

ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS EM RATAS GESTANTES TRATADAS COM EXTRATO AQUOSO DE PIPER METHYSTICUM: OBSERVAÇÕES PRELIMINARES

EVALUATION OF BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN PREGNANT RATS TREATED WITH AQUEOUS EXTRACT OF PIPER METHYSTICUM: PRELIMINARY OBSERVATIONS

Isabel Cristina Brandão*, Mônica. S. Suzuki**, Lucimar Las Casas***, Vera Maria Peters#

RESUMO

Objetivo: No presente trabalho são avaliados parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas expostas ao extrato aquoso de *Piper methysticum* no período de implantação do blastocisto. Métodos: Quarenta ratas Wistar prenhes foram organizadas aleatoriamente nos grupos controle e tratado, que receberam respectivamente 1 ml de água destilada e 10 mg de extrato aquoso de kava / kg de peso corporal em 1 ml de água destilada. O tratamento foi feito por via intragástrica, duas vezes ao dia, nos dias 5, 6 e 7 pós - inseminação (1º dia=espermatózoide no esfregaço) e eutanasiadas, no 15º dia de prenhez, por exsanguinação total (punção cardíaca) sob anestesia. Resultados: houve leucopenia e aumento significativo na dosagem de Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) entre os animais do grupo tratado. Contudo, não foram observadas alterações histopatológicas no fígado. Conclusão: O extrato aquoso de kava-kava, administrado a ratas prenhes, parece não causar toxicidade hepática, embora tenha evidenciado leucopenia e aumento de TGO.

PALAVRAS-CHAVE:

Piper methysticum. Bioquímica. Hematologia. Prenhez. Ratas Wistar.

ABSTRACT

Aims: To evaluate biochemistry and hematological parameters in pregnant rats treated with aqueous extract of *Piper methysticum*. Methods: Forty pregnant rats were randomly distributed into two groups: Control that received 1ml of distilled water and treated with 10mg of aqueous extract of kava/kg/body weight, by gavage, twice a day, from day-6 to 7 post insemination (day 1 = spermatozoa visible in the vaginal smear). Euthanize was performed by exsanguinations via cardiac puncture under anesthesia (ketamine plus xylazine) at 14 post insemination day. Results: Treated animal presents leucopenia and higher concentration of TGO. No histopathologic alteration was observed in the liver. Conclusion: The *Piper methysticum* aqueous extract seems do not cause hepatotoxicity, but cause leucopenia and increase the plasmatic level of TGO.

KEY WORDS:

Piper methysticum. Biochemistry. Hematology. Pregnancy. Wistar Rat.

1 INTRODUÇÃO

O kava é um extrato derivado do rizoma e da raiz secos de *Piper*

methysticum, um arbusto com folhas largas em forma de coração, membro da família da pimenta-do-reino (*Piperaceae*) (FETROW et al., 2000).

* Graduandos da Faculdade de Farmácia e Bioquímica - UFJF.
 ** Graduandos da Faculdade de Farmácia e Bioquímica - UFJF.
 *** Farmacêutica e Bioquímica.
 # Pesquisadora do Centro de Biologia da Reprodução - UFJF. Universidade Federal de Juiz de Fora. Centro de Biologia da Reprodução. Campus Universitário.
 Correspondence author: Vera Maria Peters. Universidade Federal de Juiz de Fora - Centro de Biologia da Reprodução. Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário. Bairro São Pedro - CEP: 36036-900 - Juiz de Fora - MG. (32) 2102-3251. direção.cbr@ufjf.edu.br.
 Submitted: 06/09
 Accepted: 08/09
 Agradecimento: Apoio financeiro e estrutural - Rede Mineira de Bioterismo e TOXIFAR/ FAPEMIG; apoio técnico - funcionários e estagiários do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), UFJF/MG.



Figura 1: Folha de *Piper methysticum*. In: <http://www.herbalfire.com/images/kava-kava.jpg>

A *Piper methysticum*, conhecida como Kava, é uma planta nativa de muitas ilhas do sul do Pacífico e foi usada cerimonialmente por milhares de anos (FETROW et al., 2000).

As partes subterrâneas do kava contêm elevadas quantidades de kavalactonas, os ingredientes farmacologicamente ativos da planta, enquanto os alcalóides estão presentes somente em quantidades pequenas. Os alcalóides estão concentrados nas folhas e caules e parecem ser as principais toxinas de plantas associadas à hepatotoxicidade humana e animal (NERURKAR et al., 2004).

Os componentes biologicamente ativos são obtidos a partir da substituição química da estrutura pirona básica. Os ingredientes farmacologicamente ativos são: iangonina, desmetoxi-iangonina, 5,6-desidrometisticina, 11-metoxi-iangonina e 11-metoxi-nor-iangonina, sendo que a metisticina, a kauaína, a diidrometisticina e a diidrocauaína são componentes ativos de estrutura 5,6-diidro-alfa-pirona. A pipermetistina é um alcalóide isolado das folhas de kava (FETROW et al., 2000).

O extrato de kava parece útil no tratamento da ansiedade, pois demonstrou redução nos escores na Escala de Ansiedade de Hamilton. Em experimentos com animais de laboratório, observou-se que o extrato de kava é capaz de inibir convulsão induzida experimentalmente. As kavalactonas kauaína, diidrocauaína, metisticina e diidrometisticina parecem possuir efeito analgésico significativo, agindo por uma via que não a opióide. A kauaína possui atividade inibitória da ciclooxigenase *in vitro*; as kavalactonas metisticina e diidrometisticina mostraram efeito protetor contra dano de tecido cerebral em ratos submetidos a isquemia (CLARE et al., 2002; DALLAS et al., 2004; PEPPING et al., 1999).

O efeito ansiolítico do extrato de kava ainda não foi devidamente elucidado, mas acredita-se que os receptores GABA estejam envolvidos, uma vez que o kava compartilha, com os benzodiazepínicos, efeitos semelhantes sobre o sistema nervoso central. Outros mecanismos sugeridos incluem redução da neurotransmissão excitatória ao diminuir a liberação de glutamato e inibição reversível na monoamino oxidase B (MAO-B) noradrenalina ou antagonismo da dopamina (CLARE et al., 2002; DALLAS et al., 2004; KATZUNG et al., 2003; PEPPING et al., 1999).

A posologia indicada para a terapêutica da ansiedade humana baseia-se no conteúdo de cavapironas, que varia de acordo com a preparação. A dose ideal para controle da ansiedade consiste em 50 a 70 miligramas de kavalactonas purificadas, três vezes ao dia. Isso equivale a 100 – 250 mg de extrato de raiz seca de kava três vezes ao dia. Como hipnótico, pode-se utilizar uma dose de 180 – 210mg de kavalactonas, de 30 minutos à uma hora antes de deitar (FETROW et al., 2000; KATZUNG et al., 2003).

Na maioria dos pacientes os efeitos adversos são discretos nas doses recomendadas. Esses efeitos consistem em formigamento na

boca e indisposição gastrointestinal; com o uso crônico foi observado pele seca, escamosa, pigmentada e olhos avermelhados, podendo estar relacionado ao metabolismo do colesterol. Foi também descrita esfoliação na palma das mãos, planta dos pés, antebraços, costas e pernas, que são efeitos adversos da ingestão por longo prazo de dosagens tóxicas de kava. Incluem hiperúremia, hiperbilirrubinemia, hematúria, hipoalbuminemia, linfocitopenia, trombocitopenia (FETROW et al., 2000; KATZUNG et al., 2003; PEPPING et al., 1999).

Estudos *in vitro* sugerem que a inibição pelas Kavalactonas das enzimas P450 humanas, responsáveis pelo metabolismo de mais de 90% das drogas, poderia potencializar a interações medicamentosas e promover toxicidade hepática (NERURKAR et al., 2004).

Na literatura antiga, a ingestão crônica de uma média de 63g, diariamente, de pó de raiz crua, via preparações tradicionais, é descrita como não só induzindo à erupção cutânea, mas também lesando fígado, coração e pulmões. Contudo, a relação risco-benefício dos extratos de kava permanece melhor em comparação com aquela de outras drogas usadas para tratar a ansiedade (DALLAS; CLOUATRE, 2004).

O kava deve ser evitado durante a gravidez e lactação, entretanto a literatura consultada não faz referência a estudos experimentais visando à verificação da toxicidade do extrato durante a gestação. Dado o potencial terapêutico do extrato e a necessidade de se avaliarem os riscos reprodutivos do extrato, o propósito do presente trabalho foi avaliar o efeito do extrato aquoso de kava administrado às ratas durante a prenhez inicial.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 40 ratas da linhagem Wistar, no 15^o dia de prenhez, provenientes da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução- Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, providas de cama de maravalha selecionada e cochos para ração peletizada (Nuvilab[®]), sendo essas, por sua vez, mantidas em armários climatizados (Alesco[®]), localizados em alojamentos com temperatura e luz (12:12 horas claro/escuro) controladas.

2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Quarenta ratas Wistar prenhes foram organizadas aleatoriamente em dois grupos de 20 animais – Controle (água destilada) e Tratado (extrato aquoso de kava, obtido da Farmácia Las Casas – Juiz de Fora, MG, onde estão arquivados número de lote e laudo técnico de controle de qualidade).

Ao grupo controle foi administrado 1ml de água destilada e ao grupo tratado 10 mg de extrato aquoso de kava/ kg de peso corporal em 1 ml de água destilada. O tratamento foi feito por via intragástrica, duas vezes ao dia, nos dias 5, 6 e 7 pós - inseminação (1º dia=espermatozóide no esfregaço), correspondendo ao período inicial de gestação, quando ocorre a implantação do blastocisto.

A dosagem administrada ao grupo tratado corresponde à dose terapêutica indicada (100-250mg de extrato de raiz seca de kava três vezes ao dia), levando em consideração o metabolismo do animal (KATZUNG, 2003).

Os animais foram sacrificados no 15º dia de prenhez, por exsanguinação total (punção cardíaca) sob anestesia (Cetamina + xilazina) e a morte certificada pela parada cardíaca total. Foi realizada laparotomia exploradora visando a avaliar alterações viscerais e amostras do fígado foram tomadas para avaliação histopatológica.

O sangue obtido por punção cardíaca foi acondicionado em dois tipos de tubos, um com anticoagulante ácido tetracético de etileno diamino (EDTA) 1%, para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro sem anticoagulante para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos (LIMA et al., 1992).

O sangue coletado sem EDTA foi centrifugado (centrífuga Sorvall modelo RC-3) por 10 minutos, a 3000 rpm, obtendo-se, assim, o soro. As análises bioquímicas foram feitas em espectrofotômetro CELM SB-190 e constaram das dosagens de uréia, aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP), colesterol total e triglicérides, realizadas de acordo com as instruções fornecidas pela CELM para SB-190. A dosagem de creatinina foi realizada seguindo as instruções fornecidas pela LABTEST para SB190.

O sangue coletado em tubo contendo EDTA 1 % foi processado imediatamente após a coleta. Os esfregaços sanguíneos foram corados pelo método de Leishman e analisados em microscópio OLYMPUS BX 41. As análises constaram do estudo das séries vermelhas (eritrograma) e brancas (leucograma). O hemograma foi realizado por métodos manuais, seguindo técnicas laboratoriais de rotina (LIMA et al., 1992).

No eritrograma foi realizada a contagem de hemácias, a determinação do hematócrito, da hemoglobina, além dos seguintes índices hematimétricos: volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM).

O hematócrito foi determinado em microcentrífuga FANEM[®], usando tubos capilares. O número de hemácias foi contado em câmaras de Neubauer, após diluição com o líquido diluidor para eritrócitos (líquido de Hayem). A hemoglobina foi medida espectrofotometricamente (CELM SB-190). Os índices hematimétricos VGM, HGM E CHGM foram calculados segundo as equações 1, 2 e 3, respectivamente: Equação 1: $[(HTC \div HTM) \times 10]$;

Equação 2: $[(Hb \div HTM) \times 10]$; Equação 3: $[(Hb \div HTC) \times 100]$ (9).

No leucograma, contaram-se os leucócitos totais e fez-se a contagem celular diferenciada; o número total de leucócitos foi contado em câmaras de Neubauer após diluição com o líquido diluidor para leucócitos (líquido de Türk) (LIMA et al. 1992).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biologia da Reprodução da UFJE.

2.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Peças cirúrgicas do fígado foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7.0), depois foram clivadas e desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme processamento histológico de rotina. Os fragmentos incluídos foram cortados em micrótomo, em secções de 6µm de espessura. As lâminas com os cortes histológicos foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina.

Os cortes corados em hematoxilina e eosina foram analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 200X, 400X e 1000X, em toda sua extensão. A análise foi realizada por observador com formação em patologia e morfologia, e percorreu toda a extensão do corte.

A partir desta avaliação, foram selecionadas, em aumento de 400X, áreas representativas de cada amostra para captura digital por sistema computadorizado Axion Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha), através de câmera digital acoplada a microscópio ótico. As áreas representativas, a partir do espaço porta em direção à vênula central do lóbulo, foram demarcadas em três zonas - 1, 2 e 3, cuja avaliação da integridade morfológica é importante fisiopatologicamente, visto que estas regiões determinam o gradiente metabólico hepático e as alterações morfológicas que refletem hepatopatias que acometem as zonas em ordem crescente.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita pelo teste t de Student. Nível de significância dos testes $\alpha=0,05$.

3 RESULTADOS

Durante o tratamento com extrato aquoso de kava não se observaram sinais clínicos de toxicidade materna e nenhuma morte foi registrada.

Os parâmetros hematológicos nos grupos experimentais encontram-se na tabela 1. As medidas referentes ao perfil bioquímico estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 1: Hemograma de ratas no 15^a dia de gestação, controles e tratados com 10mg de extrato aquoso de kava /kg de peso corporal .

Variáveis	Grupos	
	Controle (n=20)	Tratado (n=20)
Hematimetria (10 ³ Cel/mm ³)	6506 ± 1055	6596 ± 1525
Hemoglobina (g/dl)	13,00 ± 2,00	13,16 ± 1,80
Hematócrito (%)	37,94 ± 3,35	38,06 ± 3,72
Volume globular médio (fl)	59,72 ± 10,03	59,94 ± 14,78
Concentração de hemoglobina globular média (%)	33,17 ± 5,28	35,06 ± 6,55
Hemoglobina globular média (pg)	20,11 ± 3,14	19,71 ± 4,06
Leucometria global (Cel./mm ³)	5750 ± 1770	3931 ± 1076 *
Bastonetes (%)	1,43 ± 0,85	1,94 ± 0,75
Neutrófilos Segmentados (%)	34,53 ± 7,14	33,06 ± 7,44
Linfócitos (%)	57,67 ± 7,56	58,06 ± 8,21
Eosinófilos (%)	2,80 ± 1,42	3,29 ± 1,93
Monócitos (%)	3,47 ± 1,55	3,50 ± 1,26

Resultados expressos em média ± desvio padrão. * p<0,05

Tabela 2: Análises bioquímicas em ratas no 15^a dia de gestação, controles e tratados com 10 mg de extrato aquoso de kava /kg de peso corporal.

Variáveis	Grupos	
	Controle (n=20)	Tratado (n=20)
Colesterol (mg/dl)	68,69 ± 18,71	61,46 ± 9,73
Triglicérides (mg/dl)	127,44 ± 35,73	102,94 ± 37,44
Glicose (mg/dl)	115,33 ± 25,91	127,50 ± 35,67
AST/TGO (u/l)	96,23 ± 27,41	148,83 ± 68,07 *
ALT/TGP(u/l)	60,80 ± 14,58	54,47 ± 7,98
Gama GT (U/l)	19,31 ± 5,16	21,85 ± 6,55
Creatinina (mg/dl)	0,49 ± 0,12	0,50 ± 0,10
Uréia (mg/dl)	43,21 ± 10,26	48,62 ± 12,30

Resultados expressos em média ± desvio padrão. * p<0,05

A análise histopatológica do fígado não evidenciou alterações microscópicas, conforme pode ser verificado nas figuras 2 e 3.

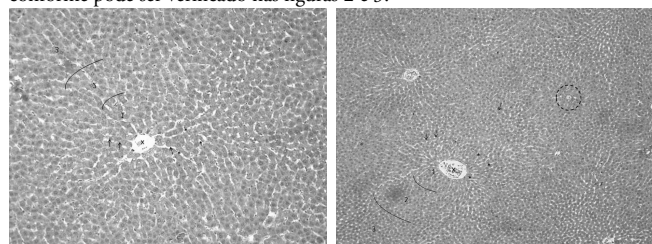


Figura 2: Organização e morfologia do trato portal e vênulas hepáticas histologicamente normais em aspecto panorâmico. Rede capilar (asteriscos), hepatócitos (setas), vênula central (x) e triáde porta (círculo). Zonas 1, 2 e 3 que fornecem, sequencialmente, a direção de atividade metabólica de cada unidade lobular hepática. (a) grupo controle, (b) grupo tratado, coloração HE e aumento original 250x.

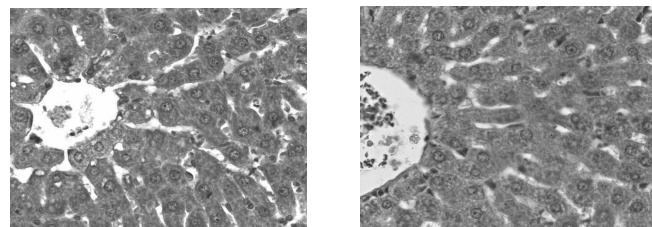


Figura 3: Organização e morfologia hepáticas compatíveis com a normalidade. (a) grupo controle, (b) grupo tratado, coloração HE e aumento original 400x.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O efeito da administração do extrato de Kava em animais gestantes é importante devido a seu amplo uso em humanos como ansiolítico, embora suspeite-se que cause hepatotoxicidade.

A hepatotoxicidade do kava ainda não está devidamente esclarecida ou comprovada, há estudos indicando que ela poderia ser causada devido à má qualidade do material e que não há indícios claros de que os casos relatados de hepatotoxicidade sejam realmente atribuídos à kava ou a algum tipo de interação medicamentosa. Entretanto, outros estudos indicam a possibilidade de efeito hepatotóxico de diversas frações do extrato em virtude de modular a expressão de genes CYP (ERNEST et al., 2007; GUO et al., 2009; JHOO et al., 2006; TESCHKE et al., 2009).

No presente trabalho, foram identificados leucopenia e aumento significativo na dosagem de transaminase glutâmico oxalacética (TGO). Aminotransferases AST/TGO (aspartato-aminotransferase), ALT/TGP (alanina-aminotransferase) e gama-glutamil transferase (Gama GT) são provas de função hepática. Embora TGO e TGP sejam comumente consideradas como enzimas hepáticas, em razão de suas altas concentrações nos hepatócitos, apenas a TGP é específica para o fígado; a TGO está abundantemente presente em outros tecidos animais, existindo em quantidades mais apreciáveis no miocárdio, músculos esqueléticos, cérebro e rins. Desta forma, qualquer lesão com destruição celular desses tecidos (à exceção do cérebro) provoca considerável aumento dessas enzimas no sangue. Os dados obtidos parecem, a princípio, corroborar os demais achados de ausência de hepatotoxicidade, principalmente pela ausência de lesões histopatológicas observáveis à microscopia óptica. Vale ressaltar, porém, que as atividades metabólicas do hepatócito estão intimamente associadas à proximidade física desta célula com capilares sinusóides e à sua associação com os espaços perivasculares típicos do fígado. Devido às alterações bioquímicas e hematológicas observadas, pode-se sugerir que possíveis alterações microscópicas no fígado possam vir a ocorrer com a continuidade da administração, ou mesmo que tais resultados laboratoriais reflitam, precocemente, alterações ainda subclínicas (LIMA et al., 1992).

Os dados hematológicos mostram que os animais tratados com Kava apresentaram leucopenia, entretanto não foi detectada linfocitopenia, conforme o que observou PEPPING (1999).

Em conclusão, o extrato aquoso de *Piper methysticum*, administrado no início da gestação de ratas, induziu leucopenia e aumento de TGO, sem, no entanto, levar a alterações microscópicas no fígado.

5 REFERÊNCIAS

- BONEVSKI, B.; WILSON, A.; HENRY, D.A. An analysis of news media coverage of complementary and alternative medicine, **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 6, p. 2406, 2008.
- DALLAS, L.C. Kava-kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 58-96, 2004.
- EISENBERG, D.M. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 280, n. 18, p. 1569-1575, 1998.
- ERNST, E. A re-evaluation of kava (*Piper methysticum*). **British Journal**, London, v. 64, n. 4, p. 415-417, 2007.
- FETROW, C.W.; AVILA, J.R. **Manual de medicina alternativa para o profissional. Guanabara Koogan**. 1 ed. Rio de Janeiro, 2000.
- GUO, L.; LI, Q.; XIA, Q.; DIAL, S.; CHAN, P.C.; FU, P. Analysis of gene expression changes of drug metabolizing enzymes in the livers of F344 rats following oral treatment with kava extract. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 433-442, 2009.
- HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por Exames Laboratoriais**. 16.ed. São Paulo: Manole, v. 1, p. 1276, 1982.
- JHOO, J.W.; FREEMAN, J.P.; HEINZE, T.M.; et al. In vitro cytotoxicity of nonpolar constituents from different parts of kava plant (*Piper methysticum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 8, p. 3157-3162, 2006.
- JOOS, S.; MUSSELMANN, B.; MIKSCH, A.; ROSEMANN, T.; SZECSENYI, J. The role of complementary and alternative medicine (CAM) in Germany-a focus group study of GPs. **BMC Health Services Research**, London, v. 8, p. 127, 2008.
- JOSEPH, P. Alternative therapies. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Bethesda, v. 56, p. 957-960, 1999.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica. Guanabara Koogan**, 1 ed. Rio de Janeiro, 2003.
- LIMA, A. **Os Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 7.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1992.
- PRATIBHA, V.N.; KLAUS, D.C.T. In vitro toxicity of kava alkaloid, Pipermethystine, in help G2 cells compared to kavalactones. **Toxicological Sciences**, v. 79, p. 106-111, 2004.
- STEVINSON, C.; HUNTLEY, A.; ERNST, E. A systematic reviews of the safety of kava extract in the treatment of anxiety. **Drug Safety**, San Francisco, v. 25, n. 4, p. 251-261, 2002.
- STICKEL, E.; BAUMÜLLER, H.M.; SEITZ, K.; et al. Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum rhizoma*). **Journal of Hepatology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 62-67, 2003.
- TESCHKE, R.; GENTHNER, A.; WOLFF, A. Kava hepatotoxicity: comparison of aqueous, ethanolic, acetonetic kava extracts and kava-herbs mixtures. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 123, n. 3, p.378-384, 2009.