

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Ações terapêuticas de *Echinodorus grandiflorus* frente ao modelo
de aterosclerose**

FRANCIELLY MOURÃO GASPAROTTO

Dourados - MS

2019

FRANCIELLY MOURÃO GASPAROTTO

Ações terapêuticas de *Echinodorus grandiflorus* frente ao modelo de
aterosclerose

Tese de Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Candida Aparecida Leite
Kassuya

Dourados - MS

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G249a Gasparotto, Francielly Mourao
Ações terapêuticas de *Echinodorus grandiflorus* frente ao modelo de aterosclerose [recurso eletrônico] / Francielly Mourao Gasparotto. -- 2019.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Candida Aparecida Leite Kassuya.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Alismataceae. 2. Antioxidante. 3. Aterosclerose. 4. Dislipidemia. 5. Hipertrofia ventricular. I. Kassuya, Candida Aparecida Leite. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo
Arquimedes pelo apoio
incondicional em todos
os momentos, és um
professor para a vida,
meu orgulho.

AGRADECIMENTO (S)

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço ao meu esposo, Dr. Arquimedes, a pessoa que Deus escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins, pelos “puxões de orelha”, pelo apoio, pelos infinitos ensinamentos e principalmente por ser um profissional e ser humano exemplar a ser espelhado diariamente.

Agradeço imensamente ao meu filho Pedro, que é um presente divino em minha vida e que me ensina todos os dias o segredo de superação, meu grande exemplo e motivação.

Agradeço aos meus familiares e principalmente aos meus pais, que sempre me motivaram, mostrando o quanto era importante estudar.

Agradeço meu grande amigo e padrinho Dr. Emerson, por me oportunizar e acompanhar a concretização desse sonho, muito obrigado padrinho, sem seu apoio esse sonho não seria realizado!!!

Ao meu amigo Rhanany, pelo incentivo e contribuições no desenvolvimento desse trabalho; sobretudo, nas medidas morfométricas cardíacas, muito obrigado Rha.

À Dr. Francislaine, pela sua contribuição na finalização desse trabalho.

Agradeço muito a minha orientadora Dr. Candida, por ter aceitado dividir seus conhecimentos com tanta paciência e confiança, gratidão sem fim.

Agradeço também a todos os professores do PPGCS (programa de pós graduação em ciências da saúde), pelos ensinamentos que passaram, os quais foram, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional.

Agradeço as minhas amigas Roberta, Fernanda, Érika, Cláudia, Miriam e Jaqueline que possuem o dom de fazer os meus dias mais felizes e engraçados. Meninas, vocês já fazem parte da minha vida.

E a tantos outros amigos e parceiros que me apoiam de forma direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano na verdade continua misterioso diante de meus olhos.

(ISSAC NEWTON)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de migração das células durante o processo de desenvolvimento da aterosclerose	9
Figura 2 - Eventos na formação de lesão aterosclerótica	1
Figura 3 - Formação de radicais livres e a tentativa de equilíbrio pelos antioxidantes	2
Figura 4 – Espécie <i>Echinodorus grandiflorus</i> . Fotografias obtidas Horto de plantas medicinais da Universidade Paranaense – UNIPAR, Umuarama.	8

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Trisfosfato (ATP do inglês, <i>adenosine triphosphate</i>)
AVE	Acidente vascular encefálico
CAT	Catalase
CCR2:	Receptor de quimiocina tipo (do inglês, <i>chemokine receptor type 2</i>)
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
DASH	Dieta apropriada para hipertensos (DASH, do inglês, <i>Dietary Approaches to stop Hypertension</i>)
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes Mellitus
DRC	Dieta rica em colesterol (do inglês, <i>high cholesterol diet</i>)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ESEG	Extrato do sobrenadante de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
GPX	Glutathione peroxidase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>high Density Lipoproteins</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico sintase indutiva (iNOS, do inglês, <i>Inductive nitrite synthase oxide</i>)
IL-1	Interleucina-1 β (IL-1 β , do inglês, <i>Interleukin-1β</i>)
IL-6	Interleucina-6 (IL_6, do inglês, <i>Interleukin</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês, <i>Low-density lipoprotein</i>)
LDL _{OX}	Lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL _{OX} , do inglês, <i>Oxidized low density lipoprotein</i>)
MCP-1:	proteína de quimioatração de monócito (do inglês, <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MDA	Malondialdeído
MEVs	Mudanças no estilo de vida

NO· Radical óxido nítrico

NOS Óxido nitrito sintase

OMS Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês, *World Health*

Organization)

ONOO⁻ Peroxinitrito

O₂ Oxigênio Molecular

O₂⁻ Ânion superóxido

OH Radical hidroxila

SOD Superóxido dismutase

sICAM-1 Molécula de adesão intercelular solúvel 1

sVCAM-1 Molécula de adesão celular vascular solúvel 1

TBARS Substância reativa ao Ácido Tiobarbitúrico

UNICEF Fundo das nações unidas para infância

Ações terapêuticas de *Echinodorus grandiflorus* frente ao modelo de aterosclerose

RESUMO

Excesso de peso e dislipidemia estão entre os problemas de saúde mais graves nas sociedades ocidentais. Estas condições aumentam o risco de doença cardíaca e têm sido associadas a uma maior prevalência de arritmias cardíacas e morte súbita. O presente estudo investigou os efeitos cardioprotetores da fração solúvel em etanol de um infuso das folhas de *Echinodorus grandiflorus* (ESEG) na dislipidemia, aterosclerose e remodelação ventricular de coelhos machos da linhagem Nova Zelândia, alimentados com dieta rica em colesterol (CRD) a 1%. Primeiramente, obtivemos a ESEG e realizamos um estudo fitoquímico detalhado por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas com ionização por "electrospray". Inicialmente, os animais foram separados em 6 grupos experimentais (n=6). Depois, durante 60 dias, os animais foram alimentados com a CRD ou uma dieta sem adição de colesterol (branco, artigo 1 ou controle negativo, artigo 2). Após 30 dias do início do CRD, grupos de coelhos foram tratados por via oral (v.o.) com o veículo (água filtrada) (controle negativo, artigo 1 ou controle positivo, artigo 2) o ESEG (10, 30 e 100 mg/kg) ou sinvastatina (2,5 mg/kg). Foi realizado a coleta de sangue no primeiro dia do experimento, 30 e 60 dias após. Durante todo o período experimental, o ganho de peso corporal foi medido semanalmente. Ao final de 60 dias da alimentação com as dietas, foram investigados o perfil eletrocardiográfico, os níveis dos lipídios séricos, a concentração de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox), os níveis de malondialdeído (MDA), e os níveis séricos de nitrotirosina, interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, molécula de adesão intercelular solúvel-1 (sICAM-1) e molécula de adesão celular vascular solúvel 1 (sVCAM-1). Amostras do ventrículo direito, arco aórtico e do segmento torácico também foram coletadas para investigar o sistema de defesa antioxidante tecidual e para as análises anatomohistopatológicas. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise unidirecional de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett ou do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A investigação fitoquímica do ESEG mostrou uma grande quantidade de flavonóides C- e O-glicosídeos. Os animais tratados com ESEG tiveram ganho de peso corporal semelhante aos coelhos que foram

tratados com a dieta comercial padrão, diferente dos animais que foram alimentados com o CRD e tratados apenas com veículo após 60 dias. No grupo controle negativo, a análise eletrocardiográfica mostrou alterações morfológicas e funcionais nos animais alimentados com a CRD, indicando, sobretudo hipertrofia do ventrículo esquerdo, flacidez miocárdica, degeneração gordurosa e hipertrofia ventricular esquerda concêntrica. Um aumento significativo nos níveis de colesterol total e frações, LDLox, triglicerídeos, nitrotirosina e MDA, além de uma importante diminuição na atividade do sistema antioxidante tecidual do músculo ventricular e dos diferentes ramos arteriais também foram detectadas. Todas essas alterações foram acompanhadas pelo aumento significativo dos níveis de IL-1 β , IL-6, sICAM-1 e sVCAM-1 e pelo desenvolvimento de lesões ateroscleróticas na camada íntima de todo o sistema arterial avaliado. O ESEG na dose de 100 mg/kg reduziu significativamente os níveis dos lipídios séricos em coelhos alimentados com a CRD. Este tratamento também modulou o sistema de defesa antioxidante arterial e cardíaco, reduzindo a oxidação de lipídios e proteínas. Da mesma forma, os níveis séricos de IL-1 β , IL-6, sICAM-1 e sVCAM-1 diminuíram significativamente, acompanhados por uma redução das lesões cardíacas e ateroscleróticas em todos os ramos arteriais avaliados. Os dados obtidos mostraram que o ESEG na dose de 100 mg/kg pode ser considerado promissor para a prevenção das alterações vasculares e cardíacas induzidas por uma dieta rica em colesterol.

Palavras-chave: Alismataceae, antioxidante, aterosclerose, dislipidemia, hipertrofia ventricular

Therapeutic actions of *Echinodorus grandiflorus* against the atherosclerosis model.

ABSTRACT

Excess weight and dyslipidemia are among the most serious health problems in Western societies. These conditions increase the risk of heart disease and have been associated with a higher prevalence of cardiac arrhythmias and sudden death. The present study investigated the cardioprotective effects of *Echinodorus grandiflorus* on dyslipidemia, atherosclerosis and ventricular remodeling of New Zealand male rabbits fed a 1% high cholesterol diet (CRD). First, we obtained an ethanol soluble fraction from the infusion of *E. grandiflorus* (ESEG) leaves and performed a detailed phytochemical study by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Then, for 60 days, the animals were fed the CRD or a cholesterol-free diet (white, item 1 or negative control, article 2). After 30 days of the initiation of CRD, rabbit groups were treated orally (v.o.) with vehicle (filtered water) (negative control, item 1 or positive control, article 2) or ESEG (10, 30 e 100 mg/kg) ou sinvastatina (2,5 mg/kg). Blood collection was performed on the first day of the experiment, 30 and 60 days later. At the end of 60 days, the electrocardiographic profile, serum lipid levels, oxidized low density lipoprotein (oxLDL) concentration, levels of malondialdehyde (MDA), and serum levels of nitrotyrosine, interleukin -1 (IL-1 β), IL-6, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) were investigated. Samples of the right ventricle, aortic arch and thoracic segment were also collected to investigate the tissue antioxidant defense system and histopathological and morphometric analyzes. Statistical analyzes were performed by means of unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test or the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. ESEG treated animals had similar body weight gain to rabbits that were treated with the standard commercial diet, unlike animals that were fed the CRD and treated with vehicle alone after 60 days. Phytochemical investigation of ESEG showed a large amount of flavonoid C- and O-glycoside. Electrocardiographic analysis showed important morphological and functional alterations in the animals fed with CRD, indicating hypertrophy of the left ventricle, myocardial flaccidity, fatty degeneration, and concentric left ventricular hypertrophy.

An expressive increase in the levels of total cholesterol and fractions, oxLDL, triglycerides, nitrotyrosine and TBARS, besides a significant decrease in the activity of the tissue antioxidant defense system of the ventricular muscle and in the different arterial branches were also detected. All of these changes were accompanied by significant increases in IL-1 β , IL-6, sICAM-1 and sVCAM-1 levels, and by the development of atherosclerotic lesions in the intima-layer of the whole arterial system evaluated. Oral administration of ESEG 100 mg/kg significantly reduced serum lipid levels in rabbits fed CRD. This treatment also modulated the arterial and cardiac antioxidant defense system, reducing the oxidation of lipids and proteins. Similarly, serum levels of IL-1 β , IL-6, sICAM-1 and sVCAM-1 decreased significantly, accompanied by a reduction of cardiac and atherosclerotic lesions in all arterial branches. The data presented here showed that ESEG 100 mg/kg can be considered promising for the prevention of cardiac and vascular changes induced by a high cholesterol diet.

Keywords: Alismataceae, antioxidant, atherosclerosis, dyslipidemia, ventricular hypertrophy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aterogênese e doença aterosclerótica	16
2.2 O papel das espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) na aterogênese	21
2.3 Tratamentos disponíveis para as dislipidemias e aterosclerose	23
2.4 Plantas medicinais e propriedades bioativas	25
2.5 <i>Echinodorus grandiflorus</i>	27
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5 APÊNDICES	46
5.1 Artigo 1: Heart-Protective Effects of <i>Echinodorus grandiflorus</i> in Rabbits that Are Fed a High-cholesterol Diet	48
5.2 Manuscrito 1: Antiatherosclerotic properties of <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli: from antioxidant and lipid-lowering effects to an antiinflammatory role	58
6. CONCLUSÕES	92
7 ANEXOS	93
7.1 Aprovação do Comitê de ética (CEUA) – UFGD.	94
7.2 Aprovação do Comitê de ética (CEUA) – UNIPAR.	95

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), sobretudo a aterosclerose, exercem influência na qualidade de vida dos pacientes, sendo considerada um dos motivos mais importantes de incapacidade física e morte prematura em indivíduos acometidos (HERON et al., 2009). Caracteriza-se por um processo de início silencioso, progressivo, crônico e sistêmico, acompanhada por agressão à superfície arterial, resultado de uma resposta inflamatória e fibroproliferativa da camada íntima das artérias (LUZ et al., 2003).

O evento inicial da aterogênese ocorre através do distúrbio da função do endotélio vascular, e o principal fator contribuinte para o desencadeamento é a hipercolesterolemia (LIBBY, 2002). A lesão provocada pela presença da placa aterosclerótica pode comprometer vários segmentos arteriais, sendo responsável por diversas complicações adjacentes como coronariopatias, claudicações intermitentes dos membros inferiores, acidentes vasculares encefálicos e aneurisma da aorta abdominal (LASTÓRIA et al., 2002; TORNWALL et al., 2001).

A aterosclerose representa um dos mais importantes processos patológicos cardiovasculares e tem se constatado que o envelhecimento é um fator que exerce influência direta para sua manifestação (WENGER, 1992). Evidências sugerem que a doença aterosclerótica se manifesta principalmente em adultos, cuja incidência aumenta exponencialmente a partir dos 45 anos de idade. Entretanto, estudos detectaram uma alta prevalência (40%) de placas ateroscleróticas nas autópsias de adultos jovens, sugerindo que o processo aterosclerótico também possa ocorrer de maneira precoce (MCGILL, 2000).

A aterosclerose durante a gestação, quando na presença de hipercolesterolemia materna, pode ter início precoce na fase fetal intra-uterina, tendo progressão lenta na adolescência, com manifestações clínicas tardias quando adultos (NAPOLI et al., 1997). É fato que os homens são mais afetados do que as mulheres, sobretudo quando são mais jovens (SAITO et al., 2002).

A camada íntima dos vasos, incluindo as artérias, é constituída por tecido conjuntivo encoberto por uma monocamada de células endoteliais. Normalmente é na camada íntima dos vasos que as placas ateroscleróticas se formam. Essas placas são revestidas por uma capa fibrosa formada por matriz extracelular densa, colágeno,

células T, macrófagos e células musculares lisas (SUNG; FRIEDLANDER; KOBASHIGAWA, 2004).

A agressão ao endotélio vascular irá desencadear a disfunção endotelial, constituindo o gatilho inicial para a formação da placa aterosclerótica. Vários são os fatores que predispõem o início e manutenção desse processo, incluindo a dislipidemia, o diabetes e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (YOLANDA et al., 2000). As alterações na superfície do endotélio favorecem o aumento na permeabilidade vascular às lipoproteínas plasmáticas, retendo essas partículas no espaço subendotelial (PICCINATO; CHERRI; MORIYA, 2001; ZANELLA et al., 1992). Essas partículas lipídicas sequestradas na camada íntima de artérias de médio e grande calibre, sobretudo as lipoproteínas de baixa densidade podem sofrer oxidação (LDLox), processo que as torna imunogênicas e pró-inflamatórias (ELLULU et al., 2016).

Outra característica comum na disfunção endotelial que precede o processo aterosclerótico é a expressão aumentada de moléculas de adesão (como ICAM e VCAM), que juntamente com a secreção de citocinas pelo músculo vascular, são responsáveis pela adesão e pelo recrutamento de linfócitos e monócitos para o espaço subendotelial. Os monócitos subendoteliais se diferenciam em macrófagos que por sua vez fagocitam as partículas de LDLox e passam por um processo metamórfico se transformando em células espumosas, o principal constituintes das placas ateroscleróticas (SUKHOVERSHIN; YEPURI; GHEBREMARIAM, 2015).

Devido a importância dessa patologia muitos estudos se dedicaram a padronização de diferentes modelos experimentais que pudessem mimetizar todas as fases do processo aterosclerótico. As dietas baseadas na suplementação com colesterol entraram em destaque, deixando como obsoletos os modelos baseados em técnicas cirúrgicas ou dietas baseadas em proteínas animal e gordura vegetal (KRITCHESKY et al., 1989; KRITCHESKY, 2001).

Há mais de 20 anos os coelhos são caracterizados como o modelo experimental mais prático e reprodutível quando se pretende extrapolar dos resultados para seres humanos (RAMOS MORALES, 1987). Os coelhos desenvolvem placas ateroscleróticas com a adição de 1% de colesterol na dieta por um período de 8 a 12 semanas (KOLODGIE et al., 2003). Com essa metodologia é possível induzir lesões ateroscleróticas em todas as artérias de condutância de grande calibre, inclusive em ambas as carótidas (ALFONSO VALIENTE et al., 2001). Dados disponíveis na

literatura mostram que o tipo e a extensão da lesão aterosclerótica induzidas em coelhos é diretamente proporcional aos níveis de colesterol sérico, que conseqüentemente, é proporcional a quantidade de colesterol incluída na dieta (BOCAN et al., 1993).

Os tratamentos disponíveis para o controle da aterosclerose são moderadamente efetivos (CABRAL et al., 2007). Porém, a incidência de efeitos adversos, sobretudo com o uso das estatinas, reduz consideravelmente a adesão ao tratamento farmacológico (Bonfim et al., 2015). Assim, existem um grande interesse na descoberta de novas moléculas ou terapias alternativas (LEWEY et al., 2013). Nesse sentido, em todo o mundo, os produtos naturais foram e continuam a ser uma importante fonte de novas biomoléculas químicas ou de medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001).

A *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Alismataceae) é uma espécie nativa do Brasil, comumente conhecida como “erva do brejo”, “chá-de-campanha” ou “chapéu de couro”. É uma planta herbácea, considerada um subarbusto aquático, rizomatoso, perene, sendo facilmente encontrada em regiões alagadas ou cultivada para fins medicinais (GARCIA et al., 2010; PRANDO et al., 2015;). É empregada na medicina tradicional como laxante, hipotensor, emoliente, adstringente, diurético e hipolipemiante (LORENZI; MATOS, 2008). O extrato das folhas de *E. grandiflorus* possuem diversas ações biológicas comprovadas, dentre elas destacando-se seus efeitos, diurético (PRANDO et al., 2016), vasodilatador (TIBIRIÇA et al., 2007), antihipertensivo (LESSA et al., 2008) e anti-inflamatório (DUTRA et al., 2006).

Quimicamente a espécie é bem conhecida. Foram identificados em diferentes preparações um grande número de flavonóides glicosídicos (PRANDO et al., 2016) e substâncias terpenoídicas das quais destacam-se diterpenos dos tipos clerodano (COSTA et al., 1999; TANAKA, 2000) e cembrano, tais como equinodol (MANN; HARTMAN, 1993) e o ácido equinóico (TANAKA et al., 1997, TANAKA, 2000).

Apesar das informações acerca dos benefícios cardiovasculares desta espécie e seu extenso uso popular no tratamento da hipertensão e/ou dislipidemias, inexistem dados na literatura que mostrem o impacto na prevenção e/ou evolução da doença cardíaca e aterosclerótica induzidas pelo colesterol. Assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos hipolipemiantes, antioxidante, cardioprotetores e antiateroscleróticos da fração solúvel em etanol obtida da infusão das folhas de *E. grandiflorus* em coelhos Nova Zelândia submetidos a dieta rica em colesterol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aterogênese e doença aterosclerótica

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) acarretam um grande impacto econômico e financeiro no serviço de saúde de diferentes países. As doenças cardiovasculares, com aproximadamente 31% do total dos casos, podem ser consideradas as principais causas de morbimortalidade no Brasil (MALTA et al., 2017).

Há mais de 50 anos a aterosclerose foi definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença que possui como característica o acúmulo vascular de lipídeos, tecido fibroso e depósitos de cálcio (WHO, 1958). Atualmente sabe-se que o processo aterosclerótico é muito mais complexo e possui uma grande contribuição do processo inflamatório. Os locais da “rede vascular” onde as placas ateroscleróticas se formam mais facilmente são em áreas de maior estresse de cisalhamento, ou seja, com maior fluxo sanguíneo turbulento (KOJDA; HAMBRECHT, 2005).

Os vasos sanguíneos são formados pelas túnicas íntima (camada subendotelial de tecido conjuntivo frouxo), média (tecido elástico ou tecido muscular liso) e adventícia (tecido conjuntivo denso não modelado e tecido conjuntivo frouxo). As propriedades das células endoteliais mudam durante a transição da inflamação aguda e crônica e durante a transição da imunidade inata para imunidade adaptativa (POBER; SESSA, 2007).

Fisiologicamente sabe-se que o endotélio vascular possui importantes funções vasculoprotetoras. Seu papel na liberação de moléculas anticoagulantes e antiinflamatórias são fundamentais para a homeostasia vascular (POBER; SESSA, 2007). Além disso, o endotélio auxilia na vasodilatação, inibe a adesão leucocitária e a proliferação de células musculares lisas. Esse processo é catalizado principalmente por alguns mediadores endógenos, incluindo o óxido nítrico (NO), a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Em contraponto, o endotélio também libera agentes vasoconstritores, incluindo a endotelina, a angiotensina II, e as espécies reativas de oxigênio (ERO) (CARVALHO et al., 2001).

Em condições homeostáticas favoráveis existe um equilíbrio entre a liberação de fatores dilatadores e constritores pelo endotélio vascular. Porém, na presença de múltiplos fatores de risco incluindo a hipertensão arterial sistêmica (HAS), pode ocorrer

um desequilíbrio nesse processo, com uma redução da liberação dos mediadores vasodilatadores, conduzindo à disfunção endotelial, uma etapa limitante da gênese do processo aterosclerótico (CARVALHO et al., 2001; PICCINATO; CHERRI; MORIYA, 2001; SIMÕES; SCHMIDT, 1996). Alterações na função do endotélio em resposta a ações mecânicas (hipertensão arterial e “shear stress”), imunológicas e químicas refletem ativação da aterosclerose. Essas alterações precedem as manifestações clínicas da aterosclerose que estão associadas a perdas importantes das funções fisiológicas do endotélio. Uma delas é a regulação do tônus e do fluxo vasculares mediada pelo NO de acordo com as necessidades locais (TREPELS; ZEIHNER; FICHTLSCHERER, 2006).

Os processos envolvidos na injúria endotelial são múltiplos, além da HAS; outros fatores de risco como dislipidemias, diabetes mellitus, tabagismo, obesidade e sedentarismo também exercem expressiva importância no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (YOLANDA et al., 2000).

As dislipidemias geralmente são provocadas pelas modificações na produção, no clearance ou no catabolismo de lipídeos, em consequência de sedentarismo, dieta inadequada, fatores ambientais e/ou genéticos (RABELO, 2001). A hipercolesterolemia, em particular o aumento do LDL (Low Density Lipoproteins), é o principal preditor das DCV, porque as partículas de LDL são 70% de colesterol no sangue, sendo o principal alvo de intervenção médica. Entretanto, o aumento nos níveis de HDL (high Density Lipoproteins), popularmente conhecido como “colesterol do bem”, diminui o risco relativo para a DCV. Isso se explica devido a habilidade que o HDL tem em remover o colesterol, através do “transporte inverso” do colesterol presente nas células até ao fígado para posterior excreção. Além disso, O HDL é capaz de prevenir a agregação e a oxidação das partículas de LDL na parede arterial, diminuindo o potencial aterogênico dessa lipoproteína (GIULLUM, 2000).

Segundo Bierman (1992), o Diabetes Mellitus (DM) é um dos fatores de risco mais importantes para a doença aterosclerótica. A exposição prolongada à hiperglicemia, à hiperinsulinemia e a presença de resistência insulínica provocam alterações celulares em todas as etapas do processo aterosclerótico, exacerbando seu curso clínico (BECKMAN et al, 2002). No DM, alterações como a oxidação e a glicação das lipoproteínas, bem como na presença de partículas pequenas e densas de LDL, constituem-se em diferenças qualitativas no status de dislipidemia, tornando essa condição ainda mais aterogênica (BIERMAN, 1992; SOBENIN, et al, 1996).

Guedes e cols. (2007), analisando o impacto do uso de tabaco sobre o perfil lipídico plasmático de usuários em idades jovens, mostraram que o grupo representado pelos usuários de tabaco apresentaram os níveis séricos de colesterol total, LDL, triglicérides e apolipoproteína B100, significativamente mais elevados, e níveis séricos de HDL menores, quando comparados com grupo de não fumantes. Adolescentes fumantes tenderam demonstrar níveis de lipídeos-lipoproteínas plasmáticas alterados duas vezes maiores que não fumantes. Quando comparados aos não fumantes. Corroborando com dados publicados por Prescott e cols. (2002) e Price e cols. (1999) ao relatarem que adultos fumantes tendem a apresentar um perfil plasmático aterogênico mais comprometido quando comparados à adultos não fumantes.

A obesidade é também um importante preditor das doenças cardiovasculares. A prevalência da obesidade na infância e na adolescência traz conseqüências em curto e longo prazos, por estar associada a um perfil lipídico anormal, com aumento da concentração de colesterol total, triglicérido e LDL-c, e diminuição de HDL-c (NCEP, 2001)

O sedentarismo também tem sido apontado como fator de risco para as DCV. A prática de atividade física exerce um efeito positivo para os riscos cardiovasculares. O menor nível de atividade física e o sedentarismo estão associados com maior prevalência de obesidade infantil, apontando o sedentarismo como um fator de risco presente em idades precoces para o desenvolvimento de DCV, incluindo a aterosclerose (BYRNES et al., 1999; STEINBECK, 2001).

Todos esses fatores de risco isolados e/ou geralmente associados, irão atuar de maneira complexa e decisiva para o desencadeamento bem como a progressão lenta e crônica da doença aterosclerótica, cujo mecanismos primordiais estarão voltados principalmente sobre alterações funcionais e estruturais na camada íntima dos vasos e no endotélio (CANTOS et al., 2004).

O tecido endotelial lesado favorece a penetração de moléculas de colesterol, sobretudo o LDL, para a camada subendotelial. As moléculas de LDL são frequentemente oxidadas, convertendo-se em lipídeos (LDL_{ox}) altamente imunogênicos e pró-inflamatórios. Essas partículas são responsáveis pela estimulação da produção de várias citocinas (incluindo a IL-1 β e IL-6) nas células musculares vasculares e aumento da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e endotélio, principalmente as moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e vascular-1 (VCAM-1) (endotélio). Essas

quimiocinas atraem e facilitam a penetração dos monócitos no espaço subendotelial. Essas células são convertidas em macrófagos (especialmente o subtipo M1) e passam a fagocitar ativamente as moléculas de LDLox (pois possuem receptores scavenger para captação de LDLox). Assim, os macrófagos repletos de LDLox tem o processo migratório comprometido e sofrem um processo metamórfico e se convertem em células espumosas, que aumentam gradativamente sofrem diferentes graus de calcificação, denominando-se ateromas. Além disso, no processo inflamatório da aterosclerose, ocorre a ativação de células endoteliais e macrófagos que conduz a liberação de vários tipos de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, ROS (espécies reativas de oxigênio), os quais induzem o acúmulo contínuo da migração de leucócitos, contribuindo como desenvolvimento da inflamação (Figura 1) (BECKSTROM et al., 2007; FRIEDLANDER; ALTMAN, 2001; SUNG; FRIEDLANDER; KOBASHIGAWA, 2004). A placa ateromatosa cresce lentamente, diminuindo o fluxo sanguíneo a jusante. Em alguns casos as placas ficam tão grandes que podem se projetar para o lúmen da artéria, reduzindo acentuadamente o fluxo sanguíneo e causando oclusão completa do vaso (RODRIGUES; GOTTSCHALL, 1992).

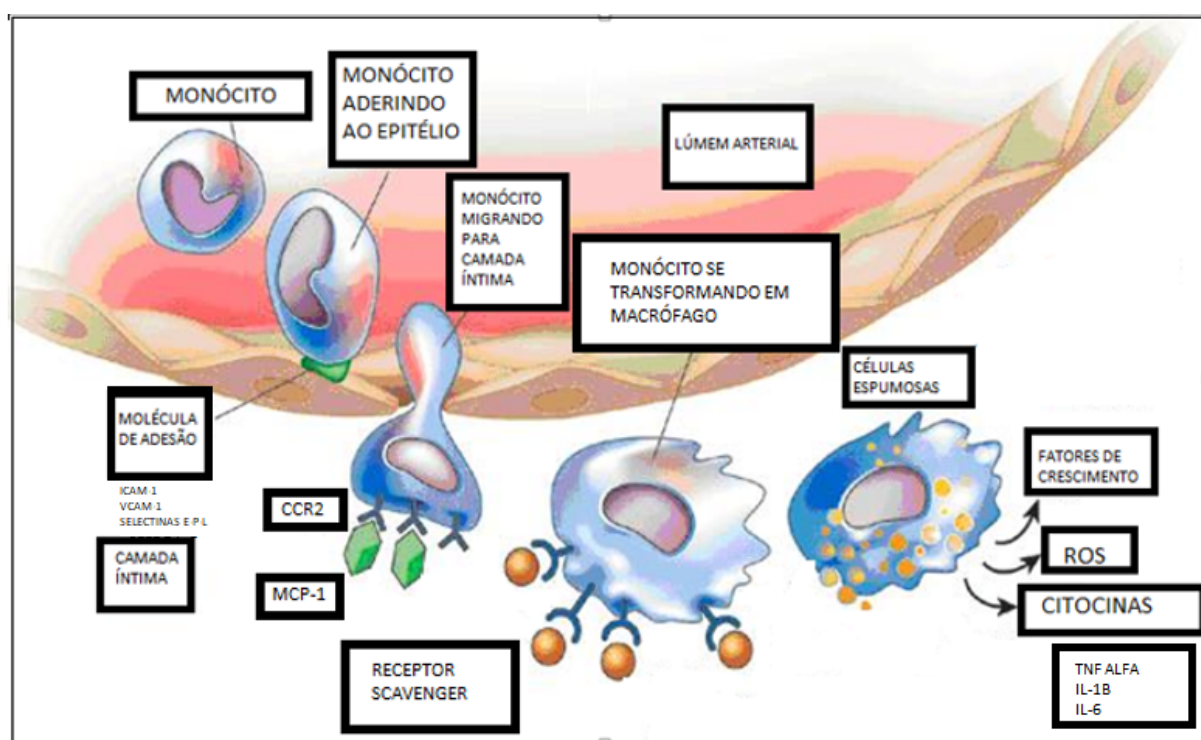


Figura 1: Processo de migração das células durante o processo de desenvolvimento da aterosclerose. FONTE: Adaptado. <http://anotsocoolsterol-biobio.blogspot.com>. (MCP-1: proteína de quimioatração de monócito; CCR2: receptor de quimiocina tipo 2)

As placas de ateroma não são constituídas apenas de células espumosas. Nelas encontra-se também componentes da matriz extracelular e um núcleo lipídico necrótico, formado principalmente por fragmentos de células mortas. As placas denominadas estáveis possuem grande quantidade de colágeno, capa fibrosa espessa, poucas células inflamatórias e um núcleo necrótico reduzido. As placas instáveis possuem grande atividade inflamatória e proteolítica, com núcleo necrótico volumoso e capa fibrosa fina. Uma eventual ruptura da capa fibrosa que reveste a placa aterosclerótica expõe material lipídico altamente trombogênico, estimulando a adesão e a agregação plaquetária. Como consequência, ocorre a aterotrombose e suas manifestações clínicas, incluindo o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico (AVE) (FALUDI et al., 2017; GAO et al., 2013).

Apesar de vários fatores endógenos e exógenos estarem envolvidos com a origem da aterosclerose, como já foi discutido anteriormente, o estresse oxidativo também merece um lugar de destaque. De fato, além da oxidação do LDL, os produtos da peroxidação lipídica aumentam a permeabilidade das células endoteliais, facilitando o influxo das moléculas de LDL para o espaço subendotelial (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2015). Em um contexto amplo, a inflamação e o estresse oxidativo são fundamentais para desenvolvimento e manutenção do processo aterosclerótico, pois as células inflamatórias geram espécies reativas de oxigênio, que por sua vez podem aumentar a oxidação progressiva das moléculas de LDL, que estimulam a liberação de várias citocinas e quimiocinas que mobilizam mais células inflamatórias (EL-SHEAKH et al., 2015).

A HAS e o diabetes, por terem alta prevalência e devido às graves complicações fisiológicas que acarretam, também são importantes fatores envolvidos com a aterosclerose. (KANNEL et al., 1974). De fato, a HAS é um dos principais fatores de risco, pois é pouco comum que as placas ateroscleróticas se formem em áreas da rede vascular com baixo regime pressórico, tais como os vasos de resistência ou as veias (KANNEL et al., 1974; SIMÕES; SCHMIDT, 1996). Por outro lado, raramente os pacientes apresentam apenas um fator de risco. Na maioria dos casos a HAS é acompanhada por outros fatores de risco não menos importantes, sobretudo o diabetes e as dislipidemias (Figura 2) (CANTOS et al., 2004). Neste caso os fatores de risco funcionam como um grande catalisador, onde, se não forem reduzidos ou controlados, as lesões endoteliais por eles induzidas seguirão um curso lento e contínuo. Assim,

através de um processo inflamatório local e de uma lesão endotelial persistente, o processo aterosclerótico se desenvolve de forma lenta e progressiva afetando a resposta vascular, na maioria das vezes sem manifestações clínicas até que ocorra uma obstrução vascular significativa (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2015).

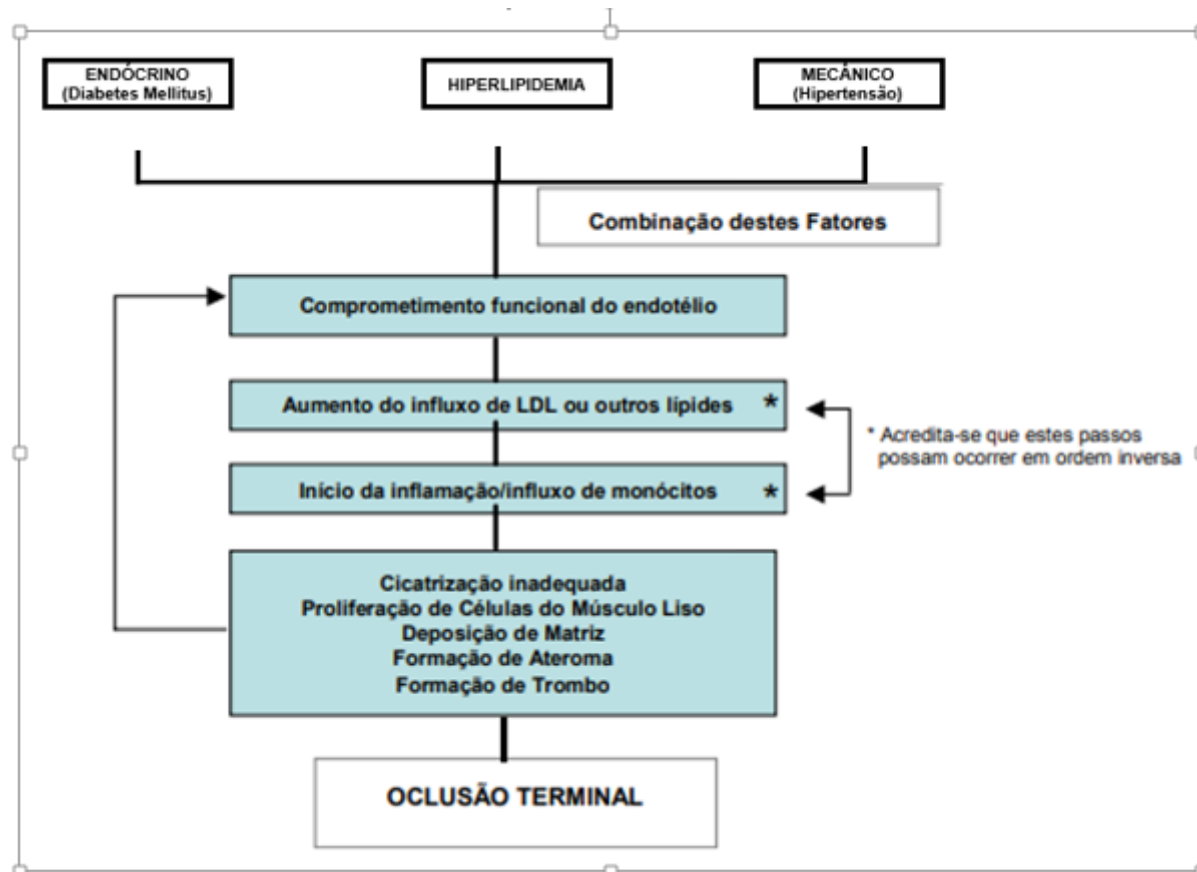


Figura 2. Eventos na formação de lesão aterosclerótica. Adaptado de GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005.

2.2 O papel das espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) na aterogênese

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERN) são constituídas basicamente por radicais livres, dos quais os elétrons encontram-se desemparelhados, e a produção encontra-se aumentada durante o estresse oxidativo (Figura 3). Dentre os radicais livres destacam-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), enquanto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma das principais ERO. Por outro lado, dentre as ERN destacam-se o radical óxido nítrico (NO^{\cdot}) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (LUBRANO et al., 2015; NICKENING et al., 2002).

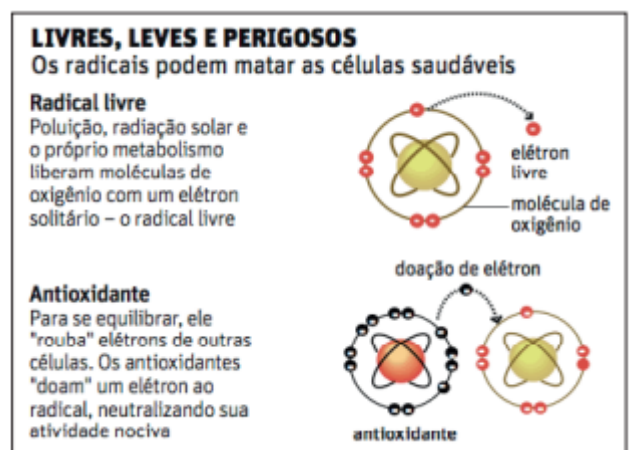


Figura 3: Imagem ilustrativa sobre a formação de radicais livres e a ação dos antioxidantes. Fonte: <http://rspress.com.br/health4life/>

Atualmente sabem-se que a formação de radicais livres é um processo fisiológico contínuo que ocorre regularmente durante o processo metabólico. Os radicais livres possuem inúmeros efeitos benéficos, incluindo a produção adequada do trifosfato de adenosina (ATP), a fertilização do óvulo e a ativação de genes. Entretanto, quando sua produção está expressivamente aumentada pode ocorrer danos oxidativos em diferentes estruturas celulares, incluindo proteínas e lipídeos. De fato, esse desequilíbrio na produção de radicais livres pode conduzir a disfunção endotelial, HAS e aterosclerose (HUSAIN et al., 2015; VARA et al., 2014; VAZIRI et al., 2000).

Estudos realizados apontam o papel das espécies reativas no desenvolvimento e progressão da doença aterosclerótica. É bastante claro que elas contribuem diretamente com as modificações oxidativas que ocorrem nas partículas de LDL, e indiretamente na liberação de citocinas inflamatórias e na proliferação das células musculares lisas (SITI et al., 2015; TOUYZ et al., 2005).

Foram identificadas significativas alterações na expressão da NADPH oxidase, xantina oxidase, lipoxigenases, mieloperoxidase e óxido nítrico sintase em lesões ateroscleróticas iniciais, conduzindo ao aumento na produção de espécies reativas. De fato, duas fontes particularmente importantes de espécies reativas sobre o sistema cardiovascular, e no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, são a NADPH oxidase e a óxido nítrico sintase (NOS) desacoplada. Ambas as enzimas têm sido bem estudadas por serem importantes fontes de $O_2^{\cdot-}$ (LI et al., 2014; GRIENGLING et al., 2003; GUZIK et al., 2000).

Durante o processo aterosclerótico ocorre a expressão de duas isoformas da NOS, a endotelial (eNOS) e a indutiva (iNOS). O problema se reside não necessariamente na expressão da NOS, mas sim em um processo denominado “desacoplamento” da eNOS. Nesse caso, devido a ausência de L-arginina e/ou tetrahydrobiopterina (BH4), co-fatores para produção de NO, ocorre uma redução do oxigênio molecular (O_2) para $O_2^{\cdot-}$. Essa alteração promove, simultaneamente, um aumento na produção local de $O_2^{\cdot-}$ e óxido nítrico (NO), conduzindo para a formação de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um eficiente oxidante (KAWASHIMA; YOKOYAMA, 2004). Além disso, quando há o desequilíbrio redox no coração e nos vasos sanguíneos, a NADPH oxidase também desempenha um papel substancial como fonte de $O_2^{\cdot-}$, contribuindo para o estresse oxidativo subjacente a aterosclerose (GRIENGLING et al., 2003; VARA et al., 2014).

Existe um equilíbrio entre a produção e a neutralização de espécies reativas em basicamente todos os sistemas biológicos. Essa equação equânime é mantida por um importante sistema de defesa antioxidante. Na prática existem dois sistemas antioxidantes que atuam de forma sinérgica e coordenada, um enzimático e outro não enzimático. O sistema enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX), controlando e/ou reduzindo a concentração de várias espécies reativas. Como exemplo, a SOD pode promover a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual pode ser degradado em H_2O pela GPX ou pela CAT (LUBRANO et al., 2015; NOJIRI et al., 2006).

Por outro lado, atuando de forma sinérgica ao sistema enzimático existem várias macromoléculas como a glutatona, vitaminas, minerais e compostos polifenólicos que atuam como agentes antioxidantes não enzimáticos. Ainda assim, estudos conduzidos apontam importantes efeitos antioxidantes endógenos após o consumo moderado de polifenóis. Essas moléculas mostraram vários benefícios cardioprotetores, incluindo melhora da função endotelial, diminuição da pressão arterial e redução da agregação plaquetária (QUIÑONES et al., 2013; STOCLET et al. 2004).

2.3 Tratamentos disponíveis para as dislipidemias e aterosclerose

A prevenção primária das dislipidemias e da aterosclerose devem ser feitas com mudanças no estilo de vida (MEV). Apesar de efetiva na maioria dos casos de hipercolesterolemia não-familiar, sabe-se que a efetividade deste tipo de intervenção é

variável e depende da adesão do paciente, do tipo de dieta adotada, da atividade física regular, além da cessação do tabagismo e etilismo. Nesse ínterim, dois tipos de dieta merecem destaque, a dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension - Dieta apropriada para hipertensos) e a dieta do mediterrâneo. A dieta DASH é baseada no consumo de frutas, verduras, legumes, grãos integrais, peixes, aves, leite e derivados com baixo teor de gordura, e alimentos fontes de gordura monoinsaturada. De um modo geral, a gordura total deve representar 27% da alimentação, sendo até 6% de gordura saturada e até 150 miligramas de colesterol. Os carboidratos são responsáveis por 55% das calorias da alimentação e as proteínas por 18%. Além disso, o consumo de fibras deve ser de 30 gramas por dia. Por outro lado, a dieta do mediterrâneo é baseada no consumo de alimentos frescos e naturais como azeite, frutas, legumes, cereais, leite e queijo, sendo necessário evitar produtos industrializados. Além disso, a dieta prevê o uso de ervas e especiarias em vez de sal para dar sabor aos alimentos (BRICARELLO et al., 2018; FINICELLI et al., 2019).

Apesar da prevenção primária ser realizada com MEV, em alguns casos mais severos o tratamento farmacológico se faz necessário. Atualmente existe um vasto arsenal terapêutico destinado ao tratamento das dislipidemias e para a prevenção da aterosclerose. Entre esses, destacam-se os inibidores da absorção de colesterol (p.ex. ezetimiba), os sequestradores de ácidos biliares (p.ex. colestiramina e colestipol), a niacina e seus derivados (p.ex. nicofuranose e niceritrol), os fibratos (p.ex. clofibrato e ciprofibrato), os inibidores da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) (p.ex. anacetrapib e torcetrapib), e as estatinas (p.ex. sinvastatina, atorvastatina e rosuvastatina) (COSTET, 2010; MANNU et al., 2013; TAMARGO et al., 2007).

Dentre todos os agentes supracitados, as estatinas é a classe que de longe apresenta melhores resultados em curto e longo prazo. Atuando através da inibição competitiva da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a conversão do HMG-CoA redutase em L-mevalonato, este grupo de fármaco impede eficazmente a síntese do colesterol hepático. Assim, ocorre a indução da expressão de receptores para o colesterol LDL no fígado, o que por sua vez, aumenta o catabolismo e diminui a concentração plasmática do mesmo (GUPTA, 2015; SILVA et al., 2006; SPOSITO et al., 2007).

Apesar da eficácia das estatinas, o aparecimento de efeitos adversos como alterações na função hepática, mialgia, e em menor proporção a rabdomiólise, tem

estimulado a pesquisa de diversos tratamentos alternativos, incluindo as plantas medicinais (KOLOVOU et al., 2008; MAGNI et al., 2015; SILVA et al., 2006). Assim, atualmente, existe um grande interesse na busca de opções terapêuticas alternativas para a prevenção e tratamento das dislipidemias, sobretudo para ser utilizada concomitantemente com as terapias convencionais. Nesse aspecto, uma opção bem aceita provém dos produtos naturais, especialmente aqueles que são habitualmente utilizados pela população e fazem parte do arsenal cultural transmitido por gerações.

2.4 Plantas medicinais e propriedades bioativas.

Na segunda metade do século XX houve um substancial incentivo à aplicação da medicina tradicional e popular nas questões de saúde das comunidades (SACRAMENTO, 2001). Órgãos como OMS e o UNICEF reiteraram a importância da inclusão da medicina tradicional na atenção primária à saúde. Desde então, a OMS tem incentivado a pesquisa de novos medicamentos tendo como base as plantas medicinais, assim como sua utilização no tratamento de diversas patologias (OMS, 1978).

Apesar dos avanços da medicina e da química, a maioria dos medicamentos utilizados (cerca de 90%) compreendiam as plantas medicinais até o início do século passado (CORRÊA et al., 2001). Porém, devido ao interesse econômico de grandes multinacionais e também dificuldades relacionadas ao controle de qualidade desses extratos vegetais, houve mudança no cenário do mercado consumidor, percebendo-se o predomínio do uso de produtos quimicamente sintetizados ou de derivados isolados de plantas medicinais. Ainda assim, nesse mesmo período, foi observado um aumento considerável no interesse da indústria farmacêutica e da medicina no segmento fitoterápico, movido muitas vezes pela ampliação do mercado consumidor (FERREIRA, 1998).

Durante as décadas de 1980 e 1990, foi necessário realizar a retirada de um grande número de drogas sintéticas, devido a sólidas evidências de intoxicações graves, tanto em animais como em seres humanos; nesse ínterim, as plantas medicinais tanto nas formas de infusões e tinturas, bem como os fitoterápicos padronizados, mostraram-se uma interessante opção terapêutica, tendo sua importância e seu espaço reestabelecidos na medicina atual. A comunidade científica tem se interessado nos estudos com plantas medicinais, resultando em um aumento substancial nas publicações

de revistas científicas renomadas, reforçando mais uma vez, a importância deste assunto para a comunidade mundial como um todo (SMET; PETER, 2002; TYLLER, 1999).

De uma maneira geral, o objetivo principal da validação de novos produtos naturais, seria aumentar a opção terapêutica no mercado farmacêutico e não a substituição dos medicamentos comercializados e já registrados, ofertando assim, indicações terapêuticas complementares às medicações já existentes. Da mesma forma, esta atividade pode fornecer substratos autóctones para o desenvolvimento de uma indústria farmacêutica local, reforçando dessa maneira, as tradições populares (FRANCISCHI, 2005). Ainda assim, essa prática, poderia facilitar a aceitação do uso dos fitoterápicos e das plantas medicinais pela comunidade, por pertence ao arsenal terapêutico tradicional construído culturalmente (FARSNWORTH, 1985).

De fato, os fitoterápicos sempre representaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. Dados da OMS indicam que apesar da maioria da população dos países em desenvolvimento dependerem da medicina moderna, 80% desta população ainda se vale de práticas tradicionais pelo uso de plantas medicinais. No Brasil, os dados obtidos em levantamento realizado pelo Departamento de Comércio Exterior mostram um crescente aumento na exportação de plantas medicinais nas últimas décadas (TOMAZZONI et al., 2006; BRASIL, 2006a).

Com o crescimento mundial do consumo de plantas medicinais e fitoterápicos, vários países têm se preocupado em monitorar com que frequência este tipo de terapêutica que vem sendo utilizada (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b). Florencio; Junior (2008) realizaram estudo descritivo através da análise de formulários preenchidos pelos profissionais da área de saúde e pela população do interior do estado do Rio de Janeiro, e ficou constatado que 63% dos entrevistados utilizam as plantas medicinais como forma de tratamento, mesmo com a disponibilidade de medicamentos sintéticos. Também foi observado que a automedicação ainda ocorre de maneira expressiva com plantas medicinais (sem prescrição e/ou informação médica), juntamente com o medicamento sintético e, não raro os casos, substituindo-o, sem o conhecimento do médico. Estes dados demonstram o conhecimento empírico da população em relação ao uso de plantas medicinais, e a necessidade de novos estudos serem conduzidos a fim de esclarecer os efeitos dos constituintes ativos destes produtos naturais.

De fato, é observado o crescimento do uso de produtos naturais para o tratamento de diferentes processos patológicos, sobretudo as doenças cardiovasculares.

Há evidências de que vários produtos naturais, (principalmente os ricos em compostos polifenólicos - incluindo os flavonóides) podem atuar na prevenção das doenças cardiovasculares através de diferentes mecanismos como: redução da disfunção endotelial, redução do estresse oxidativo e redução da inflamação (FUHRMAN et al., 2001; PEREZ-VIZCAINO et al., 2009; QUIÑONES et al., 2013). Corroborando com os dados acima, estudos comprovaram que os flavonóides bem como seus derivados glicosilados são eficazes em reduzir partículas de LDLox e também diminuem a produção de pró oxidantes endógenos como a NADPH oxidase (De WHALEY et al., 1990; SIES et al., 2010; YANG et al., 2011). Preparações ricas em kaempferol, miricetina, quercetina, apresentaram propriedades anti-inflamatória, antitrombótica, antioxidante; e cardioprotetora e antiaterogênica (GARDI et al., 2015; OJEDA et al., 2010; STOCLET et al., 2004).

Evidências científicas comprovam a capacidade dos compostos fenólicos em aumentar a expressão da eNOS, favorecendo a biodisponibilidade de NO; importante para proteção do endotélio vascular. (NADERALI; DOYLE; WILLIAMS, 2000; WALLERATH et al., 2002; THANDAPILLY et al., 2010). E, atribui-se os efeitos protetores dos compostos fenólicos às suas propriedades pleiotrópicas (participam de inúmeras reações biológicas), modulando a atividade de várias enzimas e interferindo na sinalização dos processos celulares (ABD-ELBASET et al., 2015; LI et al., 2012; NDIAYE et al., 2003;).

Ainda existem poucas espécies que já foram investigadas e validadas clinicamente como agentes antiaterogênicos e hipolipemiantes (HASANI-RANJBAR et al., 2010). Assim, os dados disponíveis sugerem a necessidade de uma investigação efetiva com o intuito de validar farmacologicamente a utilização desses produtos naturais, sobretudo aqueles que já fazem parte do arsenal terapêutico popular.

2.5 *Echinodorus grandiflorus*

O gênero *Echinodorus* (Alismataceae) possui 26 espécies que ocorrem principalmente na região dos trópicos na América do Sul (HAYNES; HOLM-NIELSEN, 1994), sugerem que a espécie teve origem no Sul do Brasil, sendo introduzida na América do Norte para fins ornamentais (LEHTONEN, 2009). As espécies predominantes no Brasil, são a *Echinodorus grandiflorus*, (Cham. & Schltldl.)

Micheli e *E. macrophyllus* (Kunth) Micheli, as quais se distribuem preferencialmente em regiões de banhando e de solo úmido.

As plantas desse gênero são amplamente utilizadas para fins ornamentais (LEHTONEN, 2016). Podem ser empregadas em diversas áreas como no preparo de refrigerantes e na indústria alimentícia (LIMA-DELLAMORA et al., 2017). Além de apresentar grande eficiência na biorremediação (BARBOSA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015) destacando seu emprego no processo de recuperação de águas contaminadas (WAN-RU, 2014; YING; LEI, 2014).

E. grandiflorus (Figura 4) é uma macrófita enraizada (crescem desde locais encharcados até ambientes totalmente submersos), possui folhas ovaladas e coriáceas, com largura de aproximadamente 35 cm, comprimento próximo de 38 cm; possui pecíolo áspero, com comprimento 2 a 3 vezes maior do que o limbo foliar; flores de pétalas brancas, raramente de cor rosa ou amarela, com diâmetro de 2,5 a 3,5 cm e fruto seco e inflorescência paniculada com 6 a 12 verticilos (RATAJ et al., 1969). São espécies hermafroditas, possuem mecanismo de autoesterilidade tardia aparentemente através do mecanismo de autoincompatibilidade (PANSARIN; PANSARIN, 2011; VIEIRA; LIMA, 1997).



Figura 4. Espécie *Echinodoros grandiflorus*. Fotografias obtidas do Horto de plantas medicinais da UNIPAR - Universidade Paranaense, Brasil a 430 m acima do nível do mar (S23°47'55, W53°18'48). O material vegetal foi identificado pela Dra. Mariza Barion Romagnolo (Universidade Estadual de Maringá - UEM, Brasil). Um espécime de comprovante foi depositado no Herbário da UEM (n° 20810).

A Echinodoros grandiflorus é citada como uma planta medicinal em pesquisas etnobotânicas (SILVA et al., 2009; MAGALHÃES, 2010), estando entre as dez espécies mais citadas em alguns estudos (KFFURI, 2008; MAGALHÃES, 2010).

Evidenciando a importância do gênero *Echinodoros*, o Ministério da Saúde elencou a *Echinodoros macrophyllus* (Kunth) Michel juntamente com outras espécies de plantas medicinais que poderão ser prescritas aos usuários do sistema único de saúde (SUS) (BRASIL, 2011). *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* são popularmente conhecidas como chapéu-de-couro (PANIZZA, 1997). Ambas são utilizadas popularmente para as mesmas finalidades medicinais em diversas regiões do Brasil (LORENZI; MATOS, 2008; PANIZZA, 1997); Contudo, a composição química entre as espécies é diferenciada; conforme aponta a literatura; evidenciando a necessidade de novos estudos químicos e farmacológicos buscando identificar as substâncias ativas.

A *E. grandiflorus* é uma espécie de grande expressão na medicina popular, no entanto, com pouquíssimas informações sobre cultivo, variedades existentes e fenologia visando a um melhor aproveitamento e conservação da planta (BEVILAQUA et al., 2001). No entanto, a análise da composição química das plantas bem como o controle de fatores ambientais, tornam-se essenciais para efeitos de comercialização do material, identificando os materiais mais atrativos à indústria farmacêutica, além de auxiliar aos produtores na seleção de genótipos mais eficientes em termos fitoterápicos, uma vez que fatores externos (umidade do solo, pH, temperatura e estações climáticas) podem influenciar na expressão de determinados princípios ativos (BEVILAQUA et al., 2001; SILVA JUNIOR; VIZZOTO, 1996). No presente estudo, as espécies foram cultivadas no horto de plantas medicinais da Universidade Paranaense e adubadas com matéria orgânica obtida a partir de compostagem de restos de podas vegetais, além disso, foi adaptado um sistema artificial de retenção hídrica (revestimento subterrâneo com material impermeável) sob as espécies cultivadas.

As folhas de *E. grandiflorus* apresentam em sua composição diterpenos (do tipo clerodano e cembrano), flavonóides C- e O-glicosídeos (sobretudo C-heterosídeos de flavonas como a isoorientina e a swertiajaponina), derivados do ácido o-hidroxicinâmico (ácidos chicórico e caftárico), esteróides, ácidos graxos, arilpropanoídes simples (ácido cafeico, ferúlico e isoferúlico) e ácido trans-aconítico (PIMENTA; 2000; PRANDO, 2016; SCHNITZLER et al., 2007; TANAKA, 2000).

Nos extratos etanólicos obtidos de folhas de *E. grandiflorus* e analisados por técnicas de cromatografia e espectrofotometria, foi observado que os constituintes majoritários eram solidagolactona-I e Isoorientina. Nos extratos aquosos, o ácido ferúlico era o constituinte majoritário. O melhor marcador químico seria o diterpênico clerodânico solidagolactona-I, uma vez que foi verificado que os componentes fenólicos possuíam maior oscilação em relação à sazonalidade (PIMENTA et al., 2002).

Garcia et al., (2010) confirmaram os estudos anteriores ao identificarem os flavonoides, isoorientina, isovitexina e os ácidos trans-acotínico e chicórico, a partir dos extratos aquoso, diclorometânico e hidroalcoólicos (30, 50 70 e 96% EtOH; v/v) de folhas de *E. grandiflorus*.

O fitol também foi descrito como constituinte do extrato hexânico de folhas da espécie, onde também foram caracterizados o ácido palmítico, esteroides e o diterpeno clerodan-3, 13-dien 16 -15-olido (PIMENTA, 2006)

O chá das folhas de *E. grandiflorus* é utilizado, na medicina popular brasileira, como diurético, depurativo do sangue, anti-inflamatório, antihipertensivo, hepatoprotetor, no tratamento de afecções cutâneas, doenças venéreas, artrite e reumatismo (CORREIA, 1984; BRANDÃO et al., 2009).

Vários estudos farmacológicos foram conduzidos com a *E. grandiflorus*. Estudos pré-clínicos relatam que esta espécie é promissora para o tratamento de doenças cardiovasculares. Diferentes preparações que foram obtidas desta espécie mostraram propriedades antioxidantes (LUNARDI et al., 2014), vasodilatador (ALMEIDA et al., 2003), diuréticas (CARDOSO et al., 2003; PRANDO et al., 2015; PRANDO et al., 2016), anti-edematosas (GARCIA et al., 2010), hipoglicemiante (BARBOSA-FILHO et al., 2005), anti-hipertensivas (LESSA et al., 2008; PRANDO et al., 2016) e vasodilatadoras (TIBIRIÇA et al., 2007), antirreumática, sendo também usada para combater ácido úrico e problemas de pele (TESKE; TRENTINI, 2001). Surpreendentemente, apesar do uso popular extenso, seus efeitos hipolipidêmicos e antiateroscleróticos permanecem desconhecidos.

Considerando o exposto acima, esta proposta poderá ajudar a caracterizar a *E. grandiflorus* como uma planta promissora no desenvolvimento de novos fitoterápicos, principalmente devido à lacuna existente na validação desse tipo de fármaco como adjuvante no tratamento das dislipidemias e aterosclerose. Frente a isso, e considerando que inexitem dados que justifiquem e/ou subsidiem os efeitos cardioprotetores, antiaterogênicos e hipolipemiantes da *E. grandiflorus*, e acreditando que existe a necessidade de ampliar o arsenal terapêutico complementar nestas condições, objetivamos investigar os efeitos da administração do extrato bruto de *E. grandiflorus* em coelhos Nova Zelândia submetidos a dieta rica em colesterol.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil hipolipemiante, antiaterogênico e cardioprotetor do sobrenadante etanólico do infuso obtido das folhas de *E. grandiflorus* (ESEG) em coelhos Nova Zelândia submetidos a dieta rica em colesterol (CRD).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar as folhas de *E. grandiflorus*, produzir o extrato e realizar a caracterização fitoquímica do ESEG;
- Induzir a hipercolesterolemia, a disfunção ventricular e a aterogênese em coelhos machos da linhagem Nova Zelândia através da administração de dieta comercial enriquecida com 1% de colesterol (CRD) por 60 dias;
- Acompanhar o ganho de peso corporal durante os 60 dias do estudo;
- Determinar o padrão eletrocardiográfico dos animais após 60 dias de CRD e 30 dias de tratamento com o ESEG;
- Mensurar os níveis dos lipídeos séricos, LDLox, malondialdeído, nitrotirosina, citocinas (IL-1 e IL-6), e moléculas de adesão solúveis ICAM-1 e VCAM-1 com e sem a administração do ESEG;
- Avaliar o índice de aterogênese no arco aórtico, aorta torácica, abdominal, ílica, após 60 dias de CRD com e sem tratamento por 30 dias com o ESEG;
- Investigar as alterações histopatológicas cardíacas e realizar a morfometria do ventrículo esquerdo dos animais alimentados com CRD com e sem tratamento com o ESEG;
- Avaliar a atividade da superóxido dismutase e os níveis de lipoperóxidos e glutathiona reduzida nos ramos arteriais e músculo ventricular após 60 dias de CRD e 30 dias de tratamento com o ESEG.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELBASET, M., EL-SHAIMAA, A.A., GAMAL, A.; SHERBINY, EL., MOHAMED, S., ELGENDY, A.M. Quercetin modulates iNOS, eNOS and nostrin expressions and attenuates oxidative stress in warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, p. 246–255, 2015.

ALFONSO VALIENTE, M.A, CARRALERO, G.A.; PENA, A.M.Q.; CARBALLO, R.S. Evaluación de un posible modelo experimental de aterosclerosis carotídea en Conejos hipercolesterolémicos. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 20, p. 192-6, 2001.

ALMEIDA, A.L.F., PIMENTA, D.S.; FIGUEIREDO, M.R.; TIBIRIÇÁ, E. Investigação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito vasodilatador de extrato bruto aquoso de *Echinodorus grandiflorus* em aorta isolada de coelho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 35. 2003, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: Editora da USP, 2003.

BARBOSA, U.A.; SANTOS, I.F.S.; SANTOS, A.M.P.; SANTOS, D.C.; MOTA, G. Determination and Evaluation of the Metals and Metalloids in the Chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli). **Biological trace element research**, v. 154, n. 3, p. 412-417, 2013.

BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 392-413, 2005.

BECKMAN, J.A.; CREAGER, M.A.; LIBBY, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **Journal American of the Medical Association**, v. 287, p. 2570-2581, 2002.

BECKSTROM, B.W. HORSLEY, S.H.; SCHEETZ, J.P.; KHAN, Z.; SILVEIRA, A.M.; CLARK, S.J.; GREENWELL, H.; FARMAN, A.G. Correlation between carotid area calcifications and periodontitis: a retrospective study of digital panoramic radiographic findings in pretreatment cancer patients. **Oral Surgery, Oral Medical, Oral Pathology and Oral Radiology**, v.103, p.359- 366, 2007.

BEVILAQUA, G.A.P.; NEDEL, J.L.; ZUANAZZI, J.A.; CORREA, C.T. Geographical distribution and chemical composition of “chapéu de couro” (*Echinodorus* spp.) in the Rio Grande do Sul state, Brazil. **Ciência Rural**, v. 31, p. 213-218, 2001.

BIERMAN, E.L. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. **Arteriosclerosis Thrombosis**, v. 12, p. 647-56, 1992.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; GRAEL, C.F.; NETTO JÚNIOR, N.L.; MONTEMOR, R. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of

Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 19, p. 478-4, 2009.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Brasília, DF, 2006b.

BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília. **Anvisa**, v. 1, p. 126, 2011.

BRICARELLO, L.; POLTRONIERI, F.; FERNANDES, R.; RETONDARIO, A.; DE MORAES TRINDADE, E.B.S.; DE VASCONCELOS, F.A.G. Effects of the Dietary Approach to Stop Hypertension (DASH) diet on blood pressure, overweight and obesity in adolescents: A systematic review. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 28, p. 1-11, 2018.

BRITO, F.A.; SAMPAIO, A.L.F.; PIMENTA, D.S.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C.; HENRIQUES, M.G.M. O. Inibição por extratos de *Echinodorus grandiflorus* do edema de pata induzido pelo composto 48/80, histamina e serotonina. In: REUNIÃO ANUAL DAFEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 14. 1999, Caxambu. **Anais**. Lavras: Editora da UFLA, 1999.

BOCAN, T.M.; MUELLER, S.B.; MAZUR, M.J.; UHLENDORF, P.D.; BROWN, E.Q.; KIEFT, K.A. The relationship between the degree of dietary induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. **Atherosclerosis**, v. 34, p. 623-574, 1993.

BONFIM, M.R.; OLIVEIRA, A.S.B.; AMARAL, S.L.; MONTEIRO, H.L. Tratamento das dislipidemias com estatinas e exercícios físicos: evidências recentes das respostas musculares. *Arquivo brasileiro de cardiologia*, v. 4, p. 324-332, 2015.

BYRNES, S.E.; BAUR, L.A.; BERMINGHAN, M.; BROCK, K.; STEINBECK, K. Leptin and total cholesterol are predictors of weight gain in pre-puberal children. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 23, p. 146-50, 1999.

CABRAL, M.C.; PIRES, M.S.; BAHIA, C.P.; RINALDI, M.L.; RIBEIRO, H. A. C.; XAVIER, R. F.; FREITAS, R. B.; ANTONIOL, T.; FILHO, W.B.; FONTES, L.B.A. Farmacologia da dislipidemia e aterosclerose. **Revista científica Fagoc Saúde**, v. 2, p. 73-79, 2017.

CARDOSO, G.L.C.; PEREIRA, N.A.; LAINETTI, R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética do chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* [Cham. Schl] Mitch., Alismataceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, p. 5-7, 2003.

CARVALHO, M.H.C. SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z.B.; NIGRO, D. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, n.1, p.76-88, 2001.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Pag 214- 215, 1984.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica**. 4. ed. Petrópolis: Vozes, 2001.

COSTA, M.; TANAKA, C.M.A.; IMAMURA, P.M.; MARSALOLI, A.J. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 117-122, 1999.

COSTET, P. Molecular pathways and agents for lowering LDL-cholesterol in addition to statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, p. 263–278, 2010.

DE WHALEY, C.V.; RANKIN, S.M.; HOULT, J.R.S. Flavonoids inhibit the Oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. **Biochemical pharmacology**, 39:1743-50, 1990.

DUTRA, R.C.; TAVARES, C.Z.; FERRAZ, SO.; SOUSA, O.V.; PIMENTA, D.S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 469-474, 2006.

ELLULU, M. S; PATIMAH, I.; KHAZA'AI, H.; RAHMAT, A.; ABED, Y.; ALI, F. Atherosclerotic cardiovascular disease: a review of initiators and protective factors. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 2016.

EL-SHEAKH, A. R; GHONEIM, H. A.; SUDDEK, G. M.; AMMAR, E. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of flavocoxid in high-cholesterol-fed rabbits. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 12, p. 1333–1344, 2015.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **Journal of the American Medical Association**, v. 19, p. 2486-97, 2001.

FALUDI, A.A.; IZAR, M.C.O.; SARAIVA, J.F.K; CHACRA A.P.M.; BIANCO, H.T.; AFIUNE NETO, A. *et al.* Atualização Da Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

FARSNWORTH, N.R. **Medicinal plants in therapy**. Bull W. H. O. [S.I.], v. 63, p. 956-981, 1985.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FINICELLI, M.; SQUILLARO, T.; DI CRISTO, F.; DI SALLE, A.; MELONE, M.A.B.; GALDERISI, U.; PELUSO, G. Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 5807-5826, 2019.

FLORENCIO, V.; JUNIOR, V. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

FRANCISCHI, J. N. **A farmacologia em nossa vida**. 1. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

FRIEDLANDER, A.H.; ALTMAN, L. Carotid artery atheromas in postmenopausal women. Their prevalence on panoramic radiographs and their relationship to atherogenic risk factors. **The Journal of the American Dental Association**, v.132, p.1130-1136, 2001.

FUHRMAN, B., AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 12, p. 41–8, 2001.

GAO, H.; LIU, Z.; WAN, W.; QU, X.; CHEN, M. Aqueous extract of yerba mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1225–1231, 2013.

GARCIA, E.F.; OLIVEIRA, M.A.; GODIN, A.M.; FERREIRA, W.C.; BASTOS, L.F.; COELHO, M.M.; et al: Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Phytomedicine**, v. 18, p 80-86, 2010.

GARDI, C., BAUEROVA, K., STRINGA, B., KUNCIROVA, V., SLOVAK, L., PONIST, S., DRAFI, F., BEZAKOVA, L., TEDESCO, I., ACQUAVIVA, A., BILOTTO, S., RUSSO, G.L. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat Adjuvant arthritis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 150-157, 2015.

GIULLUM, R.F. Index of tissue distribution, apolipoproteins B and AI, lipoprotein, and triglycerides concentration in children age 4-11 years: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Clinical Epidemiology**, v.54, p. 367-75, 2000.

GOTTLIEB, M.G.V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E.H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, 2005.

GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v, 108, p. 1912-1916, 2003.

GUPTA, S. LDL Cholesterol, Statins And PCSK 9 Inhibitors. **Indian heart jornal**, v. 67, p. 419 – 424, 2015.

GUEDES, D.P.; GUEDES, J.E.R.P.; BARBOSA, D.S.; OLIVEIRA, J.A. Uso de tabaco e perfil lipídico-lipoprotéico plasmático em adolescentes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n.1, 2007.

GUZIK, T.J.; WEST N.E.; BLACK, E.; MCDONALD, D.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R.; CHANNON, K.M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circulation Research**, v.86, p. 85-90, 2000.

HASANI-HANJBAR, S.; MORADABADI, L.; NAYEBI, N.; MEHRI, A. The Efficacy and Safety of Herbal Medicines Used in the Treatment of Hyperlipidemia; A Systematic Review. **Current pharmaceutical design**, v.16, p. 2935-47, 2010.

HAYNES, R.R.; NIELSEN, L.B.H. **Flora Neotropica: monograph 64 – The Alismataceae**, New York: New York Botanical Garden, 105 p, 1994.

HERON, M.; HOYERT, D.L.; MURPHY, S.M.; XU, J.; KOCHANNEK, K.D.; TEJADA-VERA, B. Deaths: Final Data for 2006. **National Vital Statistics Report**, v.57, p. 131-4, 2009.

HUSAIN, K.; HERNANDEZ, W.; ANSARI, R.A.; FERDER, L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. **World journal of biological chemistry**, v. 6, p. 209-217, 2015.

JÚNIOR, I.F.S.; RANGEL, T.E.; SANTOS, S.R.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos de *Aspidosderma subincanum* Mart (Guatambu) e *Echinodorus macrophyllus* Michell- (chapéu de couro) pelo método de microdiluição. In: XVIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2004. Manaus/AM. **Livro de resumo do XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Manaus/AM. p.136, 2004.

KANNEL, W.B. Role of blood pressure in cardiovascular morbidity and mortality. **Progress Cardiovascular e Diseases**, v.17, p.5-10, 1974.

KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology**, v. 24, p. 998-1005, 2004.

KFFURI, C.W. Etnobotânica de plantas medicinais no município de Senador Firmino (Minas Gerais). 2008. 101 f. **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)** – Programa de pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

- KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovascular Research**, v.67, n.2, 2005.
- KOLODZIE, F.D.; PETROV, A.; VIRMANI, R.; NARULA, N.; VERJANS, J.W.; WEBER, D.K.; HARTUNG, D.; STEINMETZ, N.; VANDERHEYDEN, J.L.; VANNAN, M.A.; GOLD, H.K.; REUTELINGSPERGER, C.P.; HOFSTRA, L.; NARULA, J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. **Circulation**, v. 108, p. 3134-9, 2003.
- KOLOVOU, G.D., KOSTAKOU, P.M., ANAGNOSTOPOULOU, K.K., COKKINOS, D.V. Therapeutic effects of fibrates in postprandial lipemia. **American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions**, v. 8, p. 243-255, 2008.
- KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; BISES, G.; KLURFELD, D.M. Experimental atherosclerosis in rabbits fed cholesterol free diets. **Atherosclerosis**, v. 75, p. 123-7, 1989.
- KRITCHEVSKY, D. Diet and atherosclerosis. **The Journal Nutrition Health Aging**, v. 5, p.155-9, 2001.
- LASTÓRIA, S.; MAFFEI, F.H.A. Aterosclerose obliterante periférica: epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico e diagnóstico. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA, editores. **Doenças vasculares periféricas**. Rio de Janeiro: Medsi; p. 1007-24, 2002.
- LEHTONEN, S. On the origin of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae) in Florida (*E. floridanus*) and its estimated potential as an invasive species. **Hydrobiologia**, v. 635, p. 107-112, 2009.
- LEHTONEN, S. Shutting down the chaos engine—or, identifying some problematic *Echinodorus* (Alismataceae) types. In: **Annales Botanici Fennici. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board**, p. 115-129, 2016.
- LESSA, M.A.; ARAÚJO, C.V.; KAPLAN, M.A.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M.R.; TIBIRIÇÁ, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 161-8, 2008.
- LEWEY, J.; SHRANK, W.H.; BOWRY, A.D.; KILABUK, E.; BRENNAN, T.A.; CHOUDHRY, N.K. Gender and racial disparities in adherence to statin therapy: a meta-analysis. **American Heart Journal**, v.165, n. 5, p. 665-78, 2013.
- LI, H., XIA, N., FOSTERMANN, U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. **Nitric Oxide**, v. 26, p. 102–10, 2012.
- LI, H., HORKE, S., FOSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, p. 208-219, 2014.

- LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868-74, 2002.
- LIMA-DELLAMORA, E.C.; OSORIO-DE-CASTRO, C.G.S.; MADRUGA, L.G.S.L.; AZEREDO, T.B. Utilização de registros de dispensação de medicamentos na mensuração da adesão: revisão crítica da literatura. **Caderno de Saúde Pública**, v. 33, p. 1-16, 2017.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 544, 2008.
- LUBRANO, V., BALZAN, S. Enzymatic antioxidant system in vascular Inflammation And coronary artery disease. **The journal of experimental medicine**, v. 20, p. 218-24, 2015.
- LUNARDI, R.F.; WOHLBERG, M.; MEDEIROS, N.; AGOSTINI, F.; FUNCHAL, C.; DANI, C. In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, “leather hat” in Wistar rat liver. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1451- 1462, 2014.
- LUZ, P.L.; UINT, L. Endotélio na aterosclerose: interações celulares e vasomotricidade. In: Luz, P.L.; Laurindo, F.R.M.; Chagas, A.C.P. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu; p. 131-60, 2003.
- MAGALHÃES, A.C. Etnobotânica, sabers locais e agricultura no contexto de uma floresta urbana: Maciço da Pedra Branca, RJ, 2010. 92 f. **Dissertação (Mestrado em Geografia)** – Programa de Pós Graduação em Geografia, Pontifícia |Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2010.
- MAGNI, P., MACCHI, C., MORLOTTI, B., SIRTORI, C.R., RUSCICA, M. Risk identification and possible countermeasures for muscle adverse effects during statin therapy. **European Journal of Internal Medicine**, v. 26, p. 82–88, 2015.
- MALTA, D.C.; BERNAL, R.T.I.; LIMA, M.G.; DE ARAÚJO, S.S.C.; DA SILVA, M.M.A.; FREITAS, M.I.F.; BARROS, M.B.A. Doenças crônicas não transmissíveis e a utilização de serviços de saúde: análise da Pesquisa Nacional de Saúde no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, Supl. 1-4s, 2017.
- MANNS, D.; HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrene derivate from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Medica**, v. 59, p. 465-466, 1993.
- MANNU, G.S.; ZAMAN, M.J.; GUPTA, A.; REHMAN, H.U.; MYINT, P.K. Evidence of lifestyle modification in the management of hypercholesterolemia. **Current cardiology reviews**, v. 9, p. 2-14, 2013.
- MCGILL, J.R.H.C.; MCMAHAN, C.A.; ZIESKE, A.W. Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. **Circulation**, v.102, p.374-379, 2000.

NADERALI, E.K.; DOYLE, P.J.; WILLIAMS, G. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. **Clinical Science**, v. 98, p. 537-43, 2000.

NAPOLI, C.; D'ARMIENTO, P.F.; MANCINI, P.F.; POSTIGLIONE, A.; WITZTUM, J.L.; PALUMBO, G.; PALINSKI, W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2680-90, 1997.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; STOCLET, J. C.; SCHINIKERTH, V.B. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 310, p. 371-7, 2003.

NICKENING, G.; HARRISON, D.G. The AT-1-type angiotensin receptor in oxidative stress and hypertension part I: oxidative stress and atherogenesis. **Circulation**, 105:3936, 2002.

NOJIRI, H.; SHIMIZU, T.; FUNAKOSHI, M.; YAMAGUCHI, O.; ZHOU, H.; KAWAKAMI, S.; OREKHOV, A.N.; TERTOV, V.V.; KUDRYASHOV, S.A.; SMIRNOV, V.N. Trigger like stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low densitylipoprotein in cultured cells. **Circulation Research**, v. 66, p. 311–20, 2006.

OJEDA, D.; JIMÉNEZ-FERRER, E.; ZAMILPA, A.; HERRERA-ARELLANO, A.; TORTORIELLO, J.; ALVAREZ, L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 7–10, 2010.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 28. ed. São Paulo: IBRASA, p.79-80, 1997.

PANSARIN, E. R.; PANSARIN, L. M. Reproductive biology of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae): evidence of selfsterility in populations of the state of São Paulo. **Rodriguésia Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 62, n. 1, 2011.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; SANTOS-BUELGA, C., OSUNA, A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 67-75, 2009.

PICCINATO, C.E.; CHERRI, J.; MORIYA, T. Hipertensão e doença arterial periférica. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, n.3, p.306-315, 2001.

PIMENTA, D.S.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M. A.C. Essencial oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. Schetal Micheli) Chapéu de Couro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 623-628, 2000.

PIMENTA, D.S. Contribuição a ecologia, cultivo e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Chapéu de couro). **Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)** – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 176, 2002.

PIMENTA, D.S.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 623-628, 2006.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

PRANDO, T.B.L.; BARBOZA, L.N.; GASPAROTTO, F.M.; ARAÚJO, V.O.; TIRLONI, C.A.S.; DE SOUZA, L.M.; LOURENÇO, E.L.B.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 369-378, 2015.

PRANDO, T.B.L.; BARBOZA, L.N.; ARAÚJO, V.O.; MOURÃO GASPAROTTO, F.; SOUZA, L.M.; LOURENÇO, E.L.B.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1249-1258, 2016.

PRESCOTT, E.; SCHARLING, H.; OSLER, M.; SCHNOHR, P. Importance of light Smoking and inhalation habits on risk of myocardial infarction and all cause mortality. A 22 year follows up of 12.149 men and women in The Copenhagen City Heart Study. **Journal of the Epidemiology Community Health**, v. 56, p.702-6, 2002.

PRICE, J.F.; MOWBRAY, P.I.; LEE, A.J.; RUMLEY, A.; LOWE, G.D.; FOWKES, F.G.; Smoking and cardiovascular risk factors in the development of cardiovascular disease and coronary artery disease: Edinburg Artery Study. **European Heart Journal**, v. 20, p. 344-53, 1999.

QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols On cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 68, p.125– 31, 2013.

RABELO, L.M. Fatores de risco para doença aterosclerótica na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 2, p.153-64, 2001.

RAMOS MORALES, E.L. La aterosclerosis: algunas consideraciones acerca de su estudio experimental; revisión bibliográfica. **Revista Cubana de Medicina**, v. 26, p. 965-70, 1987.

RATAJ, K. *Echinodorus grandiflorus* (Cham. Et Schlecht.) Mich., its geographical distribution and variability. **Folia Geobotanica et Phytotaxonomica**, v. 4, n. 3, p. 319-326, 1969.

RIBEIRO, E.S.; PEREIRA, M.P.; DE CASTRO, E.M.; BARONI, G.R.; CORRÊA, F.F.; PEREIRA, F.J. Relações da anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na

- tolerância ao 192 chumbo em *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, p. 605-612, 2015.
- RODRIGUES, R.; GOTTSCHALL, C.A.M. Aterogênese. **RBORL**, v.38, n.1, p.88-95, 1992.
- SACRAMENTO, H.T. Legislação para produção, comercialização e uso de plantas medicinais. Jornada Catarinense de Plantas Medicinais. Lages: **Anais**, p. 57-61, 2001.
- SAITO, I.; OZAWAB, H.; AONOA, H.; IKEBEA, T.; YAMASHITAC, T.; MAKINO, Y. Trends in fatal coronary heart disease among people aged 25-74 years in Oita City, Japan, from 1987-1998. **Journal of the Clinical Epidemiology**, v.55, p. 469-476, 2002.
- SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A.; CAMARÉ, C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. **Biochimie**, v. 125, p. 281-296, 2015.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R.(org) **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 3. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, Capítulo 15, p.301-332, 2001.
- SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Trans-aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. aureus, a Brazilian medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.2, p.149-154, 2007.
- SIES, H. Polyphenols and health: update and perspectives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 2-5, 2010.
- SILVA JUNIOR, A.A.; VIZZOTTO, V.J. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.9, p.5-8, 1996.
- SILVA, M.A.; SWANSON, A.C.; GANDHI, P.J.; TATARONIS, G.R. Statin-related adverse events: a meta-analysis. **Clinical therapeutics**, v. 28, p. 26-35, 2006.
- SILVA, M.D.; DREVECK, S.; ZENI, A.L.B. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população rural no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí – Indaial. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 10, 2009.
- SILVA, G.P.; FERNANDES, D.C.; VIGLIANO, M.V.; DA FONSECA, E.N.; SANTOS, S.V.; MARQUES, P.R.; JUSTO, M.D.; SABINO, K.C.; COELHO, M.G. Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits high in vitro and in vivo anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1584-1596, 2016.
- SIMÕES, M.V.; SCHMIDT, A. Hipertensão arterial como fator de risco para doenças cardiovasculares. **Medicina**, v.29, p.214-219, 1996.

SITI, H.N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review).

Vascularpharmacology, v.71, p. 40-56, 2015.

SMET, D.; PETER, A.G.M. Herbal remedies. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2046-2056, 2002.

SOBENIN, I.A.; TERTOV, V.V.; OREKHOV, A.N. Atherogenic modified LDL in diabetes. **Diabetes**, v.45, p. 35-39, 1996.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.; BERTOLAMI, M.C.; AFIUNE NETO, A.; SOUZA, A.D.; LOTTENBERG, A.M.; CHACRA, A.P.; FALUDI, A.A.; LOURES-VALE, A.A.; CARVALHO, A.C.; DUNCAN, B.; GELONESE, B.; POLANCZYK, C.; RODRIGUES; SOBRINHO, C.R.; SCHERR, C.; KARLA, C.; ARMAGANIJAN, D.; MORIGUCHI, E.; SARAIVA, F.; PICHETTI, G.; XAVIER, H.T.; CHAVES, H.; BORGES, J.L.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, J.I.; NICOLAU, J.C.; DOS SANTOS, J.E.; DE LIMA, J.J.; VIEIRA, J.L.; NOVAZZI, J.P.; FARIA NETO, J.R.; TORRES, K.P.; PINTO, L.D.E.A.; BRICARELLO, L.; BODANESE, L.C.; INTROCASO, L.; MALACHIAS, M.V.; IZAR, M.C.; MAGALHÃES, M.E.; SCHMIDT, M.I.; SCARTEZINI, M.; NOBRE, M.; FOPPA, M.; FORTI, N.A.; BERWANGER, O.; GEBARA, O.C.; COELHO, O.R.; MARANHÃO, R.C.; DOS SANTOS FILHO, R.D.; COSTA, R.P.; BARRETO, S.; KAISER, S.; IHARA, S.; CARVALHO, T.D.; MARTINEZ, T.L.; RELVAS, W.G.; SALGADO, W. IV Brazilian Guideline for dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.7, Suppl 1:2-19, 2007.

STEINBECK, K.S. The importance of physical activity in the prevention of overweight And obesity in childhood: to review and in opinion. **Obesity Reviews**, v. 2, p. 117-130, 2001.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.H.; EL BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 299-313, 2004.

SUKHOVERSHIN, R. A.; YEPURI, G.; GHEBREMARIAM, Y. T. Endothelium-Derived Nitric Oxide as an Antiatherogenic Mechanism: Implications for Therapy. **Methodist DeBakey cardiovascular journal**, v. 11, n. 3, p. 166–171, 2015.

SUNG, E.C.; FRIEDLANDER, A.H.; KOBASHIGAWA, J.A. The prevalence of calcified carotid atheromas on the panoramic radiographs of patients with dilated cardiomyopathy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 97, p.404- 407, 2004.

TAMARGO, J.; CABALLERO, R.; GÓMEZ, R.; NÚÑEZ, L.; VAQUERO, M.; DELPÓN E. Lipid-lowering therapy with statins, a new approach to antiarrhythmic therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, p. 107–126, 2007.

- TANAKA, C.M.A.; SARRAGIOTTO, M.H.; ZUKERMANSCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A.J. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1547-1549, 1997.
- TANAKA, C.M.A. Constituintes químicos de cinco espécies de *Echinodorus* e avaliação do betapineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados. **Tese Doutorado em Química**, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 202, 2000.
- TESKE, M.; TRENTINI, A. M. Herbarium: Compêndio de fitoterapia. 4. ed. Curitiba: **Herbarium Laboratório Botânico**, 2001.
- THANDAPILLY, S.J.; WOJCIECHOWSKI, P.; BEHBAHANI, J.; LOUIS, XL.; YU, L.; JURIC, D.; et al. Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure. **American Journal of the Hypertension**, v.23, p.192-6, 2010.
- TIBIRIÇA, E.; ALMEIDA, A.; CAILLEAUX, S.; PIMENTA, D.S.; KAPLAN, M.A.; LESSA, M.A.; FIGUEIREDO, M.R. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 50-55, 2007.
- TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 15, p. 115-21, 2006.
- TÖRNWALL, M.E.; VIRTAMO, J.; HAUKKA, J.K.; ALBANES, D.; HUTTUNEN, J.K. Life-style factors and risk for abdominal aortic aneurysm in a cohort of Finnish male smokers. **Epidemiology**, v. 12, p. 94-100, 2001.
- TOUYZ, R.M. Molecular and cellular mechanism in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 14, p. 125-31, 2005.
- TREPELS, T.; ZEIHNER, A.M.; FICHTLSCHERER, S. The endothelium and inflammation. **Endothelium**, v. 13, p. 423-9, 2006.
- TYLER, V. E. Phytochemicals: back to the future. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1589-1592, 1999.
- VARA, D.; PULA, G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. **Current Molecular Medicine**, v. 14, p. 1103-25, 2014.
- VAZIRI, N.D.; WANG, X.Q.; OVEISI, F.; RAD, B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. **Hypertension**, v. 36, p. 142-46, 2000.
- VIEIRA, M.F.; LIMA, N.A.S. Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). **Aquatic Botany**, v. 58, n. 2, p. 89-98, 1997.

WALLERATH, T.; DECKERT, G.; TERNES, T.; ANDERSON, H.; LI, H.; WITTE, K.; FÖRSTERMANN, U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 106, p.1652-8, 2002.

WAN-RU, L. Effect of organic acids amendment on cadmium uptake and translocation by *Echinodorus Osiris*. **Turang Tongbao**, v. 45, n. 1, p. 205-209, 2014.

WENGER, N.K. Exclusion of the elderly and woman from coronary trials. **Journal of The American Medical Association**, V. 268, P. 1460-1, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of atherosclerotic lesions. **World Health Organization Technical Reports Series**, n. 143, p. 3-20, 1958.

YANG, M.Y.; HUANG, C.N.; CHAN, K.C.; YANG, Y.S.; PENG, C.H.; WANG, C.J. Mulberry leaf polyphenols possess antiatherogenesis effect via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1985-95, 2011.

YOLANDA, M.G.A.; EURICO, T.D.C.F^o.; SÉRGIO, M.P.P.; JOSÉ, A.E.C.; WONG, C.P.; JÚLIO, L. Fatores de Risco para Aterosclerose em uma População Idosa Ambulatorial na Cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 74, p.181-188, 2000.

YING, L.; LEI, L. A comparison of decontaminating effects of hydroponic plants on domestic sewage. **Jiangxi Nongye Daxue Xuebao**, v. 36, p. 881-886, 2014.

ZANELLA, M.T.; FREIRE, M.B.; MILAGRES, R.; FERREIRA, S.; BONOMO, P.P.; KOHLMANN, O.JR.; RIBEIRO, A.B. Blood pressure disturbances in diabetes mellitus. **Journal of the Hypertension**, v.10, p.559-570, 1992.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo 1:

Artigo publicado na revista PLANTA MEDICA

(Qualis B1 em Medicina II; Fator de Impacto 2.494)

Normas da revista: <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/clarivate-scholarone-prod-us-west-2-s1m-public/wwwRoot/prod1/societyimages/plamed/Planta-Guidelines-authors-2018-01.pdf>

Heart-Protective Effects of *Echinodorus grandiflorus* in Rabbits That Are Fed a High-cholesterol Diet

Authors

Francielly Mourão Gasparotto¹, Francislaine Aparecida dos Reis Livero², Rhanany Allan Caloi Palozzi¹, Maria Letícia Ames², Bruna Nunes², Guilherme Donadel², Rita de Cassia Lima Ribeiro², Emerson Luiz Botelho Lourenço², Cândida Aparecida Leite Kassuya¹, Arquímedes Gasparotto Junior¹

Affiliations

- 1 Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil
- 2 Laboratório de Pesquisa Pré-Clinica de Produtos Naturais, Universidade Paranaense, Umuarama, PR, Brazil

Key words

Alismataceae, antioxidant, atherosclerosis, dyslipidemia, *Echinodorus grandiflorus*, ventricular hypertrophy

received April 13, 2018

revised May 5, 2018

accepted June 11, 2018

Bibliography

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0644-2794>

Published online June 21, 2018 | *Planta Med* 2018; 84: 1271–1279 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York | ISSN 0032-0943

Correspondence

Prof. Dr. Arquímedes Gasparotto Junior
Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular,
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados
Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O. Box 533
79.804-970 Dourados, MS, Brazil
Phone: + 55 (67) 34 1023333, Fax: + 55 (67) 34 10 23 21
arquimedesjunior@ufgd.edu.br

ABSTRACT

Excess weight and dyslipidemia are among the most serious health problems in Western societies. These conditions enhance the risk of cardiac disease and have been linked with a higher prevalence of cardiac arrhythmias and sudden death. The present study investigated the cardioprotective effects of *Echinodorus grandiflorus* on ventricular remodeling in rabbits that were fed a 1% cholesterol-rich diet. We first obtained an ethanol-soluble fraction of *E. grandiflorus* and performed a detailed phytochemical study by liquid chromatography-DAD/ESI-MS. For 60 days, male rabbits were fed the cholesterol-rich diet or a diet without the addition of cholesterol. After 30 days, different groups of rabbits were treated with the ethanol-soluble fraction of *E. grandiflorus* (10, 30, and 100 mg/kg, p. o.), simvastatin (2.5 mg/kg), or vehicle once daily for 30 days. At the end of 60 days, the serum lipoprotein ratio, electrocardiographic profile, histopathological alterations, and the cardiac antioxidant defense system were investigated. Echocardiographic analysis showed morphological and functional alterations in cholesterol-rich diet-fed animals, indicating left ventricle hypertrophy. The total cholesterol/high-density lipoprotein ratio and low-density lipoprotein/high-density lipoprotein ratio were significantly higher in cholesterol-rich diet-fed rabbits. Myocardial flaccidity, fatty degeneration, and concentric left ventricular hypertrophy were observed. An increase in lipid peroxidation levels, a decrease in superoxide dismutase activity, and a decrease in reduced glutathione levels were observed in the myocardium of all cholesterol-rich diet-fed rabbits. Treatment with the ethanol-soluble fraction of *E. grandiflorus*, especially the highest dose, significantly reduced all of these alterations, thus demonstrating the cardioprotective effect of the ethanol-soluble fraction of *E. grandiflorus* on cardiac changes that are induced by a cholesterol-rich diet.

Introduction

In recent decades, epidemiological data have shown a significant increase in excess weight and dyslipidemia around the world. Despite a virtually global distribution, data indicate a higher prevalence in Western countries, mainly because of its diet pattern [1].

The term "Western diet" encompasses the predominant food pattern not only in Western countries but also in most countries with moderate to high degrees of economic and social development. In these countries, the diet features the high intake of processed and refined foods and the relatively high consumption of animal products, including meat and dairy products [2].

ABBREVIATIONS

Akt	protein kinase B
AP-1	activator protein 1
API	atmospheric pressure ionization
ASK-1	apoptotic signaling regulatory kinase type 1
CDR	cholesterol-rich diet
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ESEG	ethanol-soluble fraction from <i>Echinodorus grandiflorus</i>
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
EtOH	ethanol
GSH	glutathione
HDL	high-density lipoproteins
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
IV	interventricular
LC-DAD-MS	high-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry
LDL	low-density lipoproteins
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
LPO	lipid peroxidation
LV	left ventricle
MAPK	mitogen-activated protein
MeOH	methanol
MMPs	matrix metalloproteinases
NF- κ B	nuclear factor- κ B
PDA	photodiode array
ROS	reactive oxygen species
Rt	retention time
SOD	superoxide dismutase
SMV	simvastatin
TC	total cholesterol
TG	triglycerides

Animal food products are known to be high in saturated fats and cholesterol. A CRD is among the major risk factors for the development of cardiovascular disease, directly contributing to the high death rate from heart disease in Western countries [3]. A CRD contributes to an increase in serum lipid levels and atherosclerosis, and the cardiac muscle itself can be affected when the consumption of these foods exceeds the daily recommended amounts. In fact, a CRD can induce cellular lipid degeneration, characterized by the abnormal and reversible accumulation of lipids in myocardial fibers, forming vacuoles as a result of imbalances in the synthesis, use, or mobilization of these lipids [4]. Consequently, an inflammatory process is initiated that can lead to ventricular hypertrophy and heart failure [5]. Additionally, fatty infiltration may interfere with cardiac depolarization, prolonging the QRS complex and contributing to the onset of arrhythmias and sudden death [6].

In Brazil and several other countries around the world, the population often uses different natural products as lipid-lowering agents, mainly because of the high prevalence of heart disease [7–10]. Several studies have shown that several medicinal species

have significant lipid-lowering and antiatherosclerotic effects [11–13]. However, studies that have investigated heart-protective effects are still rather scarce. Although the deleterious effects of cholesterol accumulation in the myocardium are well known, the possible beneficial effect of several natural products on these conditions remains unknown.

Throughout Latin America, *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Alismataceae) has been gaining prominence in recent years [9]. Popularly known as “chapéu de couro”, “chá-de-campanha”, or “erva do brejo”, the species is often used as a diuretic, hypotensive, and lipid-lowering agent [14,15]. In fact, because of its relevance in Brazilian popular culture, the genus was recently included in the 5th edition of the Brazilian Pharmacopoeia [16,17].

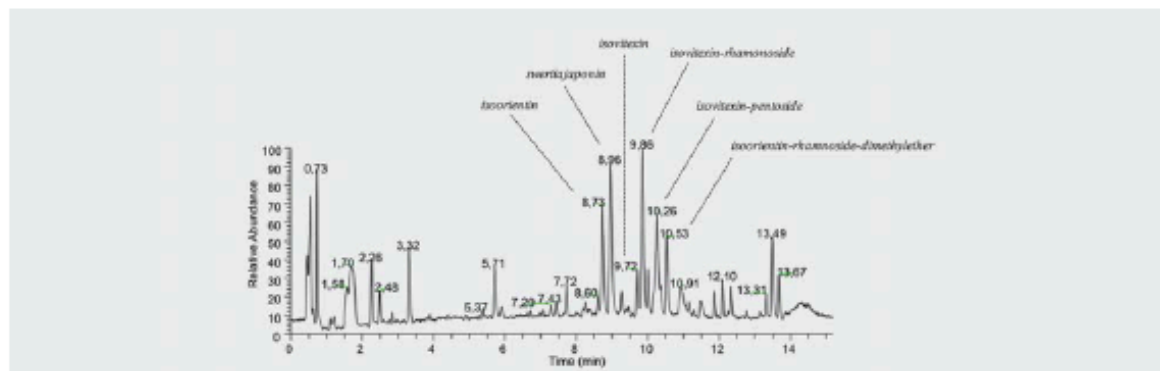
E. grandiflorus is a species with a diverse phytochemistry. The presence of different classes of secondary metabolites, including alkaloids, tannins, terpenoids, and saponins, has drawn attention [15,18]. However, polyphenolic compounds, including tannins, flavonoids, and C-glycosides, are worth mentioning because of their diuretic and antihypertensive effects [19,20]. Recent pharmacological studies have shown that different preparations that are obtained from *E. grandiflorus* have diuretic [19,20], antiedematous [18], anti-inflammatory [21,22], antihypertensive [20,23], and vasodilatory [24] effects, making the species a potential new candidate for herbal medicines.

Despite the relevance of the species as a cardioprotective agent, its effects on heart function when individuals consume a CRD remain unknown. The present study used a classic model of atherosclerosis to induce detectable cardiac changes in male New Zealand rabbits. We then evaluated the possible cardioprotective effects of an ESEG.

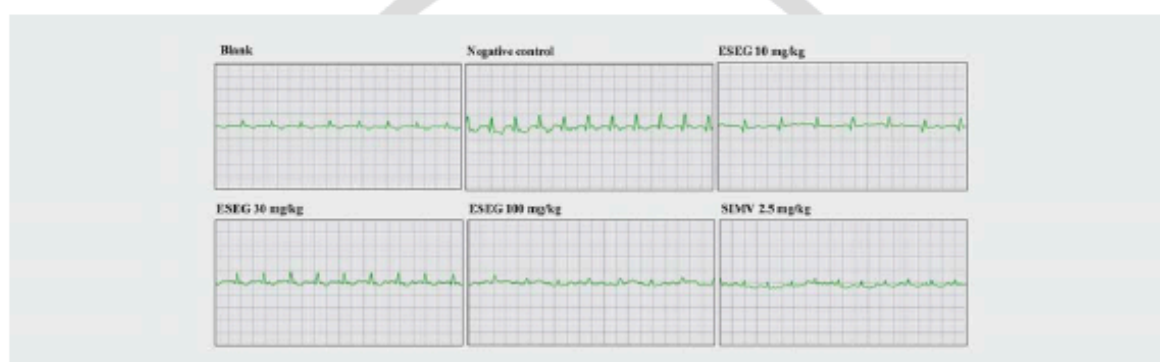
Results

The LC-DAD-MS data showed a large amount of flavonoids, including isoorientin (Rt 8.73; m/z 447.09322), swertiajaponin (Rt 8.96; m/z 461.10884), isovitexin (Rt 9.72; m/z 431.09826), swertisin (Rt 10.01; m/z 445.09322), and isoorientin-dimethylether (Rt 10.36; m/z 475.12439; ► Fig. 1). We also identified several di-C-glycoside derivatives, such as isoorientin-rhamnoside (Rt 8.91; m/z 593.15120), isoorientin-rhamnoside-dimethylether (Rt 10.53; m/z 621.18254), isovitexin-pentoside (Rt 10.26; m/z 607.16684), isovitexin-rhamnoside (Rt 9.86; m/z 577.15633), and swertisin-rhamnoside (Rt 10.22; m/z 591.17193).

► Fig. 2 shows representative electrocardiographic records of all of the experimental groups. Heart rate was not significantly different between any of the experimental rabbits (data not shown). The mean values in the negative control, blank, ESEG (10, 30, and 100 mg/kg), and positive control groups were 258 ± 32 beats per minute (bpm), 241 ± 30 bpm, 267 ± 40 bpm, 225 ± 42 bpm, 251 ± 32 bpm, and 248 ± 40 bpm, respectively. The prolonged CRD produced important electrographic changes. Rabbits in the negative control group had an expressive shortening of the duration of the P-wave (40.8 ± 3.2 ms in blank vs. 26.4 ± 1.6 ms in negative control; ► Fig. 3A). Sensitive prolongation of the duration of the QRS complex (40.4 ± 3.1 ms in blank vs. 53.8 ± 3.5 ms in negative control; ► Fig. 3C) and R-wave amplitude (0.19 ± 0.02 mV in blank



► Fig. 1 Chromatographic profile of ESEG obtained from *E. grandiflorus*.



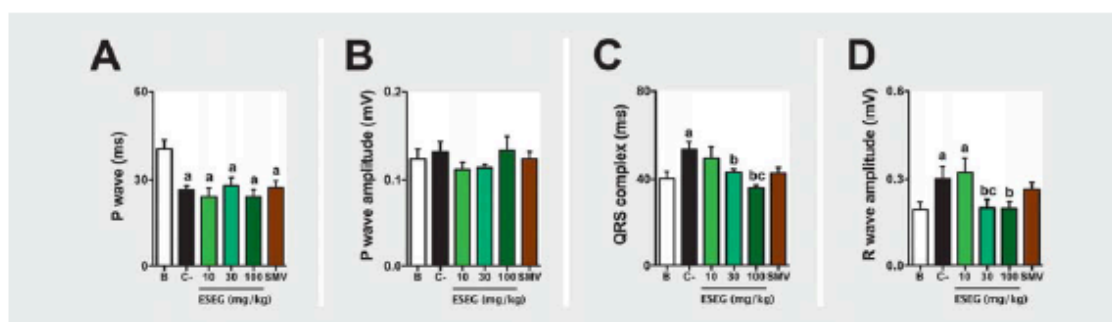
► Fig. 2 Representative electrocardiographic records carried out in limb lead II. Cardiographic electrical waves were recorded 5 to 10 min on the 60th day of the experiments. ESEG: ethanol-soluble fraction from *E. grandiflorus*; SMV: simvastatin.

vs. 0.30 ± 0.04 mV in negative control; ► Fig. 3D) was observed. Prolonged treatment with ESEG at doses of 30 and 100 mg/kg reversed the changes in the QRS complex and R-wave, with values that were very close to the blank group. Interestingly, the changes in P-wave duration were not reversed by any of the treatments (► Fig. 2A). Moreover, we did not observe any significant changes in electrocardiographic characteristics of the P-wave amplitude (► Fig. 3B), T-wave, or in the QT, ST, or RR intervals between experimental groups (data not shown).

The TC, HDL-C, LDL-C, and TG levels in all experimental groups are shown in ► Table 1. A significant increase in serum lipid levels was observed in the animals of the negative control group when compared to rabbits not fed a CRD (blank). Oral administration of ESEG for 30 days was able to reduce TC, LDL-C, and TG levels in a dose-dependent manner, reaching a reduction of approximately 6% at the dose of 100 mg/kg. In fact, at the highest dose, ESEG was able to induce a lipid-lowering effect similar to that obtained with SMV administration. On the other hand, CRD increased HDL-C levels in all experimental groups and remained unchanged regardless of treatments with ESEG or SMV.

The serum lipoprotein ratios in all of the experimental groups are presented in ► Fig. 4A, B. Blank group animals had mean TC/HDL and LDL/HDL ratios of 5.6 ± 0.8 and 2.2 ± 0.3 , respectively. The CRD significantly elevated serum lipoprotein ratios in untreated animals (negative control), with mean TC/HDL and LDL/HDL ratios of 49.0 ± 2.1 and 47.4 ± 1.0 , respectively. All of the treatments, including ESEG (at all doses) and SMV, significantly reduced the TC/HDL and LDL/HDL ratios. At the highest dose, ESEG exerted effects that were similar to SMV.

All of the animals that received the CRD exhibited important cardiac morphological changes. Morphometric measures of the IV septum and LV are shown in ► Fig. 5A, B. We observed a significant increase in IV septum thickness (2.0 ± 0.21 mm vs. 3.0 ± 0.12 mm) and LV posterior wall thickness (2.9 ± 0.18 mm vs. 3.8 ± 0.33 mm) in CRD hearts compared with the blank control. Treatment with 100 mg/kg ESEG reduced the thickness of the IV septum and LV in all CRD-fed rabbits, with values that were very similar to animals that were treated with SMV. In addition, we observed expressive lesions that were consistent with myocardial flaccidity and fatty degeneration, with fat droplets in the myocar-



► **Fig. 3** ESEG-induced electrocardiographic protective effects in rabbits undergoing a CRD. Cardiographic electrical waves were recorded 5 to 10 min on the 60th day of the experiments. P wave duration (A) and amplitude (B), QRS complex duration (C), and R wave amplitude (D) are shown. Values are expressed as the mean \pm S. E. M. ($n = 6$) compared to B ($^*p < 0.05$), C- ($^{\#}p < 0.05$), or previous ESEG dose ($^{\circ}p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. B: blank; C-: negative control group; SMV: simvastatin.

► **Table 1** Effects of the oral administration of the ESEG obtained from *E. grandiflorus* and simvastatin (SMV) on serum lipid levels from New Zealand rabbits.

Group	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)
Blank	63 \pm 4.8	16 \pm 0.7	8.6 \pm 0.8	121 \pm 9.6
Negative control	1739 \pm 51 ^b	34 \pm 1.4 [†]	1651 \pm 58 ^b	211 \pm 7.7 ^b
ESEG (10 mg/kg)	1315 \pm 40 ^{a,b}	35 \pm 1.6 [†]	1105 \pm 67 ^{a,b}	171 \pm 11
ESEG (30 mg/kg)	1031 \pm 43 ^{a,b}	33 \pm 1.7 [†]	992 \pm 45 ^{a,b}	170 \pm 13
ESEG (100 mg/kg)	710 \pm 53 ^{a,b}	37 \pm 1.8 [†]	731 \pm 34 ^{a,b}	63 \pm 5.1 ^{a,b}
SMV (2.5 mg/kg)	638 \pm 32 ^{a,b}	35 \pm 1.7 [†]	555 \pm 54 ^{a,b}	45 \pm 3.3 ^{a,b}

Values are expressed as the mean \pm S. E. M. ($n = 6$ in each group) in comparison to the negative control ($^*p < 0.05$) or blank ($^{\#}p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. TC (total cholesterol); HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol); LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol); TG (triglyceride)

dial sarcoplasm, in addition to concentric left ventricular hypertrophy and fat deposition in the pericardium in the negative control and SMV groups compared with the blank control (► **Fig. 6**). Surprisingly, the highest dose of ESEG prevented this damage.

The antioxidant effects of ESEG in cardiac tissue in rabbits that were fed the CRD are presented in ► **Table 2**. The CRD decreased SOD and reduced GSH levels by ~56 and 68%, respectively, in the negative control rabbits. Treatment with 100 mg/kg ESEG reversed these alterations in cardiac tissue. Regardless of LPO levels, 100 mg/kg ESEG prevented cell damage that was induced by the CRD in the negative control animals. SMV normalized only GSH and LPO levels, without influencing SOD activity.

Discussion

The present study used a classic animal model to induce morphological and functional alterations in CRD-fed rabbits, including dyslipidemia, LV hypertrophy, and cardiac oxidative stress. We found that ESEG exerted important cardioprotective effects, with a response pattern that was similar to SMV, a classic cardioprotective drug. We used SMV as the positive control drug to evaluate

the pharmacological response to ESEG. The use of SMV is widespread and highly effective, but important adverse effects develop in some patients, including muscle injury and liver disease [25, 26]. The present findings indicate that treatment with the phytopharmaceutical ESEG results in a similar therapeutic response, which may expand the therapeutic arsenal for the prevention and treatment of cardiac alterations that are induced by CRD.

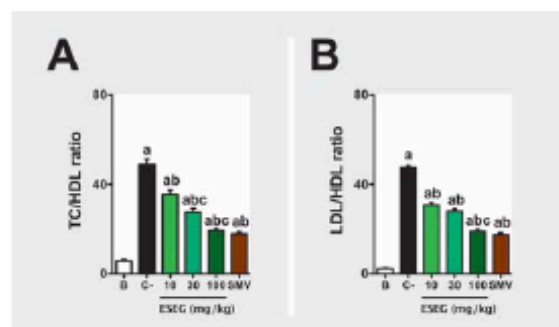
The first detectable change during a CRD is an increase in serum lipid levels. LDL-C is the prime index of cardiovascular disease risk and the main target for therapy. As a preventive measure or as an indicator of the severity of dyslipidemia, several lipoprotein ratios or "atherogenic indices" have been defined in an attempt to optimize the predictive capacity of the lipid profile. The TC/HDL ratio, also known as the atherogenic index, and the LDL/HDL ratio are two important risk indicators whose predictive value is higher than the isolated lipid parameters [27]. Population studies have shown that when these parameters are compared between an apparently healthy population and survivors of myocardial infarction, the data allow us to find a smaller population overlap [28]. This illustrates the high discriminatory power of these parameters for atherosclerotic disease. In fact, in the present study, animals

that received the CRD and did not receive any treatment had high TC/HDL and LDL/HDL ratios, reflecting fatty degeneration. This relationship was also evident when evaluating the pharmacological effects of ESEG and SMV. Prolonged administration of both substances significantly reduced lipoprotein ratios in all of the analyzed samples. The ways in which ESEG exerts these hypolipidemic effects needs further investigation. However, the substantial presence of phenolic compounds that were identified in ESEG, including glycosylated flavonoids, likely make a significant contribution to its effects.

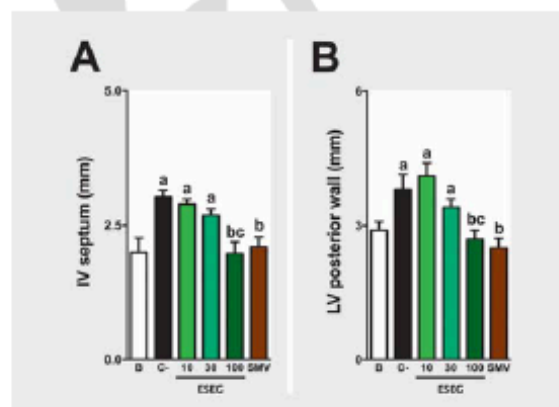
In recent decades, interest has increased in the cardioprotective effects of phenolic compounds. Several studies have reported the hypolipidemic, antiatherogenic, and cardioprotective role of these compounds [29,30]. These cardioprotective effects of phenolic compounds are related to their antioxidant activity. They also have antiinflammatory effects, inhibit LDL oxidation, prevent platelet aggregation and adhesion, and prevent smooth muscle cell migration and proliferation [31,32]. However, the cardioprotective effects of some natural products that are rich in these compounds are likely not solely attributable to a single molecule. Similarly, we believe that the lipid-lowering and cardioprotective effects of ESEG are likely attributable to a coordinated action between the different secondary metabolites that are present in this preparation. Data show that the coordinated effects of several secondary metabolites overlap significantly with the response that is induced by a single molecule, thus justifying the superior effects of some crude extracts over specific isolated metabolites [33].

Another relevant aspect concerns the heart-protective effects of ESEG. Some studies have shown an independent relationship between dyslipidemia and LV mass. In fact, the high burden of subclinical disease, including dyslipidemia, contributes to a greater risk by causing left LV hypertrophy, thereby affecting the long-term prognosis [34]. The present observations with regard to lipid levels and LV mass are broadly consistent with this previous study. In the present study, animals that exhibited CRD-induced dyslipemic presented an expressive enlargement of the left ventricular wall, and the electrographic data indicated ventricular hypertrophy. The Framingham Heart Study found that patients who had a significant increase in QRS complex voltage had an approximately three times higher risk of cardiovascular events [35,36]. Additionally, increases in R-wave amplitude and QRS duration may contribute directly to cases of ventricular tachycardia or even sudden death [37]. Surprisingly, all of the animals that were fed the CRD and treated with ESEG exhibited significant cardioprotection. The left ventricular wall and electrocardiogram pattern presented characteristics that were similar to the negative control animals.

With regard to the molecular mechanisms of the cardioprotective effects of ESEG, the antioxidant system plays an important role. ROS can interfere with several processes that affect cardiac function and structure, contributing to the genesis and progression of ventricular hypertrophy. In the heart, ROS can alter the function of various ion channels and inhibit activity of the calcium membrane pump of the sarcoplasmic reticulum. Moreover, the phosphorylation of troponin T by ROS-activated kinases may contribute to the reduction of cardiac contractility [38]. ROS can also stimulate various enzymes in the MAPK family, such as ERK 1/2

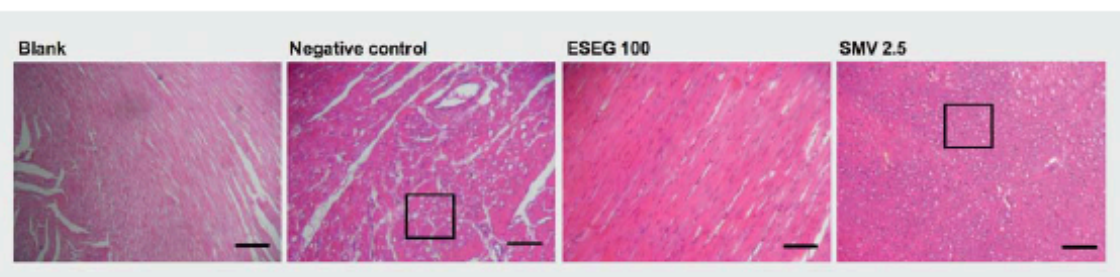


► Fig. 4 ESEG treatment reduces serum lipoprotein ratios in rabbits undergoing a CRD. TC/HDL (A) and LDL/HDL (B) ratios are shown. Values are expressed as the mean \pm S. E. M. (n = 6) in comparison with B (*p < 0.05), C- (*p < 0.05), or a previous ESEG dose (*p < 0.05) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. B: blank; C-: negative control group; TC: total cholesterol; HDL: high-density lipoproteins; LDL: low-density lipoproteins; SMV: simvastatin.



► Fig. 5 ESEG treatment reduces IV septum and LV posterior wall thickness from rabbits undergoing a CRD. Histomorphometric analyses of the IV septum (A) and LV posterior wall (B) are shown. Values are expressed as the mean \pm S. E. M. (n = 6) in comparison with B (*p < 0.05), C- (*p < 0.05), or a previous ESEG dose (*p < 0.05) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. B: blank; C-: negative control group; IV: interventricular; LV: left ventricle; SMV: simvastatin.

and ASK-1, thus contributing to the development of cardiac hypertrophy. Additionally, the activation of such transcription factors as NF- κ B and AP-1 is also involved in ROS-induced cardiac hypertrophy [38]. ROS also stimulates the proliferation of cardiac fibroblasts and activates extracellular MMPs, with consequent remodeling of the extracellular matrix [39]. Furthermore, ROS can induce the apoptosis of cardiomyocytes through various mechanisms, including direct genotoxicity, the activation of ASK-1 kinase in response to TNF- α , and the stimulation of kinase inducers of the mitochondrial killing mechanism in response to the activa-



► **Fig. 6** Representative cross-sections stained with hematoxylin-eosin of the LV posterior wall muscle of blank, negative control, ESEG (100 mg/kg), and SMV (2.5 mg/kg) group. Images in 40-X scale. Scale bar: 10 μ m. Squares indicate fatty degeneration with fat droplets. SMV: simvastatin.

► **Table 2** Antioxidant effects of the oral administration of ESEG on cardiac tissue of CDR-fed rabbits.

Parameter	Blank	C-	ESEG (10 mg/kg)	ESEG (30 mg/kg)	ESEG (100 mg/kg)	SMV (2.5 mg/kg)
SOD	34.59 \pm 1.25	15.73 \pm 0.41*	22.78 \pm 3.05	30.79 \pm 3.56	33.09 \pm 1.96 ^b	23.02 \pm 1.89
GSH	330.20 \pm 26.06	108.50 \pm 8.68*	165.00 \pm 12.68	239.60 \pm 24.87	300.20 \pm 31.20 ^b	220.80 \pm 7.75 ^b
LPO	7.29 \pm 0.46	22.14 \pm 1.15*	12.71 \pm 1.89	8.99 \pm 1.69	6.18 \pm 0.54 ^b	8.02 \pm 0.40 ^b

Values are expressed as the mean \pm S. E. M. of six rabbits in each group in comparison with B ($^*p < 0.05$) or C- ($^*p < 0.05$) using one-way Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. CRD: cholesterol-rich diet; SOD: superoxide dismutase (unit of SOD/mg of protein); GSH: reduced glutathione (μ g GSH/g of tissue); LPO: lipid peroxidation (nmol hydroperoxides/mg of protein). C-: negative control group; SMV: simvastatin

tion of β adrenergic receptors [39]. ESEG exerted ROS-protective effects on cardiac muscle. Considering that the polyphenolic compounds that are present in ESEG are classic antioxidant agents [40], one possibility is that the antioxidant effects may play a relevant role in the cardioprotective response to ESEG treatment. Furthermore, statins exert tissue antioxidant effects, including the expression of endothelial nitric oxide synthase by stimulating Akt phosphorylation at the Ser473 residue. Statins also inhibit oxidative stress-induced endothelial senescence [41]. Further support for the potential of ESEG as a viable alternative cardiological therapy derives from the fact that it has diuretic and antihypertensive activity [20] in addition to cardioprotective effects that were similar to simvastatin.

In conclusion, the present study found that ESEG may be a possible cardioprotective drug that prevents dyslipidemia and oxidative stress in cardiac tissue. The data also showed that ESEG might have beneficial effects for the prevention of ventricular hypertrophy and electrocardiographic changes that are induced by a CRD. Overall, ESEG may be useful for cardioprotection.

Material and Methods

Drugs and solvents

The following drugs, salts, and solutions were used: isoflurane and potassium chloride (Cristália). Simvastatin (purity $\geq 98\%$) and cholesterol (purity $\geq 92.5\%$) were obtained from Sigma-Aldrich. All other reagents were obtained in analytical grade.

Phytochemical study

Plant material

E. grandiflorus leaves (5.0 kg) were collected in February 2017 from the botanical garden of the Universidade Paranaense (UNIPAR, Brazil) at 430 m above sea level (S23°47'55", W53°18'48"). The plant material was identified by Dr. Mariza Barion Romagnolo (Universidade Estadual de Maringá – UEM, Brazil). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the UEM (no. 20810).

Extraction

The plant material was air-dried in an oven at 37 °C for 5 days and then cut and pulverized, yielding 2.5 kg of dry powder (50% of the initial weight). The aqueous extract was obtained by an infusion according to Prando et al. [20]. One liter of boiling water was poured for every 60 g of powdered dry leaves; the container was sealed and the extraction was allowed to proceed until room temperature was reached (~3 h). The infusion extract was treated with three volumes of EtOH, which gave rise to a precipitate and an ESEG. The ESEG was filtered, concentrated in a rotary evaporator (55 °C), and freeze-dried (9.5% w/w yield).

LC-DAD-MS analysis

The ESEG was examined by LC-DAD-MS. LC-DAD (Waters) was composed of a binary pump and PDA detector. Samples at 2 μ l concentrations were prepared in H₂O-MeOH (7:3 v/v), and the analysis was performed with a reversed-phase HSS-C18 column (2.1 \times 100 mm with 1.7 μ m particle size; Waters). The binary sol-

vent was composed of (A) 0.1% (v/v) aqueous formic acid and (B) MeOH. The linear solvent gradient at a flow rate of 0.4 mL/min was developed by increasing the solvent percentage (B) from 0 to 38% at 10 min and then to 60% at 13 min and returning to initial conditions at 14 min, followed by reequilibration for 3 min. The column was heated to 60 °C, and the samples were kept at room temperature (22 °C). The injection volume was 2 µL, and compounds were detected at λ 200–400 by HR-MS.

The HR-MS analyses were performed using an LTQ-Orbitrap-XL electrospray ionization mass spectrometer (Thermo-Scientific) that operated in the negative ionization mode at API. The source temperature was 350 °C, and a stream of N₂ gas was used for sample desolvation with a sheath gas flow rate at 60 arbitrary units (abu) and auxiliary at 20 abu. The ionization parameters were as follows: 3.5 kV spray voltage, -20 V capillary voltage, and -130 V tube lens voltage. For mass accuracy, an external calibration was performed (100–2000 *m/z*), and the resolution was set at 30000 FWHM (at *m/z* 400) in the LC-MS mode. Acquisition was obtained in total ion current mode with a mass range of 100–1000 *m/z*. Compound fragmentation was obtained by collision-induced dissociation using helium and an energy of 20 eV.

Pharmacological study

Animals

Twenty-week-old male New Zealand rabbits, weighing 2.5–3.0 kg, were obtained from Universidade Federal do Paraná (UFPR, Brazil) and housed in the vivarium of UNIPAR under controlled temperature (20 ± 2 °C) and humidity (50 ± 10%) and a 12-h/12-h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. All of the experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD, Brazil; protocol no. 08/2015; approved in January 15, 2016) and conducted in accordance with the Brazilian Legal Framework on the Scientific Use of Animals.

Experimental design

Dyslipidemia and atherosclerosis were induced according to Barboza et al. [42]. For 60 days, rabbits received a commercial diet *ad libitum* (Nutricoeelho, Purina) supplemented with 1% cholesterol (i.e., CRD). After 30 days, the animals were randomly distributed into five groups (*n* = 6/group) and orally treated by gavage with ESEG (10, 30, and 100 mg/kg), vehicle (filtered water, 1 mL/kg, negative control), or SMV (2.5 mg/kg, positive control) daily for 30 days. One group was fed without the addition of cholesterol and treated only with vehicle (blank). ESEG and SMV were solubilized in filtered water just prior to treatments.

Electrocardiography

At the end of the experimental period, all of the rabbits were kept conscious in the lateral decubitus position. Alligator clip electrodes were positioned in the folds of both elbows and both knees. A small amount of 70% alcohol was applied to each interface of the electrodes for less interference and better electrical conduction. An acclimatization time (5 min) elapsed, and then cardiographic electrical waves were recording for 5 min. Electrocardiography was recorded using an ECG recorder (ML-136 Animal Bio Amp, ADInstruments).

Serum lipoprotein measurement

After electrocardiography, all of the animals were fasted for 8 h and anesthetized with isoflurane. Blood samples were then collected from the jugular vein. Serum was obtained by centrifugation at 1500 × *g* for 5 min. TC, TG, and HDL-C levels were measured using an automated biochemical analyzer (Roche Cobas Integra 400 plus). Serum LDL-C levels were calculated according to Friedewald et al. [43]. For the TC/HDL ratio, the absolute values of TC were divided by the HDL values. Finally, to obtain the LDL/HDL ratio, we divided LDL by HDL levels.

Macroscopic evaluation

After blood collection, the rabbits were euthanized by an intravenous injection of potassium chloride. After removal, the hearts were sectioned longitudinally, cleaned, and weighed. Part of the cardiac tissue was placed in 10% buffered formalin. After 48 h of fixation, the samples were rinsed in 70% alcohol and immersed in Hexheimer's solution that contained 5 g Sudan-IV, 500 mL of 70% ethyl alcohol, and 500 mL of acetone at room temperature for 15 min. Tissues were transferred to 80% ethanol for 20 min and washed in tap water for 1 h to remove excess staining. The luminal surface was then assessed for sudanophilic lesions. Image data acquisition and analysis were performed using Motic Images Plus 2.0 software.

Histopathological analysis

A second part of the cardiac tissue was dehydrated in alcohol, cleared with xylene, and embedded in paraffin. Samples were sectioned (5 mm), stained with hematoxylin and eosin, and examined under a light microscope. Image data acquisition and analysis were performed using Motic Images Plus 2.0 software.

Cardiac antioxidant system

After euthanasia, part of the cardiac tissue was quickly collected and homogenized in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) in a 1:10 dilution. SOD activity, LPO levels, and GSH levels were determined according to Gao et al. [44], Jiang et al. [45], and Sedlak and Lindsay [46], respectively. The results are expressed as U of SOD/g of protein for SOD activity, mmol hydroperoxide/mg of protein for LPO levels, and µg of GSH/g of tissue for GSH levels. The amounts of protein in the homogenates were determined by the Bradford method [47].

Statistical analysis

The results are expressed as the mean ± standard error of the mean (S.E.M.), with *n* = 6 animals per group. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test or the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Values of *p* < 0.05 were considered statistically significant. The graphs were drawn and the statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software.

Acknowledgements

Thanks to the University Hospital of the Universidade Federal da Grande Dourados for the biochemical analyzes. Financial support was provided by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil, 59/300.046/2015), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, 449464/2014-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), and Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e Pós-Graduação (DEGPP/UNIPAR).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Saklayen MG. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2018; 20: 1–12
- [2] Mu M, Xu LF, Hu D, Wu J, Bai MJ. Dietary patterns and overweight/obesity: a review article. *Iran J Public Health* 2017; 46: 869–876
- [3] Bowen KJ, Sullivan VK, Kris-Etherton PM, Petersen KS. Nutrition and cardiovascular disease – an update. *Curr Atheroscler Rep* 2018; 20: 1–8
- [4] Parisi V, Leosco D, Ferro G, Bevilacqua A, Pagano G, de Lucia C, Perrone Filardi P, Caruso A, Rengo G, Ferrara N. The lipid theory in the pathogenesis of calcific aortic stenosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015; 25: 519–525
- [5] Tune JD, Goodwill AG, Sassoon DJ, Mather KJ. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl Res* 2017; 183: 57–70
- [6] Puddu PE, Schiaviti M, Torromeo C. Gender and cardiovascular mortality in Northern and Southern European populations. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 3893–3904
- [7] Ribeiro RV, Bieski ICC, Balogun SO, Martins DTO. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2017; 205: 69–102
- [8] Pedrollo CT, Kinupp VF, Shepard G Jr., Heinrich M. Medicinal plants at Rio Jaupari, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. *J Ethnopharmacol* 2016; 186: 111–124
- [9] Marques AM, Provance DW Jr., Kaplan MAC, Figueiredo MR. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food Chem Toxicol* 2017; 109 (Pt 2): 1032–1047
- [10] Maleki T, Akhiani H. Ethnobotanical and ethnomedicinal studies in Baluchi tribes: A case study in Mt. Taftan, southeastern Iran. *J Ethnopharmacol* 2018; 217: 163–177
- [11] El-Tantawy WH, Temraz A. Natural products for controlling hyperlipidemia: review. *Arch Physiol Biochem* 2018; 19: 1–8
- [12] Santiago PG, Gasparotto FM, Gebara KS, Bacha FB, Livero FADR, Strapazon MA, Junior ELC, Kassuya CAL, de Souza LM, Gasparotto Junior A. Mechanisms underlying antiatherosclerotic properties of an enriched fraction obtained from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytomedicine* 2017; 34: 162–170
- [13] Cavalera M, Axling U, Rippe C, Swärd K, Holm C. Dietary rose hip exerts antiatherosclerotic effects and increases nitric oxide-mediated dilation in ApoE-null mice. *J Nutr Biochem* 2017; 44: 52–59
- [14] Bolson M, Heffler SR, Chaves EID, Gasparotto Junior A, Cardozo Junior EL. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2015; 161: 1–10
- [15] Brugiole SSS, Borges LV, Pimenta DS, Brugiole ASS, Peters VM, Guerra MO. Ethnobotany and experimental Pharmacology of *Echinodorus grandiflorus* (chapéu-de-couro). In: Alejandro V, Jasiah I, eds. *Medicinal Plants: Classification, Biosynthesis and Pharmacology*. New York: Nova Science Publishers; 2009: 243–254
- [16] Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 2/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2010: 546-1v/II
- [17] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2011: 126
- [18] Garcia EF, Oliveira MA, Godin AM, Ferreira WC, Bastos LF, Coelho MM, Braga FC. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine* 2010; 18: 80–86
- [19] Prando TBL, Barboza LN, Gasparotto FM, Araújo VO, Tirloni CAS, de Souza LM, Lourenço ELB, Gasparotto Junior A. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. *J Ethnopharmacol* 2015; 174: 369–378
- [20] Prando TB, Barboza LN, Araújo VO, Gasparotto FM, de Souza LM, Lourenço EL, Gasparotto Junior A. Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Michx. *Phytomedicine* 2016; 23: 1249–1258
- [21] Garcia Ede F, de Oliveira MA, Dourado LP, de Souza DG, Teixeira MM, Braga FC. In vitro TNF- α inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation with their phytochemical composition. *Planta Med* 2016; 82: 337–343
- [22] Garcia Ede F, de Oliveira MA, Candido LC, Coelho FM, Costa VV, Queiroz-Junior CM, Boff D, Amaral FA, de Souza Dda G, Teixeira MM, Braga FC. Effect of the hydroethanolic extract from *Echinodorus grandiflorus* leaves and a fraction enriched in flavone-C-glycosides on antigen-induced arthritis in mice. *Planta Med* 2016; 82: 407–413
- [23] Lessa MA, Araújo CV, Kaplan MA, Pimenta D, Figueiredo MR, Tibiriçá E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 161–168
- [24] Tibiriçá E, Almeida A, Cailleaux S, Pimenta D, Kaplan MA, Lessa MA, Figueiredo MR. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 50–55
- [25] Ambapkar SN, Shetty N, Dwivedy A, Malve HO. Statin-induced rhabdomyolysis in patient with renal failure and underlying undiagnosed hypothyroidism. *Indian J Crit Care Med* 2016; 20: 305–307
- [26] Jose J. Statins and its hepatic effects: Newer data, implications, and changing recommendations. *J Pharm Bioallied Sci* 2016; 8: 23–28
- [27] Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubiés-Prat J, Pallardo LF, Masana L, Mangas A, Hernández-Mijares A, González-Santos P, Ascaso JF, Pedro-Botet J. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *J Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 757–765
- [28] Kinosian B, Glick H, Garland G. Cholesterol and coronary heart disease: predicting risks by levels and ratios. *Ann Intern Med* 1994; 121: 641–647
- [29] Wong ZW, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: A review. *Biomed Pharmacother* 2017; 94: 1145–1166
- [30] Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 549–555
- [31] Gormaz JG, Valls N, Sobr Mayor C, Tumer T, Rodrigo R. Potential role of polyphenols in the prevention of cardiovascular diseases: molecular bases. *Curr Med Chem* 2016; 23: 115–128
- [32] Oak ML, Auger C, Belcastro E, Park H, Lee H, Schini-Kerth VB. Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. *Free Radic Biol Med* 2018; S0891-5849: 30121–30127
- [33] Wagner H. Multitarget therapy-the future of treatment for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine* 2006; 13: 122–129

- [34] Schillaci G, Vaudo G, Reboldi G, Verdecchia P, Lupattelli G, Pasqualini L, Porcellati C, Mannarino E. High-density lipoprotein cholesterol and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hypertens* 2001; 19: 2265–2270
- [35] Kannel WB. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Am J Med* 1983; 75: 4–11
- [36] Levy D, Labib SB, Anderson KM, Christiansen JC, Kannel WB, Castelli WP. Determinants of sensitivity and specificity of electrocardiographic criteria for left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1990; 81: 815–820
- [37] Brugada P, Brugada J, Mont L, Smeets J, Andries EW. A new approach to the differential diagnosis of a regular tachycardia with a wide QRS complex. *Circulation* 1991; 83: 1649–1659
- [38] Giordano FJ. Oxygen oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500–508
- [39] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H2181–H2190
- [40] Ng TB, Liu F, Wang ZT. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci* 2000; 66: 709–723
- [41] Ota H, Eto M, Kano MR. Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2205–2211
- [42] Barboza LN, Livero FA, Prando TB, Ribeiro Rde C, Lourenço EL, Budel JM, de Souza LM, Acco A, Dalsenter PR, Gasparotto Junior A. Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. in New Zealand rabbits fed with cholesterol-rich diet. *J Ethnopharmacol* 2016; 187: 134–145
- [43] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of LDL cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499–502
- [44] Gao SJ, Zhao GC, Luo GM, Yang TS, Shen JC. Antioxidant effects of superoxide dismutase and horseradish peroxidase on lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci* 1998; 864: 284–287
- [45] Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 1992; 202: 384–389
- [46] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192–205
- [47] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254



5.2 Artigo 2:

Artigo aceito para publicação na revista JOURNAL OF MEDICINAL FOOD

(Qualis B1 em Medicina II; Fator de Impacto 1.954)

Normas da revista: <https://home.liebertpub.com/publications/journal-of-medicinal-food/38/for-authors#manuscript>

De: **Journal of Medicinal Food** <onbehalfof@manuscriptcentral.com>
Assunto: Journal of Medicinal Food - Decision on Manuscript ID JMF-2019-0017.R2
Data: 3 de abril de 2019 13:34:33 AMT
Para: Arquimedes Gasparotto <arquimedesgasparotto@gmail.com>
Responder A: mzemel@nusirt.com

Ocultar

Todos os e-mails 1

03-Apr-2019

Dear Dr. Gasparotto Junior:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Antithrombotic properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schtdl.) Micheli: from antioxidant and lipid-lowering effects to an antiinflammatory role" in its current form for publication in Journal of Medicinal Food.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

All authors will get a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement form. The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the forms acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright.

FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A DELAY IN PUBLICATION.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Please contact OpenAccess@liebertpub.com or call (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Journal of Medicinal Food, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Michael Zemel, PhD
Editor-in-Chief, Journal of Medicinal Food
mzemel@nusirt.com

Antiatherosclerotic properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldl.)**Micheli: from antioxidant and lipid-lowering effects to an antiinflammatory role**

Short title: Antiatherosclerotic effects of *Echinodorus grandiflorus*

Francielly Mourão Gasparotto¹, Rhanany Alan Calloi Palozi¹, Claudio Henrique Francisconi da Silva², Karoline Bach Pauli², Guilherme Donadel², Bruno Henrique Lopes Botelho Lourenço², Bruna Caroline Nunes², Francislaine Aparecida dos Reis Lívero², Lauro Mera de Souza³, Emerson Luiz Botelho Lourenço², Cândida Aparecida Leite Kassuya¹, Arquimedes Gasparotto Junior^{1*}

Affiliation

¹ *Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil*

² *Laboratório de Pesquisa Pré-Clínica de Produtos Naturais, Universidade Paranaense, Umuarama, PR, Brazil*

³ *Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Faculdade Pequeno Príncipe, Curitiba, PR, Brazil*

Correspondence

Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12, P.O. Box 533, 79.804-970 Dourados, MS, Brazil. E-mail: arquimedesjunior@ufgd.edu.br Phone: +55 (67) 3410-2333, Fax: +55 (67) 3410-2321

ABSTRACT

Echinodorus grandiflorus is an important medicinal plant species that is native to South America. Despite extensive popular usage as a hypolipidemic drug, its effects as an atheroprotective agent remain unknown. The aim of the present study was to evaluate the effects of an ethanol soluble fraction that was obtained from *E. grandiflorus* (ESEG) leaves against the development of atherosclerosis in rabbits. Male rabbits received a diet that was supplemented with 1% cholesterol (cholesterol-rich diet [CRD]) for 60 days. After 30 days of the CRD, the animals were divided into five groups ($n = 6$) and treated with ESEG (10, 30, and 100 mg/kg), simvastatin (2.5 mg/kg), or vehicle once daily for 30 days. The negative control group was fed a cholesterol-free diet and treated orally with vehicle. At the end of 60 days, serum lipids, oxidized low-density lipoprotein, thiobarbituric acid reactive substances, nitrotyrosine, and serum IL-1 β , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 levels were determined. Samples from the aortic arch and thoracic segment were also collected to investigate the tissue antioxidant defense system and perform histopathological analysis. Oral ESEG administration significantly reduced serum lipid levels in CRD-fed rabbits. This treatment also modulated the arterial antioxidant defense system by reducing lipid and protein oxidation. Similarly, serum IL-1 β , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 levels significantly decreased, accompanied by a reduction of atherosclerotic lesions in all arterial branches. These findings suggest that ESEG may be a new herbal medicine that can be directly applied for the treatment and prevention of atherosclerotic disease.

KEYWORDS: Alismataceae; antiinflammatory; antioxidant; atherosclerosis; dyslipidemia

ABBREVIATIONS

ANOVA: analysis of variance; CRD: cholesterol-rich diet; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ESEG: ethanol soluble fraction obtained from *E. grandiflorus*; EtOH: ethanol; GSH: glutathione; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; IL-1 β : interleukin 1 beta; IL-6: interleukin 6; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; LPO: lipid peroxidation; NT: nitrotyrosine; ox-LDL: oxidized low-density lipoprotein; SD: standard deviation; SMV: simvastatin; sICAM: soluble intercellular adhesion molecule-1; SOD: superoxide dismutase; sVCAM: soluble vascular cell adhesion molecule-1; TBARS: thiobarbituric acid reactive species; TC: total cholesterol; TG: triglyceride.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases, especially atherosclerosis, exert an important influence on patients' quality of life, being considered one of the most important reasons for physical disability and premature death around the world. It is characterized by a silent and progressive onset, accompanied by aggression to the arterial surface, a result of an inflammatory and fibroproliferative response of the intima layers of the arteries.¹ The initial event of atherogenesis occurs through vascular endothelial function disorder, and the main contributory factor for triggering is hypercholesterolemia.² The lesion caused by the presence of the atherosclerotic plaque may compromise several arterial segments and is responsible for several adjacent complications such as coronary artery disease, intermittent limb claudication, stroke and abdominal aortic aneurysm.³

Primary prevention of dyslipidemia and atherosclerosis should be made with lifestyle changes. Although effective in most cases of non-familial hypercholesterolemia, it is known that the effectiveness of this type of intervention is variable and depends on the patient's adherence, type of diet adopted, regular physical activity, as well as the cessation of smoking and alcoholism.² Although lifestyle changes are quite effective, in some cases pharmacological treatment is necessary. Currently there is a vast therapeutic arsenal for the treatment of dyslipidemias and for the prevention of atherosclerosis. These include cholesterol absorption inhibitors (eg ezetimibe), bile acid sequestrants (eg cholestyramine and colestipol), niacin and its derivatives (eg nicofuranose and niceritrol), fibrates (eg clofibrate and ciprofibrate), cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors (eg anacetrapib and torcetrapib), and statins (eg simvastatin, atorvastatin and rosuvastatin).⁴ Despite the efficacy of statins, the appearance of adverse effects such as changes in hepatic function, myalgia, and to a

lesser extent rhabdomyolysis, has stimulated the research of several alternative treatments, including medicinal plants.⁵ Thus, there is currently great interest in the search for alternative therapeutic options for the prevention and treatment of dyslipidemias, especially to be used concomitantly with conventional therapies.^{6,7} In this regard, a well accepted option comes from natural products, especially those that are commonly used by the population and are part of the cultural arsenal transmitted by generations.

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schltld.) Micheli. (Alismataceae), popularly known as “chapéu de couro,” “chá-de-campanha,” and “erva do brejo,” is a plant species that is native to South America. The infusion of its leaves has been used as an antihypertensive and diuretic agent by different native populations.^{8,9} Because of its extensive ethnobotanical use in Brazil, the genus *Echinodorus* was included as a hypolipidemic and diuretic agent in the 5th edition of the Brazilian Pharmacopoeia.^{10,11}

Several preclinical studies have reported that *E. grandiflorus* is a promising species for the treatment of cardiovascular diseases. Different preparations that were obtained from this species were shown to have diuretic,^{12, 13} antiedematous,¹⁴ antihypertensive,^{13, 15} and vasodilatory¹⁶ properties. Surprisingly, despite extensive popular usage, its hypolipidemic and antiatherosclerotic effects remain unknown. The present study employed a classic model of atherosclerosis in male New Zealand rabbits to investigate the effects of *E. grandiflorus* against dyslipidemia and atherosclerosis. We also evaluated the possible molecular pathways that may be involved in its cardioprotective actions.

MATERIALS AND METHODS

Drugs and reagents

The following drugs, salts, and solutions were used: isoflurane and potassium chloride (Cristália, Itapira, SP, Brazil). Simvastatin and cholesterol were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All of the other reagents were obtained in analytical grade.

Plant material and preparation of the ethanol soluble fraction (ESEG)

Echinodorus grandiflorus leaves (5.0 kg) were collected in February 2014 from the botanical garden of the Universidade Paranaense (UNIPAR; Umuarama, Brazil) at 430 m above sea level (S23°47'55–W53°18'48). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Universidade Estadual de Maringá (HUEM; no. 20810). From the dried and crushed leaves of *E. grandiflorus* we obtained the ESEG (yield: 9.54% w/w). The procedure to obtain ESEG and the detailed phytochemical analysis were recently published by Gasparotto et al.¹⁷

Animals

Fourteen-week-old male New Zealand rabbits, weighing 1.8-2.0 kg, were obtained from Universidade Federal do Paraná (UFPR, Brazil) and housed at the UNIPAR vivarium under controlled temperature (20°C ± 2°C), humidity (50% ± 10%), and a 12 h/12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. All of the experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD; Dourados, Brazil; protocol no.

08/2015) and conducted in accordance with the Brazilian Legal Framework on the Scientific Use of Animals.

Experimental procedures

Dyslipidemia and atherosclerosis were induced according to Barboza et al.¹⁸ The rabbits received *ad libitum* a commercial diet (Purina® Rabbit Chow®, St. Louis, Missouri, EUA) that was supplemented with 1% cholesterol (cholesterol-rich diet [CRD]) for 60 days. After 30 days, the animals were randomly distributed into five groups ($n = 6/\text{group}$) and orally treated by gavage with ESEG (10, 30, and 100 mg/kg), vehicle (filtered water, 1 ml/kg; positive control), or simvastatin (2.5 mg/kg) daily for 30 days. One group was fed a cholesterol-free diet and was treated only with vehicle (negative control).

Body weight was measured at the beginning of the experiments and after 30 and 60 days. The water and feed intake was also monitored weekly. On day 60, all of the animals were fasted for 8 h and anesthetized with isoflurane. Blood samples were then collected from the jugular vein. Serum was obtained by centrifugation ($1,500 \times g$ for 5 min). Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels were measured using an automated biochemical analyzer (Roche Cobas Integra 400 plus). Serum very low-density lipoprotein cholesterol/low-density lipoprotein cholesterol (VLDL/LDL-C) levels were calculated as the difference between TC and HDL-C. Serum oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), nitrotyrosine (NT), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Malondialdehyde (MDA) levels were measured using an MDA assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

After blood collection, the rabbits were euthanized by an intravenous injection of potassium chloride. Aorta segments (aortic arch, thoracic, abdominal, and aortoiliac segments) were removed and fixed in 10% formalin. The aortic arch was considered from the exteriorization of the aorta in the heart to the bifurcation of the left subclavian artery. The thoracic segment was considered from the end of the bifurcation of the left subclavian artery to the diaphragm; and the abdominal portion was comprised between the diaphragm and the bifurcation of the iliac arteries. Finally, the aortoiliac segments were obtained from the bifurcation of the left iliac artery to the inguinal ligament. After 48 h, a part of each arterial branch was longitudinally sectioned, rinsed in 70% alcohol, and immersed in Sudan-IV staining solution at room temperature for 15 min. The tissues were transferred to 80% alcohol for 20 min and washed in tap water for 1 h, and the luminal surface was assessed for sudanophilic lesions. The analysis included digital image capture by Motic Images Plus 2.0 software, image processing for edge detection (lesion identification) and, finally, computation of lesions. Diseased portions of the vessels stained red with Sudan IV dye, appeared black or dark gray on the computer monitor. The edited image was separated into diseased and nondiseased areas by using an iterative algorithm for multiple threshold detection. Finally, the program provided the area corresponding to the lesions that were subtracted from the total area of the vessel.

A second part of the arterial branches was dehydrated with alcohol and xylene, embedded in paraffin, sectioned at 5 μm , stained with hematoxylin/eosin, and microscopically examined. The intima and media layers were measured using a caliper. For each animal, we assemble several blades with the entire arterial branch studied. All

neointimal formation (per slide) was identified, and for each atherosclerotic formation six lines of division were established. For each neointimal formation were performed six measurements, and one mean for each slide was obtained. When all the slides were evaluated, a new mean for each animal was determined. The area of the microscope was adjusted using an ocular micrometer coupled with the 100X objective, determining the size of the field per μm^2 . All images were obtained and evaluated by Motic Images Plus 2.0 software.

Finally, a third part of the arterial branches was sectioned and homogenized in K^+ phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5). Superoxide dismutase (SOD) was analyzed using the pyrogallol oxidation method.¹⁹ Lipid peroxidation (LPO) rate was measured by the FOX method according to Jiang et al.²⁰ Glutathione (GSH) levels were measured based on a previously described technique,²¹ with a few modifications. The amount of protein in the homogenates was determined using the Bradford method.²²

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of six animals per group. The statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test or the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The graphs were drawn and the statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

RESULTS

ESEG treatment prevents progressive weight loss in CRD-fed rabbits

Body weight gain in rabbits that were fed the CRD and treated with ESEG, simvastatin, or vehicle is shown in Fig. 1. Negative control animals had a body weight of 2.38 ± 0.52 kg at the beginning of the experiments, which increased to 3.44 ± 0.77 kg and 3.68 ± 0.51 kg after 30 and 60 days, respectively. Positive control rabbits had significantly lower body weight gain after 30 days (2.89 ± 0.46 kg) and 60 days (2.92 ± 0.35 kg). Similarly, animals that were treated with ESEG (10, 30, or 100 mg/kg) or simvastatin had body weight gain that was similar to positive control animals at the end of 30 days. At the end of the experimental period, all of the animals that were treated with ESEG (30 and 100 mg/kg) had body weight gain that was similar to rabbits that were treated with the standard commercial diet, with a body weight profile that was significantly different from animals that were fed the CRD and treated only with vehicle. Moreover, the changes in body weight were related to the feed consumption. Animals fed with standard commercial diet (negative control) maintained a regular food intake. On the other hand, the groups fed with CRD started to consume less feed during the experiment. Interestingly, this change was reversed after ESEG treatment at doses of 30 and 100 mg/kg (data not shown).

Prolonged treatment with ESEG significantly reduces serum lipids in CRD-fed rabbits

The TC, HDL-C, VLDL/LDL-C, and TG levels in negative control animals were 64 ± 12 mg/dl, 16 ± 1.8 mg/dl, 49 ± 12 mg/dl, and 121 ± 8.8 mg/dl, respectively. Positive control rabbits exhibited increases in serum lipid levels (1739 ± 125 mg/dl, 35 ± 3.6 mg/dl, 1705 ± 125 mg/dl, and 211 ± 18 mg/dl for TC, HDL-C, VLDL/LDL-C, and TG, respectively; Fig. 3A-D). Oral ESEG administration for 30 days dose-dependently

reduced TC, VLDL/LDL-C, and TG levels, reaching to 710 ± 130 mg/dl, 673 ± 129 mg/dl, and 46 ± 8.1 mg/dl, respectively, at the dose of 100 mg/kg. At the highest dose, ESEG induced a lipid-lowering effect that was similar to simvastatin treatment. The CRD increased HDL-C levels in all of the experimental groups, and HDL-C levels remained unchanged regardless of treatment with ESEG or simvastatin (Fig. 2A-D).

ESEG treatment reduces macroscopic lesions in aorta segments from rabbits undergoing CRD

Atherosclerotic lesions in aorta segments were used as an index of disease severity (Fig. 3A-E). The total average area of the aortic arch, thoracic, abdominal, and aortoiliac branches were 63 ± 6 mm², 550 ± 35 mm², 228 ± 22 mm², and 76 ± 8 mm², respectively. The area percentage of sudanophilic lesions in the aortic arch, thoracic, abdominal, and aortoiliac segments in the positive control group after 60 days of the CRD were $35 \pm 8.1\%$, $9.2 \pm 1.8 \%$, $12 \pm 2.0 \%$, and $17 \pm 2.0 \%$, respectively (Fig. 3A-D). The area percentage of sudanophilic lesions in the aortic arch, thoracic, abdominal, and aortoiliac segments in animals that were treated with ESEG at 100 mg/kg decreased to $16 \pm 2.5 \%$, $4.0 \pm 0.8 \%$, $4.7 \pm 1.7 \%$, and $5.7 \pm 0.9 \%$, respectively (Fig. 3A-D). ESEG at the dose of 30 mg/kg reduced sudanophilic lesions in the aortic arch ($20 \pm 6.1 \%$) and abdominal segment ($7.5 \pm 1.4 \%$). Although simvastatin decreased the areas of sudanophilic lesions in all arterial branches, the results were statistically lower than treatment with 100 mg/kg ESEG.

Prolonged treatment with ESEG reduces atherosclerotic lesions in the tunica intima from aorta segments of CRD-fed rabbits

Morphometric measures of the intima layer of aortic arch, thoracic, abdominal, and aortoiliac segments are shown in Fig. 4A-D. The histopathological examination of aorta segments in the positive control group showed significant thickness in the intima layer (aortic arch: $28 \pm 7.8 \mu\text{m}$; thoracic segment: $30 \pm 8.7 \mu\text{m}$; abdominal segment: $52 \pm 12 \mu\text{m}$; aortoiliac segment: $36 \pm 9.4 \mu\text{m}$) compared with the negative control group (aortic arch: $1.95 \pm 0.72 \mu\text{m}$; thoracic segment: $2.02 \pm 0.51 \mu\text{m}$; abdominal segment: $1.80 \pm 0.45 \mu\text{m}$; aortoiliac segment: $1.79 \pm 0.60 \mu\text{m}$). Treatment with ESEG (30 and 100 mg/kg) reduced the thickness of the intima layer in all CRD-fed rabbits, with values that were very similar to animals that were treated with simvastatin. No significant morphometric differences in the media layers were observed among groups (data not shown).

ESEG reduces serum levels of oxidative/nitrosative stress markers and modulates the arterial antioxidant defense system of CRD-fed rabbits

Positive control animals exhibited significant increases in TBARS and NT levels (~75% increase) compared with negative control animals (Fig. 5A-C). Similarly, ox-LDL levels increased from $75 \pm 12.9 \text{ mU/ml}$ in the negative control group to $432 \pm 70 \text{ mU/ml}$ in rabbits that were fed the CRD. Treatment with 30 and 100 mg/kg ESEG reduced TBARS and NT levels to values that were close to negative control animals (negative controls: $2.53 \pm 0.41 \text{ mol/L TBARS}$, $0.013 \pm 0.002 \mu\text{mol/L NT}$; 30 mg/kg ESEG: $3.07 \pm 0.74 \text{ mol/L TBARS}$, $0.016 \pm 0.001 \mu\text{mol/L NT}$; 100 mg/kg ESEG: $2.31 \pm 0.62 \text{ mol/L TBARS}$, $0.012 \pm 0.002 \mu\text{mol/L NT}$). Similarly, ox-LDL levels were significantly reduced by ESEG (30 and 100 mg/kg), with values that were close to

negative control animals at the highest dose (30 mg/kg ESEG: 257 ± 74 mU/ml; 100 mg/kg ESEG: 114 ± 45 mU/ml). Although animals that were treated with simvastatin also presented an interesting antioxidant response, the values were less expressive than those in animals that were treated with ESEG (Fig. 5A-C).

The results of the analysis of the arterial antioxidant defense system are presented in Table 1. The CRD increased lipid peroxidation levels by ~168% in positive control animals. Treatment with 100 mg/kg ESEG reversed this increase in all of the evaluated tissues. Treatment with 100 mg/kg ESEG also reversed the decreases in SOD activity and GSH levels that were observed in positive control animals.

ESEG treatment induces important anti-inflammatory response in atherosclerotic rabbits

Serum IL-1 β , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 levels in CRD-fed rabbits that were treated with ESEG and simvastatin are shown in Fig. 6A-D. IL-1 β , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 levels in negative control animals (baseline: 483 ± 90 pg/ml, 214 ± 39 ng/L, 3.92 ± 0.65 ng/L, and 1.60 ± 0.55 ng/L, respectively) increased to 884 ± 92 pg/ml, 542 ± 91 ng/L, 11.89 ± 1.87 ng/L, and 4.95 ± 0.77 ng/L, respectively, in positive control animals. In CRD-fed rabbits, treatment with 100 mg/kg ESEG reduced IL-1 β , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 levels to values that were close to negative control animals and simvastatin-treated animals.

DISCUSSION

One of the main triggers of the atherosclerotic process is a CRD. Excess dietary cholesterol, mainly LDL-C and VLDL-C, when not properly transported and metabolized, remains in the systemic circulation in large amounts, thus contributing directly to the development of endothelial dysfunction and atherosclerosis.²³ Moreover, the CRD can also increase vascular oxidative stress, inducing oxidative/nitrosative imbalance and leading to LDL-C oxidation, endothelial cell activation, monocyte recruitment, and foam cell formation.²⁴ In the present study we induced significant dyslipidemia in New Zealand rabbits by administering CRD. We also observed an oxidative/nitrosative imbalance that led to a significant increase in ox-LDL levels. As a result, we found an expressive increase in atherosclerotic plaque formation in different arterial branches. In fact, rabbits constitute excellent models for the study of the development of atherosclerosis. They share important characteristics with humans that are not observed in rodents, including high sensitivity to dietary cholesterol, hepatic LDL-C receptor, cholesterol ester transfer protein (CETP), presence of the VLDL-C receptor on macrophages, and heterogeneous HDL-C particles.²⁵

The use of synthetic lipid-lowering drugs - including statins - have shown significant efficacy in reducing cholesterol levels in different patients. It is now known that the mechanism of action of statins to obtain cholesterol reduction is due to the inhibition of the enzyme HMG-CoA reductase, through an affinity of these drugs with the active site of the enzyme. This inhibition is reversible and competitive with the HMG-CoA substrate.²⁶ Furthermore, part of the cardioprotective effect of statins derives from complex pleiotropic effects, including antioxidant and antiinflammatory activity.²⁷ Despite the efficacy of statins, the appearance of side effects such as changes in hepatic function and myalgia has stimulated the research of several alternative treatments, including herbal medicines.²⁸ Although herbal medicines are not completely

free of side effects, many species commonly used by the population have shown to be safe and highly effective in reducing plasma lipids.²⁹ Most often the available studies do not precisely define the mechanisms involved in the lipid-lowering properties of medicinal species. However, different secondary metabolites including saponins, tannins, alkaloids, and/or flavonoids can act synergistically, affecting the absorption, metabolism or excretion of cholesterol.³⁰

Echinodorus grandiflorus is frequently used in Brazil as a lipid-lowering agent.^{10, 11} A recent study by Gasparotto et al.¹⁷ using the same experimental model showed that the CRD was able to induce significant cardiac alterations in male rabbits. Myocardial flaccidity, fatty degeneration, and concentric left ventricular hypertrophy were observed in all CRD-fed rabbits. Treatment with ESEG, especially the highest dose, significantly reduced all cardiac changes that are induced by CRD. So, we hypothesized that ESEG may also have atheroprotective effects. Confirming our hypothesis, 30-day treatment with ESEG reduced serum lipid levels, especially at higher doses. A modulatory effect on the arterial antioxidant defense system was also observed, with a significant antioxidant and antinitrosant response. Consequently, atherosclerotic lesions significantly decreased, and effects that were superior to simvastatin were also observed in some arterial branches. When considering lipid-lowering effects, simvastatin presented a response that was very similar to ESEG. However, ESEG appeared to have higher antioxidant potential, reflected by a greater preventive effect on the formation of atherosclerotic lesions. Our results allow us to conjecture that ESEG has additional cardioprotective effects to statins because, in addition to effectively reducing serum lipids, it has shown important antioxidant, diuretic and hypotensive effects.^{12, 13}

Since statins have well-defined pleiotropic effects, we chose to evaluate whether ESEG would also be able to have these activities. To investigate the pleiotropic effects of ESEG, we measured the levels of inflammatory markers that commonly increase during the atherosclerotic process. Endothelium damage that is caused by the accumulation of oxidized LDL-C can promote the release of various inflammatory mediators, including IL-1 β and IL-6, and induce the expression of different adhesion molecules, such as sICAM-1 and sVCAM.³¹ These adhesion molecules are essential for the adhesion, rolling, and migration of leukocytes from the bloodstream to the site of injury.³² Thus, monocytes are able to transmigrate into the subendothelial space where, after phagocytizing ox-LDL and metamorphose into foam cells, they progressively accumulate to form atherosclerotic plaques.³³ In the present study, CRD-fed rabbits that were treated only with vehicle exhibited significant increases in IL-1 β , IL-6, sICAM-1, and sVCAM levels and consequently an increase in the thickness of the arterial intima layer. All of the animals that were treated with ESEG or simvastatin exhibited reductions of the levels of inflammatory markers, directly contributing to atheroprotective effects. The atheroprotective effects of ESEG, in addition to its lipid-lowering effects, appear to derive from a significant reduction of lipid oxidation, which possibly decreases endothelial damage by reducing IL-1 β , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 expression and monocyte transmigration through the vascular wall.

The main chemical constituents that are present in this species have been characterized. Several diterpenoids, phenolic acids, flavonols, alkaloids, saponins, and tannins have been identified.³⁴ Moreover, large amounts of phenolic compounds, mainly C-glycoside flavonoids (e.g., isoorientin, isoorientin-*O*-rhamnoside, isoorientin-*O*-rhamnoside-dimethylether, isoorientin 7,3'-dimethylether, swertiajaponin, swertiajaponin-*O*-rhamnoside, isovitexin, isovitexin-*O*-rhamnoside, swertisin, and

swertisin-*O*-rhamnoside) have been identified.^{12, 13} In a recent study we have shown that the ESEG has abundant amounts of C-glycoside flavonoids, including isoorientin, swertiajaponin, isovitexin, and swertisin derivatives.¹⁷ Previous studies reported that isovitexin (apigenin-6-C-glucoside), an isomer of vitexin, generally purified together with vitexin has an important antioxidant, anti-inflammatory and vasodilatory effect.^{35, 36} Similarly, other flavonoids like quercetin and its glycosylated derivatives showed inhibitory effects on the oxidative modification of LDL by macrophages, and naringenin 7-*O*-cetyl ether showed a significant inhibitory effect of HMG-CoA reductase.^{37, 38} Additionally, several studies have shown that flavonoid supplementation prevents hepatic steatosis, dyslipidemia, and insulin resistance primarily through inhibition of hepatic fatty acid synthesis and increased fatty acid oxidation.^{7, 39} Therefore, the present data suggest that the lipid lowering, antioxidant, antiinflammatory, and antiatherogenic effects of ESEG may be attributable to coordinated actions of its secondary metabolites, mainly to flavonoids and their glycosylated derivatives.

CONCLUSION

ESEG possesses secondary metabolites that are responsible for significant hypolipidemic, antioxidant, and antinitrosant properties, which can modulate the local inflammatory process by reducing the evolution of atherosclerotic disease. The present results suggest that ESEG may be a new herbal medicine that can be directly applied for the treatment and prevention of atherosclerotic disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All of the authors participated in the design and interpretation of the study, analysis of the data, and review of the manuscript. FMG, RACP, CHFS, FARL, KBP, GD, BHLBL, BCN, LMS, and ELBL conducted the experiments; FMG, CALK, AGJ, and FARL were responsible for data discussion and manuscript revision. AGJ was the senior researcher who was responsible for this work. All of the authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil, no. 59/300.046/2015), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, no. 449464/2014-8), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL STATEMENT

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All of the procedures that involved animals were in accordance with the ethical standards of the institution. This article does not contain any studies with human participants and/or specimens.

REFERENCES

1. Pant S, Deshmukh A, Gurumurthy GS, Pothineni NV, Watts TE, Romeo F, et al: Inflammation and atherosclerosis--revisited. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;19(2):170-178.
2. Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR: Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res* 2015;46(5):408-426.
3. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J: The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol* 2015;71:40-56.
4. Charo IF, Taub R: Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(5):365-376.
5. Kazi DS, Penko JM, Bibbins-Domingo K: Statins for Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Review of Evidence and Recommendations for Clinical Practice. *Med Clin North Am* 2017;101(4):689-699.

6. Bahmani M, Mirhoseini M, Shirzad H, Sedighi M, Shahinfard N, Rafieian-Kopaei M:
A review on promising natural agents effective on hyperlipidemia. *Evid Based Complementary Altern Med* 2015;20(3):228-238.
7. Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin NA, Ahmad SA, Shukor MY:
Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *BioMed Res Int* 2014;480258.
8. Bolson M, Hefler SR, Chaves EID, Gasparotto Junior A, Cardozo Junior EL: Ethno-
medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of
the surrounding region of forest fregments of Paraná, Brazil: *J Ethnopharmacol*
2015;161: 1-10.
9. Brugiolo SSS, Borges LV, Pimenta DS, Brugiolo ASS, Peters VM, Guerra MO:
Ethnobotany and Experimental Pharmacology of *Echinodorus grandiflorus*
(chapéu-de-couro). In: Alejandro V, Jasiah I, editors. Medicinal Plants:
Classification, Biosynthesis and Pharmacology: *New York. Nova Science
Publishers* 2009;243-254.
10. Brasil. Farmacopeia Brasileira. 5rd ed. Brasília: Anvisa; 2010.
11. Brasil. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. 1st ed. Brasília:
Anvisa; 2011.
12. Prando TBL, Barboza LN, Gasparotto FM, Araújo VO, Tirloni CAS, de Souza LM,
et al: Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic

- properties of native species of the Brazilian biodiversity. *J Ethnopharmacol* 2015;174:369-378.
13. Prando TBL, Barboza LN, Araújo VO, Gasparotto FM, de Souza LM, Lourenço ELB, et al: Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli. *Phytomedicine* 2016;23(11):1249-1258.
 14. Garcia EF, Oliveira MA, Godin AM, Ferreira WC, Bastos LF, Coelho MM, et al: Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine* 2010;18(1):80-86.
 15. Lessa MA, Araújo CV, Kaplan MA, Pimenta D, Figueiredo MR, Tibiriçá E: Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundam Clin Pharm* 2008;22(2):161–168.
 16. Tibiriçá E, Almeida A, Caillleaux S, Pimenta D, Kaplan MA, Lessa MA, et al: Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *J Ethnopharmacol* 2007;111:50-55.
 17. Gasparotto FM, Lívero FAR, Palozi RAC, Ames ML, Nunes B, Donadel G, et al: Heart-protective effects of *Echinodorus grandiflorus* in rabbits that are fed a high-cholesterol diet. *Planta Med* 2018;84(17):1271-1279.

18. Barboza LN, Lívero FAR, Prando TBL, Ribeiro RC, Lourenço ELB, Budel JM, et al: Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. in New Zealand rabbits fed with cholesterol-rich diet. *J Ethnopharmacol* 2016;187:134-145.
19. Gao SJ, Zhao GC, Luo GM, Yang TS, Shen JC: Antioxidant effects of superoxide dismutase and horseradish peroxidase on lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci* 1998;864:284-287.
20. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP: Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 1992;202:384–389.
21. Sedlak J, Lindsay RH: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1):192-205.
22. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
23. Kruth HS: Lipoprotein cholesterol and atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2001;1(6):633-653.
24. Li H, Horke S, Forstermann U: Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014;237(1):208-219.

25. Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen YE: Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol Ther* 2015;146:104-19.
26. McTaggart F, Buckett L, Davidson R, Holdgate G, McCormick A, Schneck D, et al: Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol* 2001;87:28B-32B.
27. Miller SJ: Emerging mechanisms for secondary cardioprotective effects of statins. *Cardiovasc Res* 2001;52(1):5-7.
28. Bellosta S, Corsini A: Statin drug interactions and related adverse reactions: an update. *Expert Opin Drug Saf* 2018;17(1):25-37.
29. Cox P, Balick M: The ethnobotanical approach to drug discovery. *Sci American* 1994;270:82-87.
30. Konda VGR, Madhavi E, Ruckmani A, Venkataramana Y. A review on medicinal plants with potential hypolipidemic activity. *Int J Pharm Bio Sci* 2013;4:729-740.
31. Steinberg D: Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8:1211-1217.

32. Khan R, Spagnoli V, Tardif JC, L'Allier PL: Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2015;240:497-509.
33. Swystun LL, Liaw PC: The role of leukocytes in thrombosis. *Blood* 2016;128:753-762.
34. Garcia EF, Oliveira MA, Godin AM, Ferreira WC, Bastos LF, Coelho MM, et al: Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine* 2010;18(1):80-86.
35. He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX, Peng BW: A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia* 2016;115:74-85.
36. Tirloni CAS, Palozi RAC, Schaedler MI, Guarnier LP, Silva AO, Marques MA, et al: Influence of *Luehea divaricata* Mart. extracts on peripheral vascular resistance and the role of nitric oxide and both Ca²⁺-sensitive and Kir6.1 ATP-sensitive K⁺ channels in the vasodilatory effects of isovitexin on isolated perfused mesenteric beds. *Phytomedicine* 2018;56:74-82.
37. De Whaley CV, Rankin SM, Hoult JRS: Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. *Biochem Pharmacol* 1990; 39:1743-1750.

38. Lee MK, Moon SS, Lee SE, Bok SH, Jeong TS, Park YB, et al: Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats. *Bioorganic Med Chem* 2003;11:393–398.

39. Mulvihill EE, Burke AC, Huff MW. Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Annu Rev Nutr* 2016 ;36:275-299.

Figures legend

Figure 1. ESEG treatment prevents progressive weight loss in CRD-fed rabbits. Body weight was measured at the beginning of experiments (day 0) and after 30 and 60 days of treatment with ESEG (10, 30, and 100 mg/kg), SMV (2.5 mg/kg), or vehicle (1 ml/kg). Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$) in comparison with C- (^a $p < 0.05$), C+ (^b $p < 0.05$), or previous ESEG dose (^c $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. C-: negative control group, C+: positive control group.

Figure 2. Prolonged ESEG treatment reduces lipid serum levels of CRD-fed rabbits. Serum sample were obtained on the 60th day of experiments and TC (A), HDL-C (B), VLDL/LDL-C (C), and TG (D) levels were analyzed. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$) in comparison with C- (^a $p < 0.05$), C+ (^b $p < 0.05$) or previous ESEG dose (^c $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. C-: negative control group; C+: positive control group. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; VLDL/LDL-C: very low-density lipoprotein/low-density lipoprotein cholesterol; SMV: simvastatin; TC: total cholesterol; TG: triglyceride.

Figure 3. ESEG treatment reduces sudanophilic lesions in aorta segments from rabbits undergoing cholesterol-rich diet (CRD). Percentage of atherosclerotic lesions in the aortic arch (A), thoracic (B), abdominal (C), and aortoiliac segments (D) and representative macroscopic observations in thoracic segments (E) are shown. Results are expressed as percent of the area covered by plaque over the total area evaluated. Images in 4-X scale. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$) in comparison with C- (^a $p < 0.05$), C+ (^b $p < 0.05$), SMV ([#] $p < 0.05$), or previous ESEG dose (^c $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. C-: negative control group; C+: positive control group; SMV: simvastatin.

Figure 4. ESEG treatment reduces arterial thickness in aorta segments from rabbits undergoing cholesterol-rich diet (CRD). Histomorphometric analyses of tunica intima from aortic arch (A), thoracic (B), abdominal (C), and aortoiliac segments (D) are shown. Representative cross-sections of the abdominal segment stained with hematoxylin-eosin are also presented (E). Black arrows show neointimal formation. Images in 40 x scale. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$) in comparison with C- (^a $p < 0.05$), C+ (^b $p < 0.05$), SMV ([#] $p < 0.05$), or previous ESEG dose (^c $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. C-: negative control group; C+: positive control group; SMV: simvastatin.

Figure 5. ESEG reduces serum levels of oxidative/nitrosative stress markers. Serum malondialdehyde (MDA; A), nitrotyrosine (NT; B), and oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) levels (C) are presented. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$) in comparison with C- (^a $p < 0.05$), C+ (^b $p < 0.05$), SMV ([#] $p < 0.05$), or previous ESEG dose (^c $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. C-: negative control group; C+: positive control group; SMV: simvastatin.

Figure 6. ESEG treatment reduces interleukins and soluble adhesion molecules levels in CRD-fed rabbits. Serum L-1 β (A), IL-6 (B), sVCAM-1 (C), and sICAM-1 (D) concentration are shown. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$) in comparison with C- (^a $p < 0.05$), C+ (^b $p < 0.05$), or previous ESEG dose (^c $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. C-: negative control group; C+: positive control group; SMV: simvastatin.

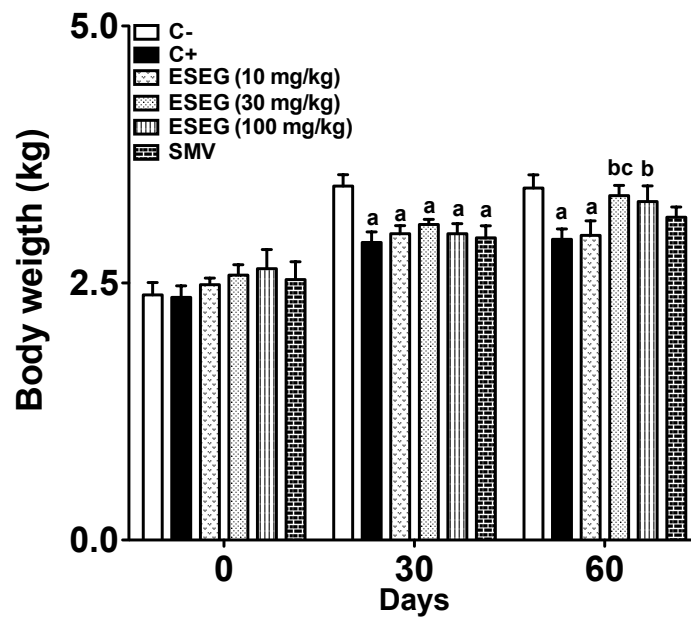


Figure 1

Gasparotto et al.

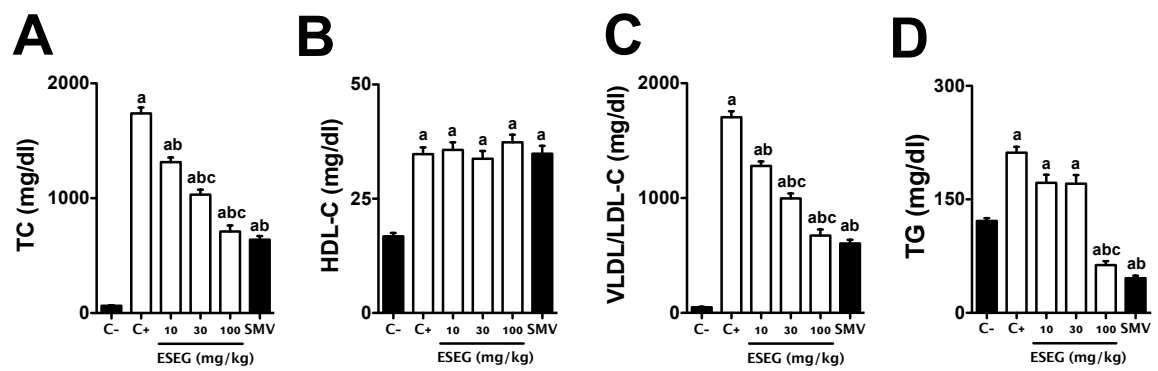


Figure 2

Gasparotto et al.

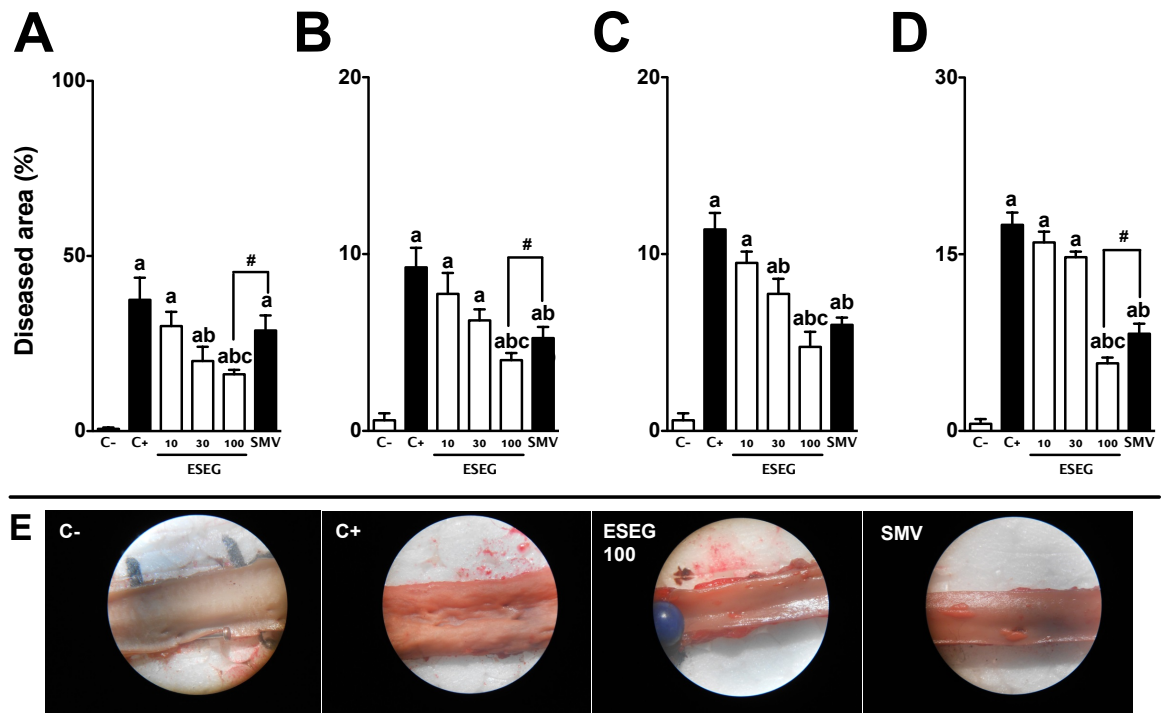


Figure 3

Gasparotto et al.

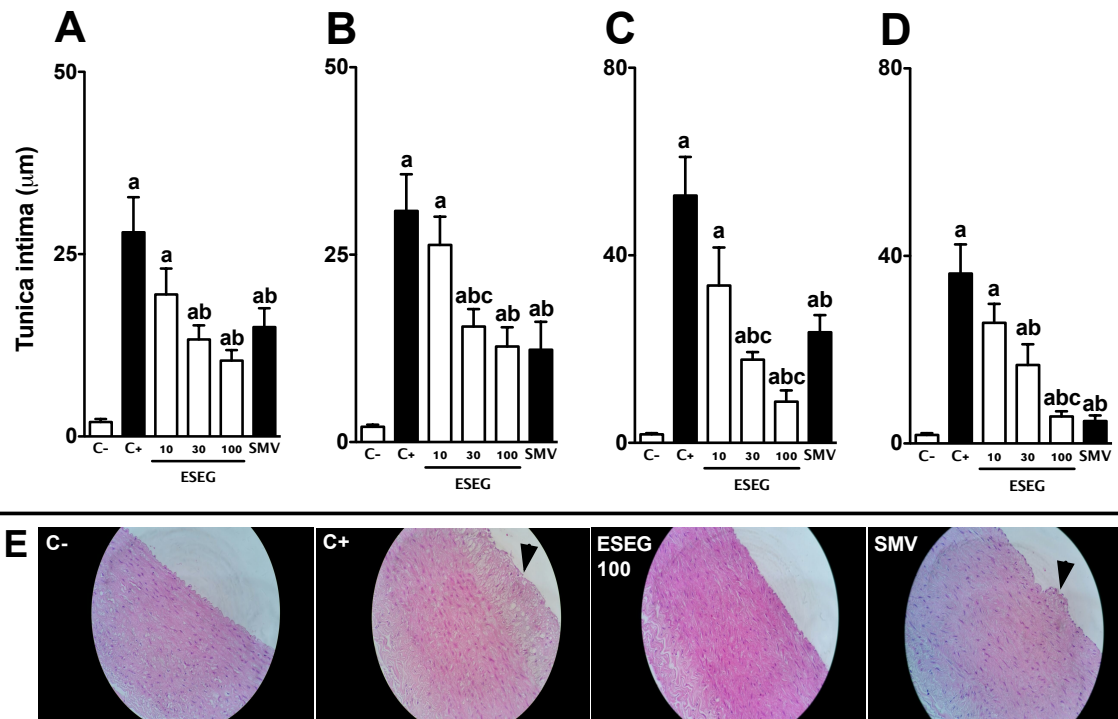


Figure 4

Gasparotto et al.

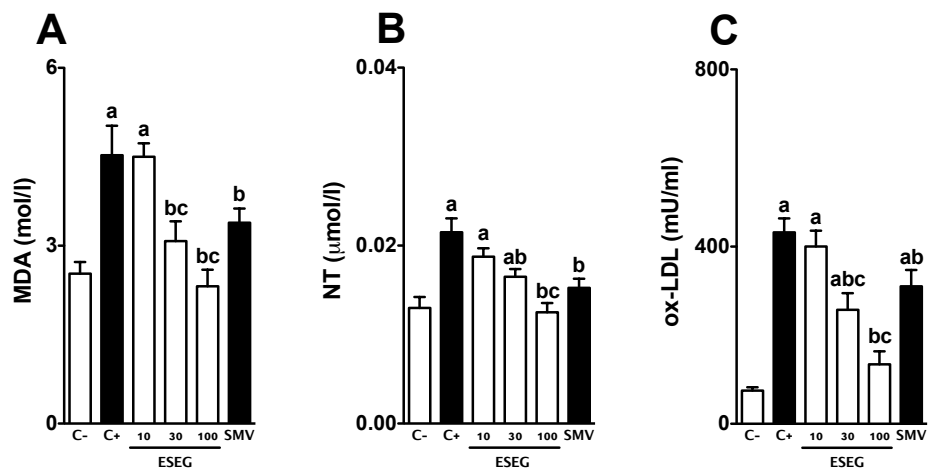


Figure 5

Gasparotto et al.

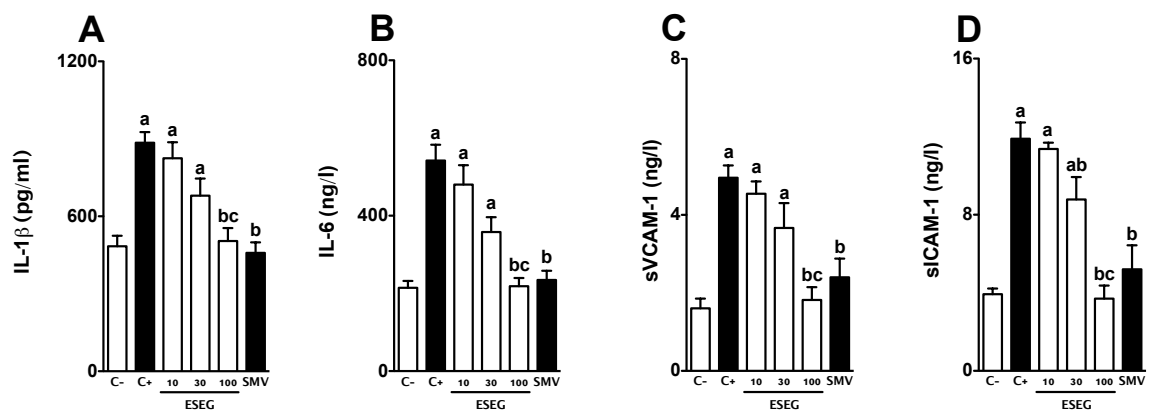


Figure 6

Gasparotto et al.

Table 1.

Effects of oral administration of ESEG obtained from *E. grandiflorus* on antioxidant tissue defense system.

Parameter	C-	C+	ESEG (10 mg/kg)	ESEG (30 mg/kg)	ESEG (100 mg/kg)	SMV (2.5 mg/kg)
SOD	83.83 ± 6.21	26.34 ± 4.22 ^a	42.70 ± 12.1	65.18 ± 9.10	73.53 ± 2.99 ^b	35.11 ± 9.11 ^a
GSH	373.2 ± 13	126.5 ± 9 ^a	217.9 ± 61	349.5 ± 29	402.1 ± 44 ^{bc}	232.20 ± 71
LPO	6.24 ± 1.85	16.74 ± 2.01 ^a	8.34 ± 0.92	7.60 ± 1.82	6.01 ± 1.82 ^b	11.32 ± 1.99

Values are expressed as mean ± SD of 6 rabbits in each group in comparison with C- (^ap < 0.05), C+ (^bp < 0.05) or ESEG previous dose (^cp < 0.05) using one-way Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. SOD: Superoxide dismutase (Unit of SOD/mg of protein); GSH: reduced glutathione (µg GSH/g of tissue); LPO: lipid peroxidation (nmol hydroperoxides/mg of protein). C-: negative control group; C+: positive control group; SMV: simvastatin.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse estudo nos permitiram chegar as seguintes conclusões:

1. O ESEG apresenta grandes concentrações de flavonóides C- e O-glicosídeos, compatíveis com a espécie segundo dados de literatura disponíveis;
2. A administração da CRD a 1% por 60 dias em coelhos machos da linhagem Nova Zelândia foi capaz de acarretar intensa dislipidemia e oxidação lipídica e protéica, o que conduziu a alterações cardíacas e vasculares compatíveis com a doença aterosclerótica;
3. O tratamento por trinta dias com o ESEG foi capaz de reduzir expressivamente os níveis dos lipídeos séricos e a oxidação lipídica e protéica, além de modular o sistema de defesa antioxidante cardíaco e vascular;
4. O ESEG foi capaz de reverter as alterações elétricas cardíacas e prevenir a hipertrofia do ventrículo esquerdo;
5. As lesões ateroscleróticas presentes nos diferentes ramos arteriais foram significativamente reduzidas após o tratamento prolongado com o ESEG, com valores semelhantes aos obtidos após a administração da sinvastatina;
6. Os efeitos aqui observados estão relacionados diretamente com uma redução significativa dos níveis de interleucinas-1 e -6, além da redução dos níveis de ICAMs-1 e VCAMs-1;
7. Os dados em conjunto conferem ao ESEG um possível efeito hipolipemiante, antioxidante, cardioprotetor e antiaterosclerótico nesse modelo experimental.

7 ANEXOS

7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA - UFGD



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 3 de março de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Investigação dos efeitos hipolipemiantes e antiaterogênicos de *Echinodorus grandiflorus* (cham. & schlttdl.) Micheli em modelo experimental de aterosclerose”**, protocolo nº 08/2015, sob responsabilidade de Arquimedes Gasparotto Junior– que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 11 de dezembro de 2015.

<i>Vigência do Projeto</i>	01/04/2016 – 01/04/2017
<i>Espécie/linhagem</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> /Var. Nova Zelândia
<i>Nº de animais</i>	36
<i>Peso/idade</i>	1,5 Kg/ 3 meses
<i>Sexo</i>	Machos
<i>Origem</i>	Universidade Federal do Paraná/UFPR

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

7.2 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – UNIPAR



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC

DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)

CERTIFICADO

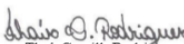
Certificamos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS HIPOLIPEMIANTES E ANTIATEROGÊNICOS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS (CHAM. & SCHLTDL.) MICHELI EM MODELO EXPERIMENTAL DE ATÉROSCLEROSE", protocolo 29767/2016, sob a responsabilidade de EMERSON LUIZ BOTELHO LOURENCO, - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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), tendo sido aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Paranaense - UNIPAR em reunião realizada em 17/09/2015.

We hereby certify that the project "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS HIPOLIPEMIANTES E ANTIATEROGÊNICOS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS (CHAM. & SCHLTDL.) MICHELI EM MODELO EXPERIMENTAL DE ATÉROSCLEROSE", protocol n.29767/2016, under the responsibility of EMERSON LUIZ BOTELHO LOURENCO – involving production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (with the exception of Man), for scientific or teaching purposes – complies with Law n. 11,794, published on October 8, 2008, by Decree n. 6,899 of July 15, 2009, and with norms published by the Brazilian Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA), and approved by the COMMITTEE FOR ETHICS IN THE USE OF ANIMALS (CEUA) of UNIPAR - Universidade Paranaense at the meeting held on 09/17/2015.

UMUARAMA - PR, 20/02/2019.


Prof. Dr. Luciano Seraphim Gasques
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº.29767


Thais Camilla Rodrigues
Secretária CEPEEA/UNIPAR