

## **Análise Estereológica Cardiorrenal de Coelhos Hiperlipidêmicos Tratados com *Moringa Oleífera* in Natura Comparados com a Atorvastatina<sup>1</sup>**

TAYANE NASCIMENTO DA SILVA

LAILA ISIS COSTA LIMA

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

ROSANE PEREIRA DOS REIS<sup>2</sup>

Doutoranda em Biotecnologia pelo Programa de Doutorado em Biotecnologia

Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)

Universidade Federal de Alagoas –UFAL

DANIELE GONÇALVES BEZERRA

Professora Adjunta da Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Doutora em Biologia Humana e Experimental

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil

CAMILA ALBUQUERQUE MELO DE CARVALHO

Professora Titular I do Centro Universitário Barão de Mauá

Doutora em Ciências Médicas pelo Departamento de Cirurgia e Anatomia

Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brasil

### **Resumo:**

*A mortalidade anual devido às doenças do coração é de aproximadamente 17 milhões de pessoas, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, os medicamentos considerados mais eficazes no tratamento do nível elevado do colesterol são as estatinas. Um dos tratamentos alternativos às estatinas é um extrato folhear cuja origem é a Moringa oleífera (M.O.). A M.O. é uma árvore que cresce amplamente em muitos países tropicais e subtropicais. O objetivo deste estudo foi comparar a estereologia cardiorrenal de coelhos hiperlipidêmicos tratados com Moringa oleífera in natura versus tratados com a atorvastatina. Foram incluídos 30 coelhos machos da espécie *Oryctolagus cuniculus* da linhagem Nova Zelândia.*

---

<sup>1</sup> Cardiorrenal Stereological Analysis of Hyperlipidemic Rabbits Treated with in Natura Oilyage Moringa Compared with Atorvastatin

<sup>2</sup> Corresponding author: rosane\_pr@hotmail.com

*Inicialmente os coelhos foram submetidos à aterosclerose experimental com administração de gema de ovo durante 100 dias. Posteriormente, os coelhos foram separados em três grupos e submetidos ao tratamento durante 35 dias, grupo: Controle Negativo [CN], onde os animais receberam soro fisiológico 0,9%; grupo *Moringa oleífera* [MoN], onde os animais receberam o extrato das folhas in natura de M.O (400mg/Kg); e o grupo controle positivo [CP], a atorvastatina (10mg/dia). Após a eutanásia, o rim e coração do animal foram analisados. O resultado do estudo comparativo morfológico através da estereologia estabelecido não observou diferença significativa entre os grupos CN (controle negativo - soro fisiológico 0,9%), MoN (extrato das folhas de M.O.) e CP (controle positivo - atorvastatina) apontando para a necessidade de estudos com outras dosagens das substâncias.*

**Palavras-chave:** *Moringa Oleífera*, Atorvastatina, Coelho Hiperlipidêmico, Morfometria, Estereologia.

**Abstract:**

*Annual mortality from heart disease is approximately 17 million people, according to the World Health Organization (WHO). Currently, the most effective drugs in the treatment of high cholesterol levels are statins. One of the alternative treatments to statins is a leaf extract whose origin is the Oleiferous Moringa (M.O.). M.O. is a tree that grows widely in many tropical and subtropical countries. The aim of this study was to compare the cardiorenal stereology of hyperlipidemic rabbits treated with *Moringa oleífera* in natura versus treated with atorvastatin. Thirty male rabbits of the species *Oryctolagus cuniculus* of the New Zealand strain were included. Initially, the rabbits were submitted to experimental atherosclerosis with egg yolk administration for 100 days. Subsequently, the rabbits were separated into three groups and submitted to treatment for 35 days, group: Negative Control [CN], where the animals received 0.9% saline; *Moringa oleífera* group [MoN], where the animals received the extract of the leaves in natura of M.O (400mg/Kg); and the positive control group [CP], atorvastatin (10mg/day). After euthanasia, the kidney and heart of the animal were analyzed. The result of the morphological comparative study through the established stereology did not observe significant difference between*

*the cn groups (negative control - saline 0.9%), MoN (extract of the leaves of M.O.) and CP (positive control - atorvastatin) pointing to the need for studies with other dosages of the substances.*

**Keywords:** Moringa Oleífera, Atorvastatin, Hyperlipidemic Rabbit, Morphometry, Steorology.

## INTRODUÇÃO

Cerca de 40% dos brasileiros tem hiperlipidemia e, aproximadamente, 17 milhões de pessoas morrem em todo o mundo devido às doenças do coração, segundo a Organização Mundial da Saúde. No Brasil a mortalidade é alta cerca de 300 mil pessoas por ano - em decorrência de infartos e acidentes vasculares encefálicos. Os altos níveis de colesterol no sangue contribuem diretamente para a aterosclerose e infarto (Schmidt et al. 2011). Atualmente os medicamentos mais eficazes no tratamento do nível elevado do colesterol são as estatinas e, entre elas, a mais utilizada é a atorvastatina (Campo e Carvalho 2007).

A atorvastatina cálcica na forma de comprimidos revestidos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA é indicada para tratamento da hipercolesterolemia isolada ou associada à hipertrigliceridemia. Uma planta medicinal alternativa que tem sido testada é a *Moringa oleífera* (M.O), um recurso natural e mais acessível a toda população. Árvore originária da Índia que pertence à família *Moringaceae*, contém uma grande quantidade de antioxidantes naturais, como catalase, polifenol e ácido ascórbico. É uma planta considerada medicinal pelo seu alto valor nutricional e que também é utilizada para fins industriais (Goyal et al. 2007).

Com sua grande propriedade fitoquímica a M.O. desempenha um papel importante em seu modo de ação contra as doenças e são consideradas úteis no tratamento de estresse oxidativo (Chang, Lin e Lai 2012). As folhas de M.O. contêm alcalóides, glicosídeos, flavonóides, compostos fenólicos, saponinas, esteróides e taninos (Mensah et al. 2012), com seu alto teor em substâncias antioxidantes, o seu uso em pacientes com inflamações diversas, câncer, hipertensão, doenças

cardiovasculares, reumatismo e transtornos renais tem aumentado (Farooq et. al. 2012).

Esse estudo teve como objetivo, analisar a morfologia renal e cardíaca através da esteorologia para determinar a diferença do perfil lipídico de coelhos hiperlipidêmicos tratados com extrato aquoso de folhas de *Moringa oleífera* comparados com atorvastatina.

## MÉTODOS

O estudo morfométrico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), Maceió/AL. Os animais foram mantidos no biotério da instituição em condições ideais, com ração e água *ad libitum* antes e durante o experimento.

Foram incluídos 15 coelhos machos adultos jovens (12 meses de idade) com peso corporal maior que 2Kg, da espécie *Oryctolagus cuniculus* da linhagem Nova Zelândia. Inicialmente os coelhos colocados em gaiolas individuais e submetidos à aterosclerose experimental através da administração via oral de 10 ml de gema de ovo duas vezes ao dia durante 100 dias. O sorteio dos animais foi realizado aleatoriamente para cada grupo, por permutação de bloco com o auxílio de um programa gratuito (Research Randomize), sendo 3 blocos com 5 números. Cada bloco correspondeu a um grupo a ser estudado com intervenções diferentes: CN (controle negativo - soro fisiológico 0,9%), MoN (extrato das folhas de M.O.), CP (controle positivo - atorvastatina) e, os números gerados foram dos coelhos que comporão cada grupo.

Para obtenção do extrato de folhas *in natura* (MoN), o pó de folhas (500 g) foi homogeneizado com água destilada (1 L) e após agitação, a mistura foi filtrada em papel de filtro. O filtrado correspondeu ao extrato de folhas *in natura* (MoN).

Após os 100 dias iniciais, os coelhos foram tratados durante 35 dias nos grupos previamente selecionados após randomização: CN (soro fisiológico 0,9%), MoN (extrato das folhas *in natura* de M.O - 400mg/Kg), e CP (atorvastatina - 10mg/dia). A dose da atorvastatina foi baseada no estudo de Jorge et al. (2005). Após o período do tratamento, os coelhos foram sacrificados com dose letal de propofol na dose de

150mg/kg endovenosa, segundo orientação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea 2013).

Após a eutanásia, o coração e o rim do animal foram coletados e pesados através do método de Scherle (Scherle 1970). Após pesagem, foram mantidos em solução de formaldeído a 10% por até 48h e seguiram rotina histológica até a coloração das lâminas com Tricrômio de Masson.

Para a análise estereológica foi feito o uso de um sistema de vídeo-microscopia e de um sistema-teste de pontos e linhas proibidas. No coração, foram analisados: densidade de volume (Vv) de cardiomiócitos; densidade de volume (Vv) de Interstício e densidade de volume (Vv) de vasos. No rim, foi analisado o seguinte parâmetro: volume glomerular médio ponderado. (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Os dados estereológicos foram testadas pela ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis e depois pelo teste de Tukey's. Em todos os casos o nível de significância  $p \leq 0,05$  foi considerado.

## RESULTADOS

### CORAÇÃO

O resultado do estudo morfométrico no coração está representado pela Figura 1, onde foi possível observar no parâmetro morfométrico estabelecendo que não houve diferença significativa entre os grupos CN (controle negativo - soro fisiológico 0,9%), MoN (extrato das folhas de M.O.) e CP (controle positivo - atorvastatina).

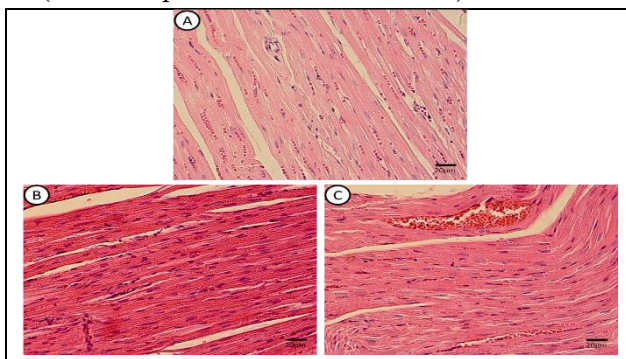


Figura 1: Fotomicrografias do ventrículo esquerdo de coelhos objetiva de 40x; onde estão representados: A) Salina; B) Moringa; C) Atorvastatina.

Fonte: Autores.

Na figura 2 é possível observar a estabilidade dos diferentes grupos. Neste parâmetro não houve diferença significativa em relação á densidade de comprimentos de vasos do coração; densidade de volume de cardiomiócitos e vasos dos grupos.

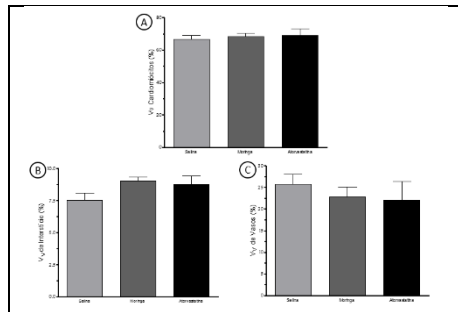


Figura 2. Análise estereológica do ventrículo esquerdo, onde estão representados: A) densidade de volume (Vv) de cardiomiócitos; B) ) densidade de volume (Vv) de Interstício; C) densidade de volume (Vv) de vasos. Dados apresentados em média  $\pm$  DP. Neste parâmetro não houve diferença significativa entre os grupos, considerando  $p \leq 0,05$ .

Fonte: Autores.

## RIM

O resultado do estudo comparativo do rim está representado na Figura 3. Em A(CN), B(MoN) e C(CP) é possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos CN (controle negativo - soro fisiológico 0,9%), MoN (extrato das folhas de M.O.) e CP (controle positivo - atorvastatina).

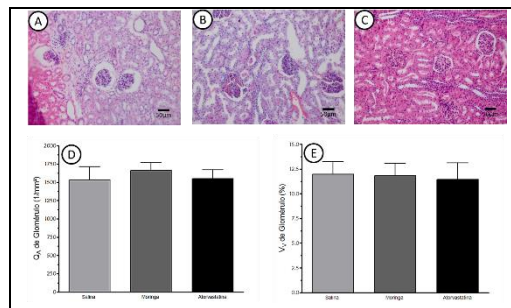


Figura 3: Análise comparativa dos glomérulos, dos grupos CN (controle negativo - soro fisiológico 0,9%), MoN (extrato das folhas de M.O.) e CP (controle positivo - atorvastatina). As imagens representam os grupos estudados e descritos nos gráficos A(salina), B(Moringa) e C(Atorvastatina) mostram glomérulos do rim.

Fonte: Autores.

Comparando-se os grupos estudados tanto do rim como no coração na figura 1, 2 e 3 é possível notar na forma de gráficos a estabilidade de cada grupo CN (controle negativo - soro fisiológico 0,9%), MoN (extrato das folhas de M.O.) e CP (controle positivo - atorvastatina).

## DISCUSSÃO

Estudos clínicos demonstraram os efeitos benéficos da terapia com as estatinas na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (Pedersen 2004; Kulkarni e Reaven, 2002). Para quem nunca utilizou das estatinas, a *Moringa* surge como uma opção acessível à população mais carente devido ao baixo custo de consumo se comparado com a atorvastatina, que seu custo pode chegar aproximadamente a 60 reais (20 mg 30 Comprimidos), enquanto as sementes de *Moringa* podem ser encontradas por 10 reais (pacote com 60 sementes) 0,6 centavos cada semente. Aos pacientes que fazem uso das estatinas é importante que se desejarem modificar o tratamento utilizado que consultem um profissional da saúde, pois de acordo com Laufs et al (2000) e Westphal et al (2008) a interrupção do tratamento com as estatinas podem levar a uma perda rápida das suas ações protetoras e é seguida de uma deteriorização rebote na vasculatura.

Em outros estudos, verificamos o efeito dos flavonóides que é encontrado em grande quantidade na folha da M.O. eles elevam os níveis da lipoproteína HDL na circulação sanguínea fazendo-se necessário, uma vez que esta lipoproteína tem um papel protetor no organismo. Estudos demonstram que flavonóide apresenta bons efeitos como hipolipidêmicos (Pereira 1999). Mesmo não havendo diferenças nesse estudo, a planta M.O. tem compostos que podem fazer efeitos parecidos ou iguais aos medicamentos utilizados hoje servindo até como uma nova opção mais barata para a medicina. Segundo Rolim et al (2016): “Estudos com dosagens maiores do extrato folha de moringa devem ser realizados, podendo ainda submeter outras partes da planta a testes, uma vez que há uma série crescente de trabalhos mostrando efeitos benéficos quando se utiliza com intuídos medicinais”.

A presente pesquisa utilizou a dosagem de 400mg/Kg, existem trabalhos que já utilizaram 600mg/kg como Jain (2010), quando

avaliaram a atividade hipolipidêmica da M.O. Desta forma, outras concentrações maiores podem ser testadas.

## CONCLUSÃO

Pesquisas foram realizadas sobre a utilização da *Moringa Oleifera* como tratamento para a hiperdislipidemia, mais estudos precisam ser realizados para um aprofundamento da utilização das folhas como tratamento. O resultado da pesquisa não apresentou efeito significativo na diminuição do colesterol. Talvez estudos com dosagens maiores do extrato folha de M.O. podem apresentar um resultado significativo, podendo ainda submeter outras partes da planta a testes, já que durante as pesquisas bibliográficas foi possível perceber que há trabalhos mostrando efeitos benéficos quando se utiliza a M.O. com intuits medicinais.

## REFERÊNCIAS

1. Campo, V. L. e Carvalho, I. 2007. “Estatinas hipolipemicas e novas tendências terapêuticas”. *Química Nova* 30, no. 2 (Mar./Apr.): 425-430. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200033>.
2. Castrogiovanni, P., Mazzone, V. e Imbesi, R. 2011. “Immunolocalization of HB-EGF in human skin by streptavidin-peroxidase (HRP) conjugate method”. *Int. J. Morphol.* 29, no. 4 (Dezembro): 1162-7. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022011000400015>.
3. Chang, C. L., Lin, C. S. e Lai, G.H. 2012. “Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts”. *Evid. Based complement. Alternat. Med.*, no. 984295 (Aug). doi: 10.1155/2012/984295.
4. Conceia. 2013. “Conselho nacional de controle de experimentação animal. Diretrizes da prática de eutanásia do concea”. Ministério da ciência, tecnologia e inovação.
5. Farooq, F. et al. 2012. “Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer”. *J. Med. Plants Res.* 6, no. 27 (July): 4368–4374. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.279>
6. Goyal, B. R. et al. 2007. “Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera Lam*”. An overview. *Nat Prod Rad.* 6, no. 4 (July-August): 347–353.



7. Jain P.G. et al. 2010. "Hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* Lam". *Brasilian Journal of Pharmacology* 20, no. 6 (Dec.): 969-73. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000038>.
8. JORGE, P.A. et al. 2005. "Effects of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, and simvastatin on endothelial function, lipid peroxidation, and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits". *Arq Bras Cardiol.* 84, no. 4(Apr):314-9. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2005000400008>.
9. Kulkarni, M. e Reaven, P.D. 2002 "Heart protection study: LDL lowering therapy and cardiovascular outcomes in patients with low cholesterol levels or diabetes". *Curr Diab. Resp.* 2, no 3 (Jun.): 269-273. doi: 10.1007/s11892-002-0094-2.
10. Laufs, U. et al. 2000. "Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice". *Stroke* 31, no. 10 (Oct.): 2442-2449. doi: 10.1161/01.str.31.10.2442.
11. Moore K. L., Dalley A. F. e Agur, A. M. R. 2010. "Clinically Oriented Anatomy". 6th ed. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
12. Mandarim-De-Lacerda, C.A. 2003. "Stereological tools in biomedical research". *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 75, no. 4 (Dec.): 469-486. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006>.
13. Mensah, J. K. et al. 2012. "Phytochemical, nutritional and antibacterial properties of dried leaf powder of *Moringa oleifera* Lam. from Edo Central Province, Nigeria". *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 2, no 1: 107-112.
14. Pedersen, T. S. 2004. "Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study, (4S)". *Clinical Trial* 5, no. 3 (October.): 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.027>.
15. Pereira, W. L. et al. 1999. "Redução nos níveis de lipídeos utilizando o flavonóide biochanina A e os corantes monascus e clorofila". *Revista Brasileira de Corantes Naturais* 3, n. 3: 59-65.
16. Rolim, J. et al. 2016. "Hiperplasia miointimal na artéria ilíaca em coelhos submetidos à angioplastia e tratados com moringa oleífera". *Rev. Col. Bras. Cir.* 43, no. 1(Jan./Feb.): 028-034. <https://doi.org/10.1590/0100-69912016001007>.
17. Scherle, W. 1970. "A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology". *Mikroskopie.* 26, no.1 (May): 57-63.

18. Schmidt, M.I. et al. 2011. “Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais”. *The Lancet.*, no. Special (May): 61-73. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60135-9.
19. Westphal, C. et al. 2008. “Measuring bee diversity in different European habitats and biogeographical regions”. *Ecological Monographs* 78, no. 4 (November): 653-671.