



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Zingiber officinale*
Roscoe NA ENDOMETRIOSE INDUZIDA EM RATAS WISTAR**

José Meneses de Moraes Filho

São Luís
2019

JOSÉ MENESES DE MORAIS FILHO

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Zingiber officinale*
Roscoe NA ENDOMETRIOSE INDUZIDA EM RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Àrea de Concentração: Alterações endócrinas

Linha de Pesquisa: Endometriose

Orientador: Prof. Dr. Plinio Cunha Leal

Coorientador: Prof. Dr. João Nogueira Neto

Coordenadora: Profa. Dra. Maria do Desterro
Soares Brandão do Nascimento

São Luís
2019

**Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA**

Morais Filho, José Meneses de

Efeitos do extrato aquoso de *Zingiber officinale*
Roscoe na endometriose induzida em ratas Wistar /
José Meneses de Moraes Filho. - 2019.

54 f.: il.

Orientador(a): Prof. Dr. Plínio Cunha Leal

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Saúde do Adulto Mestrado Acadêmico, Universidade
Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Endometriose. 2. Modelos animais. 3. *Zingiber*
officinale. 4. Fitoterapia. I. Leal, Plínio Cunha. II.
Título

JOSÉ MENESES DE MORAIS FILHO

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Zingiber officinale*
Roscoe NA ENDOMETRIOSE INDUZIDA EM RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: 29/01/2020.

Prof. Dr. Plinio Cunha Leal (Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto Universidade Federal do
Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto Universidade Federal do
Maranhão

Prof^a. Dr^a. Flavia Castello Branco Vidal Cabral
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto Universidade Federal do
Maranhão

Prof. Dr. Ed Carlos Rey Moura
Professor Adjunto de Medicina I Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Vinicius José da Silva Nina (Suplente)
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Universidade Federal do
Maranhão

A minha esposa Mirella Amorim e a minha filha
Anna Júlia. Por elas vivo todos dias.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que me deu vida, uma família e um trabalho. Mesmo sem merecer, sempre cuida de mim.

À minha família, que está ao meu lado em todos os momentos, apoiando-me e consolando-me quanto necessário.

Ao meu orientador Prof. Dr. Plínio da Cunha Leal e ao coorientador Prof. Dr. João Nogueira Neto: mais que me ajudaram, carregaram-me durante toda a jornada. Meu mais sincero muito obrigado.

Aos Doutores George Castro Figueiredo de Mello, Lyvia Maria Rodrigues de Sousa Gomes e Lucilene Amorim Silva, por importantes contribuições nesta pesquisa.

À Liga Acadêmica de Cirurgia Experimental, em especial às doutorandas Izabelle Smith Frazão Ramos e Salie Santos Rodrigues Oliveira. Agradeço pela ajuda e pelos ensinamentos transmitidos a mim nesse período.

Ao Programa de Pós-Graduação e Inovação Saúde do Adulto, representado pela Prof^a. Dr^a. Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento e por todos os professores, em especial ao Prof. Dr. Marcelo de Souza Andrade pelos conhecimentos transferidos e pela companhia.

E a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram-me durante esses dois anos. Nunca teria conseguido sem o apoio de todos.

“Só uma mulher que sofre com a endometriose sabe o tamanho da dor que sente.”

Caroline Salazar

RESUMO

Introdução: A endometriose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo desenvolvimento e crescimento de estroma e glândulas do tecido endometrial fora da cavidade uterina, podendo acometer qualquer órgão. Quando localizada no abdome de mulheres é associada à dor e à subfertilidade, e, em alguns casos, com substancial redução da qualidade de vida. O tratamento objetiva a redução da dor, possibilidade da fertilidade e melhora da qualidade de vida, podendo ser clínico e/ou cirúrgico, que reduzem os focos da doença e os sintomas inerentes aos órgãos acometidos, mas sem cura definitiva. Novas estratégias de tratamento têm sido pesquisadas, como a utilização de extratos de plantas, dentre elas *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre), que possui ação anti-oxidante e efeito imunomodulador, reduzindo a produção das citocinas pró-inflamatórias, o volume dos focos ectópicos e atrofiando os implantes.

Objetivo: Analisar aspectos macroscópicos e microscópicos dos tecidos endometrióticos e avaliar o TNF- α e a IL-6 no lavado peritoneal de ratas com endometriose induzida que receberam gengibre por via oral. **Método:** Ensaio clínico randomizado com 20 ratas da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*. Foi induzido endometriose e, após 21 dias, foi realizada nova cirurgia para aferição do volume do tecido ectópico. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle (n=8) recebeu por gavagem solução de cloreto de sódio a 0,9%, e o grupo gengibre (n=8) por gavagem 500 mg/kg de extrato aquoso de *Zingiber officinale* Roscoe, ambos por 14 dias. Após esse período, os animais foram sacrificados e foi coletado o líquido do lavado peritoneal, aferição dos volumes das lesões e excisão dos focos endometrióticos para análise histológica. **Resultados:** Os volumes médios finais após a intervenção foram maiores no grupo controle ($120,93 \text{ mm}^3 \pm 78,91$) do que no grupo gengibre ($40,50 \text{ mm}^3 \pm 19,57$), com diferença estatística significativa ($p = 0,01$). O foco da endometriose cresceu mais no grupo controle ($75,81 \text{ mm}^3 \pm 58,95$) do que no grupo gengibre ($2,07 \text{ mm}^3 \pm 18,87$) ($p = 0,004$) ao comparar o tamanho das lesões no dia da eutanásia. Não houve diferença na dosagem de TNF- α no grupo controle ($59,26 \text{ pg/ml} \pm 12,07$) em relação ao grupo gengibre ($55,00 \text{ pg/ml} \pm 13,49$) ($p = 0,51$), assim como não houve diferença na dosagem de IL-6 no grupo controle ($183,43 \pm 13,90$) e no grupo gengibre ($205,18 \pm 34,81$) ($p = 0,12$). O grau de atrofia das lesões foi maior no grupo gengibre ($1 \pm 0,92$) do que no grupo controle ($2,25 \pm 1,16$) ($p = 0,03$). **Conclusões:** O extrato de gengibre reduziu e atrofiou os volumes dos focos de endometriose autotransplantados, embora não tenha reduzido a IL-6 e TNF- α no lavado peritoneal.

Palavras-chave: Endometriose. Modelos animais. *Zingiber officinale* Roscoe. Fitoterapia.

ABSTRACT

Introduction: Endometriosis is a chronic inflammatory disease characterized by the development and growth of stroma and glands of endometrial tissue outside the uterine cavity, may affect any organ and when located in the abdomen of women is associated with pain and subfertility and in some cases with substantial reduction in quality of life. The treatment aims at reducing pain, the possibility of fertility and improving quality of life, and may be clinical or / and surgical, which reduces the focuses of the disease and symptoms, inherent to the affected organs, but without definitive cure. New treatment strategies have been researched such as the use of plant extracts, among them *Zingiber officinale* Roscoe (ginger), which have anti-oxidant action and immunomodulatory effect, reducing the production of pro-inflammatory cytokines, the volume of ectopic foci and atrophying the implants. **Objective:** To analyze macroscopic and microscopic aspects of endometriotic tissues and to evaluate TNF- and IL-6 in the peritoneal lavage of rats with induced endometriosis that received ginger orally. **Method:** Randomized clinical trial of 20 virgin Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*). Endometriosis was induced in the animals and after 21 days a new surgery was performed to measure the volume of ectopic tissue and the animals were randomly divided into two groups: the control group (n=8) received 0.9% sodium chloride solution by gavage and the ginger group (n=8) received 500 mg/kg of *Zingiber officinale* Roscoe extract by gavage, both for 14 days. After this period the animals were sacrificed and the liquid from the peritoneal lavage was collected, the volumes of the lesions and the excision of the endometriotic foci were measured for histological analysis. **Results:** The final mean volumes after the intervention were higher in the control group ($120.93 \text{ mm}^3 \pm 78.91$) than in the ginger group ($40.50 \text{ mm}^3 \pm 19.57$), with significant statistical difference ($p = 0.01$). The focus of endometriosis increased more in the control group ($75.81 \text{ mm}^3 \pm 58.95$) than in the ginger group ($2.07 \text{ mm}^3 \pm 18.87$) ($p = 0.004$) when comparing the size of the lesions on euthanasia day. There was no difference in the TNF- dosage in the control group ($59.26 \text{ pg/ml} \pm 12.07$) in relation to the ginger group ($55.00 \text{ pg/ml} \pm 13.49$) ($p = 0.51$), as well as no difference in the IL-6 dosage in the control group (183.43 ± 13.90) in relation to the ginger group (205.18 ± 34.81) ($p = 0.12$). The degree of atrophy of the lesions was higher in the ginger group (1 ± 0.92) than in the control group (2.25 ± 1.16) ($p = 0.03$). **Conclusions:** The ginger extract reduced and atrophied the volumes of the autotransplanted endometriosis foci but did not reduce IL-6 and TNF- α in the peritoneal lavage fluid.

Keywords: Endometriosis. Animal models. *Zingiber officinale* Roscoe. Phytotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Medicamentos, mecanismo de ação e reações adversas de drogas usadas no tratamento hormonal da endometriose.....	19
Quadro 1 - Medicamentos, mecanismo de ação e reações adversas de drogas usadas no tratamento hormonal da endometriose.....	20
Figura 1 - Tecido retirado do corno lateral direito do útero e implantado na parede lateral esquerda do abdome de ratas	24
Figura 2 - <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	26
Figura 3 - Rizoma do <i>Zingiber officinale</i> Roscoe e estrutura interna	27
Figura 4 - Representação da via NF- κ B e ação do gingerol. Via normal de ativação da via NF- κ B (setas cheias) e com a inibição da I κ B quinase (IKK) pelo gingerol (setas tracejadas), evitando a fosforilação do I κ Ba e a translocação da p65 (RelA) no núcleo celular	28

LISTA DE SIGLAS

12-DHGD	12-Dehydrogingerdione
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
C3	Fração C3 do complemento
CDC42	Cell Division Cycle 42
CDKN2B-AS1	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B antisense RNA 1
CEUA	Comité de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX2	Ciclooxygenase 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
FN1	Fibronectin 1
FOXN1	Gene Forkhead box N1
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas
GDNF	Fator Neurotrófico derivado da Linhagem de Células Gliais
GnRH	Hormônio Liberador Gonodotrofina
GREB	Growth Regulating Estrogen Receptor Binding
GWA	Genome Wide Association
HeLa	Células Henrietta Lacks (cancerígenas de colo uterino)
HL-60	Células Leucemia
HOXA10	HomeoboxA10
I κ B- α	Inibidor Alpha do Fator Nuclear Kappa B
IgG	Imunoglobulina G
IKK	IKB quinase
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Isoforma induzível da óxido nítrico sintetase
JNK	Quinase regulada pela sinalização extracelular

kg	Kilogramas
LH	Hormônio Luteinizante
LINC00339	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 339
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	Proteína ativada por mitógenos
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (células de cancerígenas de mama)
mg	Miligramas
MHS	Maccabi Healthcare Services
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MMP-9	Metaloproteinase 9
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NFE2L3	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 3
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PGE2	Prostaglandina E2
PICS	Práticas Integrativas e Complementares em Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PRKDC	Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic subunit
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RNA	Ácido Ribonucleico
SCID	Imunodeficiência Combinada Severa
SiHa	Células cancerígenas de colo uterino
SUS	Sistema Único de Saúde
TCDD	Tetraclorodibenzeno-p-dioxina 2,3,7,8 (Dioxina)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WNT4	Wnt Family Member 4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEORICO	17
2.1 Endometriose.....	17
2.2 Endometriose em modelos animais.....	21
2.2.1 Modelos experimentais em macacas	21
2.2.2 Modelos experimentais em coelhas	22
2.2.3 Modelos experimentais em ratas e camundongas.....	22
2.2.3.1 <i>Endometriose experimental em camundongas</i> <i>imunocomprometidos</i>	23
2.2.3.2 <i>Endometriose experimental em ratas imunocompetentes</i>	23
2.2.3.3 <i>Modelos expostos a tóxicos.....</i>	25
2.3 Zingiber officinale Roscoe (Gengibre).....	25
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos.....	30
4 ARTIGO.....	31
5 CONCLUSÃO.....	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A – CERTIFICADO – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	53
ANEXO B – TERMO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO AO JOURNAL OF MEDICINAL FOOD	54

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo desenvolvimento e crescimento de estroma e glândulas do tecido endometrial fora da cavidade uterina (KENNEDY *et al.*, 2005). Pode acometer qualquer órgão e, quando localizada no abdome de mulheres, é associada à dor e à subfertilidade, e, em alguns casos, com substancial redução da qualidade de vida.

A taxa de prevalência é desconhecida devido principalmente ao diagnóstico tardio. Estima-se a incidência de 5% a 15% das mulheres no período reprodutivo e até 3% a 5% na fase pós-menopausa (VIGANÒ *et al.*, 2004). Recentemente, Eisenberg *et al.* (2018), analisando o banco de dados Maccabi Healthcare Services (MHS) de Israel, encontraram uma prevalência de 10,8 por 1.000 mulheres com idade média de 40 anos. A incidência foi maior na faixa etária dos 44 anos, sendo 18,6 por 1.000 mulheres.

A patogênese tem sido explicada por diversas teorias que apontam para a multicausalidade, associando fatores genéticos, anormalidades imunológicas e disfunção endometrial (OLIVE; PRITTS, 2001).

O diagnóstico pode ser clínico, com base nos sintomas, no exame ginecológico e na identificação dos fatores de risco, por imagem de ultrassom transvaginal e de ressonância nuclear magnética e cirúrgica. A via laparoscopia com confirmação diagnóstica através do estudo anatomopatológico é considerada o padrão-ouro (KENNEDY *et al.*, 2005).

O tratamento objetiva a redução da dor, possibilidade da fertilidade e melhora da qualidade de vida, podendo ser clínico, quando utiliza medicamentos para a indução da pseudogravidez, pseudomenopausa ou anovulação crônica, e cirúrgico, quando reduz os focos da doença e os sintomas inerentes aos órgãos acometidos, mas sem cura definitiva (OLIVE; PRITTS, 2001; OZKAN; MURK; ARICI, 2008).

Novas estratégias de tratamento têm sido pesquisadas, entre elas a utilização de extratos de plantas e frações, como *Calligonum comosum* (KIANI *et al.*, 2019),

Glabra glycyrrhiza (NAMAVAR JAHROMI *et al.*, 2019), *Entada africana* (MVONDO *et al.*, 2017), *Euterpe oleracea* (MACHADO *et al.*, 2016), devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e anti-oxidantes.

Fitoterapia (do grego *therapeia* = tratamento e *phyton* = vegetal), o estudo das plantas e suas aplicações na cura de doenças, vem crescendo notadamente desde o começo do século XXI. O Brasil destaca-se por sua flora abundante e pela prática do uso de plantas medicinais como parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), sendo uma referência mundial na área (“Práticas Integrativas e Complementares (PICS): quais são e para que servem”, 2020).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas a garantir o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Dentre as diretrizes e linhas prioritárias estabelecidas estão a ampliação das opções terapêuticas aos usuários, promoção da pesquisa e desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, sustentabilidade da cadeia produtiva e fortalecimento da indústria farmacêutica nacional nesse campo, uso racional da biodiversidade e repartição dos benefícios decorrentes do acesso aos recursos genéticos de plantas medicinais (BRASIL, 2016a).

Entretanto, a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) de 2020 do Ministério da Saúde considera somente 12 fitoterápicos, número insignificante comparado aos medicamentos convencionais (BRASIL, 2019). Diante desse dado, são necessárias mais pesquisas para a descoberta de novas opções terapêuticas eficientes, acessíveis e de baixo custo para o tratamento da endometriose.

O Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma planta de origem asiática que foi introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVI, tornando-se extremamente popular no país. Suas propriedades terapêuticas são conhecidas pela inibição da síntese das prostaglandinas e por possuir efeito similar aos anti-inflamatórios não hormonais no tratamento da artrite reumatoide (FUNK *et al.*, 2016).

A ação dos componentes ativos do *Zingiber sp* foi demonstrada a partir da síntese e secreção de citocinas nos locais de inflamação aguda e em algumas vias de inflamação crônica (RASYIDAH *et al.*, 2014). Além disso, possui ação antioxidante e efeito imunomodulador, reduzindo a produção das citocinas pró-inflamatórias (CAKIR *et al.*, 2018; MOŠOVSKÁ; NOVÁKOVÁ; KALIŇÁK, 2015) .

Pesquisas utilizando o gengibre têm mostrado os efeitos anti-inflamatórios em várias doenças. O *Zingiber sp* é uma planta culturalmente aceita, de fácil plantio, baixo custo e acessível à população.

Este estudo se propõe a avaliar os efeitos do extrato aquoso *Zingiber officinale* Roscoe na endometriose induzida em ratas Wistar. Os resultados poderão contribuir para o melhor entendimento da ação do gengibre sobre a endometriose, possibilitando se tornar uma opção terapêutica para melhorar a qualidade de vida da população portadora dessa patologia.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Endometriose

Em 1860, o pesquisador Karl Freiherr von Rokitansky estudou a presença de tecido uterino anormal fora do útero em autópsias, sendo um dos primeiros a detectar a endometriose. Somente a partir desse momento a doença passou a ser descrita e bem estudada, apesar dos registros sugestivos datarem há mais de 2.500 anos (CORRÊA, 2014).

A etiopatogenia ainda é incerta. John Albertson Sampson, em 1927, propôs a causa da doença em seu artigo sobre a teoria da menstruação retrógrada, em que postula o implante de células endometriais provenientes do refluxo do sangue menstrual das trompas para a cavidade abdominal (SAMPSON, 1927). Entretanto, essa teoria possui limitações para explicar a origem de focos em sítios distantes e em homens submetidos à terapia estrogênica.

Dessa forma, Gruenwald (1942) sugeriu a teoria da metaplasia celômica, segundo a qual as células mesoteliais de qualquer órgão poderiam sofrer diferenciação para células endometriais. Contudo, o processo pelo qual a metaplasia ocorre permanece especulativo e os achados de endometriose na pleura, diafragma e sistema nervoso central, que corroboram essa teoria, poderiam ser explicados pela disseminação metastática por via hemática ou linfática.

Desde os anos 1940, diversos estudos relataram múltiplos parentes afetados pela endometriose, sugerindo uma tendência genética. A partir da metanálise dos estudos do genoma completo (GWA), foram descobertas regiões comuns no cromossomo 7 em 7p15.2 e no cromossomo 1 em 1p36.12 associadas ao desenvolvimento da endometriose em populações japonesas e europeias. Outros estudos encontraram associações com variantes nos genes WNT4, LINC00339, CDC42, CDKN2B-AS1, GREB, FN1, NFE2L3 e HOXA10. Também foram identificados variantes nos genes dos receptores hormonais estrogênio, progesterona, hormônio luteinizante, androgênio e hormônio folículo estimulante como fatores que contribuem

para o risco do desenvolvimento da endometriose (BIANCO; CHRISTOFOLINI; BARBOSA, 2020).

Em 1980, Weed & Arquembourg postularam que o sistema imune possuía um papel fundamental no desenvolvimento da doença. Os autores observaram o depósito de C3 e a presença de IgG no endométrio tópico e propuseram que o endométrio ectópico seria capaz de promover resposta autoimune, resultando em infertilidade (WEED; ARQUEMBOURG, 1980).

Diversas alterações celulares e moleculares foram descritas tanto para os implantes endometriais quanto para o peritônio afetado. Os implantes ectópicos são responsivos ao estrogênio e à progesterona, produzindo uma série de imunomoduladores, mediadores inflamatórios e proteínas envolvidas no processo oxidativo nos estágios finais do ciclo menstrual (WU; HSIAO; TSAI, 2015). As reações de inflamação pélvica em pacientes com endometriose estão relacionadas às manifestações imunológicas locais e sistêmicas, através do acúmulo de células inflamatórias e aumento da produção de citocinas inflamatórias, como interleucina 1, TNF- α , interleucina 6 e interleucina 8. Essas citocinas estimulam as metaloproteinases e a angiogênese (MALVEZZI; RIZZO, 2020). Nesse ambiente ocorre a superprodução das espécies oxidativas de oxigênio, as quais prejudicam a função celular e alteram a expressão gênica através da regulação de fatores de transcrição sensíveis a redox, como o NF- κ B. Este é ativado em lesões endometrióticas, o que estimula a síntese pró-inflamatória de citocinas e gera um loop de feedback positivo (CHO; KIM, 2018).

Os sintomas estão relacionados aos órgãos acometidos. Quando a endometriose está localizada na região abdominal pode ser assintomática ou pode incluir dor abdominal, dispareunia, disquezia e infertilidade. Como tal, a endometriose não só tem um impacto significativo na vida de milhões de mulheres e suas famílias, mas também está associada a uma enorme sobrecarga socioeconômica (SARIDOGAN *et al.*, 2017; HIRSCH *et al.*, 2018).

O tratamento deve ser individualizado, conforme as formas de apresentação da doença: cistos ovarianos devem ser tratados, na maioria das vezes, cirurgicamente, por via laparoscópica; e nos casos de cistos menores que 3 cm, oligossintomáticos, a

conduta conservadora pode ser instituída. Nas formas peritoneais podem ser usados anti-inflamatórios não hormonais, contraceptivos hormonais, progestagênicos ou análogos do GnRH. Na endometriose superficial, o tratamento medicamentoso deve ser a primeira escolha, e na profunda parece não haver superioridade da cirurgia sobre o tratamento clínico (SCHOR; SATO; KOPELMAN, 2014) .

A terapia hormonal visa eliminar o estímulo estrogênico, diminuindo a produção ou bloqueando seus efeitos. O objetivo é reduzir os focos endometrióticos e controlar os sintomas, melhorando, conseqüentemente, a qualidade de vida. No quadro 1 estão demonstrados os tratamentos farmacológicos indicados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016b).

A cirurgia depende da forma da doença, quadro clínico, falha do tratamento clínico, idade da paciente e desejo reprodutivo. Em 2008, o Comitê de Normas e Práticas da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva declarou que a endometriose deve ser vista como uma doença crônica, com tratamento em longo prazo, o qual exige uma estratégia para maximizar o tratamento medicamentoso em detrimento do cirúrgico (PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2008). Entretanto, o *The American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) recomenda a terapia cirúrgica conservadora para diagnóstico e tratamento, combinada com terapias médicas supressoras em adolescentes, de modo a evitar a proliferação endometrial (ACOG..., 2018).

Quadro 1 - Medicamentos, mecanismo de ação e reações adversas de drogas usadas no tratamento hormonal da endometriose

(continua)

Medicamentos	Mecanismo de ação	Reação adversas
Anticoncepcionais orais	Mantêm níveis constantes de estrogênio e progesterona e inibem a secreção hipofisária de LH e FSH.	Náuseas. Alteração do fluxo menstrual. Aumento de peso. Acne. Aumento do risco de tromboembolismo.

Quadro 1 - Medicamentos, mecanismo de ação e reações adversas de drogas usadas no tratamento hormonal da endometriose

(conclusão)

Medicamentos	Mecanismo de ação	Reação adversas
Danazol	Inibe a liberação de GnRH e o pico de LH. Aumenta os níveis de androgênios e diminui os de estrogênios.	Alterações lipídicas. Lesão hepática. Diminuição do volume das mamas. Caibras. Aumento do apetite. Acne. Edema.
Progestágenos	Inibição de gonadotrofina hipofisária e produção de hormônios ovarianos.	Redução da densidade mineral óssea. Aumento de peso. Depressão.
Análogos do GnRH	Desensibilização dos receptores de GnRH, impedindo a síntese hipofisária de LH e FSH.	Redução da massa óssea. Fogachos. Bloqueio ovariano prolongado. Craurose.
Inibidores da aromatase	Inibem a enzima p450 aromatase que no epitélio endometrial transforma testosterona circulante em estrogênio.	Fogachos. Sudorese noturna. Craurose.

Fonte: Brasil (2016b).

O consenso de Cuidados da Mulher com Endometriose de 2013, da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia, não recomenda o uso de suplementos nutricionais ou medicina alternativa no tratamento da endometriose associada à dor por não estarem estabelecidos os potenciais benefícios e riscos. Contudo, reconhece que algumas mulheres podem beneficiar-se com essas práticas (DUNSELMAN *et al.*, 2014).

Em 2016, uma revisão da Cochrane, ao avaliar o uso de suplementos dietéticos utilizados para tratamento de dismenorreia, chegou à conclusão de que os estudos foram de baixa qualidade e os resultados insatisfatórios. Entretanto, houve dados favoráveis quanto ao gengibre, valeriana e outros (PATTANITUM *et al.*, 2016).

2.2 Endometriose em modelos animais

Devido às considerações éticas do estudo em humanos, os pesquisadores da endometriose dependem do uso de modelos experimentais em animais para a análise da fisiopatologia e tratamento da doença. Os modelos mais usados são em macacos e roedores (coelhos, ratos e camundongos).

2.2.1 Modelos experimentais em macacas

Ao contrário de outros modelos, somente macacas menstruam e desenvolvem naturalmente endometriose similar à mulher. Porém, o desenvolvimento natural da doença nessa espécie pode durar vários anos, o que inviabiliza o uso desse método em pesquisas (KING *et al.*, 2016).

Em 1953, Scott, Te Linde e Wharton (1953) induziram endometriose em macacas Rhesus, desviando o fluxo menstrual normal e clampeando o colo uterino. Outros estudos inocularam fragmentos de tecido endometrial coletados a partir da curetagem uterina, no peritônio de macacas babuínas (D'HOOGHE *et al.*, 1995) e cinomolgos (SILLEM *et al.*, 1996), obtendo êxito no crescimento do tecido endometrial ectópico.

Entretanto, mesmo com o sucesso do modelo de endometriose peritoneal induzida em macacas, com endocrinologia semelhante à humana, evolução e tempo uniforme, possibilidade de documentação das alterações e presença de um ciclo natural, ainda há a necessidade de maiores investimentos, complexo manejo dos animais e desafios éticos no uso de primatas, o que dificulta a sua implementação nas pesquisas.

2.2.2 Modelos experimentais em coelhas

Os modelos experimentais em coelhas são aplicados no estudo dos efeitos da endometriose sobre a fertilidade. O endométrio é transplantado do corno do útero para o peritônio, causando alterações no local, o que explica a redução da fertilidade (KING *et al.*, 2016).

2.2.3 Modelos experimentais em ratas e camundongas

Pequenos roedores em modelos experimentais têm vantagens sobre outras espécies devido ao tamanho reduzido, como necessidade de criadouros menores, grandes ninhadas, gestações curtas, disponibilidade dos animais, anticorpos contra proteínas murina e de ratos, conhecimento do genoma do camundongo, habilidade de estabelecer lesões endometrióticas e baixo custo (AMARAL *et al.*, 2009; BRUNER-TRAN *et al.*, 2018).

Todavia, esses modelos têm uma série de desvantagens: grande número de técnicas experimentais utilizadas, intervalo filogenético entre os não primatas e os humanos, ausência de ciclos menstruais e lesões diferentes das que ocorrem em humanos. Tais lesões consistem em cistos que contêm fluido seroso claro, sem evidência de neoangiogênese (AMARAL *et al.*, 2009).

Apesar dessas diferenças, os modelos experimentais em ratas são de grande importância para o estudo da doença e o teste de novas modalidades terapêuticas (AMARAL *et al.*, 2009).

Os modelos mais usados atualmente são os de camundongas imunocomprometidos, ratas imunocompetentes e as expostas a tóxicos.

2.2.3.1 Endometriose experimental em camundongas imunocomprometidas

Incluem camundongas atímicas, que têm uma mutação espontânea no gene forkhead box N1 (FOXN1), resultando em um timo subdesenvolvido e baixa células T, camundongas com imunodeficiência combinada severa (SCID), com disfunção de linfócitos T e B, causado pela mutação da *Prkdc* (enzima reparadora de DNA) no cromossomo 16 e os Rag2y(c) com deficiência das células T, B e natural *killer* (NK), não apresentando resposta imune em longo prazo, ao contrário dos dois anteriores (BRUNER-TRAN *et al.*, 2018).

Esses animais são usados em modelo heterólogo em que fragmentos endometriais de humanos são injetados por via intraperitoneal ou subcutânea (AMARAL *et al.*, 2009). As camundongas atímicas e SCID são especialmente úteis no estudo das fases iniciais da doença, enquanto o Rag2y(c) permite maior tempo de observação e a enxertia de células imunitárias humanas (BRUNER-TRAN *et al.*, 2018).

2.2.3.2 Endometriose experimental em ratas imunocompetentes

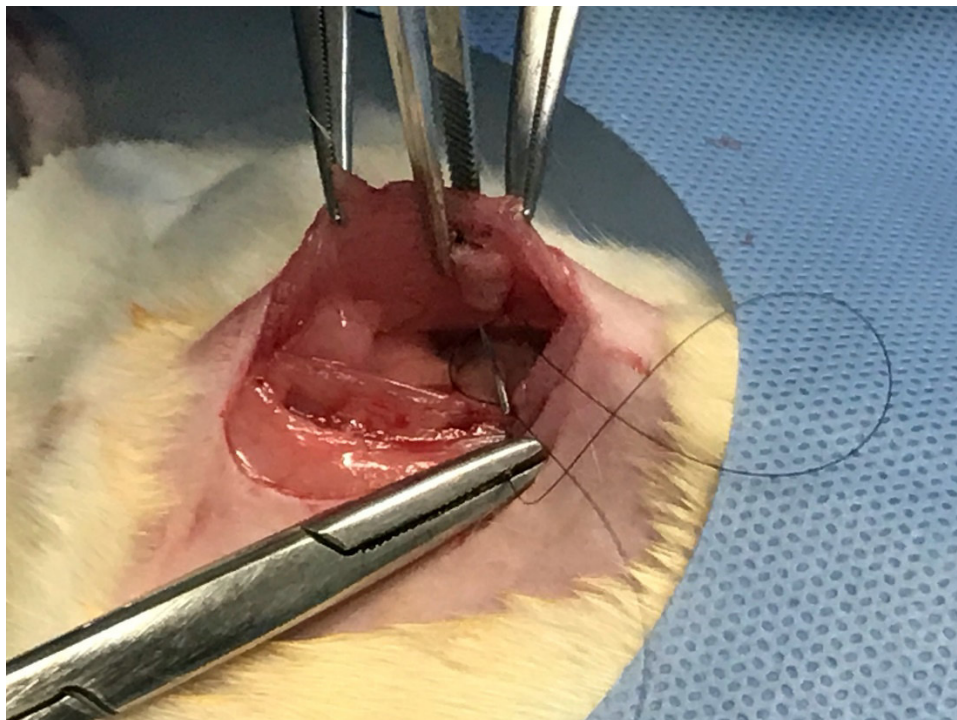
A endometriose é uma doença que depende do estímulo estrogênico para desenvolver. Entretanto, o sistema imunológico apresenta uma função importante na fisiopatologia, limitando as pesquisas com o uso de cobaias imunocomprometidas. Assim, os modelos com ratas imunocompetentes é essencial para examinar a influência do sistema imune no desenvolvimento e progressão da patologia (BRUNER-TRAN *et al.*, 2018).

Nesses modelos chamados de homólogos, o endométrio é obtido do útero do próprio animal e suturado ou disperso na cavidade peritoneal (AMARAL *et al.*, 2009).

O modelo cirúrgico foi descrito pela primeira vez por Jones, que reproduziu a doença fixando fragmento do endométrio retirado do corno uterino direito à parede lateral do abdome em ratas Sprague-Dawley (figura 1) (JONES, 1984).

Em 1985, Vernon e Wilson induziram endometriose implantando 3 fragmentos de endométrio retirados do corno uterino direito de ratas Sprague-Dawley no mesentério e 1 fragmento no ligamento útero-ovário (VERNON; WILSON, 1985). Variantes desse modelo incluem implantes na parede peritoneal, colón e músculo gastrocnemius (SIMITSIDELLIS; GIBSON; SAUNDERS, 2018).

Figura 1 - Tecido retirado do corno lateral direito e implantado na parede lateral esquerda do abdome de ratas.



Fonte: Fotografia da pesquisa realizada pelo autor, em 2019.

Recentemente, grupos de estudo estão usando modelos de ratas singênicas, em que o útero de um animal é removido durante o ciclo estral, picado e injetado no peritônio em uma ou mais ratas receptoras, com resultados semelhantes aos modelos de camundongas imunocomprometidas. Esse modelo apresenta vantagens sobre o cirúrgico, pois o desenvolvimento da endometriose é semelhante ao da menstruação retrógrada em mulheres. Logo, tanto o doador quanto o receptor podem receber a intervenção ou manipulado antes da indução da doença, além da grande quantidade de ratas transgênicas em que os genes específicos podem ser eliminados ou sobreexpressos (BRUNER-TRAN *et al.*, 2018).

2.2.3.3 Modelos expostos a tóxicos

O papel do meio ambiente no desenvolvimento da doença é controverso e continua a ser pesquisado. Como consequência da industrialização, o homem está sendo exposto a uma ampla gama de agentes tóxicos sintéticos, diversos produtos químicos que atuam como perturbadores do sistema endócrino.

A Dioxina (tetraclorodibenzeno-p-dioxina 2,3,7,8-TCDD) é uma substância cancerígena, subproduto indesejável da síntese de herbicidas, desinfetantes e outros, proveniente da poluição gerada por indústrias de inseticidas clorados, que foi associada ao aumento do risco de desenvolver endometriose em primatas (RIER, 1993). A TCDD liga-se ao receptor de hidrocarboneto de arilo (AHR), um receptor nuclear, alterando a função uterina e promovendo processos inflamatórios ligados e endometriose (POCAR *et al.*, 2005; BRUNER-TRAN *et al.*, 2008).

Portanto, os modelos em roedores expostos às substâncias tóxicas têm sido utilizados para explorar o papel potencial desses compostos no desenvolvimento da endometriose.

2.3 *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre)

Descrito pela primeira vez pelo botânico inglês William Roscoe, em 1807, é de origem do sudoeste da Ásia e do Arquipélago Malaio. É uma planta herbácea da família Zingiberaceae, podendo alcançar até 1,5 metros de altura de caule ereto. É formado por muitas folhas dísticas, sendo as basilares simples, com bainhas glabras e estrias no sentido longitudinal; e as superiores amplexicaules na base e terminam com um limbo, linear e lanceolado. As flores apresentam-se zigomorfas, hermafroditas, com colaração amarelo-esverdeada. O fruto é uma cápsula triloculada, com sementes azuis e albúmen carnoso (figura 2) (CORRÊA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1994).

Figura 2 - *Zingiber officinale* Roscoe



Fonte: Köhler (2018)

O rizoma, resultante de antigos caules aéreos, apresenta corpo alongado, pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, de 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. Sua coloração vai do amarelo couro ao marrom brilhante, estriado na longitudinal. Na sua parte inferior possui muitas raízes adventícias, cilíndricas, carnosas e de cor brancacentas. Microscopicamente apresenta cortex isodiamétrico, com células parenquimatosas de parede fina, contendo grânulos de amido, e células de secreção de paredes suberizadas, contendo oleoresinas de cor marrom amareladas e feixes acompanhados por fibras vasculares. A endoderme, de cor marrom claro, apresenta células de paredes finas e radiais suberizadas e o estelo com tecido parenquimatoso, numerosas células secretoras, oleoresinas amareladas e espalhadas, feixes vasculares não lignificados, reticulados, escalariforme e vasos espirais (figura 3) (SERPE; BONATO, 2004).

Figura 3 - Rizoma do *Zingiber officinale* Roscoe e estrutura interna



Fonte: Fotografia da pesquisa realizada pelo autor, em 2020

O cultivo exige solos bem drenados, arenosos, férteis e ricos em matéria orgânica, além do clima tropical, quente e úmido, com períodos bem definidos de calor e umidade. No Brasil, os maiores produtores são os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo (DONALISIO; SOUZA; DUARTE, 1980; CORRÊA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1994; DESDALES, 2013).

O rizoma de gengibre é amplamente comercializado em função de seu emprego na medicina popular (excitante, estomacal e carminativo), na alimentação, industrial, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria, como pães, bolos, biscoitos e geleias (CORRÊA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1994). Diversos estudos indicam que os compostos encontrados no gengibre são eficazes no alívio dos sintomas de doenças inflamatórias crônicas, como a colite ulcerosa e artrite reumatoide, considerando a sua ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, bactericida e antiviral (NAGENDRA CHARI *et al.*, 2013; HOSSEINZADEH *et al.*, 2017; CAKIR *et al.*, 2018).

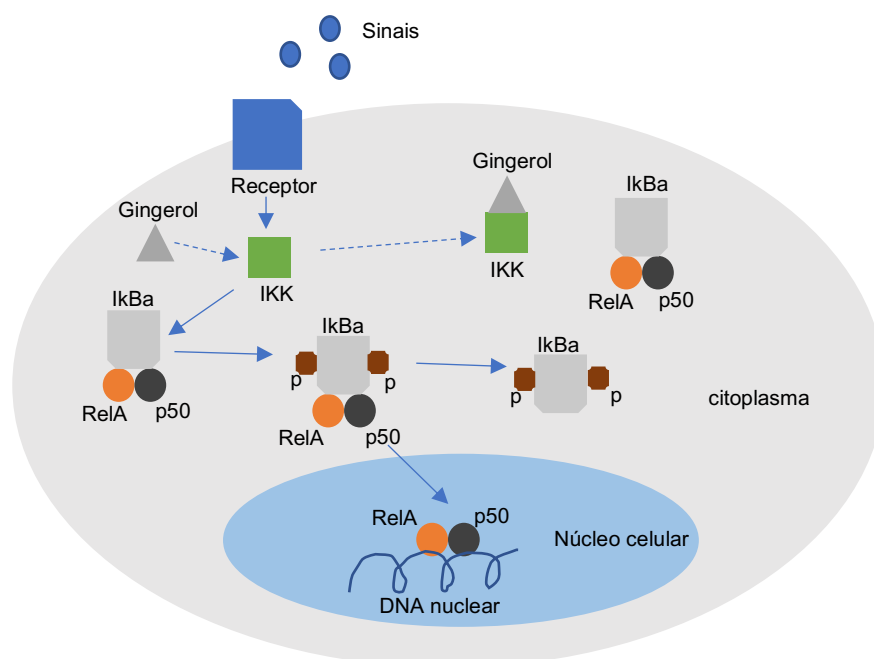
São descritos mais de 115 componentes do gengibre fresco e seco. A composição química tem como principais constituintes os carboidratos e lipídeos, dentre eles ácidos graxos livres (ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico), óleo

resina (homólogos de gingerol e zingerona), óleos voláteis (zingibereno, felandreno e canfeno). Os gingeróis e os shagois, a sua forma desidratada, são os compostos de maior interesse por seus efeitos benéficos à saúde (NEWALL; ANDERSON; PHILIPSON, 2002; SHAO *et al.*, 2010; BENZIE; WACHTEL-GALOR, 2011).

Choi *et al.* (2013) demonstraram em modelos de inflamação induzida por lipopolissacarídeos que o tratamento com extrato seco de gengibre resulta em diminuição dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias $\text{INF}\gamma$ e IL-6 e também uma diminuição na degradação do composto $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$, resultado na menor liberação do NF- κB . Houve também uma diminuição na fosforilação de MAP quinases, como p38 ERK1/2 e JNK, e conseguinte inibição da expressão do iNOS e COX-2.

Em alguns trabalhos foi observado que os componentes 6-gingerol e 6-shogal apresentaram efeito similar na redução da expressão da COX-2 por inibir a translocação da subunidade p65 do NF- κB e a fosforilação do $\text{I}\kappa\text{B}$, além da redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α (figura 4) (KIM *et al.*, 2005; HA *et al.*, 2012).

Figura 4 - Representação da via NF- κB e ação do gingerol. Via normal de ativação da via NF- κB (setas cheias) e com a inibição da I κB quinase (IKK) pelo gingerol (setas tracejadas), evitando a fosforilação do $\text{I}\kappa\text{B}$ e a translocação da p65 (RelA) no núcleo celular



Fonte: Skastione (2013).

Han *et al.* (2013) também constataram inibição de NO, PGE2 e IL-6 por efeito do composto presente no rizoma do gengibre, o 12-Dehydrogingerdione (12-DHGD), sobre uma cultura de macrófagos ativados por LPS, além de inibir o aumento da transcrição do iNOS e COX-2.

Lee (2016) comparou o uso de óleo essencial de gengibre, α -zingibereno, e cisplatina em cultura de células cancerígenas do colo uterino (HeLa) e (SiHa), cancerígenas de mama (MCF-7) e leucêmicas (HL60) e descreveu maior atividade citotóxica do óleo essencial e maior capacidade de induzir apoptose do α -zingibereno pela liberação do citocromo c e aumento da atividade da caspase 3.

Cardoso *et al.* (2019), usando extratos aquosos (infuso e decocto) e hidroalcoólico de *Zingiber officinale* Roscoe, constataram uma diminuição do índice mitótico em todas as composições, mais potente no extrato hidroalcoólico e sem anormalidades ou aberrações celulares em teste de *Allium* cepa L. Os autores concluíram que o gengibre possui ação antiproliferativa e não apresenta potencial genotóxico.

Os estudos mostraram efeitos do gengibre e seus componentes em vias inflamatórias ativadas na endometriose e na proliferação e apoptose celular, justificando, assim, pesquisas para seu uso no tratamento da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do extrato aquoso *Zingiber officinale* Roscoe na endometriose induzida em ratas Wistar.

3.2 Específicos

- a) Analisar o efeito macroscópico das lesões;
- b) Avaliar o aspecto histológico dos focos endometrióticos;
- c) Quantificar as citocinas fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) no lavado peritoneal das ratas.

4 ARTIGO

Submetido ao Journal of Medicinal Food Qualis B1 de Medicina II.

Zingiber officinale Roscoe (Gengibre) como opção complementar no tratamento clínico da endometriose: estudo experimental em ratas.

Ms José Meneses de Moraes Filho ¹

PhD João Nogueira Neto ^{1,2,3}

PhD George Castro Figueiredo de Mello ³

PhD Lyvia Maria Rodrigues de Sousa Gomes ²

PhD Lucilene Amorim Silva ^{2,3}

Ddo Izabelle Smith Frazão Ramos ^{2,3}

Ddo Salie Santos Rodrigues Oliveira ^{2,3}

PhD Plínio Cunha Leal ^{1,2}

1. Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto. Universidade Federal do Maranhão

2. Graduação do Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão

3. Laboratório de Cirurgia Experimental do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão

Correspondência:

José Meneses de Moraes Filho

Rodovia Ma 203, Condominio Alphaville, Lote W, casa 382 – Araçagy

Paço do Lumiar, MA CEP 65130-000

55 98 981120063

menanest@hotmail.com

Resumo

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, que causa dor e subfertilidade. O objetivo deste estudo foi analisar aspectos macroscópicos e microscópicos e quantificar as citocinas inflamatórias TNF- α e a IL 6 no lavado peritoneal de ratas com endometriose induzida e que receberam gengibre por via oral, sendo que o grupo controle por gavagem com solução de cloreto de sódio a 0,9% e o grupo gengibre por gavagem com 500 mg / kg de extrato fresco de *Zingiber officinale*. Ambos os grupos receberam gavagem por 14 dias. Os volumes médios finais das lesões foram maiores no grupo controle do que no grupo gengibre. Os focos de endometriose aumentaram no grupo controle de 45,10 mm³ para 120,92 mm³ (p = 0,02) e no grupo gengibre foi observado um pequeno aumento de 38,43 mm³ para 40,50 mm³ (p = 0,83). O crescimento foi maior no grupo controle do que no gengibre quanto ao tamanho das lesões após o implante e pós-tratamento (p = 0,004). Não foi encontrada diferença no TNF- α e IL-6 entre os grupos. O grau de atrofia da lesão foi maior no grupo gengibre (p = 0,03). O extrato de gengibre reduziu e atrofiou os volumes dos focos de endometriose autotransplantados, mas não reduziu a IL-6 e o TNF- α no líquido de lavagem peritoneal.

Palavras-chave: Endometriosis, Animal Models, *Zingiber officinale* Roscoe, Phytotherapy.

Introdução

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, que acomete em torno de 10% das mulheres da população em geral. É caracterizada por dor e subfertilidade, associada em algumas pacientes com substancial redução da qualidade de vida. Pode ser assintomática ou estar associada à dor abdominal, dispareunia, disquezia e infertilidade. Como tal, a endometriose não só tem um impacto significativo na vida de milhões de mulheres e suas famílias, mas também está associada a uma enorme sobrecarga socioeconômica (1,2).

A etiologia é incerta. Várias teorias já foram citadas, como a implantação peritoneal após refluxo menstrual via tubas uterinas, metaplasia celômica, presença

de remanescentes dos ductos de Muller, além de alterações imunológicas, disseminação hematogênica e linfática, e origem de células troncos (2,3).

Diversas alterações celulares e moleculares foram descritas tanto para os implantes endometriais quanto para o peritônio afetado. Os implantes ectópicos são responsivos ao estrogênio e à progesterona, produzindo uma série de imunomoduladores, mediadores inflamatórios e proteínas envolvidas no processo oxidativo nos estágios finais do ciclo menstrual (4-6). As reações de inflamação pélvica em pacientes com endometriose estão relacionadas às manifestações imunológicas locais e sistêmicas através do acúmulo de células inflamatórias e aumento da produção de citocinas inflamatórias, como interleucina 1, TNF- α , interleucina 6 e interleucina 8 (7-8).

O tratamento da endometriose é clínico e/ou cirúrgico, e objetiva a redução da dor, recuperação da fertilidade e melhora da qualidade de vida. O tratamento cirúrgico reduz os focos da doença e os sintomas, inerentes aos órgãos acometidos, mas sem cura definitiva. O tratamento clínico utiliza medicamentos para a indução da pseudogravidez, pseudomenopausa ou anovulação crônica, que impedem a ovulação das pacientes com desejo de gravidez, justificando novas pesquisas (8-9). A fitoterapia pode ser um método alternativo de tratamento da endometriose devido ao seu baixo custo e alta eficácia. Existem várias plantas comumente usadas para esse fim em todo o mundo (10-17).

As propriedades anti-inflamatórias do *Zingiber officinale* Roscoe são conhecidas pela inibição da síntese das prostaglandinas e por possuir efeito similar aos anti-inflamatórios não hormonais (18). A ação dos componentes ativos do *zingiber* sp foi demonstrada através da síntese e secreção de citocinas nos locais de inflamação aguda e em algumas vias de inflamação crônica (19). Além disso, possui ação antioxidante e efeito imunomodulador, reduzindo a produção das citocinas pró-inflamatórias (20,21). Porém, existe a necessidade de avaliação para o seu uso seguro e efetivo no tratamento da endometriose, assim como já foi realizado com outros extratos.

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo analisar os aspectos macroscópicos e microscópicos, e quantificar o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a

interleucina 6 em lavado peritoneal em ratas Wistar com endometriose induzida, que receberam *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre) por via oral.

Métodos

Ensaio clínico randomizado, realizado no período de setembro de 2018 a janeiro de 2019, com 20 ratas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), adultas, virgens, pesando entre 180 e 250 g, com 60 dias de vida, cedidas pelo Biotério da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Universitário da UFMA. Foram respeitadas a legislação brasileira para o uso de animais de experimentação (Lei Federal de nº 6.638/1979) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), filiado ao *International Council for Laboratory Animal Science*. Este estudo teve a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMA) CIAEP 01. 0341. 2014.

Os animais foram mantidos por um período de adaptação de 30 dias no Laboratório de Cirurgia Experimental, em gaiolas de polipropileno, com tampa de grade metálica, medindo 46 x 31 x 16 cm³, com fundo forrado com xilana, que era trocada a cada 48 horas. Os animais foram observados durante 24 horas em condições ambientais controladas em torno de 22° a 24°C, com ciclo claro/escuro, alternado de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

Antes da cirurgia, os animais foram pesados com balança eletrônica (Marte®, modelo A500, 110-220 v, indústria brasileira) e anestesiados com a dose padrão da combinação ketamina 5% e xilazina 2% (1:1), de 0,2 ml para cada 100mg de peso, por via intramuscular, com agulha hipodérmica de 13mm x 4,5 mm (Becton- Dickson®, Paraná, Brasil), na borda posterior da coxa direita, sendo considerados anestesiados quando havia ausência de reflexos corneanos e interdigitais.

Foi realizada depilação manual de uma área de 4 x 5 cm na região abdomino-caudal do animal, seguida de antissepsia com Polvidine Tópico® (polivinil-pirrolidona-iodo) e colocação de campo fenestrado. Os animais foram submetidos a incisão mediana de 3 cm com bisturi de lâmina nº 15, atingindo a pele, o plano músculo-aponeurótico e o peritônio, com visualização dos órgãos intracavitários e exposição

do útero, anexos e mesentério. Seguiu-se a identificação, apreensão, ligadura e secção do terço médio do corno uterino esquerdo, com uso de 3 pontos simples de fio de nylon 6-0 (Mononylon®, Ethicon, São Paulo, Brasil) e hemostasia. Foi realizado o fatiamento da peça retirada do útero em cortes longitudinais e transversais, formando retalhos de 4 x 4 mm, em meio líquido de Ringer lactato®, sendo transpassado ponto com fio de nylon 6-0 na região central da superfície serosa do retalho e mantido reparado.

Os retalhos foram autotransplantados na superfície peritoneal parietal do lado direito no terço posterior da parede anterior abdominal das ratas, mantendo-se a superfície serosa em contato com o mesentério e a superfície endometrial voltada para a cavidade peritoneal. A fixação foi realizada com ponto simples. A cavidade do peritônio foi coberta com gaze embebida em cloreto de sódio a 0,9% durante o procedimento.

A síntese da parede foi realizada em 2 planos de sutura contínua (pele e plano músculo-aponeurótico), com fio de nylon 5-0. Os animais permaneceram no laboratório por 21 dias. Ao final desse período, os animais foram reoperados para serem feitos os inventários da cavidade peritoneal com identificação do foco de autotransplante e medida com paquímetro digital, seguido do cálculo do volume ($4 \times \pi (\text{comprimento}/2) \times (\text{largura}/2) \times (\text{altura}/2) \times 3$). Foi usado o Sistema de Graduação de Crescimento de Implantes de acordo com Quereda *et al.* (1996). Somente aqueles que desenvolveram o grau de crescimento I a III (Figura 1) permaneceram no estudo (21).

As ratas que atingiram esse fator de inclusão foram divididas em dois grupos, cada um com 8 ratas, aleatoriamente distribuídas. O grupo controle recebeu gavagem com solução de cloreto de sódio a 0,9%, na quantidade de 1ml/ 100g de peso animal, e o grupo Zingiber recebeu gavagem com 500mg/kg ou 0,5mg/100g do extrato de gengibre, de acordo com Ali *et al.* (2008) (Galena, São Paulo, Brasil) (22).

O extrato foi preparado pela reconstituição de amostras do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, cultivadas no Estado de São Paulo, secas por atomização, pesando 0,15g em vidro relógio e acrescentado aos poucos em uma proveta preenchida com 300 ml de solução aquosa, homogeneizando lentamente. O produto foi colocado em repouso, em temperatura ambiente, em recipiente tampado por 2 horas. Em seguida,

a solução foi filtrada com auxílio de funil de Buchner e papel de filtro, envasada e rotulada.

Ambos os grupos receberam gavagem uma vez ao dia, por um período de 14 dias, em torno das 19 horas, após pesagem que foi realizada diariamente para correção da dose.

Após esse período, os animais foram submetidos à eutanásia, com jejum prévio para evitar regurgitação. Uma dose anestésica de ketamina/xilazina foi administrada até a ausência completa dos reflexos, parada respiratória e morte. Depois, a área ventral foi depilada e foram feitas duas incisões transversais, uma margeando o rebordo costal e a outra, os ossos pélvicos. Uniram-se as incisões lateralmente, expondo a cavidade peritoneal.

Para a detecção dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina 6 (IL-6), foi coletado lavado peritoneal de cada animal e foram usados kits de imunoabsorção enzimática (Rat IL-6, TNF-alpha Quantikine Ekisa Kit, R&D, Systems, Minneapolis, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Novo inventário foi realizado e foram calculadas as medidas do autotransplante e sua excisão. A peça foi limpa com cloreto de sódio a 0,9% e colocada em recipiente identificado com formol tamponado a 10%. A avaliação histológica foi feita no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFMA. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas por um único patologista, que levou em consideração a persistência de células epiteliais do autoimplante semiquantitativamente, com classificação grau III, a parede bem preservada; grau II, parede moderadamente preservada e infiltração leucocitária; grau I, a parede epitelial pobremente preservada, com uma célula epitelial ocasional; e grau 0, sem parede epitelial, conforme descrito por Keenan *et al.* (1999) (23).

A análise estatística foi realizada no programa Startplus: mac Pro 7.1.0.0/Core v7.1.30, no sistema operacional macOS 10.13 High Serra®, com nível de significância (α), utilizado para rejeitar a hipótese de 5% ($p < 0,05$). Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição da amostra. Como os dados tinham distribuição normal, utilizou-se o teste t para análise estatística.

Resultados

Endometriose foi induzida em 20 animais, entretanto, três não desenvolveram a doença e uma evoluiu a óbito no pós-operatório imediato ao implante. Não houve diferença estatística significativa entre o volume médio das lesões ($38,43 \text{ mm}^3 \pm 19,96$) no grupo gengibre e ($45,10 \text{ mm}^3 \pm 29,96$) no grupo controle 21 dias após a implantação da endometriose ($p = 0,60$). Duas semanas após o tratamento com gengibre e solução salina, no dia da eutanásia, os volumes médios finais das lesões foram maiores no grupo controle ($120,93 \text{ mm}^3 \pm 78,91$) do que no grupo gengibre ($40,50 \text{ mm}^3 \pm 19,57$), com diferença estatística significativa ($p = 0,01$) (Tabela 1).

Houve aumento do foco de endometriose no grupo controle de $45,10 \text{ mm}^3 \pm 29,96$, 21 dias pós-implantação, para $120,92 \text{ mm}^3 \pm 78,91$, no dia da eutanásia ($p=0,02$). No grupo gengibre, houve discreto aumento de $38,43 \text{ mm}^3 \pm 19,96$ para $40,50 \text{ mm}^3 \pm 19,57$, sem diferença estatística significativa ($p=0,83$).

O foco da endometriose cresceu mais no grupo controle ($75,81 \text{ mm}^3 \pm 58,95$) do que no grupo gengibre ($2,07 \text{ mm}^3 \pm 18,87$) ($p = 0,004$) (Tabela 1) ao comparar o tamanho das lesões no dia da eutanásia.

Em relação à avaliação do processo inflamatório com dosagem de citocinas no lavado peritoneal, não houve diferença na dosagem de $\text{TNF-}\alpha$ no grupo controle ($59,26 \text{ pg/ml} \pm 12,07$) em relação ao grupo gengibre ($55,00 \text{ pg/ml} \pm 13,49$) ($p = 0,51$), assim como não houve diferença na dosagem de IL-6 no grupo controle ($183,43 \pm 13,90$) em relação ao grupo gengibre ($205,18 \pm 34,81$) ($p = 0,12$) (Tabela 2).

Além disso, o grau de atrofia das lesões foi maior no grupo gengibre ($1 \pm 0,92$) do que no grupo controle ($2,25 \pm 1,16$) ($p = 0,03$) (Figura 2B e 2a, respectivamente).

Discussão

No presente estudo observou-se que o extrato de gengibre reduziu e atrofiou os volumes dos focos de endometriose implantados em ratas Wistar, embora não tenha reduzido a IL-6 e o $\text{TNF-}\alpha$ no lavado peritoneal.

Ainda não existe tratamento clínico ideal para endometriose. Em geral, o tratamento inicial na suspeita de endometriose é empírico e, geralmente, são usadas substâncias anti-inflamatórias ou que interfiram no ciclo menstrual. O medicamento ideal seria aquele que interferisse em toda a fisiopatologia da endometriose, isto é, no

processo inflamatório, no distúrbio imunofisiológico, no estresse oxidativo, no controle da proliferação celular ectópica e que, além disso, evitasse recidiva (1-6).

O arsenal terapêutico atual inclui drogas de primeira escolha com nível de evidência A, como os progestágenos, anti-progestágenos e análogos de GnRH. Não há recomendação para o uso de suplementos nutricionais, medicina complementar ou tradicional no tratamento da endometriose, porque os potenciais benefícios e/ou danos não são claros. No entanto, existe reconhecimento dos benefícios por algumas mulheres (9).

Apesar das críticas ao uso experimental de novas drogas para o possível tratamento clínico de endometriose em roedores, devido à sua grande diferença com os seres humanos, drogas consideradas como primeiras opções terapêuticas foram inicialmente testadas com esse modelo. A literatura continua a aceitar vários estudos experimentais em roedores com endometriose, dentre os quais estão os extratos de fitoterápicos (11-15).

O uso de extratos naturais com efeitos favoráveis no tratamento da endometriose experimental foi descrito por vários autores.

Machado *et al.* (2016) fizeram uso do extrato *Euterpe oleracea* (açaí) durante 30 dias, com redução significativa da área superficial dos focos, redução histológica e diminuição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), metaloproteinase 9 (MMP-9) e ciclooxigenase-2 (COX-2) pelo método de imunohistoquímica (12). Mvondo *et al.* (2017) fizeram uso de extrato de *Entada africana* Guill et Peer (mimosaceae) em diferentes doses, com avaliação nos 3º, 7º e 14º dias, e observaram prevenção na progressão da endometriose, redução da dismenorrea, promoção do crescimento de folículos ovarianos, prevenção da anovulação e estimulação do desejo sexual (13). Nahari e Ranzi (2018) avaliaram os efeitos da *Silymarin amplifies* durante 28 dias. Através da avaliação de RNA de GDNF (Fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais) e quinase reguladora extracelular (ERK 1/2), os autores identificaram redução da angiogênese, apoptose acelerada e consequente fibrose das lesões de endometriose experimental (14). Jie *et al.* (2013) fizeram uso de Sanjie Zhentong durante 28 dias, com redução significativa dos volumes dos focos de endometriose e de VEGF e TNF- α (15). Yavuz *et al.* (2014) usaram o resveratrol, que é encontrado na casca da uva, durante 7 dias, havendo redução morfológica e potente efeito anti-oxidante.

Esses estudos mostram efeitos semelhantes ao uso de medicamentos bem aceitos no tratamento clínico da endometriose, justificando, assim, pesquisas com uso de extratos naturais.

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe, *Zingiberaceae*) é um membro da família de plantas Zingiberaceae e é usado como especiaria comum em muitas regiões do mundo, desde a sua descoberta na medicina natural. Provou ser muito útil para culturas tradicionais asiáticas (indígenas e chinesas) e árabes. Em alguns estudos, identificou-se uma boa relação entre as propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anti-oxidantes do gengibre (21).

Exemplos de pesquisas experimentais em ratas, mostrando os efeitos do gengibre, foram demonstradas por Cakir *et al.* (2018) na prevenção de enterocolite em ratas Wistar, com redução significativa de TNF- α , IL-1 β , IL-6, glutathione peroxidase, superóxido desmutase, oxidina xantina, malonaldeído e mieloperoxidase, confirmando os feitos acima descritos (17). Rasyidath *et al.* (2013) mostraram aumento da catalase e malodialdehyde em testículos de ratos Wistar após o uso de extrato de gengibre (19). Mošovská *et al.* (2015) confirmaram esse efeito anti-oxidante do extrato de gengibre através de dois métodos de espectometria, teste de ABTS e DPPH, mostrando forte habilidade para eliminar esses radicais (20). Esses dados sugerem o gengibre como uma boa escolha para pesquisas no tratamento da endometriose, inicialmente experimental.

Conclusão

A avaliação da eficácia do extrato de gengibre na endometriose experimental em ratas Wistar, proposta nesta pesquisa, buscou avaliar o volume dos autotransplantes antes e depois do tratamento proposto, a histologia das camadas glandulares dos focos e os fatores pró-inflamatórios: Interleucina 6 e TNF- α no lavado peritoneal no final do tratamento e comparação com o grupo controle após 14 dias de exposição ao referido extrato.

A dose usada foi de 500 mg/kg, conforme descrita por Ali *et al.* (22) em sua revisão sobre propriedades fitoquímicas, farmacológicas e toxológicas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), apesar de outros pesquisadores terem usado tanto doses menores, de 100 mg/kg (19), quanto doses maiores, de 1.000 mg/dia (21). Na avaliação do lavado peritoneal não foi observada uma redução significativa da IL-6 e

TNF- α , provavelmente devido à necessidade de um maior período de exposição a esse extrato (12,14,15) e de doses maiores do extrato de gengibre.

As reduções significativas dos volumes dos focos de endometriose autotransplantados ($p=0,01$) e aumento da atrofia ao exame histológico no grupo gengibre, concordando com a maioria dos extratos testados na endometriose experimental citados acima (8,12-15), poderia ser atribuída à ação citotóxica e indutora da apoptose do composto α -zingibereno (24), presente no rizoma da planta. Contudo, a hipótese não pode ser confirmada pela ausência de experimentação específica no estudo.

Sugere-se, diante do exposto, aumentar a dose e utilizar o extrato aquoso de gengibre por um período maior de tempo, além de analisar outros mediadores da inflamação, citotoxicidade e marcadores do estresse oxidativo.

Referências

1. Hirsch M, Begum MR, Paniz E, Barker C, Davis CJ, Duffy JMN. Diagnosis and management of endometriosis: a systematic review of international and national guidelines. BJGO 2018;125:556-564.
2. Saridogan E, Becker CM, Feki A, Grimbizis GF, Hummelshoj L, Keckstein J, Nisolle M, et al. Recommendations for the surgical treatment of endometriosis. Part 1: ovarian endometrioma. Gynecol Surg 2017;14(1):27.
3. Suardika A, Pemayun T G A. New insights on the pathogenesis of endometriosis and novel non-surgical therapies. J Turk Ger Gynecol Assoc 2018;19:158-64.
4. Wu MH, Hsiao KY, Tsai SJ. Endometriosis and possible inflammation markers. Gynecology and Minimally Invasive Therapy 2015;4:61-67
5. Ziętek A, Futyma K, Nowakowski L, Gogacz M, Rechberger T. Journal of Acute Disease 2015; 4(3): 169–172.
6. Scutiero G, Iannone P, Bernardi G, Bonaccorsi G, Spadaro S, Volta CA, Greco P, Nappi L. Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. Oxid Med Cell Longev 2017;19:1-7.
7. Cho YJ, Kim HY. Oxidative stress and endometriosis. Kosin Medical Journal 2018;33:135-140.

8. Neto NJ, Coelho TM, Aguiar GC, et al. Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (Cat's claw) extract. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011;154:205–8.
9. Dunselman GAJ, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe D, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. Hum Reprod 2014; 29(3):400-12
10. Dog TL. Endometriosis. In: White K, editor. Women's health in complementary and integrative medicine. United States: Elsevier Inc.; 2005. p. 51–93.
11. Demirel MA, Suntar I, Ilhan M, Keles H, Akkol EK. Experimental endometriosis remission in rats treated with *Achillea biebersteinii* Afan.: histopathological evaluation and determination of cytokine levels. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2014(175):172–177.
12. Machado DE, Rodrigues-Baptista KC, Alessandra-Perini J, Soares de Moura R, Santos TAd, Pereira KG, et al. *Euterpe oleracea* Extract (Açaí) Is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis. PLoS ONE 2016;11(11): 1-17.
13. Mvondo MA, Essono SM, Tatsinkou FDB, Ateba SB, Njamen D. The Root Aqueous Extract of *Entada africana* Guill. et Perr. (Mimosaceae) Inhibits Implant Growth, Alleviates Dysmenorrhea, and Restores Ovarian Dynamic in a Rat Model of Endometriosis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2017; 2017:1-15.
14. Nahari E, Razi M. *Silymarin amplifies* apoptosis in ectopic endometrial tissue in rats with endometriosis; implication on growth factor GDNF, ERK1/2 and Bcl-6b expression. Acta Histochem 2018;120(8):757-767.
15. Jie Z, Zheng G, Wei-Yi Z, Wei X, Ya-Li L. Beneficial effects of the Chinese herbal medicine Sanjie Zhen- tong Capsule on experimental endometriosis in rats. Chin J Nat Med 2013, 11(6): 0666–0672.
16. Yavuz S, [Aydin NE](#), [Celik O](#), [Yilmaz E](#), [Ozerol E](#), [Tanbek K](#). Resveratrol successfully treats experimental endometriosis through modulation of oxidative stress and lipid peroxidation. J Cancer Res Ther 2014; 10(2):324-329.
17. Saltan G, Süntar I, Ozbilgin S, Ilhan, Demirel MA, Oz BE, Keleş H, Akkol EK. *Viburnum opulus* L.: A remedy for the treatment of endometriosis demonstrated by rat model of surgically-induced endometriosis. J Ethnopharmacol 2016;193:450-455.

18. Funk JL, Frye JB, Oyarzo JN, Chen J, Zhang H, Timmermann BN. Anti-Inflammatory Effects of the Essential Oils of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in Experimental Rheumatoid Arthritis. *PhamaNutrition* 2016;4(3):123-31.
19. Rasyidah TI, Suhana S, Nur-Hidayah H, Kaswandi MA, Noah RM. Evaluation of Antioxidant Activity of *Zingiber Officinale* (Ginger) on Formalin-Induced Testicular Toxicity in Rats. *J Med Bioeng* 2014; 3(3):149-53.
20. Mošovská S, Nováková D, Kaliňák M. Antioxidant activity of ginger extract and identification of its active components. *Acta Chi Slov* 2015; 8(2):115-19.
21. Quereda F, Barroso J, Acien P. Individual and combined effects of triptoreline and gestrinone on experimental endometriosis in rat. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;67:35-40.
22. [Ali BH](#), Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(2):409-20.
23. Keenan JA, William-Boyce PK, Massey PJ, Chen TT, Caudle MR, Bukovsky A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertil Steril* 1999;72(1):135–41.
24. Lee, Y. Cytotoxicity evaluation of essential oil and its component from *Zingiber officinale* Roscoe. *Toxicological Research* 2016; 32(3): 225-230.

Tabela 1. Tamanho do foco de endometriose para um grupo de ratos antes e após o tratamento por via oral, durante 14 dias com gengibre (0,5mg/100g), ou solução salina (1ml/ 100g).

Grupo	Volume inicial	Volume final	Variação de tamanho	P
Gengibre	38,43 mm ³ ± 19,96	40,50 mm ³ ± 19,57	2,07 mm ³ ± 18,87	0,83
Controle	45,10 mm ³ ± 29,96	120,92 mm ³ ± 78,91	75,81 mm ³ ± 58,95	0,02
P	0,60	0,01	0,004	

T test (with $p < 0.05$ for rejecting the null hypothesis) comparing averages of the initial and final volumes before and after and between the groups.

Tabela 2. Comparação entre as dosagens de IL-6 e TNF- α no lavado peritoneal dos animais.

Grupo	TNF-α	IL-6
Gengibre	55,00 pg/ml ± 13,49	205,18 pg/ml ± 34,81
Controle	59,26 pg/ml ± 12,07	183,43 pg/ml ± 13,90
P	0,51	0,12

T test (with $p < 0.05$ for rejecting the null hypothesis) comparing cytokines dosage in ascites between groups

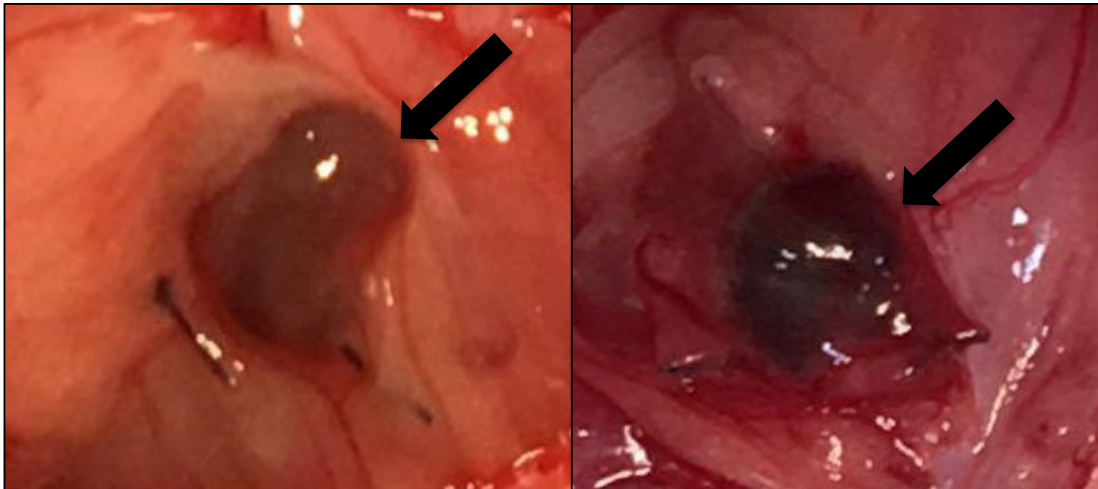


Figura 1. Fotomicrografia mostrando autotransplantes com diâmetros maiores que 4,5 mm e classificados como grau III Queredo et al (22), sendo usados para inclusão no estudo.

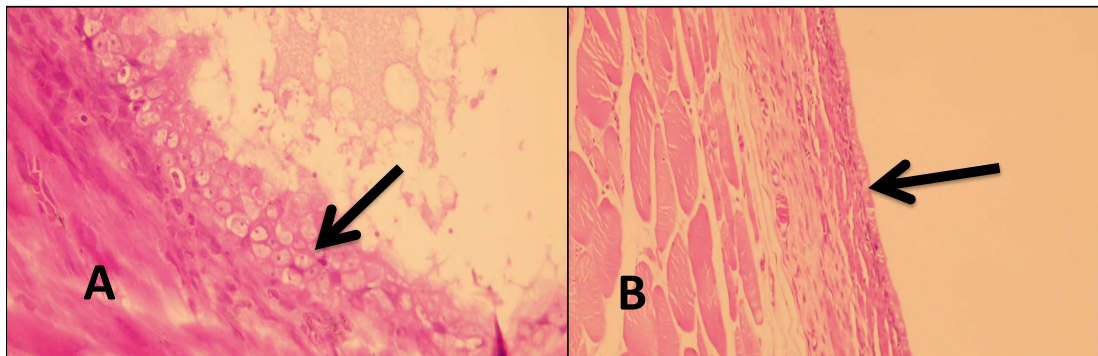


Figura 2. A, Fotomicrografia de células epiteliais bem desenvolvidas, com citoplasma (seta) bem desenvolvido (40x) do grupo de ratas tratadas com cloreto de sódio (1ml/100mg de peso corpóreo) via oral, durante 14 dias. Grau III. B, Fotomicrografia de células epiteliais moderadamente preservadas, com citoplasma (seta) pouco desenvolvido (40x) do grupo de ratas tratadas com extrato de gengibre (500mg/Kg/dia) via oral, durante 14 dias. Grau II.

5 CONCLUSÃO

O propósito da pesquisa foi avaliar os efeitos do extrato aquoso de gengibre na endometriose induzida em ratas Wistar. Após a finalização do protocolo, o grupo que recebeu extrato aquoso de *Zingiber officinale* Roscoe apresentou redução e atrofia nos volumes dos focos endometrióticos em comparação com o grupo controle, que recebeu soro fisiológico.

Foi observado também que no grupo que recebeu extrato de gengibre houve redução do crescimento dos focos da endometriose, embora não tenha havido diferença significativa nos níveis de citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α no lavado peritoneal entre os dois grupos.

Apesar de atualmente os consensos não recomendarem o uso de suplementos nutricionais, medicina complementar ou tradicional no tratamento da endometriose, pois os potenciais benefícios e riscos não são claros, neste estudo o gengibre mostrou-se uma opção interessante no tratamento da endometriose experimental.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo não avaliou todos os componentes envolvidos na resposta inflamatória da endometriose. Os níveis de interleucina 12 (IL-12), importante parâmetro na endometriose, devido à ativação de outras interleucinas, não foram aferidos devido à indisponibilidade dos kits de imunoabsorção enzimática específicos para ratas. Outras citocinas, como a interleucina 8 (IL-8), e o fator de crescimento endotelial (VEGF) não foram dosados por limitações financeiras.

Também não foram analisados os efeitos citotóxicos e a indução da apoptose dos componentes do gengibre, já que não corresponde a um objetivo da pesquisa.

Aspectos da infertilidade não foram avaliados pelo tempo abreviado de observação, assim como a dor, principal sintoma da doença, pela indisponibilidade logística da avaliação através do método de von Frey.

A pesquisa também apresentou limitações técnicas devido à ausência de padronização de metodologias e de protocolos clínicos experimentais mais refinados na literatura, que foram a base da elaboração do desenho do estudo.

Várias análises mostram a fitoterapia como uma opção terapêutica complementar no tratamento da endometriose. Todavia, são necessários mais estudos experimentais, com protocolos clínicos padronizados e a natural progressão para pesquisas em humanos a fim de validar seus resultados.

REFERÊNCIAS

- ACOG Committee Opinion No. 760: Dysmenorrhea and Endometriosis in the Adolescent. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 132, n. 6, p. e249-e258, 2018.
- AMARAL, V. F. *et al.* Desenvolvimento de modelo experimental de endometriose em ratas. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, p. 250-255, 2009.
- BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. **Herbal medicine**: biomolecular and clinical aspects. 2th ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2011.
- BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARBOSA, C. P. Genética. *In*: PODGEAC, S. (ed.). **Coleção Febrasgo endometriose**. 2. ed. Rio de Janeiro: Gen, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação nacional de medicamentos essenciais**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 879, de 12 de Julho de 2016**. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Endometriose. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016b. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2016/prt0879_15_07_2016.html. Acesso em: 10 dez. 2019.
- BRUNER-TRAN, K. L. *et al.* Dioxin may promote inflammation-related development of endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 89, n. 5, p. 1287-1298, 2008.
- BRUNER-TRAN, K. L. *et al.* Rodent models of experimental endometriosis: identifying mechanisms of disease and therapeutic targets. **Current Women s Health Reviews**, Saif Zone, v. 14, n. 2, p. 173-188, 2018.
- CAKIR, U. *et al.* Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) for the treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 225, p. 297-308, 2018.
- CARDOSO, E. dos S. *et al.* Avaliação do potencial citogenotóxico do Ziniber officinale Roscoe (gengibre), Zingiberaceae. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v. 24, n. 1, 2019.
- CHO, Y. J.; KIM, H. Y. Oxidative stress and endometriosis. **Kosin Medical Journal**, Busan, v. 33, n. 2, p. 135-140, 2018.

CHOI, Y. Y. *et al.* Dried ginger (*Zingiber officinalis*) inhibits inflammation in a lipopolysaccharide-induced mouse model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2013, p. 914563, 2013.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

CORRÊA, F. J. S. História da endometriose. In: PODGEAC, S. (ed.). **Coleção Febrasgo endometriose**. Rio de Janeiro: Elsevier Ireland, 2014. p. 1-11.

D'HOOGE, T. M. *et al.* Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 173, n. 1, p. 125-134, 1995.

DESDALES, F. Produtor de gengibre quer de volta o mercado. **Tribuna**, Curitiba, 19 jan. 2013. Disponível em: www.tribunapr.com.br/noticias/economia/produtor-de-gengibre-quer-de-volta-o-mercado. Acesso em: 21 nov. 2019.

DONALISIO, M. G. R.; SOUZA, C. J.; DUARTE, F. R. Instruções para o cultivo do gengibre. **O Agrônomo**, Campinas, v. 32, p. 176-180, 1980.

DUNSELMAN, G. A. J. *et al.* ESHRE guideline: management of women with endometriosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 400-412, 2014.

EISENBERG, V. H. *et al.* Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 125, n. 1, p. 55-62, 2018.

FUNK, J. L. *et al.* Anti-inflammatory effects of the essential oils of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in experimental rheumatoid arthritis. **PharmaNutrition**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 123-131, 2016.

GRUENWALD, P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 44, n. 3, p. 470-474, 1942.

HA, S. K. *et al.* 6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: A new approach to neuroprotection. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 211-223, 2012.

HAN, Y. A. *et al.* Anti-inflammatory effects of the *Zingiber officinale* roscoe constituent 12-dehydrogingerdione in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 cells. **Phytotherapy Research**, London, v. 27, n. 8, p. 1200-1215, 2013.

HIRSCH, M. *et al.* Diagnosis and management of endometriosis: a systematic review of international and national guidelines. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. v. 125, n. 5, p. 556-564, 2018.

HOSSEINZADEH, A. *et al.* Protective effect of ginger (*zingiber officinale roscoe*) extract against oxidative stress and mitochondrial apoptosis induced by interleukin-1 β in cultured chondrocytes. **Cells, Tissues, Organs**, Basel, v. 204, n. 5/6, p. 241-250, 2017.

JONES, R. C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinologica**, Copenhagen, v. 106, n. 2, p. 282-288, 1984.

KENNEDY, S. *et al.* ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 2698-2704, 2005.

KIANI, K. *et al.* Calligonum comosum (Escanbil) extract exerts anti-angiogenic, anti-proliferative and anti-inflammatory effects on endometriotic lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 26, n. 239, p. 11918, 2019.

KIM, E. C. *et al.* [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 335, n. 2, p. 300-308, 2005.

KING, C. M. *et al.* Models of endometriosis and their utility in studying progression to ovarian clear cell carcinoma. *Journal of Pathology*. **The Journal of Pathology**, London, v. 238, n. 2, p. 185-196, 2016.

KÖHLER, F. E. File: Koeh-146-no text.jpg. *In*: WIKIMÉDIA: Commons. [San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, 2018]. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Koeh-146-no_text.jpg. Acesso em: 18 nov. 2019.

LEE, Y. Cytotoxicity evaluation of essential oil and its component from *Zingiber officinale Roscoe*. **Toxicological Research**, Seoul, v. 32, n. 3, p. 225-230, 2016.

MACHADO, D. E. *et al.* Euterpe oleracea extract (Açaí) is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis. **PLoS One**, San Francisco, v. 16, n. 11, p. e0166059, 2016.

MALVEZZI, H.; RIZZO, L. V. Imunologia. *In*: PODGEAC, S. (ed.). **Coleção Febrasgo endometriose**. 2. ed. Rio de Janeiro: Gen, 2020.

MOŠOVSKÁ, S.; NOVÁKOVÁ, D.; KALIŇÁK, M. Antioxidant activity of ginger extract and identification of its active components. **Acta Chimica Slovaca**, Bratislava, v. 8, n. 2, p. 115-119, 2015.

MVONDO, M. A. *et al.* The root aqueous extract of *entada africana* guill. et Perr. (Mimosaceae) inhibits implant growth, alleviates dysmenorrhea, and restores ovarian dynamic in a rat model of endometriosis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2017, n. 25, p. 1-15, 2017.

NAGENDRA CHARI, K. L. *et al.* Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food Chemistry**, Barking, v. 139, n. 1/4, p. 509-514, 2013.

NAMAVAR JAHROMI, B. *et al.* Comparing the effects of glycyrrhiza glabra root extract, a cyclooxygenase-2 inhibitor (Celecoxib) and A gonadotropin-releasing hormone analog (Diphereline) in a rat model of endometriosis. **International Journal of Fertility & Sterility**, Theran, v. 13, n. 1, p. 45-50, abr. 2019.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILIPSON, J. D. **Plantas medicinais: guia para profissionais de saúde**. São Paulo: Premier, 2002.

OLIVE, D. L.; PRITTS, E. A. Treatment of endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 345, n. 4, p. 266-275, 2001.

OZKAN, S.; MURK, W.; ARICI, A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1127, p. 92-100, 2008.

PATTANITUM, P. *et al.* Dietary supplements for dysmenorrhea. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 3, Mar. 2016.

POCAR, P. *et al.* Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. **Reproduction**, Colchester, v. 129, n. 4, p. 379-389, 2005.

PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 90, n. 5, p. S260-S269, 2008. Supplement.

RASYIDAH, T. I. *et al.* Evaluation of antioxidant activity of zingiber officinale (ginger) on formalin-induced testicular toxicity in rats. **Journal of Medical and Bioengineering**, Berlin, v. 3, n. 3, p. 149-153, 2014.

RIER, S. Endometriosis in rhesus monkeys (*macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Fundamental and Applied Toxicology**, London, v. 21, n. 4, p. 433-441, 1993.

SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 14, n. 4, p. 422-469, 1927.

SARIDOGAN, E. *et al.* Recommendations for the surgical treatment of endometriosis: part 1: ovarian endometrioma. **Gynecological Surgery**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 27, 2017.

SCHOR, E.; SATO, H.; KOPELMAN, A. Tratamento clínico da dor pélvica em mulheres com endometriose. *In*: PODGEAC, S. (ed.). **Manual de endometriose**. São Paulo: Febrasgo, 2014. p. 58-63.

SCOTT, R.; TE LINDE, R.; WHARTON, L. Further studies on experimental endometriosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 66, n. 5, p. 1082-1103, 1953.

SERPE, E. R.; BONATO, R. R. Zingiber officinale ROSCOE: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

SHAO, X. *et al.* Quantitative analysis of ginger components in commercial products using liquid chromatography with electrochemical array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 58, n. 24, p. 12608-12614, 2010.

SILLEM, M. *et al.* Ectopic growth of endometrium depends on its structural integrity and proteolytic activity in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) model of endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 66, n. 3, p. 468-473, 1996.

SIMITSIDELLIS, I.; GIBSON, D. A.; SAUNDERS, P. T. K. Animal models of endometriosis: replicating the aetiology and symptoms of the human disorder. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 257-269, 2018.

SKASTIONE. NF- κ B mechanism. *In*: WIKIMEDIA. [San Francisco, CA: Wikimedia, 2013]. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nf-%CE%BAB.svg>. Acesso em: 10 dez. 2019.

VERNON, M. W.; WILSON, E. A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. Fertility and sterility. **Fertility and Sterility**, New York, v. 44, n. 5, p. 684-694, 1985.

VIGANÒ, P. *et al.* Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 177-200, 2004.

WEED, J. C.; ARQUEMBOURG, P. C. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v. 23, n. 3, p. 885-893, 1980.

WU, M. H.; HSIAO, K. Y.; TSAI, S. J. Endometriosis and possible inflammation markers. **Gynecology and Minimally Invasive Therapy**, Taiwan, v. 4, n. 3, p. 61-67, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação do efeito do Zingiber officinale Roscoe em endometriose induzida em ratas wistar” registrada com o nº 23115.004711/2017-18, sob a responsabilidade de **João Nogueira Neto**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	10/09/2017 à 10/07/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos/Wistar (<i>Rattus norvegicus albinus</i>)
Nº de animais	10 animais
Peso/Idade	180-250g/60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Lucilene Amorim Silva

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

ANEXO B – TERMO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO AO JOURNAL OF MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food

Journal of
MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food: <http://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood>

Zingiber officinale Roscoe (ginger) as a complementary option for clinical treatment of endometriosis: an experimental study in rats

Journal:	<i>Journal of Medicinal Food</i>
Manuscript ID	JMF-2019-0320
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	09-Jan-2020
Complete List of Authors:	Moura, Ed Carlos; Universidade Federal do Maranhao, Morais Filho, José Meneses ; Universidade Federal do Maranhao, DEMED 1 Sousa Gomes, Lyvia Maria ; Universidade Federal do Maranhao Nogueira Neto, João ; Universidade Federal do Maranhao Smith Frazão Ramos, Isabelle; Universidade Federal do Maranhao Santos Rodrigues Oliveira, Salie ; Universidade Federal do Maranhao Castro Melo, George ; Universidade Federal do Maranhão Amorim Silva, Lucilene ; Universidade Federal do Maranhao Cunha Leal, Plínio; Universidade Federal do Maranhao
Keyword:	Ginger
Manuscript Keywords (Search Terms):	ginger, Endometriosis, experimental study

SCHOLARONE™
Manuscripts