos arteriais comprometidos como a aorta, carótidas, renais, ilíacas e femorais (Costa e Fagundes 2003, Bispo 2011).

A hiperplasia miointimal vascular corresponde a um estágio inicial da aterosclerose, precedendo a formação da placa. A presença e a gravidade do espessamento miointimal tem sido correlacionada à aterosclerose (Chequer et al. 2006). Em lesões ateroscleróticas, os componentes principais da placa fibrosa são células de músculo liso vascular, matriz extracelular e o colesterol extracelular (Ross e Glomset 1999).

Na patogenia da doença aterosclerótica, um conjunto de fatores de risco clássicos e emergentes tem sido correlacionado. Entre os principais fatores da lesão arterial, podem destacar a hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, tabagismo, obesidade, envelhecimento e fatores genéticos (Carvalho et al 2010, Bomfim et al. 2015).

Roman Junior (2013) ressalva em seu estudo que a inibição do edema de pata induzido por formol em ratos tratado com essências ou extrato etanólico da *Alpinia zerumbet*, sugere atividade anti-inflamatória. Desse modo, com achado supracitado é possível constatar que o uso das plantas medicinais pode possuir um resultado benéfico no perfil lipídico, além de ser uma alternativa acessível financeiramente as classes vulneráveis.

Entretanto, como na literatura existem poucas referências dos efeitos farmacológicos da *Alpinia zerumbet* na medicina popular, tornando-a um “enigma” em relação a sua composição química, cabe aos pesquisadores, investigar os constituintes deste vegetal e suas ações, antes que outros o façam, valorizando assim a nossa cultura e contribuindo na determinação das propriedades farmacológicas das plantas com potencial terapêutico.

Assim, pressupõe-se que a utilização do óleo essencial extraído das folhas verdes da *Alpinia zerumbet* tenha influência direta como protetor na hiperplasia miointimal em camundongos submetidos ao modelo de aterosclerose experimental, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma nova terapêutica, com um bioproduto para esse tipo de patologia.

Neste contexto, é relevante responder a pergunta de pesquisa: Qual a diferença da média de hiperplasia miointimal em modelo experimental de aterosclerose tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* comparados com aqueles que não a usaram? Sendo assim o presente estudo teve o objetivo de determinar a diferença de média de hiperplasia miointimal em modelo experimental de aterosclerose tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* comparados com aqueles que não a usaram.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um ensaio clínico randomizado com animais de experimentação, com 12 semanas de seguimento, aprovado pelo pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Tiradentes, Maceió, sob o número 61-A (anexo). O presente estudo foi realizado no Centro de cirurgia experimental e biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Maceió – Alagoas, em parceria com o Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, na cidade de Aracaju - Sergipe.

Foram incluídos camundongos da linhagem C57BL/6J (Paigen, Mitchell e Holmes 1987). E foram excluídos: Fêmeas; Idade menor que 28 dias; Animais doentes e Animais com alterações anatômicas das estruturas abordadas. O sorteio dos animais para cada grupo foi feito por aleatorização simples com auxílio do programa gratuito Research Randomizer, no site <http://www.randomizer.org/form.htm>, sendo quatro blocos com 08 (oito) números cada (Vieira 1984). Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais e a identificação do animal foi feita por meio de escrita à tinta azul indelével na cauda, com caneta tipo piloto permanente (*permanent mark*®), seguindo as marcações do QUADRO 01., visando melhor identificação da numeração do animal.

QUADRO 01. Identificação dos animais:

O camundongo foi marcado pela cauda, então para melhor identificação foi realizado esse processo de marcação com caneta permanente de cores azul ou preta, onde foram pintados em formas de listras finas e grossas, então as listras , que são finas e em azul, equivale a 1, e as listras mais grossas e , em preto, equivale a 3, sendo assim se fez o somatório para identificar os animais.

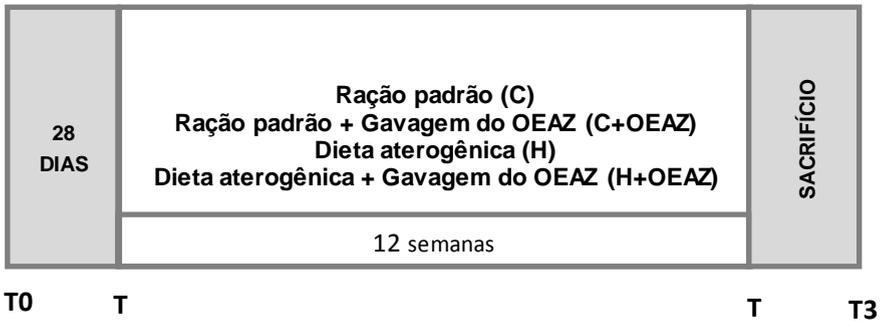
Optou-se pelo manejo fechado dos animais e a experimentação foi realizada no próprio biotério da UNCISAL, onde se dispunha de ambiente propício para os mesmos, com sistema de ventilação exaustão forçado, períodos de luminescência controlada, temperatura média de 20°C, ruído mínimo e umidade em torno de 50%. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e individualizadas.

No manejo dos animais, os animais do **GRUPO CONTROLE (C)** receberam a ração comercial da marca Presence Ratos e Camundongos®, que constitui uma dieta padrão do biotério, produzida pela AgribRANDS Purina do Brasil, LTDA, *ad libitum*, já o **GRUPO CONTROLE+ÓLEO ESSENCIAL DA ALPINIA ZERUMBET (C+OEAZ)** se alimentou com a mesma ração comercial *ad libitum* e mais a administração oral do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*. Todos os procedimentos foram realizados durante as 12 semanas do experimento.

Os camundongos foram pesados no início e ao término do experimento em balança digital de precisão para avaliação da variação do peso, a calibragem foi feita antes da pesagem de cada um dos animais.

Iniciou-se a pesquisa com 32 animais, onde os animais após 28 dias iniciais foram desmamados, e foi seguido do período experimental por 12 semanas de seguimento e o sacrifício, como demonstrado no quadro abaixo (QUADRO 02)

QUADRO 02. Delineamento experimental:



O camundongo é marcado pela cauda, então para melhor identificação foi realizado esse processo de marcação com caneta permanente de cores azul ou preta, onde são pintados em formas de listras finas e grossas, então as listras , que são finas, equivale a 1, e as listras mais grossas, equivale a 3, sendo assim faz o somatório para identificar os animais. 

Onde: T0 é o tempo inicial do estudo, T1 é o início dos procedimentos, T2 o início do sacrifício, T3 seu término.

Preparo e administração da dieta aterogênica:

A ração ofertada *ad libitum* aos grupos: **GRUPO CONTROLE (C)** e **GRUPO CONTROLE+ÓLEO ESSENCIAL DA ALPINIA ZERUMBET (C+OEAZ)** foi a de marca PRESENCE ratos e camundongos® e para os outros 02 grupos: **GRUPO HIPERLIPIDÊMICO (H)** e o **GRUPO HIPERLIPIDÊMICO TRATADOS (H+OEAZ)** foi confeccionada na PRAGSOLUÇÕES® (biociências), a dieta aterogênica composta por 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e 15% de gordura, conforme descrito no laboratório Jackson (Paigen et al. 1985; Paigen et al. 1987).

Extração do óleo essencial *Alpinia zerumbet*:

A extração do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* foi realizada em parceria com ITP – Aracaju (SE), onde as folhas e caules da *Alpinia zerumbet* foram coletadas as 5 horas as manhã, após um ano e meio de vida, no mínimo, para certificação de extração sustentável. O extrator

para a destilação se encontra a 5 Km do plantio para assegurar mínima perda de óleo por evaporação.

Procedimentos e grupos:

O grupo **CONTROLE (C)** recebeu a ração padrão da Presence Ratos e Camundongos®, *ad libitum*.

O grupo **HIPERLIPIDÊMICO (H)** recebeu a ração confeccionada na PRAGSOLUÇÕES® (biociências) sendo a dieta aterosclerótica com 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e gordura de 15%, ofertada *ad libitum* durante 12 semanas (Paigen et al. 1990).

O grupo **HIPERLIPIDÊMICO** tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (**H+OEAZ**) recebeu a ração confeccionada na PRAGSOLUÇÕES® (biociências) sendo a dieta aterosclerótica com 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e 15% de gordura (Paigen et al. 1985), ofertada *ad libitum* durante 12 semanas e foi ofertado por gavagem a dose de 100mg/kg do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* todos os dias para os animais deste grupo.

No grupo **CONTROLE** tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (**C+OEAZ**), os animais se alimentavam com a ração padrão da Presence Ratos e Camundongos®, *ad libitum* e ainda foi ofertado por gavagem a dose de 100mg/kg do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* todos os dias para os animais deste grupo.

Sacrifício:

Os procedimentos foram administrados por um período de 12 semanas, ao término os animais foram anestesiados usando ketamina e xilasina (Aguila e Lacerda 2003) e foi coletado amostra de cerca de 1mL sangue através de punção cardíaca para dosagem do perfil lipídico, e foi coletada por via transabdominal a artéria aorta torácica descendente de todos os animais.

Análise histológica e morfométrica:

As peças arteriais foram fixadas em formalina a 10% por no mínimo 24 horas e em seguida foram levadas para o preparo rotineiro de lâminas histológicas para microscopia óptica: desidratação gradativa e crescente de álcool a 70% até o álcool absoluto – diafanização em xilol crescentes e embebição em parafina líquida a 60°C, e preparação dos

blocos de parafina. Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo com espessura de 03 (três) μm e os cortes montados em lâminas de vidro extra-finas (76 x 25 mm), em seguida foram coradas com HE (hematoxilina-eosina) para estudo da morfologia geral e da espessura da túnica média da artéria torácica (Asada et al. 1996; Rolim 2012; Nogueira 2012), a qual foi usada para os vasos dos animais e em seguidas montadas com lamínulas e resina natural. Outras lâminas (usando lâminas silanizadas) foram preparadas para imunohistoquímica.

- **Densidade de superfície de lamelas (Sv[lam]):** Fazendo uso da estereologia foram analisados 32 campos por grupo usando videomicroscopia (4 campos por lâmina). Um sistema de teste de arcos cicloides foi fixado na tela do monitor e calibrado. O número de intersecções das lamelas com os arcos cicloides (IL) foi contado em cada um dos 4 campos em cada corte por animal (40x), para estimar a densidade de superfície das lamelas através da fórmula: $SV[\text{lamelas}] = 2I[\text{lamelas}]/LT$, conforme Pereira, Bezerra e Mandarin-de-Lacerda 2004. Onde I[lamelas]: número total de intersecções das lamelas com os arcos cicloides, e o LT: foi o comprimento da linha pré-determinado no sistema teste utilizado (Pereira, Bezerra e Mandarin-de-Lacerda 2004).

3. RESULTADOS

Foram utilizados tabelas e gráficos para a apresentação dos dados.

3.1 Variáveis

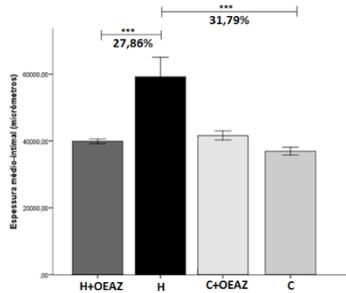
3.1.1 Variável primária

- ESPESSURA MÉDIO-INTIMAL

Animais do grupo HIPERLIPIDÊMICO tratados com o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (**H+OEAZ**) obtiveram redução de 27,86% na espessura médio-intimal quando comparados com os valores do grupo hiperlipidêmico (**H**), com $p < 0,001$. Já os animais do grupo CONTROLE (**C**) apresentaram redução em 31,79% na espessura médio-intimal quando comparados com os valores do grupo HIPERLIPIDÊMICO (**H**),

com $p < 0,001$; como demonstrado no gráfico abaixo (GRÁFICO 01). Pode-se evidenciar isso também nas figuras 04, 05, 06 e 07.

GRÁFICO 01. Diferença dos valores da espessura médio-intimal¹ em micrômetros entre os grupos estudados, com * $p < 0,001$:**



¹Essa variável não atendeu ao pressuposto da homocedasticidade e foi submetida ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn. Estão apresentados como mediana e intervalo interquartilico (com o intervalo entre o quartil 1 e o quartil 3, ou entre o valor 25% e o 75% do grupo).

Com *** $p < 0,001$;

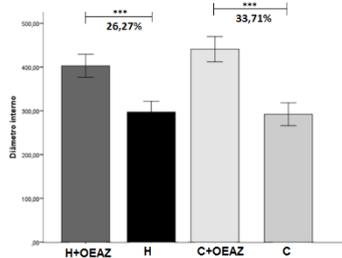
3.3 Variáveis

3.3.2 Variáveis secundárias

- DIÂMETRO INTERNO

Animais do grupo HIPERLIPIDÊMICO tratados com o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (**H+OEAZ**) obtiveram aumento de 26,27% no diâmetro interno quando comparados com os valores do grupo HIPERLIPIDÊMICO (**H**), com $p < 0,001$. Já os animais do grupo CONTROLE tratados com óleo essencial *Alpinia zerumbet* (**C+OEAZ**) apresentaram um aumento em 33,71% na espessura médio-intimal quando comparados com os valores do grupo CONTROLE (**C**), com $p < 0,001$; como demonstrado no gráfico abaixo (GRÁFICO 02).

Gráfico 02. Diferença dos valores médios do diâmetro interno¹, * p < 0,001:**

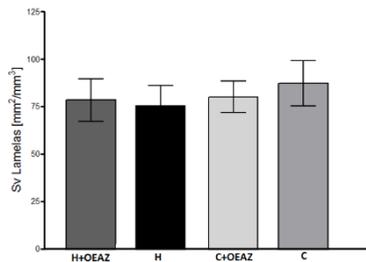


p-valor para análise de variância de 1 fator, com post hoc de Tukey-HSD, com ***p < 0,001;

- DENSIDADE DE SUPERFÍCIE DAS LAMELAS ELÁSTICAS (Sv)

Na comparação da densidade de superfície das lamelas elásticas não houve diferença significativa entre os grupos (p = 0,22), conforme GRÁFICO 03.

Gráfico 03. Comparação dos valores médios da densidade de superfície das lamelas elásticas entre os grupos, com p = 0,22:



p-valor para análise de variância de 1 fator, com post hoc de Tukey-HSD, com p = 0,22.

- POSITIVIDADE DO MARCADOR C4D

Na análise da expressão do marcador C4D pelo patologista a intensidade de maior expressão foi para o grupo (H), considerado fortemente marcado. O grupo (C) foi considerado de moderada expressão do marcador e o grupo (H+OEAZ) foi considerado com fraca expressão e por final o grupo (C+OEAZ) foi considerado com negativa expressão do marcador, conforme visto na Figura 01.

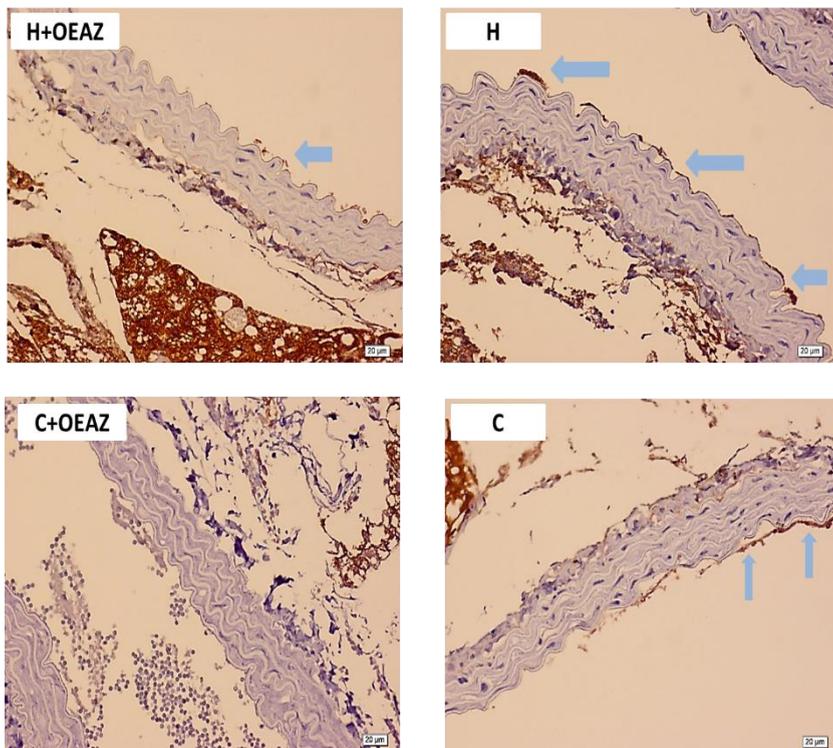


Figura 01. Fotomicrografia com o marcador C4D foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): **(H)** grupo HIPERLIPIDÊMICO, **(H+OEAZ)** grupo HIPERLIPIDÊMICO tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, **(C)** grupo CONTROLE, **(C+OEAZ)** grupo CONTROLE tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*.

Corte transversal. Objetiva de 40x.

- POSITIVIDADE DO MARCADOR CD34

Quanto à intensidade de expressão do marcador CD34 a intensidade de maior expressão foi para o grupo **(H)** considerado forte, no grupo **(C+OEAZ)** foi considerado de moderada expressão e nos grupos **(H+OEAZ)** e **(C)** tiveram fraca expressão do marcador, conforme se verifica na Figura 02.

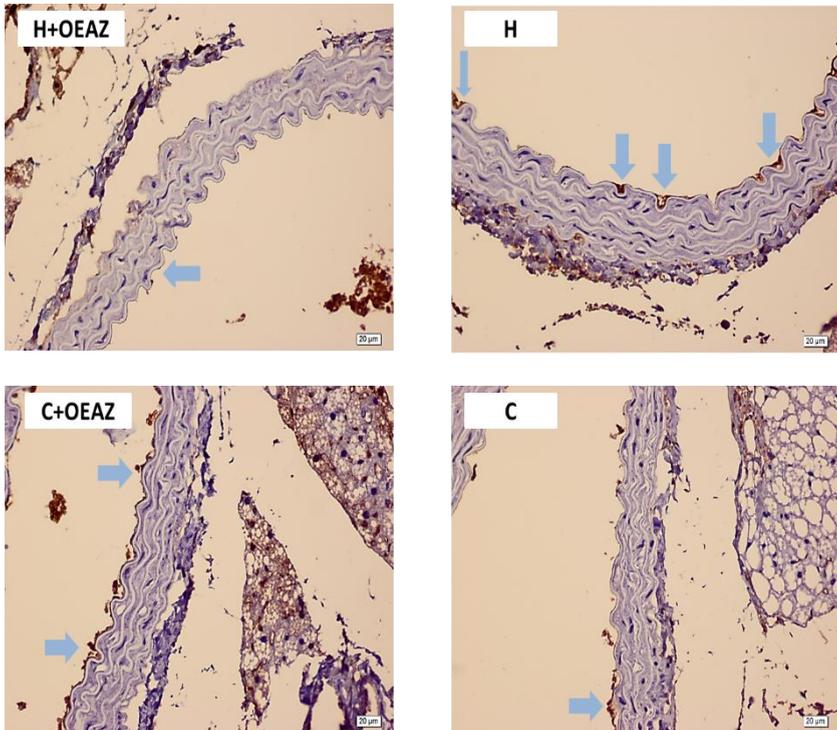


Figura 02. Fotomicrografia com o marcador CD34 foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): **(H)** grupo HIPERLIPIDÊMICO, **(H+OEAZ)** grupo HIPERLIPIDÊMICO tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, **(C)** grupo CONTROLE, **(C+OEAZ)** grupo CONTROLE tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*. Corte transversal. Objetiva de 40x.

- POSITIVIDADE DO MARCADOR HHF-35

Quanto à expressão do marcador HHF-35, a expressão foi para o grupo **(H)**, considerado fortemente marcado na íntima, já os grupos **(H+OEAZ)**, **(C+OEAZ)** e **(C)** tiveram fraca expressão do marcador na íntima conforme visto na Figura 03.

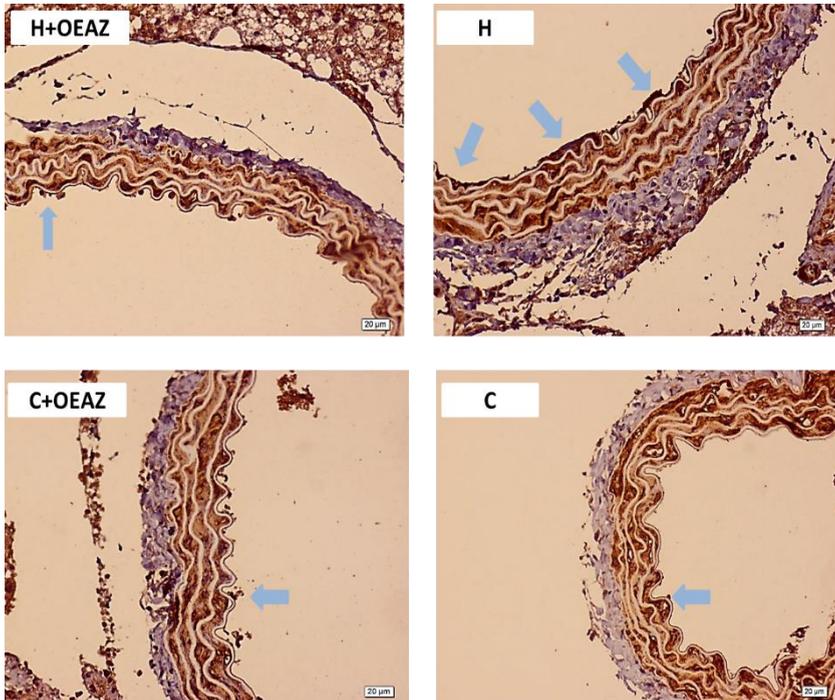


Figura 03. Fotomicrografia com o marcador HHF-35 foi positivamente expresso na parte descendente da aorta (musculatura lisa da túnica média e íntima): **(H)** grupo HIPERLIPIDÊMICO, **(H+OEAZ)** grupo HIPERLIPIDÊMICO tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, **(C)** grupo CONTROLE, **(C+OEAZ)** grupo CONTROLE tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet*. Corte transversal. Objetiva de 40x.

4. DISCUSSÃO

A aterosclerose é a principal causa de doença cardíaca e acidente vascular cerebral. Atualmente, apesar de alguns avanços recentes na terapia de aterosclerose, as principais opções terapêuticas ainda apresentam as suas desvantagens. Por isso é necessário pesquisas inovadoras para identificar agentes eficazes e assim desenvolver novas estratégias terapêuticas para o tratamento desta doença mortal.

Neste estudo utilizou-se como modelo animal o camundongo, e o mesmo é o modelo animal mais utilizado para o estudo do metabolismo dos lipídios, disfunção endotelial e aterosclerose (Borges 2011). Sabe que apesar das diferenças entre os seres humanos e os

camundongos, os mesmos possuem uma aproximação entre os conjuntos de genes, e a utilização dos camundongos como modelo experimental apresentam algumas facilidades como o curto período de reprodução, tamanho pequeno e boa manipulação (Moghadasian 2002). Nesse estudo utilizou-se um protocolo de indução de aterosclerose experimental descrito por Paigen et al., em 1985, onde o mesmo utilizou uma dieta aterosclerótica composta por: 0,5% de ácido cólico, 1,25% de colesterol e 15% de gordura durante 14 semanas em camundongos C57BL6J, porém no estudo Paigen conseguiu verificar que a partir de 7 semanas de exposição a essa dieta já houve ocorrência de lesão e que isso aumenta com a duração da exposição a dieta, sendo um modelo experimental muito utilizado em estudos de disfunção endotelial, partindo disso o nosso estudo utilizou-se da dieta por 12 semanas como protocolo.

Kimura et al., (1966) através da análise da composição química da *Alpinia zerumbet* identificou que a planta em suas folhas possuem compostos como alcaloides, flavonoides, catequina e epicatequina. Porém, quando se trata dos constituintes do óleo essencial, Fujita e Yamashita (1973) encontraram principalmente mono e sesquiterpenos, com altas concentrações de cineol e terpineno, rutina, derivados do kaempferol e taninos.

A partir disso, diversas pesquisas foram realizadas com a finalidade de determinar a atividade biológica destes constituintes. Mpalantinos et al., (1998), por exemplo, procurou isolar o diidro-5,6-deidrokaavaína (DDK), flavonóides, e 5,6-deidrokaavaína, do extrato aquoso das folhas de *Alpinia zerumbet*. Após isto, verificaram que os flavonóides identificados como rutina, campferol-3-O-rutinosídeo, campferol-3-Oglucuronido, catequina e epicatequina são substâncias que contribuem para as atividades hipotensora, diurética e antiulcerogênica do extrato aquoso da planta, e que o 5,6-deidrokaavaína e o DDK atuam como antiulcerogênico e antitrombótico.

O óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na dosagem proposta reduziu de forma significativa a espessura miointimal dos animais sob dieta hiperlipidêmica (gráfico 01), isto se deve ao fato do óleo possuir em sua composição terpinen-4-ol; 1,8-cineol; γ -terpineno e p-cimeno, sendo relatados na literatura por possuírem efeitos hipotensores (Lahlou et al. 2003; Shen et al. 2012; Da Cunha et al., 2013) e assim

existe um crescente consenso sobre as suas respostas vasorrelaxantes ou até mesmo sob os efeitos nas células endoteliais (De Moura et al. 2005; Da Cunha et al. 2013) ou nas células vasculares musculares lisas (Lahlou et al. 2003).

Outro fator que tem sido relatado é que os terpenos causam inibição à modificação oxidativa do LDL-c in vitro, onde os mesmos também estão presentes na composição química da *Alpinia zerumbet* (Odbayar et al. 2006), em outro estudo com Shen et al. em 2012 o OEAZ conseguiu reduziu os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas no plasma, corroborando com esses dados Chen et al. em 2014 avaliou o efeito protetor do OEAZ derivados dos frutos da alpinia e conseguiu verificar também uma redução da ação da LDL oxidase e assim diminuir a apoptose em células endoteliais da aorta humana, destacando assim seu potencial na prevenção do dano endotelial contribuindo também para essa diminuição da espessura encontrada neste estudo, porém ainda não foi esclarecido o mecanismo de ação para isso.

Essa diminuição da espessura miointimal da aorta dos camundongos seria importante, pois concorda com o estudo onde descrevem que o aumento do espessamento da camada miointimal é um importante parâmetro para caracterizar a doença aterosclerótica generalizada, principalmente da doença arterial coronariana precoce, onde o aumento da espessura da túnica média e íntima da artéria carótida, por exemplo, está relacionado com a maioria dos fatores de risco cardiovasculares em humanos (Engelhorn et al. 2006).

Alguns estudos demostram a resposta hipotensora com a utilização do OEAZ que pode ser resultado da sua ação vasodilatadora diretamente sobre o músculo liso vascular, o que pode ter relação com os resultados deste trabalho, onde ocorreu um aumento do diâmetro da luz do vaso dos grupos onde foi utilizado o OEAZ em comparação com aqueles que não utilizaram. Para Lahlou et al. em 2003, observaram que a atividade hipotensora do terpineno-4-ol presente no OEAZ, ocorreu independente da presença funcional do sistema nervoso simpático sugerindo assim uma ação periférica com vasodilatação.

Já no estudo de Moura et al., 2005 com o extrato de folhas da *Alpinia zerumbet* em ratos tratados com acetato de desoxicorticosterona (DOCA) houve vasodilatação com o aumento da produção de óxido

nítrico (NO) ou *monofosfato cíclico de guanosina* (GMPc), que segundo Vanhoutte et al. em 2017, considera-se o NO um radical livre anti-aterosclerótico por inibir a adesão de monócitos às células endoteliais e assim inibir a proliferação de células de músculo liso, além de sua ação como vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária.

Segundo Da Cunha et al. em 2013, esses componentes do OEAZ inibiram os canais de cálcio (Ca^{2+}) dos anéis da aorta torácica de ratos, o que causa uma hipotensão por vasodilatação. Já para Moura et al. em 2005, nos vasos mesentéricos, essa ação vasodilatação é independente de canais de potássio, voltagem-dependente e ATP-dependente, mas que pode ocorrer via formação de óxido nítrico (NO) e formação de GMPc no músculo liso, como segundo mensageiro e que ainda deve possuir a participação de receptores de bradicinina (via bradicinina/NO/GMPc). Dessa forma, a ativação dos receptores de bradicinina induziriam a produção de NO pelo endotélio que, por sua vez, ativaria a guanililciclase a produzir GMPc através de GTP Como consequência do aumento intracelular deste segundo mensageiro, desencadeia-se uma sequência de fosforilações proteicas culminando na redução intracelular de cálcio e conseqüentemente no relaxamento da musculatura lisa vascular (Vanhoutte et al. 2017), o que com os nossos resultados encontrados

O resultado dessa pesquisa não apresentou efeito significativo na glicemia e no perfil lipídico, ao contrário do trabalho de Lin et al. em 2008 que conseguiu avaliar a ação hipolipidêmica ao uso do OEAZ e ao pó das sementes, em um grupo de hamsters alimentados com dieta rica em colesterol, confirmaram um efeito hepatoprotetor tendo ação na redução do colesterol total e dos triglicerídeos e da capacidade de elevação do HDLc . No estudo de Tu e Tawata em 2014, quanto à glicemia relatam um efeito hipoglicemiante ao uso da *Alpinia zerumbet*, discordando do nosso estudo.

O início e a progressão do processo aterosclerótico são regulados por mecanismos inflamatórios e está relacionada ao aumento na circulação sanguínea de marcadores inflamatórios, caracterizando um estado de inflamação crônica. A etapa inicial da aterosclerose é o recrutamento de monócitos e células T para a parede do vaso. As moléculas de adesão são proteínas de superfície celular que são expressas em pequenas quantidades pelas células endoteliais e sua

expressão está muito aumentada na presença de citocinas inflamatórias. Assim, monócitos e linfócitos expressam moléculas de adesão em resposta à expressão endotelial, são ativados, sofrem rolamento seguido de adesão, transmigram para a camada íntima arterial perpetuando a resposta inflamatória. Os macrófagos expressam receptores para lipoproteínas modificadas, englobando partículas minimamente oxidadas (Vanhoutte et al. 2017).

5. CONCLUSÃO

A diferença da média de hiperplasia miointimal em modelo experimental de aterosclerose tratados com óleo essencial da *Alpinia zerumbet* comparados com aqueles que não a usaram é de 27,86%.

REFERÊNCIAS

1. AGUILA, M.B.; LACERDA, C.A.M. "Aorta wall quantitative alterations due to different long-term high-fat diet in rats". *Food and chemical Toxicology*. v. 41, p. 1391- 1397, 2003.
2. ASADA, Y. et al. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. *Atherosclerosis*. v. 121, n. 1, p. 45-53, 1996.
3. BISPO, F.R.M. Efeitos da Leucoantociniadinina de uva sobre a camada subendotelial arterial em coelhos albinos (*Oryctolagus Cuniculos*) submetidos à aterosclerose experimental. 96 f. Mestrado. (Ciências da Saúde). Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2011.
4. BOMFIM, E.S. et al. Fatores de riscos associados à aterosclerose em pacientes portadores de hipertensão e diabetes. *Caderno Saúde e Desenvolvimento*. v. 7, n. 4, 2015.
5. BORGES, J.C.A. Características estruturais e funcionais das células endoteliais: Revisão da Literatura. 44 f. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2011.
6. CARVALHO, A.C.A. et al. Desenvolvimento de placas de ateroma em pacientes diabéticos e hipertensos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. v. 9, Supl. 1, p. 73-77, 2010.
7. CHEN, Y.; DUO, L.; YINI, X. et al. Essential Oils from *Fructus A. zerumbet* Protect Human Aortic Endothelial Cells from Apoptosis

- Induced by Ox-LDL In Vitro. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2014, p. 9 -18, 2014.
8. CHEQUER, G. et al. Espessamento médio-intimal da carótida e função endotelial na doença arterial coronariana. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 87, n. 2, p. 84-90, São Paulo, 2006.
 9. DA CUNHA, G.H.; DE MORAES, M.O.; FECHINE, F. V.; FROTA BEZERRA, F.A.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K. M. et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. Vascular Pharmacology. v. 58, p. 337–345, 2013.
 10. DE MOURA, R.S. et al. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 46, p. 288–294, 2005.
 11. ENGELHORN, C.A. et al. Espessamento médio-intimal na origem da artéria subclávia direita como marcador precoce de risco cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 87, n. 5, p. 609-614, 2006.
 12. GHIS, G.L.M. et al. Exercício físico e disfunção endotelial. Arquivos Brasileiros de. Cardiologia. v. 95, n. 5, 2010.
 13. LAHLOU, S. et al. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. v. 17, n. 3, p. 323-330, 2003.
 14. LIN, C.H. et al. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Research Support, Non-U.S. Gov't*. v. 135, n. 4, p. 714-725, 2008.
 15. MOGHADASIAN, M.H. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Science*, v. 70, p. 855-865, 2002.
 16. MOURA, R.S. et al. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 46, n. 3, p. 288-294, 2005.
 17. MPALANTINOS, M.A. et al. Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. *Phytotherapy Research*. v. 12, p. 442-444, 1998.
 18. NOGUEIRA, M.R.S. Diferença da média de hiperplasia médio-intimal pós angioplastia na artéria ilíaca de coelhos tratados com extrato seco da *Curcuma longa*. Dissertação. Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.
 19. ODBAYAR, T.O. et al. Comparative studies of some phenolic compounds (quercetin, rutin, and ferulic acid) affecting hepatic

- fatty acid synthesis in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 54, p. 8261– 8265, 2006.
20. PAIGEN, B. et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. v. 57, n. 1, p. 65-73, 1985.
 21. PAIGEN, B.; MITCHELL, D.; HOLMES, P.A. Genetic analysis of strains C57BL/6 and BALBk to confirm the map position of Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility. *Biochemical Genetic*, v. 25, p. 881-892, 1987.
 22. PAIGEN, B., et al., Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis*. v. 10, n. 2, p. 316-323, 1990.
 23. PEREIRA, L.M.; BEZERRA, D.G.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathology - Research and Practice*. v. 200, n. 3, p. 211-217, 2004.
 24. ROLIM, J.C. Diferença da hiperplasia miointimal em coelhos submetidos a angioplastia e tratados com Moringa Oleifera. 82 f. Mestrado. (Ciências Cirúrgicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2012.
 25. ROMAN JUNIOR, W.A. Estudo farmacognóstico para as espécies medicinais: *Alpinia zerumbet*, *Solidago chilensis* e *Eugenia uniflora*. 191 f. Doutorado. (Ciências da Saúde). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
 26. ROSS, R.; GLOMSET, J.A. The pathogenesis of atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. v. 29, p. 369, Boston, 1976.
 27. SHEN, X.C.; TAO, L.; LI, W.K.; et al. Evidencebased antioxidant activity of the essential oil from *Fructus A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells' injury induced by ox-LDL. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, p. 174, 2012.
 28. TU, P.T.B.; TAWATA, S. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules*, v. 19, p. 16656-16671, 2014.
 29. VANHOUTTE, P.M.; SHIMOKAWA, H.; FELETOU, M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, v. 219, p. 22–96, 2017.
 30. VIEIRA, S. Metodologia científica para a área de saúde. 1º edição. Editora Sarvier. São Paulo. 1984.