

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

**Propriedades antiateroscleróticas da fração butanólica de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em coelhos hipercolesterolêmicos**

**PATRÍCIA GONÇALVES SANTIAGO**

**Dourados – MS  
2018**

PATRÍCIA GONÇALVES SANTIAGO

Propriedades antiateroscleróticas da fração butanólica de *Ilex paraguariensis* A.  
St.-Hil. em coelhos hipercolesterolêmicos

Área do CNPq: Etnofarmacologia

Exame de Defesa apresentado 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 Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior

Dourados – MS  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S235p Santiago, Patricia Goncalves

Propriedades antiateroscleróticas da fração butanólica de *Ilex paraguariensis*  
A. St.-Hil. em coelhos hipercolesterolêmicos / Patricia Goncalves Santiago --  
Dourados: UFGD, 2018.  
53f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Arquimedes Gasparotto Junior

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da  
Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Anti-inflamatório. 2. Antioxidante. 3. Interleucinas. 4. Moléculas de  
adesão. I. 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.**



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

ATA DA DEFESA DE **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** APRESENTADA POR **PATRÍCIA GONÇALVES SANTIAGO**, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "**FARMACOLOGIA**", REALIZADA NO DIA 09 DE JULHO DO ANO DE DOIS MIL E DEZOITO.

Ao nono dia do mês de julho do ano de dois mil e dezoito (09/07/2018), às 09h, em sessão pública, realizou-se, na sala 108-Bloco C, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Propriedades antiateroscleróticas da fração butanólica de *Ilex paraguariensis* em coelhos hipercolesterolêmicos**" apresentada pela mestranda PATRÍCIA GONÇALVES SANTIAGO, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Arquimedes Gasparotto Junior** (Presidente/orientador), **Dra. Cleide Adriane Signor Tirloni** (membro titular/UFGD), **Dra. Francislaine Aparecida dos Reis Lívero** (membro titular/externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente Ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 09 de julho de 2018.

Dr. Arquimedes Gasparotto Junior \_\_\_\_\_

Dra. Cleide Adriane Signor Tirloni \_\_\_\_\_

Dra. Francislaine Aparecida dos Reis Lívero \_\_\_\_\_

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Dedico este trabalho à minha família, pois por eles, procuro sempre fazer o melhor. Aos meus pais Luiz e Ramona que foram grandes incentivadores de minhas conquistas e aos meus irmãos Nathália e Wellington por todo o companheirismo recebido.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado a graça da vida! Por ser meu conselheiro e verdadeiro amigo em todas as horas, mesmo nos momentos mais difíceis ele se faz presente. Pela fé que me foi concedida e que se tornou a base de toda a minha esperança. Seu amor e compaixão me levaram mais além do que eu poderia imaginar. Ao meu Deus e Senhor, sou grata por toda a minha vida.

Ao Professor Dr. Arquimedes por ter me aceito como sua orientada mesmo quando ainda não tinha nenhuma experiência na área de pesquisa científica, por ter acreditado que eu poderia realizar este trabalho e ter me dado a chance de realizar o sonho de ser pesquisadora. Mostrou-me que apenas através de dedicação e responsabilidade é possível realizar trabalhos com qualidade, neste período o meu maior presente, com certeza, foi ter tido a chance de aprender com sua postura e conhecimento e desta experiência eu saio com uma nova visão, uma nova maneira de pensar e de agir e, posso dizer que seus ensinamentos levarei comigo em todas as fases da minha jornada acadêmica e da minha vida. Obrigado!

Aos meus queridos familiares, meus pais Luiz e Ramona por todo o amor recebido, pelos ensinamentos e pelo grande incentivo dado à mim durante toda a vida acreditando sempre na minha capacidade. Aos meus irmãos Wellington e Nathália que sempre estiverem me apoiando e assim como eu, sabem as dificuldades que encontramos no meio acadêmico, mesmo assim sempre foram pacientes e companheiros.

Aos meus amigos e companheiros do LabCardio que são pessoas nas quais sempre demonstraram apoio aos experimentos e às atividades do grupo, para todas as horas que precisei de ajuda, de conhecimento ou apenas de suas companhias, eles estavam lá. Quero agradecer a todo o incentivo prestado e espero poder retribuir tudo isso algum dia!

À minha amiga querida Karimi, que foi alguém muito especial na graduação, por ser a professora que mais exigia o melhor de seus alunos e, mais ainda na Pós-graduação, não tenho como agradecer sua paciência naqueles dias que desenvolvemos a parte experimental juntas, você foi peça fundamental, nas horas difíceis você estava lá me presenteando com sua experiência. Te agradeço de coração tudo que fez por mim, Obrigado!

Agradeço ao meu amor Leonardo, por todo seu amor, carinho, admiração e pela sua incansável presença, sempre compartilhando meus ideais e incentivando-me a prosseguir, obrigado pela sua paciência e por frequentemente, ter que sacrificar seus finais de semana e feriados para me apoiar nos meus objetivos.

À Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD por me oportunizar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

Ao Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN que amigavelmente, disponibilizou espaço para o desenvolvimento de parte da pesquisa.

Aos meus amigos que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram.

A todos que de alguma forma contribuíram para a finalização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos e obrigada por permitirem que esta dissertação seja uma realidade!

“Escolha uma profissão que ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida”.

(Confúcio)



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Composição das placas ateromatosas	22
Figura 2 – Distribuição geográfica da <i>Ilex paraguariensis</i> ao redor do mundo	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3-CQA	Ácido 3-O-cafeoilquínico (3-CQA, do inglês, <i>3-O-caffeoylquinic acid</i> )
4-CQA	Ácido 4-O-cafeoilquínico (4-CQA, do inglês, <i>4-O-caffeoylquinic acid</i> )
5-CQA	Ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA, do inglês, <i>5-caffeoylquinic acid</i> )
6-Ceto-PGF1 $\alpha$	6-ceto-prostaglandina F1 $\alpha$
3,4-diCQA	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico (3,4-diCQA, do inglês, <i>3,4-di-O-caffeoylquinic acid</i> )
3,5-diCQA	Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (3,5-diCQA, do inglês, <i>3,5-di-O-caffeoylquinic acid</i> )
4,5-diCQA	Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico (4,5-diCQA, do inglês, <i>4,5-di-O-caffeoylquinic acid</i> )
Apo-E	Apolipoproteína E
AVE	Acidente vascular encefálico
BRAs	Bloqueadores dos receptores de angiotensina
CGAs	Ácidos clorogênicos (CGAs, do inglês, <i>chlorogenic acids</i> )
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina (cGMP, do inglês, <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
CQAs	Ácidos cafeoilquínicos (CQAs, do inglês, <i>caffeoylquinic acids</i> )
DAC	Doença arterial coronariana
DCVs	Doenças cardiovasculares
di-CQAs	Di-cafeoilquínicos (di-CQAs, do inglês, <i>dicaffeoylquinic acids</i> )
ECA	Enzima conversora de angiotensina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, do inglês, <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCl	Ácido clorídrico
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade (HDL-C, do inglês, <i>high-density lipoprotein cholesterol</i> )
HO <sub>2</sub> •	Radical peroxil

ICAM	Molécula de adesão intercelular (ICAM, do inglês, <i>intercellular adhesion molecules</i> )
IL-1 $\beta$	Interleucina 1- $\beta$
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
LDL-C	Lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C, do inglês, <i>low-density lipoprotein cholesterol</i> )
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox, do inglês, <i>oxidized lipid-low density lipoprotein</i> )
mono-CQAs	Mono-cafeoilquínicos (mono-CQAs, do inglês, <i>mono-caffeoilquinic acids</i> )
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH, do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
n-BFIP	Fração n-butanólica de <i>Ilex paraguariensis</i> (n-BFIP, do inglês, <i>butanolic fraction from Ilex paraguariensis</i> )
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET, do inglês, <i>neutrophil extracellular trap</i> )
NO	Óxido nítrico (NO, do inglês <i>nitric oxide</i> )
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
O <sub>3</sub>	Ozônio
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> , do inglês, <i>prostaglandin I<sub>2</sub></i> )
PPARs	Agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR, do inglês, <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> )
RAC1	Substrato de toxina botulínica C3 relacionado a Ras (RAC1, do inglês, <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> )
SOD	Superóxido dismutase
sICAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1 solúvel (sICAM-1, do inglês, <i>soluble intercellular adhesion molecule-1</i> )
sVCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1 solúvel (sVCAM-1, do inglês, <i>soluble vascular cell adhesion molecule-1</i> )

TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, <i>Thiobarbituric acid reactive substance</i> )
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular (VCAM-1, do inglês, <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> )
VLDL-C	Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, do inglês, <i>very-low density lipoprotein cholesterol</i> )
VSMCs	Células musculares lisas vasculares (VSMCs, do inglês, <i>vascular smooth muscle cell</i> )

## **Propriedades antiateroscleróticas da fração butanólica de *Ilex paraguariensis* em coelhos hipercolesterolêmicos**

### **RESUMO**

A aterosclerose é uma doença caracterizada por um processo inflamatório crônico decorrente primeiramente de uma disfunção endotelial e conseqüente formação de placas ateromatosas que causam um estreitamento de artérias e podem levar às suas oclusões, provocando infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, embolia pulmonar e até a morte do indivíduo. Atualmente o tratamento medicamentoso das dislipidemias incluem principalmente hipolipemiantes como as estatinas. Entretanto, existe um alto interesse na obtenção de novos fármacos e modelos de tratamento devido aos efeitos adversos que estes medicamentos apresentam. Conseqüentemente tem crescido o interesse da população por plantas e extratos vegetais com potencial efeito cardioprotetor. Os fitoterápicos são uma boa alternativa aos medicamentos sintéticos devido ao menor custo de tratamento, menor relato de efeitos adversos e também, por muitos fitoterápicos apresentarem eficácia similar aos sintéticos. Tendo em vista que o extrato de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) é rico em compostos fenólicos e apresenta comprovada ação hipolipemiante e outros efeitos cardioprotetores por atuar inibindo a peroxidação lipídica em ratos Wistar, objetivamos com este estudo, analisar os efeitos e a regressão da aterosclerose em coelhos Nova Zelândia submetidos a uma dieta aterogênica (ração comercial acrescida de colesterol 1%) durante 8 semanas experimentais. Esse método permitiu a formação de lesões ateroscleróticas nas aortas torácica e abdominal. A partir da quarta semana da dieta aterogênica foram administrados diariamente, por gavagem, a fração butanólica de *Ilex paraguariensis* (n-BFIP) nas doses 10, 30 e 100 mg/kg. Os animais dos grupos controle receberam a sinvastatina (5 mg/kg) ou o veículo (água filtrada) pela via oral. As dosagens do perfil lipídico dos animais foram realizadas nos dias 0, 30 e 60 após o início do experimento. Ao término do período experimental, os coelhos foram submetidos à eutanásia e posteriormente, suas artérias torácicas e abdominais foram retiradas para avaliação do perfil aterogênico. As análises macroscópicas e microscópicas revelaram que o extrato inibiu a aterogênese nas artérias de coelhos com resultados dose-dependentes. O grupo de 100 mg/kg apresentou uma melhor inibição da formação de placas ateromatosas e seus resultados foram comparáveis aos do grupo tratado com sinvastatina. Apesar de seus efeitos visíveis na ateroproteção, a n-BFIP não alterou significativamente os níveis de lipídeos séricos durante o

tratamento, entretanto, estima-se que seus efeitos antiateroscleróticos sejam devidos aos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios visto que, a fração demonstrou capacidade de diminuir o estresse oxidativo plasmático e tecidual, além de reduzir os níveis de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular (ICAM-1) que modulam a resposta inflamatória nos vasos. Os resultados desta pesquisa podem influenciar a comunidade científica no interesse pela *I. paraguariensis* e sua respectiva fração butanólica na obtenção de novos fitoterápicos e no estudo de seus componentes ativos para fins profiláticos ou no tratamento das dislipidemias e aterosclerose.

**Palavras-chave:** Anti-inflamatório, antioxidante, interleucinas, moléculas de adesão.

## **Antiatherosclerotic properties of the butanolic fraction of *Ilex paraguariensis* in hypercholesterolemic rabbits**

### ***ABSTRACT***

Atherosclerosis is a disease characterized by a chronic inflammatory process resulting primarily from an endothelial dysfunction and consequent formation of atheromatous plaques that cause a narrowing of arteries and may lead to its occlusions, causing myocardial infarction, stroke, pulmonary embolism and even death of the individual. Currently the drug treatment of dyslipidemias mainly include lipid-lowering drugs such as statins. However, there is a high interest in obtaining new drugs and treatment models because of the adverse effects these drugs present. Consequently, the population's interest in plants and plant extracts with potential cardioprotective effect has increased. Phytotherapies are a good alternative to synthetic drugs due to the lower cost of treatment, less reporting of adverse effects and also, for many herbal products, show similar efficacy to synthetic ones. Considering that the extract of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) is rich in phenolic compounds and has a proven lipolipidemic action and other cardioprotective effects by acting to inhibit lipid peroxidation in Wistar rats, we aimed to analyze the effects and regression of atherosclerosis in New Zealand rabbits submitted to an atherogenic diet ( commercial cholesterol plus 1% cholesterol) for 8 experimental weeks. This method allowed the formation of atherosclerotic lesions in the thoracic and abdominal aortas. From the fourth week of the atherogenic diet, the butanolic fraction of *Ilex paraguariensis* (n-BFIP) was administered daily at 10, 30 and 100 mg / kg doses per gavage. Control animals received simvastatin (5 mg / kg) or vehicle (filtered water) by the oral route. Dosages of the lipid profile of the animals were performed on days 0, 30 and 60 after the start of the experiment. At the end of the experimental period, the rabbits were submitted to euthanasia and later, their thoracic and abdominal arteries were removed for evaluation of the atherogenic profile. Macroscopic and microscopic analysis revealed that the extract inhibited atherogenesis in rabbit arteries with dose-dependent results. The 100 mg / kg group had a better inhibition of atheromatous plaque formation and their results were comparable to those in the simvastatin group. Despite its visible effects on atheroprotection, n-BFIP did not significantly alter serum lipid levels during treatment, however, its antiatherosclerotic effects are estimated to be due to antioxidant and anti-inflammatory effects since the fraction demonstrated the ability to interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule ( ICAM-1) that modulate the inflammatory

response in vessels. The results of this research may influence the scientific community in the interest of *I. paraguariensis* and its respective butanolic fraction in obtaining new herbal products and in the study of its active components for prophylactic purposes or in the treatment of dyslipidemias and atherosclerosis.

**Keywords:** Anti-inflammatory, antioxidant, interleukins, adhesion molecules.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Aterogênese.....	20
2.2 Estresse oxidativo e inflamação.....	24
2.3 Modelos animais para o estudo da aterosclerose.....	25
2.4 Fármacos sintéticos utilizados na prática clínica para a prevenção e tratamento da aterosclerose.....	26
2.5 <i>Ilex paraguariensis</i> .....	28
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivos Gerais.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
5 APÊNDICE.....	40
5.1 Artigo 1: Mechanisms underlying antiatherosclerotic properties of an enriched fraction obtained from <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.....	41
6. CONCLUSÕES.....	50
7 ANEXO.....	51
7.1 Aprovação do Comitê de Ética na Uso de Animais (CEUA).....	52

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar de os medicamentos sintéticos serem amplamente utilizados na sociedade ocidental moderna, o uso de plantas medicinais para fins curativos e profiláticos ocorre ao longo da história da humanidade e atualmente a busca crescente por um estilo de vida mais saudável tem gerado uma maior valorização do uso de fontes naturais para terapia medicamentosa por parte da população, acrescentando novas opções de prevenção e tratamento de doenças (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Fatores como o crescente aumento de comprovação científica dos efeitos farmacológicos dos fitoterápicos, o baixo custo da utilização de produtos naturais, o desenvolvimento do controle de qualidade de plantas medicinais utilizadas para a sua produção e a maior quantidade de efeitos adversos apresentados por medicamentos sintéticos, são apontados como sendo as principais causas do aumento do interesse por medicamentos de origem natural (NICOLETTI et al., 2007).

Tendo em vista que os fitoterápicos têm sido amplamente estudados e seus efeitos farmacológicos comprovados, estes medicamentos também surgem como uma nova opção de tratamento para as doenças cardiovasculares (DVCs) dentre as quais, a doença arterial coronariana (DAC) e o acidente vascular encefálico (AVE) (PIZZIOLO et al., 2011). Apesar de o índice de mortalidade por DCVs ter sofrido um declínio nas últimas décadas em países desenvolvidos, estas doenças ainda são a principal causa de morte prematura em todo o mundo. As DCVs representam a principal causa de óbito em países ocidentais, e a estimativa é que este aumento persista (ELLULU et al., 2016).

A aterosclerose é um dos principais fatores de risco das DCVs, nos países ocidentais cerca de 50% das mortes por DAC e AVE ocorrem devido à aterosclerose. Entretanto alguns países apresentam baixas taxas de prevalência indicando que elementos da dieta, estilo de vida e fatores genéticos possuem forte relação com a doença (CARDOSO et al., 2011; GOTTLIEB et al., 2005).

Acredita-se que o processo aterosclerótico se inicia precocemente na infância e adolescência, porém se manifesta clinicamente somente em indivíduos adultos. As placas ateroscleróticas ocorrem na túnica íntima das artérias. A túnica íntima compreende a camada mais interna de uma artéria, formada por tecido conjuntivo frouxo e é coberta por uma monocamada de endotélio, onde se formam as placas ateroscleróticas. Estas placas são tipicamente cobertas por uma capa fibrosa composta de matriz extracelular densa, rica em colágeno, com células musculares lisas ocasionais, macrófagos e células T (HANSSON; LIBBY, 2006).

A aterosclerose é uma doença multifatorial de artérias de grande e médio calibre, e a taxa de progressão e a gravidade das lesões dependem de fatores ambientais e hereditários. A disfunção do endotélio desempenha papel fundamental na iniciação e progressão da aterosclerose. O endotélio vascular consiste em uma camada fina de células semipermeáveis que cobrem a superfície interna dos vasos e forma um limite entre a parede do vaso e o fluxo sanguíneo. Sua integridade estrutural e funcional é vital para a proteção da parede do vaso e da função circulatória. Células endoteliais exercem funções autócrinas, parácrinas e endócrinas significativas, além de influenciarem diretamente nas células musculares lisas, nas plaquetas e nos leucócitos circulantes. O declínio da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), que é uma molécula chave que controla a função endotelial e a homeostase vascular, ou o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) são as principais causas da disfunção endotelial. O aumento de EROs gera estresse oxidativo que desempenha papel crucial na patogênese e desenvolvimento da aterosclerose (TOUSOULIS et al., 2015).

A hipercolesterolemia também é um fator contribuinte para a instalação desta doença especialmente quando associado ao estresse oxidativo, quando ocorre a hipercolesterolemia o influxo da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) é aumentado na túnica íntima das artérias, que são progressivamente oxidados por radicais livres gerados por células vasculares ativadas (TOUSOULIS et al., 2015). Em contraste, níveis insuficientes das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) impedem o transporte de colesterol da parede arterial para o descarte no fígado, portanto, altos níveis de LDL-C ou baixos níveis de HDL-C podem, assim, estabelecer o cenário para a aterosclerose (ZÁRATE et al., 2016).

A formação de placas ateroscleróticas é caracterizada pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) no interior do espaço subendotelial, gerando um processo inflamatório com consequente infiltração de células inflamatórias, proliferação excessiva de células musculares lisas vasculares (VSMCs), acúmulo de componentes do tecido conjuntivo e a captação desregulada de LDLox por macrófagos. Este processo, leva a formação de células espumosas e resulta no aumento da disfunção endotelial caracterizada por acentuado comprometimento dos níveis de NO, aumento da adesão de células inflamatórias à parede do vaso e, finalmente, o desenvolvimento de placa ateromatosa fibrosa. A longo prazo, a apoptose de células espumosas e a contínua acumulação de lipídios oxidados conduzem à formação do ateroma (ELLULU et al., 2016; SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2015; SUKHOVERSHIN; YEPURI; GHEBREMARIAM, 2015).

A ingestão de fontes ricas em polifenóis tem demonstrado favorecer a saúde cardiovascular através de um perfil lipídico melhorado, efeitos antiateroscleróticos, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e por ações diretas em células endoteliais. Embora as propriedades medicinais das plantas também possam ser atribuídas ao sinergismo de seus componentes bioativos, muitos estudos associam o uso de fontes ricas em polifenóis a um risco reduzido de DCVs e efeitos benéficos sobre a função endotelial. Os polifenóis consistem em um grande número de moléculas divididas pela sua estrutura química nas subcategorias de ácido fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas. Evidências enfatizam a importância de uma variedade de estratégias para a melhora da função endotelial e do estado cardiovascular. Nesse sentido, a maior ingestão de compostos fitoterápicos atrai a atenção por seus benefícios à saúde e também por possuir uma toxicidade relativamente baixa. (GAO et al., 2013a; TOUSOULIS et al., 2015).

Balzan et al. (2013) investigaram a eficácia da ingestão de uma fração butanólica de *I. paraguariensis* (n-BFIP) sobre o peso corporal e os níveis séricos de lipídeos de ratos hiperlipêmicos. Esta fração enriquecida e padronizada apresentou cerca de três vezes mais compostos fenólicos quando comparado à infusão aquosa. Os resultados demonstram que a n-BFIP promove uma redução sérica eficaz de triglicérides e colesterol, além de diminuir o índice aterogênico nos animais tratados. Tendo em vista que os efeitos benéficos da utilização desta fração de foi comprovada em ratos Wistar, este trabalho objetivou avaliar os efeitos hipolipemiantes e anti-aterogênicos da administração prolongada da fração n-FBIP em coelhos da espécie Nova Zelândia com aterosclerose induzida por dieta hipercolesterolêmica, visto que a aterogênese em coelhos se assemelha melhor com a condição humana, quando comparado com o modelo experimental de ratos (YANNI et al., 2015).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Aterogênese**

A aterosclerose é uma das maiores causas de morbimortalidade em todo o mundo. Os maiores fatores de riscos envolvidos no seu desenvolvimento são as dislipidemias, a produção de espécies reativas de oxigênio e a oxidação lipídica (ELLULU et al., 2016; HUSEINI et al., 2015). A disfunção endotelial é considerada o passo inicial para a progressão da aterosclerose

e o desequilíbrio entre a produção de EROs e NO é apontado como sua principal causa. A modulação da função endotelial ocorre por um balanço entre agentes vasoativos derivados do endotélio e, quando existe um aumento excessivo na produção de EROs, ocorre também o estresse oxidativo, que gera uma diminuição da ativação de agentes vasodilatadores, especialmente o NO, seja por declínio da sua produção ou pelo aumento da sua inibição pelas EROs diminuindo a biodisponibilidade de NO (ELLULU et al., 2016; TOUSOULIS et al., 2015). Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da túnica íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial (FALUDI et al., 2017).

As placas ateroscleróticas são mais facilmente formadas em áreas de fluxo sanguíneo turbulento e inicia-se com a agressão ao endotélio vascular por diversos fatores de risco, como dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e tabagismo. Retidas, as partículas de LDL-C sofrem oxidação que conduzem a uma cascata inflamatória ativando a aterogênese (FALUDI et al., 2017). As LDLox estimulam a produção de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas. Além disso os produtos da peroxidação lipídica aumentam a permeabilidade das células endoteliais, aumentando assim o influxo de LDL-C no espaço subendotelial (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2015). De fato, a inflamação e o estresse oxidativo contribuem diretamente para a patogênese da aterosclerose. As células inflamatórias geram EROs que podem induzir uma oxidação progressiva das LDL-C (EL-SHEAKH et al., 2015).

O depósito de lipoproteínas na parede arterial, é um processo chave para o início da aterogênese e ocorre de maneira proporcional à concentração destas lipoproteínas no plasma. A disfunção endotelial induz ao aumento na expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, como a molécula de adesão intercelular (ICAM) e a molécula de adesão celular vascular (VCAM). Este processo é estimulado pela presença de LDLox. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a túnica íntima da parede arterial. Os monócitos se diferenciam em macrófagos, que, por sua vez, captam o colesterol das LDLox. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Os linfócitos T, embora menos numerosos que os macrófagos no interior do ateroma, são de grande importância na aterogênese. Mediante interação com os macrófagos, as células T podem se

diferenciar e produzir citocinas que modulam o processo inflamatório local (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2015).

As estrias gordurosas são lesões iniciais que se formam ainda na infância. Com o tempo, alguns mediadores da inflamação estimulam a ativação dos processos de cura com consequente migração e proliferação das células musculares lisas e miofibroblastos da camada média arterial para a subendotelial. Ao migrarem para a íntima, passam a produzir matriz extracelular rica em colágeno que formará parte da capa fibrosa que circunda a placa aterosclerótica. No entanto, na presença de subtipos de linfócitos de fenótipo mais inflamatório a formação do tecido matricial se reduz, principalmente por inibição de síntese de colágeno pelas células musculares lisas que migraram para a íntima vascular. Além disso, ocorre maior liberação de metaloproteinases por macrófagos, que são capazes de degradar o colágeno da matriz extracelular e outros componentes teciduais locais, tornando a placa lipídica vulnerável a complicações. Estas células que migraram para a camada subendotelial também podem acabar acumulando ésteres de colesterol e formar células espumosas (FALUDI et al., 2017). A consequência final da evolução da aterosclerose é a formação de placas com capas fibrosas finas, que são o resultado do aumento da degradação do colágeno pelas metaloproteinases da matriz e a diminuição da síntese de colágeno por células musculares lisas disfuncionais ou apoptóticas. A Figura 1 demonstra a composição de placas ateromatosas (TOUSOULIS et al., 2015)

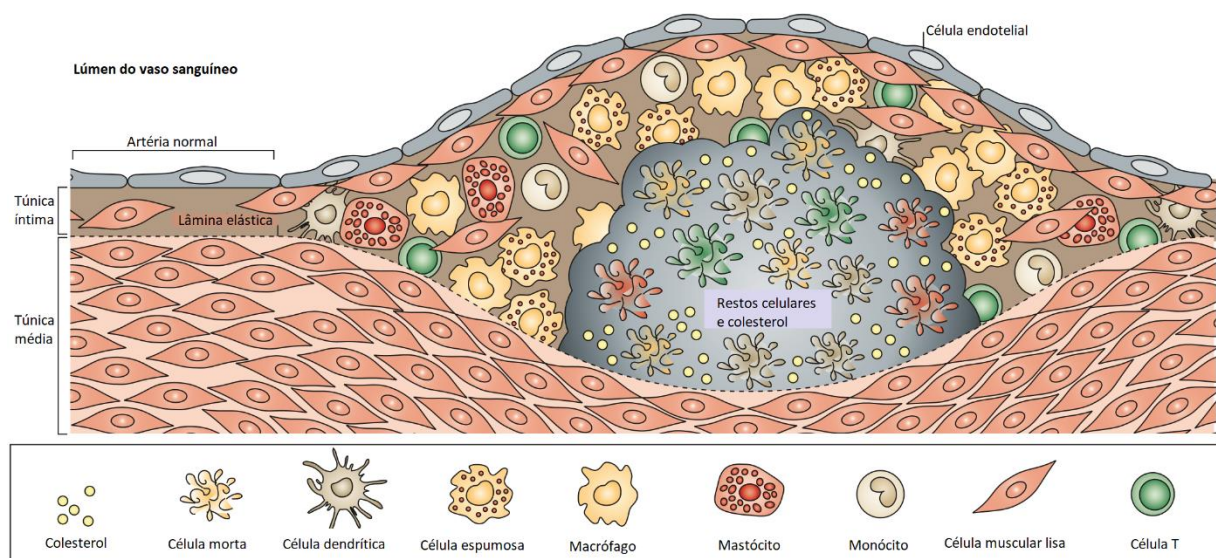


Figura 1 – Composição de placas ateromatosas (Fonte: Adaptado de Hansson, G. K.; Libby, P 2006).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico necrótico, formado principalmente por fragmentos de células mortas. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico e necrótico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico necrótico proeminente e capa fibrosa tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico desequilibrando os níveis de tromboxano A<sub>2</sub> e prostaciclina, promovendo a agregação plaquetária com consequente formação de trombo. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose como infarto agudo do miocárdio e o AVE (FALUDI et al., 2017; GAO et al., 2013b).

Alguns mecanismos têm sido propostos para a formação de ateromas e suas complicações, como a oxidação de lipoproteínas e a alteração fenotípica do endotélio vascular. Recentemente, o comprometimento da resposta imune de linfócitos, diminuindo a produção de anticorpos anti-LDLox, foi associado à aterosclerose e complicações. A maior gravidade da aterosclerose está relacionada com fatores de risco clássicos, como a dislipidemia, diabetes, tabagismo, HAS, entre outros. Entretanto, a nível celular, cristais de colesterol que reagem diretamente com armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), exercem múltiplos efeitos citotóxicos podendo levar à trombose aguda (RIDKER, 2016; SUKHOVERSHIN; YEPURI; GHEBREMARIAM, 2015).

Se os fatores de risco persistirem, as lesões progridem lentamente através de um processo inflamatório local resultante da ativação de leucócitos e lesão endotelial persistente, e através de um complexo processo de destruição, reparação e inflamação crônica. Os processos destrutivos como morte celular e proteólise levam ao acúmulo de lipídeos e detritos celulares que consistem o núcleo necrótico rico em lipídeos. Além disso, as placas ateroscleróticas são complicadas pela angiogênese intraplaca, calcificação e hemorragia, levando a placas mais complexas propensas à complicações aterotrombóticas. Placas estáveis podem permanecer clinicamente silenciosas, enquanto placas instáveis são clinicamente sintomáticas e levam a eventos cardiovasculares isquêmicos. Finalmente, a ocorrência de eventos cardiovasculares graves resulta da estrutura das placas, uma vez que, em pacientes com DAC, mais da metade da superfície da íntima coronária é coberta por lesões ateroscleróticas avançadas, incluindo placas vulneráveis (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2015).

## 2.2 Estresse oxidativo e Inflamação

Certas condições fisiopatológicas, como acúmulo de EROs, estresse oxidativo, a inflamação local, o aumento das moléculas de adesão, a resistência à insulina e o aumento do estresse de cisalhamento, participam da indução da disfunção endotelial, principalmente pela diminuição da vasodilatação dependente do endotélio (TOUSOULIS et al., 2015). Ellulu et al. (2016) apontam evidências que comprovam a relação de fatores de risco cardiovascular com o aumento do estresse oxidativo e da inflamação.

As EROs é um termo utilizado para radicais livres de oxigênio, tais como radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peroxil ( $HO_2^{\bullet}$ ) e também certos agentes não radicais que são facilmente convertidos em radicais livres, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ácido clorídrico (HCl) e o ozônio ( $O_3$ ). As EROs são moléculas instáveis e extremamente reativas que geram estresse oxidativo e podem induzir a expressão de citocinas inflamatórias (ELLULU et al., 2016). Para Jones (2006), estresse oxidativo pode ser definido como a ruptura da sinalização redox levando a um desequilíbrio entre os níveis de radicais livres e de substâncias antioxidantes. Além disso, a inflamação é um fator determinante para a progressão da aterosclerose. Níveis elevados de citocinas inflamatórias iniciam e sustentam o processo inflamatório crônico sendo responsáveis por condições inflamatórias crônicas (ZHAO; WANG; YANG, 2017).

As células endoteliais produzem substâncias bioativas como a endotelina e o óxido nítrico e além da vasoconstrição, a endotelina também promove a proliferação de células do músculo liso vascular e a aderência das células mononucleares às células endoteliais. O óxido nítrico controla a tensão muscular lisa vascular e o fluxo sanguíneo, além de reduzir a oxidação, inibir a agregação plaquetária e prevenir a trombose mural que é caracterizada pela oclusão parcial da luz da artéria pelo trombo. De fato, o equilíbrio dinâmico destas duas substâncias desempenha papéis importantes no desenvolvimento da aterosclerose (GAO et al., 2012b).

Os estados inflamatórios regulam positivamente a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que é inicialmente destinada a compensar a regulação negativa do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelo estresse oxidativo. No entanto, citocinas inflamatórias também ativam a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) de leucócitos polimorfonucleares produzindo o  $O_2^{\bullet-}$ . Quantidades excessivas de NO produzido pela iNOS reagem com o  $O_2^{\bullet-}$  formando o  $ONOO^-$ , e regulam positivamente a atividade da arginase que



reduz a formação de NO endotelial ao competir com a eNOS pela L-arginina. Além disso, em eventos ateroscleróticos o LDLox ativa a arginase II que regula negativamente o NO e causa disfunção endotelial. Portanto, o elo entre o estresse oxidativo e a resposta inflamatória leva à diminuição da biodisponibilidade de NO, gerando disfunção endotelial e efeito vasoconstritor (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

O NO desempenha um papel importante em reações anti-inflamatórias do endotélio por reduzir a expressão de moléculas de adesão endoteliais, tais como, VCAM-1 durante a hipercolesterolemia, atenuando a infiltração de monócitos na parede arterial. Além disso é capaz de atenuar os efeitos constritivos da noradrenalina, levando ao relaxamento vascular e à manutenção de equilíbrio contra fatores constritores derivados do endotélio, como a endotelina-1 (ET-1) e o tromboxano A2, modulando o tônus vascular. A diminuição da biodisponibilidade de NO participa de forma crucial na aterotrombose visto que o NO é apontado como um importante agente antiplaquetário. De fato, o NO possui ação antitrombótica, antiapoptótica, anti-inflamatória e antioxidante (ELLULU et al., 2016; TOUSOULIS et al., 2015).

A ET-1 possui propriedades pró-oxidantes e pró-inflamatórias e é de grande interesse no desenvolvimento da disfunção endotelial. Dentre seus efeitos, a ET-1 pode reduzir as propriedades vasodilatadoras endoteliais pela indução da redistribuição da eNOS da membrana plasmática para a mitocôndria da célula, através da fosforilação da eNOS, com consequente redução da produção de NO. A ET-1 também aumenta diretamente a permeabilidade glomerular à albumina e a inflamação renal, além de contribuir para o aumento das VCAM-1 e a infiltração de monócitos na placa ateromatosa. A expressão e a produção de ET-1 nas células endoteliais é aumentada pela angiotensina II, envelhecimento, LDLox e diabetes mellitus. Além disso, a superexpressão da ET-1 aumenta a atividade da NADPH oxidase com consequente aumento da formação de EROs, ativando a retroalimentação positiva da disfunção endotelial mediada pelo estresse oxidativo (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

Outras duas substâncias muito associadas ao desenvolvimento da aterosclerose são a prostaciclina e o tromboxano A2. O tromboxano A2 promove o desenvolvimento da aterosclerose através da constrição vascular e agregação plaquetária, enquanto a prostaciclina (PGI2) promove efeitos antiateroscleróticos através da inibição da agregação plaquetária, trombose e por seu efeito vasodilatador (GAO, et al., 2013c).

### **2.3 Modelos animais para o estudo da aterosclerose**

As principais características que animais experimentais utilizados como modelos de aterosclerose humana devem possuir são: a) ser fácil de adquirir e manter; b) ser fácil de manusear e ter um tamanho apropriado para permitir as manipulações experimentais; c) ser capaz de se reproduzir em laboratório e ter uma base genética bem definida; d) compartilhar com o ser humano os aspectos mais importantes do metabolismo lipídico e da fisiopatologia cardiovascular; e) apresentar lesões ateroscleróticas que se desenvolvam gradualmente enquanto o animal consome a dieta, e que as características das lesões devem imitar as de pacientes humanos com suas respectivas sequelas clínicas, tais como o infarto do miocárdio, AVE e isquemia. Por não existir um animal único que cumpra todos os requisitos, alguns modelos animais têm sido utilizados para o estudo da aterosclerose. Ultimamente, o uso de camundongos e ratos têm crescido como animais experimentais para o estudo da aterosclerose, principalmente pelo desenvolvimento de animais *knockout* para a apolipoproteína E (apo-E) e para os receptores de LDL-C. Entretanto, apesar do fácil manuseio de ratos e camundongos, o metabolismo de lipídios ainda é significativamente diferente dos humanos. Estes animais secretam ácidos biliares, que são derivados do colesterol, muito mais rápido que humanos e coelhos (FAN et al., 2014). Como uma alternativa quando comparados com ratos e camundongos, os hamsters são considerados um melhor modelo de roedor para o estudo do metabolismo de lipídios, pois o metabolismo do colesterol é semelhante ao de humanos (GAO et al., 2013a). Entretanto, o coelho ainda é o melhor modelo experimental para o estudo da aterosclerose, pois além de possuir o metabolismo das lipoproteínas semelhante ao de seres humanos, são muito sensíveis a uma dieta hipercolesterolêmica. Coelhos e humanos compartilham características lipídicas que incluem partículas de LDL-C em maior abundância no plasma, atividade do receptor hepático de LDL-C, presença de receptor de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-C) em macrófagos, proteína de transferência de colesterol esterificado, partícula heterogênea de HDL-C e sensibilidade ao colesterol dietético. Além disso, desenvolvem as lesões ateroscleróticas de maneira gradual e de forma muito semelhante aos humanos, fornecendo uma melhor visão sobre o estudo da aterosclerose (FAN et al., 2015).

#### **2.4 Fármacos sintéticos utilizados na prática clínica para a prevenção e tratamento da aterosclerose**

As estatinas são os fármacos mais amplamente utilizados para o tratamento da aterosclerose. Evidências recentes sugerem que os efeitos benéficos das estatinas podem incluir não apenas a redução do colesterol, mas também efeitos pleiotrópicos independentes da redução do colesterol. Por meio dos efeitos pleiotrópicos, as estatinas estão diretamente envolvidas na restauração ou melhora da função endotelial, atenuando o remodelamento vascular e inibindo a resposta inflamatória vascular e talvez, estabilizando as placas ateroscleróticas. Além disso, podem melhorar a disfunção endotelial através de suas propriedades antioxidantes, uma vez que parecem atenuar a produção de radicais livres induzida pela angiotensina II nas células musculares lisas, inibindo a atividade da NADPH oxidase mediada por substrato de toxina botulínica C3 relacionado a Ras (RAC1) e diminuindo a expressão do receptor tipo II da angiotensina II nas células vasculares.

A sinvastatina é a estatina mais utilizada na prática clínica para o tratamento de hiperlipidemias e na prevenção da aterosclerose. Alguns estudos apontam que a terapia de redução lipídica com sinvastatina está associada a uma regressão significativa da área de placas estabelecidas em humanos (CORTI et al., 2002; JENSEN et al., 2004). Corti et al 2015 demonstraram que a sinvastatina induz redução significativa nos níveis de colesterol total e LDL-C e reduz o tamanho da lesão aterosclerótica sem afetar a área do lúmen do vaso. A sinvastatina também foi capaz de reduzir a síntese de ET-1 em células endoteliais de aorta bovina in vitro (MILIONIS et al., 2007). Apesar de possuírem vários benefícios, devido ao aparecimento de efeitos colaterais importantes, como lesões musculares e alterações na função hepática, o interesse pelo desenvolvimento de alternativas mais acessíveis e com efeitos semelhantes aos das estatinas têm crescido (JIANG et al., 2017; TOUSOULIS et al., 2015).

Além das estatinas, dados clínicos e experimentais demonstraram que inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRAs) parecem exercer efeito benéficos antiateroscleróticos e anti-isquêmicos. Dados crescentes indicam que inibidores da ECA e BRAs são capazes de reverter a disfunção endotelial, a inflamação vascular, além de aumentar a estabilidade da placa aterosclerótica e reduzir o risco de eventos cardíacos (TOUSOULIS et al., 2015; YANG et al., 2013).

De forma semelhante, os beta-bloqueadores de terceira geração demonstraram não só reduzir a resistência periférica como também estimular a vasodilatação através de vários mecanismos. Entre os beta-bloqueadores, o nebivolol tem sido associado à melhora da função endotelial através de efeitos estimulatórios sobre a atividade da eNOs, além de seus efeitos

sobre a superóxido dismutase (SOD) celular e nos níveis de dimetilarginina. Verificou-se que o nebivolol, além de melhorar os níveis da pressão arterial sistêmica, melhorou a dilatação mediada por fluxo e aumentou indiretamente os níveis de SOD celular dos eritrócitos, sugerindo um efeito benéfico mediado pelo aumento da biodisponibilidade de NO. Além disso, o nebivolol demonstrou diminuir significativamente a quantidade de EROs liberada de células endoteliais humanas (TOUSOULIS et al., 2015). Particularmente, este efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, pela inibição da NADPH oxidase endotelial e pelo efeito direto no sequestro de EROs induzida por este fármaco (PASINI et al., 2008).

Recentemente, os agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) (glitazona e pioglitazona) passaram a ser amplamente utilizados no cenário clínico. Esses fármacos, além de seus efeitos hipoglicemiantes, antagonizam os efeitos da angiotensina II e demonstram exercer efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (JACKSON et al., 1999; TOUSOULIS et al., 2015).

As vitaminas antioxidantes têm sido entusiasticamente usadas no tratamento e na prevenção de doenças cardiovasculares (PASHKOW, 2011). Entretanto, o uso dessas vitaminas é alvo de grande debate. As vitaminas C e E são consideradas inibidoras da oxidação do LDL-C pela captura de EROs, aumentando assim a biodisponibilidade de NO. Por outro lado, enquanto a vitamina C tem demonstrado melhorar a síntese da eNOS, a vitamina E parece suprimir a expressão dessa enzima podendo atuar também como pró-oxidante (TOUSOULIS et al., 2015). A atividade pró-oxidante da vitamina E é evitada pela vitamina C. Após a neutralização de espécies reativas, a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) se converte em radical tocoferil que pode iniciar a peroxidação lipídica e exercer efeito pró-oxidante. A vitamina C (ascorbato) pode prevenir a atividade pró-oxidante do radical tocoferil por redução deste radical para  $\alpha$ -tocoferol atuando assim como agente co-antioxidante e inibindo a oxidação lipídica. Portanto, o efeito antiaterogênico da vitamina E pode ser eficaz somente em combinação com a vitamina C (CARR; ZHU; FREI, 2000).

## **2.5 *Ilex paraguariensis***

A *Ilex paraguariensis* A. ST.-Hil. pertence à família Aquilofaceae, sendo nativa da região sul da América do Sul e conhecida popularmente como erva mate. É muito popular e amplamente consumida pela população da América do Sul e por séculos, foi utilizada no

preparo de bebidas medicinais por povos indígenas desta região desempenhando assim, importante papel na economia de países como o Brasil, a Argentina, o Uruguai e o Paraguai (BORGES et al., 2013; GAO et al., 2013b).

As partes mais usualmente utilizadas da planta são as folhas, que passam por diversas etapas de processamento, tais como o branqueamento, secagem, moagem, peneiramento e em seguinte, embaladas para o comércio (BERTÉ et al., 2014). Além de ser psicoestimulante, devido ao seu alto teor de cafeína, a erva mate desperta interesse principalmente por suas propriedades antioxidantes, vasodilatadoras, hipolipidêmica, controle da obesidade, redução da glicação de proteínas e na indução de efeitos protetores durante a síndrome metabólica, além de atividades anti-inflamatórias. Em sua composição química também podemos encontrar outros compostos bioativos como saponinas triterpênicas e flavonóides (SCHINELLA et al., 2014; GAO et al., 2013c).

Na Figura 2, podemos observar sua distribuição geográfica ao redor do mundo. As propriedades terapêuticas da *I. paraguariensis* são descritas por vários estudos dentre elas, a capacidade antioxidante, que pode reduzir os níveis de lipídeos oxidados na circulação e de modular a inflamação em vários tecidos, tais como o músculo liso, tecido adiposo e fígado. Seus efeitos terapêuticos são atribuídos principalmente aos compostos fenólicos encontrados no extrato (GAO et al., 2013c). Gebara et al. (2017) avaliou a quantidade e a frequência do consumo da *I. paraguariensis* nas formas de duas bebidas mais tradicionais, o chimarrão e o tereré, reproduzindo experimentalmente as condições utilizadas para o preparo das bebidas. Contatou-se que o consumo estimado de compostos fenólicos para consumidores de chimarrão foi de 512,5-1708,5 mg/dia e para consumidores de tereré foi 583,0-1779,7 mg/dia.

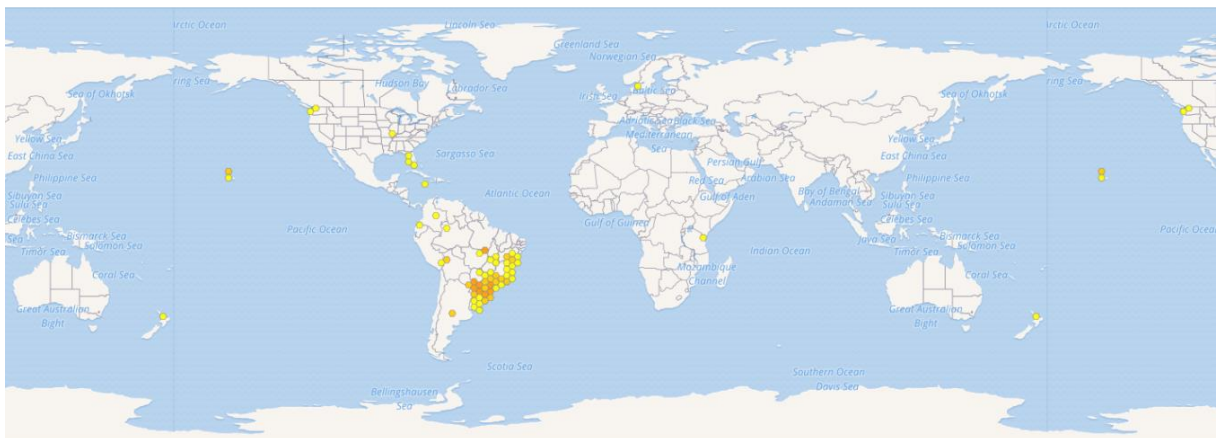


Figura 2 – Distribuição geográfica da *Ilex paraguariensis* ao redor do mundo (Fonte: [www.gbif.org](http://www.gbif.org)).

A *I. paraguariensis* é rica em metabólitos secundários, incluindo polifenóis, saponinas triterpênicas e metilxantinas. Os compostos fenólicos predominantes na espécie são os ésteres de ácido hidroxicinâmicos, classificados em ácidos clorogênicos (CGAs) e glicosídeos flavonólicos, especialmente a rutina. Os ácidos clorogênicos são famílias de compostos que incluem os ácidos cafeoilquínicos (CQAs), p-cumaroilquínicos, feruilquínicos, di-cafeoilquínicos (di-CQAs), cafeoil-feruil-quínicos, entre outros. No entanto, os CQAs mais comuns da espécie *I. paraguariensis* são os mono-cafeoilquínicos (mono-CQAs): ácido 3-O-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) e ácido 4-O-cafeoilquínico (4-CQA), bem como os di-CQAs: ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico (3,4-diCQA) de ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (3,5-diCQA) e ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico (4,5-diCQA) (BORGES et al., 2013; GEBARA et al, 2017; SCHINELLA et al., 2014). Outros compostos ativos identificados incluem aminoácidos, vitaminas C, B1, B2 e minerais (GAO et al., 2013b).

O sequestro de radicais livres, inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e a diminuição dos níveis de lipídeos no sangue são os principais mecanismos pelos quais extratos ricos em compostos fenólicos têm sido relatados como apresentando atividades antiaterogênicas. Os benefícios da ingestão de extratos com ação antioxidantes para a prevenção de eventos cardiovasculares são comprovados, como por exemplo, a administração do extrato de amora preta (*Morus nigra* L.) em modelos de ratos hiperlipidêmico, demonstrou ser capaz de diminuir as concentrações plasmáticas de lipídios, atenuar a esteatose hepática, induzida pela ingestão de um alto teor de colesterol e reduzir as lesões ateroscleróticas nas artérias. Seus efeitos na diminuição de lipídios séricos são semelhantes ao grupo tratado com sinvastatina (JIANG et al., 2017). Também, a suplementação com o extrato de uva (*Vitis vinifera* L.) atenuou a peroxidação lipídica, retardou a formação de lesão aterosclerótica e diminuiu a espessura da camada íntima na região torácica e do arco da aorta sem afetar a concentração plasmática de glicose e lipídeos, a formação de placas ateroscleróticas era mais evidente no grupo hiperlipidêmico não tratado em comparação com o grupo tratado pelo extrato (YANNI et al., 2015).

Estudos da *I. paraguariensis* realizados *in vitro* demonstram que seus extratos aquosos de são uma boa fonte de antioxidantes fenólicos, como já descrito na literatura por meio de

vários ensaios (BASTOS et al., 2007). A atividade antioxidante demonstrada pelo método do tiocianato férrico da infusão da erva mate é comparada com a atividade antioxidante do BHT (BASTOS et al., 2005). Além do efeito antioxidantes, muitos outros efeitos já foram relatados para o extrato em ensaio *in vitro*.

A glicação é a base molecular chave das complicações diabéticas devido à hiperglicemia. O extrato de *I. paraguariensis* demonstrou uma inibição dose-dependente da formação de produtos finais da glicação, estes resultados foram superiores aos relatados para o chá verde. Tal efeito deve-se a uma inibição da segunda fase das reações de glicação. A inibição da glicação do extrato de *I. paraguariensis* foi semelhante a encontrada para a aminoguanidina, um potente inibidor da glicação. (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005).

Testes *in vitro* foram conduzidos para avaliar a atividade citotóxica da *I. paraguariensis*. Tendo em vista que esta atividade está altamente relacionada com a atividade anticancerígena e a erva mate apresentou alta citotoxicidade contra células cancerígenas de fígado humano, o extrato de *I. paraguariensis* tem mostrado grande potencial frente a células tumorais (HECK; MEJIA, 2007).

Além deste efeito, podemos destacar também a capacidade de inibir a atividade da lipase pancreática *in vitro* (Martins et al., 2010), a capacidade de inibir o estresse nitrosativo (BIXBY, et al., 2005), e a regulação negativa da expressão de genes que regulam a adipogênese (ARÇARI et al., 2013). Além disso, a proteção da oxidação do ADN (ácido desoxirribonucleico) e da lipoperoxidação *in vitro* são efeitos bem elucidados e demonstrados por vários autores (CHANDRA; MEJIA 2004; MOSIMANN; WILHELM-FILHO; SILVA, 2005)

Outros estudos do extrato aquoso da *I. paraguariensis* realizados *in vivo* apresentam além dos efeitos antioxidantes, efeitos anti-inflamatórios tanto em processos locais como sistêmicos (SCHINELLA et al., 2014). Gao et al. (2013c) demonstraram que em modelos de ratos hiperlipidêmicos, o extrato aquoso de erva mate administrado por via oral inibiu a progressão da aterosclerose por reduzir os níveis séricos de colesterol total, triglicérides e LDL-C, além de melhorar a degeneração gordurosa grave das células hepáticas, tais efeitos foram atribuídos aos vários componentes antioxidantes presentes no extrato especialmente o ácido clorogênico, composto majoritário que representa cerca de 42% dos compostos bioativos encontrados neste extrato. Em hamsters, a administração da infusão de erva mate proporcionou efeitos protetores contra o estresse oxidativo, com ação hipolipidêmica e de perda de peso

corporal. Estes efeitos também foram atribuídos à ação antioxidante de compostos fenólicos como o ácido clorogênico e o ácido caféico (GAO et al., 2013a). Schinella et al. (2000) demonstraram a capacidade de inibição da peroxidação lipídica enzimática e não-enzimática em microsomas hepáticos de ratos, além de, inibir a peroxidação induzida por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em membranas de glóbulos vermelhos possivelmente por melhorar o sistema de defesa antioxidante do organismo por mecanismos ainda não muito bem esclarecidos. Em ratos hiperlipidêmicos, a administração da erva mate demonstrou ser capaz de regular a função lipídica e endotelial possivelmente por reduzir os níveis de endotelina e tromboxano B2, diminuir a expressão de ICAM-1 e aumentar os níveis de NO e de 6-ceto-PGF1 $\alpha$  no sangue, reduzindo a progressão da aterosclerose (GAO et al., 2013b). Borges et al. (2013) observaram que o consumo do extrato aquoso da erva mate em ratos promoveu perda de peso, atenuou os efeitos prejudiciais à dieta hiperlipidêmica na adiposidade e na sensibilidade à insulina e diminuiu os níveis sanguíneos de biomarcadores inflamatórios. Além disso, mostrou uma importante redução nos níveis de IL-6 sem alterar IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral e NO.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Investigar os possíveis efeitos antiateroscleróticos de uma fração butanólica enriquecida e padronizada de *Ilex paraguariensis* (n-BFIP) em coelhos hipercolesterolêmicos e analisar os prováveis mecanismos moleculares envolvidos nas respostas biológicas.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Obter a fração butanólica a partir das folhas de *Ilex paraguariensis* (n-FBIP) e proceder à caracterização química de seus diferentes metabólitos secundários;
2. Induzir a hipercolesterolemia e a aterogênese em coelhos da linhagem Nova Zelândia através da administração de dieta comercial enriquecida com 1% de colesterol por 8 semanas;
3. Acompanhar o ganho de peso corporal durante o tratamento experimental;
4. Mensurar os níveis de colesterol total e de suas frações HDL, não-LDL e TG, nos diferentes grupos experimentais no tempo 0, 30 e 60 dias;
5. Verificar macroscopicamente o índice de aterogênese no arco aórtico e na aorta torácica após os tratamentos com a n-BFIP ou sinvastatina;
6. Avaliar microscopicamente as alterações histopatológicas nas artérias onde houve formação de ateroma e mensurar o espessamento da camada íntima dos vasos nos diferentes grupos experimentais;
7. Determinar os efeitos antioxidantes e a ação da n-BFIP sobre a concentração sérica de IL-1 $\beta$ , IL-6, sICAM, sVCAM, nitrotirosina, nitrito e TBARS;
8. Avaliar os efeitos da n-BFIP sobre os níveis intracelulares de GMPC.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The *in vitro* and *in vivo* effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v. 141, p. 809-815, 2013.

BALZAN, S.; HERNANDES, A.; REICHERT, C. L.; DONADUZZI, C.; PIRES, V. A.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; CARDOZO JUNIOR, E. L. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, p. 115-122, 2013.

BASTOS, D. H. M.; ISHIMOT, E. Y.; MARQUES, M. O M.; FERRI, A. F.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 538-543, 2006.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007.

BERTÉ, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; HOFFMANN-RIBANI, R.; MACCARI, JUNIOR A. Processing and Impact on Antioxidants in Beverages: Antioxidant Activity of Maté Tea and Effects of Processing. **Elsevier**, p. 145–153, 2014.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, p. 345-358, 2005.

BORGES, M. C.; VINOLO, M. A. R.; NAKAJIMA, K., CASTRO, I. A.; D.; BASTOS, D. H. M.; BORELLI, P; FOCK, R. A.; TIRAPEGUI, J.; CURI, R.; ROGERO, M. M. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. II, p. 561–9, 2013.

CARDOSO, A.P.Z., NOGUEIRA, M.S., HAYASHIDA, M., SOUZA, L.D. & CESARINO, E.J. Aspectos clínicos e socioeconômicos das dislipidemias em portadores de doenças cardiovasculares. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v.21, p. 417-436, 2011.

CARR, A. C.; ZHU, B.; FREI, B. Potencial antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). **Circulation research**, v. 87, p. 349-354, 2000.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CORTI, R.; FAYAD, Z. A.; FUSTER, V.; WORTHLEY, S. G.; HELFT, G.; CHESEBRO, J.; MERCURI, M.; BADIMON, J. J. Effects of Lipid-Lowering by Simvastatin on Human Atherosclerotic Lesions. **Circulation**, p.249-252,2001.

CORTI, R.; FUSTER, V.; FAYAD, Z. A.; WORTHLEY, S. G.; HELFT, G.; SMITH, D.; WEINBERGER, J.; WENTZEL, J.; MIZSEI, G.; MERCURI, M.; BADIMON, J. J. Lipid Lowering by Simvastatin Induces Regression of Human Atherosclerotic Lesions. **Circulation**, v. 106, p. 2884-2887, 2002.

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.

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.

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.

FAN, J.; KITAJIMA, S.; WATANABE, T.; XU, J.; ZHANG, J.; LIU, E.; CHEN, Y.E. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 146, p. 104–19, 2015.

GAO, H.; LONG, Y.; JIANG, X.; LIU, Z.; WANG, D.; ZHAO, Y.; LI, D.; SUN, B. Beneficial effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 6, p. 572–578, 2013a.

GAO, H.; LIU, Z.; QU, X.; ZHAO, Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. **Fitoterapia**, v. 84, n. 1, p. 264–272, 2013b.

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, 2013c.

GBIF. Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/5414252>>, Acesso em: 24/05/2018

GEBARA, K. S.; GASPAROTTO-JUNIOR, A.; SANTIAGO, P. G.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, L. M.; MORAND, C.; COSTA, T. A.; CARDOZO-JUNIOR, E. L. Daily Intake of Chlorogenic Acids from Consumption of Maté (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Traditional Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 46, p. 10093–10100, 2017.

GOTTLIEB, M. G. V.; BONARDI, G. ; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 15, p. 203-207, 2005.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 508–519, 2006.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138-151, 2007.

HUSEINI, H. F.; ANVARI, M. S.; KHOOB, Y. T.; RABBANI, S.; SHARIFI, F.; ARZAGHI, S. M.; FAKHRZADEH, H. Anti-hyperlipidemic and anti-atherosclerotic effects of *Pinus eldarica* Medw. nut in hypercholesterolemic rabbits. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 23, p. 32, 2015.

JACKSON, S. M.; PARHAMI, F.; XI, X.; BERLINER, J. A.; HSUEH, W. A.; LAW, R. E.; DEMER, L. L. Peroxisome Proliferator Activated Receptor Activators Target Human Endothelial Cells to Inhibit Leukocyte Endothelial Cell Interaction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 9, p. 2094–2104, 1999.

JENSEN, L. O.; THAYSSSEN, P.; PEDERSEN, K. E.; STENDER, S. HAGHFELT, T. Regression of Coronary Atherosclerosis by Simvastatin: A Serial Intravascular Ultrasound

Study. **Circulation**, v. 110, p. 265-270, 2004.

JIANG, Y.; DAI, M.; NIE, W.; YANG, X. ZENG, X. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 228–235, 2017.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidant e Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-427, 2005.

MARTIN, F. NOSO, T. M.; PORTO, V. B.; CURIEL, A.; GAMBERO, A.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L.; CARVALHO, P. O. Maté Tea Inhibits *In Vitro* Pancreatic Lipase Activity and Has Hypolipidemic Effect on High-fat Diet-induced Obese Mice. **Obesity**, v. 18, p. 42-47, 2010.

MILIONIS, H. J.; LIBEROPOULOS, E. N; ELISAF, M. S.; MIKHAILIDIS, D. P. Analysis of Antihypertensive Effects of Statins. **Current Hypertension Reports**, v. 9, n. 3, p. 175-183, 2007.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, p. 59-70, 2006.

NICOLETTI, M.A., OLIVEIRA-JÚNIOR, M.A., BERTASSO, C.C., CAPOROSSO, P. Y., TAVARES, A.P.L. Principais Interações no Uso de Medicamentos Fitoterápicos. **Infarma** 19, 32-40, 2007.

PASHKOW, F. J. Oxidative Stress and Inflammation in Heart Disease: Do Antioxidants Have a Role in Treatment and/or Prevention? **International journal of inflammation**, v. 2011, p. 514623, 11 ago. 2011.

PASINI, A. N.; GARBIN, U.; STRANIERI, C.; BOCCIOLETTI, V.; MOZZINI, C.; MANFRO, S.; PASINI, A.; COMINACINI, M.; COMINACINI, L. Nebivolol treatment reduces serum levels of asymmetric dimethylarginine and improves endothelial dysfunction in essential hypertensive patients. **American Journal of Hypertension**, 2008.

PIZZIOLO, V.R., BRASILEIRO, B.G., OLIVEIRA, T.T. & NAGEM, T.J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008 in Brazil between 1998 and 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 13, 98-109, 2011.

RIDKER, P. M. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream to Identify Novel Targets for Atheroprotection. **Circulation Research**, v. 118, n. 1, p. 145–156, 2016.

SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A.; CAMARÉ, C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. **Biochimie**, v. 125, p. 281–296, 2016.

SCHINELLA, G.; NEYRET, E.; CÓNSOLE, G.; TOURNIER, H.; PRIETO, J. M.; RÍOS, J.; GINER, R. M. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. **Planta Medica**, 2014.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015.

SOUZA-MOREIRA, T.M., SALGADO, H.R.N. & PIETRO, R. Brazil in the context of plants and derivatives quality control. *Rev. Bras. Farmacogn.-Braz. J. Pharmacogn.* 20, 435-440 (2010).

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.

TOUSOULIS, D.; PSALTOPOULOU, T.; ANDROULAKIS, E.; PAPAGEORGIOU, N.; PAPAIOANNOU, S.; OIKONOMOU, E.; SYNETOS, A.; STEFANADIS, C. Oxidative stress and early atherosclerosis: novel antioxidant treatment. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 29, n. 1, p. 75–88, 2015.

YANG, S.; LI, R.; TANG, L.; QU, X.; GE, G.; MA, J.; LIU, H.; QIAO, Z.; FANG, W. TLR4-mediated anti-atherosclerosis mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor – Fosinopril. **Cellular Immunology**, v. 285, n. 1–2, p. 38–41, set. 2013.

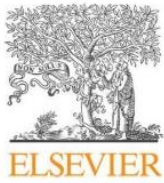
YANNI, A. E.; EFTHYMIU, V.; LELOVAS, P.; AGRIGIANNIS, G.; KOSTOMITSOPOULOS N.; KARATHANOS, V. T. Effects of dietary Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) on atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits. **Food Funct.**, v. 6, n. 3, p. 963–971, 2015.

ZÁRATE, A.; MANUEL-APOLINAR, L.; SAUCEDO, R.; HERNÁNDEZ-VALENCIA, M.; BASURTO, L. Hypercholesterolemia As a Risk Factor for Cardiovascular Disease: Current Controversial Therapeutic Management. **Archives of medical research**, v. 47, n. 7, p. 491–495, 2016.

ZHAO, L.; WANG, X.; YANG, Y. Association between interleukin-6 and the risk of cardiac events measured by coronary computed tomography angiography. **International Journal of Cardiovascular Imaging**, v. 33, n. 7, p. 1237-1244, 2017.

## **5 APÊNDICES**





Contents lists available at ScienceDirect

## Phytomedicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/phymed](http://www.elsevier.com/locate/phymed)



### Mechanisms underlying antiatherosclerotic properties of an enriched fraction obtained from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.



Patrícia Gonçalves Santiago<sup>a</sup>, Francielly Mourão Gasparotto<sup>a</sup>, Karimi Sater Gebara<sup>a</sup>, Flavia Barbieri Bacha<sup>d</sup>, Francislayne Aparecida dos Reis Lívero<sup>a</sup>, Maria Angélica Strapazon<sup>b</sup>, Euclides Lara Cardozo Junior<sup>b</sup>, Cândida Aparecida Leite Kassuya<sup>a</sup>, Lauro Mera de Souza<sup>c</sup>, Arquimedes Gasparotto Junior<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Electrophysiology and Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Biological, Medical and Health Sciences, Paranaense University, Umuarama, PR, Brazil

<sup>c</sup> Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Pequeno Príncipe Faculty, Curitiba, PR, Brazil

<sup>d</sup> University Center of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Adhesion molecules  
Antiatherosclerotic  
Antioxidant  
Cytokines  
*Ilex paraguariensis*  
Lipid levels

#### ABSTRACT

**Background:** *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae) popularly known as 'mate' is an important species native to South America. Despite numerous studies showing significant antioxidant and lipid lowering properties, the antiatherosclerotic mechanisms of this species remain unknown.

**Purpose:** To evaluate the possible antiatherosclerotic effects of a butanolic fraction (n-BFIP) obtained from *I. paraguariensis* and to investigate the molecular mechanisms involved in this activity.

**Methods:** First, n-BFIP was obtained from the hydroalcoholic extract and a detailed phytochemical investigation about its main secondary metabolites was performed. Then, during 8 experimental weeks, rabbits received diet supplemented with 1% cholesterol (CRD). After 4 weeks of CRD, animals were redistributed into five groups ( $n = 6$ ) and treated (p.o.) with n-BFIP (10, 30 and 100 mg/kg), simvastatin (5 mg/kg), or vehicle (filtered water, 1 ml/kg) once daily for 4 weeks. An additional group was fed with cholesterol-free diet and treated with vehicle. At the end of 8 weeks, serum samples were obtained for the measurement of serum lipids, lipid and protein oxidation and indirect nitric oxide levels. In addition, serum IL-1 $\beta$ , IL-6, sICAM-1, sVCAM-1, and intracellular cGMP levels in rabbit aortic rings were measured. Samples from the aortic arch and thoracic segment were collected for histopathological analysis.

**Results:** CRD induced oxidative and nitrosative stress and increased serum lipids, IL-1 $\beta$ , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 levels. In addition, structural changes in the intima layers of different arterial branches were also found. Although it did not change serum lipids, n-BFIP reverted oxidative and nitrosative stress and reduced IL-1 $\beta$ , IL-6, sICAM-1, and sVCAM-1 levels, besides to increasing intracellular levels of cGMP *in vitro*. In addition, the formation of atherosclerotic plaques was reduced to values close to those of animals fed with cholesterol-free diet.

**Conclusions:** A 4-week n-BFIP treatment reduces the progression of the atherosclerotic disease in New Zealand rabbits. These effects are associated with an attenuation of oxidative and nitrosative stress, affecting IL-1 $\beta$ , IL-6, sICAM-1 and sVCAM-1 levels.

#### Introduction

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae)

popularly known as 'mate' is an important species native to South America. Historically, it was adapted by native inhabitants (Guaraní indigenous tribes) from a vast region that includes Paraguay, Uruguay,

**Abbreviations:** ANOVA, one-way analysis of variance; C-, negative control group; C+, positive control group; CRD, cholesterol-rich diet; CGAs, chlorogenic acids; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HR-MS, high-resolution mass spectrometry; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 beta; IL-6, interleukin 6; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; n-BFIP, butanolic fraction from *Ilex paraguariensis*; non-HDL-C, non-high-density lipoprotein cholesterol; NT, nitrotyrosine; ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; S.E.M., mean  $\pm$  standard error of the mean; sGC, soluble guanylyl cyclase; SNP, sodium nitroprusside; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; SIMV, simvastatin; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; TBARS, thiobarbituric acid; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; UPLC, ultra performance liquid chromatography

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [arquimedesgasparotto@gmail.com](mailto:arquimedesgasparotto@gmail.com), [arquimedesjunior@ufgd.edu.br](mailto:arquimedesjunior@ufgd.edu.br) (A. Gasparotto Junior).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.012>

Received 7 March 2017; Received in revised form 14 June 2017; Accepted 14 August 2017

0944-7113/© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.



North-Eastern Argentine and Southern Brazil (Bracesco et al., 2011; Grigioni et al., 2004). For centuries, this species has been used in the preparation of stimulant beverages (e.g. ‘chimarrão’, ‘tereré’ or ‘chá mate’) and for its possible medicinal properties (Bracesco et al., 2011).

Chemically, *I. paraguariensis* is well known. Alkaloids (methyl-xanthines), flavonoids, vitamins, tannins, chlorogenic acid derivatives (CGAs), triterpenes, and several ursolic acid saponins have been identified (Heck and de Mejia, 2007). The properties attributed to CGAs, such as free radical scavenger, antioxidant system modulator and their possible effects on glucose metabolism, have put these compounds in evidence (Olthof et al., 2001).

In the last 20 years, considerable scientific progress has been aimed at identifying the medicinal properties of *I. paraguariensis*. Among its pharmacological activities, antioxidant (Pereira et al., 2017), anti-inflammatory (Muñoz-Culla et al., 2016), and lipid-lowering effects (Balzan et al., 2013; Gao et al., 2013; Messina et al., 2015) stand out, evidenced in numerous *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* assays. In addition, its effects on body weight, glucose uptake and metabolism are also commonly described (Andersen and Fogh, 2001; Arçari et al., 2009; Conceição et al., 2017; Gamboa-Gómez et al., 2015; Kim et al., 2015).

Although several studies have shown its possible positive effects on atherosclerosis progression markers (Cardozo Junior and Morand, 2016), some available data are inconsistent. While in rodents, *I. paraguariensis* extracts show promising antioxidant and lipid lowering effects (Balzan et al., 2013; Gao et al., 2013), in other animal models, data are inconclusive (Mosimann et al., 2006). In fact, the molecular mechanisms by which *I. paraguariensis* could exert its antiatherosclerotic effects are not fully elucidated.

Considering the existing gaps regarding the effectiveness of *I. paraguariensis* against atherosclerosis evolution, a butanolic fraction from hydroalcoholic extract of *I. paraguariensis* (n-BFIP) was obtained and its different secondary metabolites were characterized. Then, using a classic atherosclerosis model in New Zealand rabbits, the role of n-BFIP against dyslipidemia and atherosclerotic process was evaluated. Finally, the participation of oxidative stress, inflammatory cytokines and adhesion molecules in this process was investigated.

## Material and methods

### Drugs and chemicals

Cholesterol, simvastatin (SIMV), sodium nitroprusside, and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one (ODQ) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile, methanol, and formic acid were purchased from J. T. Baker (Center Valley, PA, USA). All other reagents and solutions were obtained in analytical grade.

### Plant material and n-BFIP preparation

*Ilex paraguariensis* leaves were collected in the municipality of Ivaí/PR, Brazil (25°00'40" S - 50°48'02" W, 748 m). The n-BFIP was prepared according to Balzan et al. (2013). For this, leaves were dried in a forced air oven at 45 °C during 48 h. After milling, the powder of leaves was extracted with 70% ethanol (1:2.5 w/v), filtered and evaporated to obtain the crude extract, which was fractionated by liquid/liquid partitioning (n-hexane, chloroform, ethyl acetate and n-butanol), obtaining the n-butanol fraction (yield of 9.316%).

### Phytochemical analysis

The phytochemical analysis of n-BFIP was developed by LC-MS on an Ultra Performance Liquid Chromatographer (UPLC™) equipped with binary pump, column oven and a sample delivery system (Waters Co.). Separation was carried out with a C<sub>18</sub> column, HSS-T3 (Waters), with 100 × 2.1 mm and particle size of 1.7 μm. The mobile phase was composed of ultra-pure water and acetonitrile, both with 0.1% of

formic acid (v/v), increasing the organic solvent content from 0% (initial) to 20% (5 min), 70% (13 min) and 0% (13.5 min), at flow rate of 400 μl/min and column temperature of 60 °C. The sample was prepared using 2 mg/ml in H<sub>2</sub>O-methanol (7:3, v/v) and injection volume of 5 μl. Detection was provided by high-resolution mass spectrometry (HR-MS).

HR-MS was performed in an LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific), with electrospray at atmospheric pressure ionization in the positive and negative ionization modes. For sample desolvation, sheath gas using nitrogen at flow rate of 40 arbitrary units (a.u.) and auxiliary gas at 10 a.u. was used, along with source temperature of 350 °C. The energies for positive ionization were: spray of 4.5 kV, tube lens of 120 V and capillary of 30 V and, for negative ionization: spray of 3.5 kV, tube lens of –200 V and capillary of –40 V. The mass resolution was set at 15,000 FWHM (at m/z 400) in LC-MS mode. External calibration was regularly performed covering m/z 100 – 2000 and acquisition occurred in total ion current. In the negative ionization, compounds were fragmented by collision induced dissociation using helium and energy of 20 eV, whereas saponins produced better fragment-ions in the positive ionization mode (energy at 40 eV), with post-column infusion of LiCl solution (10 mM) introduced to the sample with syringe pump at 5 μl/min.

## Pharmacological studies

### Animals

Male New Zealand rabbits weighing 1.8–2.0 kg were obtained from Federal University of Mato Grosso do Sul and housed at the Federal University of Grande Dourados under controlled temperature (20 ± 2 °C), relative humidity (50 ± 10%), 12 h light/12 h dark cycle, with *ad libitum* access to food and water. The ethics committee on animal use of the Federal University of Grande Dourados approved all procedures (Protocol N<sup>o</sup>. 09/2015).

### Experimental procedures

Dyslipidemia and atherosclerosis were induced according to Barboza et al. (2016). During 8 weeks, rabbits received *ad libitum* commercial diet (Nutricoeelho, Purina<sup>®</sup>) supplemented with 1% cholesterol (cholesterol-rich diet – CRD). After 4 weeks, animals were distributed into five groups for treatment (p.o.) with n-BFIP, vehicle (filtered water, 1 ml/kg) or SIMV, daily, for 4 more weeks. One group was fed without the addition of cholesterol (negative control). The final groups (n = 6) were: (1) *Negative control* (C-): chow without cholesterol and vehicle; (2) *Positive control* (C+): CRD and vehicle; (3) *n-BFIP 10*: CRD and 10 mg/kg of n-BFIP; (4) *n-BFIP 30*: CRD and 30 mg/kg of n-BFIP; (5) *n-BFIP 100*: CRD and 100 mg/kg of n-BFIP; (6) SIMV: CDR and 5 mg/kg of SIMV.

Body weights were weekly measured. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and non-high-density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C) levels were detected using biochemical analyzer at the beginning of experiments and at weeks four and eight. At the end of experiments, rabbits were fasted for 12 h and anesthetized with isoflurane. Blood was collected from the abdominal cava vein, and the serum samples were obtained by centrifugation (1500 g for 5 min). After euthanasia by intravenous administration of potassium chloride, aorta segments (aortic arch and thoracic segments) were removed and fixed in 10% formalin. After 48 h, part of each segment was longitudinally sectioned, rinsed in 70% alcohol and immersed in Sudan Black B staining solution at room temperature during 15 min. Tissues were transferred to 80% ethanol for 20 min, washed in tap water for 1 h and the luminal surface was assessed for sudanophilic lesions. Samples of different arterial branches were dehydrated with alcohol and xylene, embedded in paraffin, sectioned at 5 μm, stained with hematoxylin/eosin and microscopically examined. Intima and media layers were measured with Motic Images Plus software version 2.0.



*Investigation of the key mediators involved in antiatherosclerotic activity of n-BFIP.* Serum nitrotyrosine (NT), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), and interleukin 6 (IL-6) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay kit according to the manufacture's specifications (BD Biosciences, CA, USA). Thiobarbituric acid (TBARS) levels were measured using TBARS assay kits (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) according to manufacturer's instruction. Plasma nitrite concentration was determined by enzymatically reducing nitrate according to technique described by Schmidt et al. (1989).

In order to evaluate the role of the NO-cGMP pathway in the atheroprotective effects of n-BFIP, we measured the intracellular concentration of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) according to methods described by Estancial et al. (2015). For this, rabbit aortic rings (2–3 mm; n = 5) were removed and placed in Krebs-Henseleit solution (composition in mm: 117 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> and 11 glucose). The aortic rings were mounted in an organ bath and continuously bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4) at 37 °C. A resting tension of 2 g was applied to each tissue and a rest period of 1 h was allowed before the experiments. Then, aortic rings were then stimulated for 15 min with sodium nitroprusside (SNP, a NO donor, 10  $\mu$ m), or n-BFIP in different concentrations (0.01, 0.1, and 1 mg/ml) in the absence and in the presence of soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor ODQ (100  $\mu$ m, 30 min). Subsequently, the tissues were removed and frozen in liquid nitrogen. Then, the tissues were homogenized in trichloroacetic acid (5% wt/vol), centrifuged (10 min at 4 °C at 1500 g) and the supernatant was collected. The pellet was dried, weighed, and the trichloroacetic acid was extracted. Procedures for antibody incubation, and tracer preparation were performed as described in commercially available kits (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, USA). All experiments were performed in duplicate.

### Statistical analyses

Data were analyzed for homogeneity of variance and normal distribution. Differences among means were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test. p-values less than 0.05 were considered statistically significant. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.).

## Results

### Phytochemical characterization

In the n-BFIP chromatogram (Fig. 1), many secondary metabolites were observed, namely those from the series of isomeric monocateoylquinic acids. These compounds were fragmented, producing 3

deprotonated ions at m/z 353.0876 [M-H]<sup>-</sup> with fragment-ions at m/z 135.044, 173.045, 179.034 and 191.056. Monocateoylquinic acids were identified as neo-chlorogenic acid (3.75 min), chlorogenic acid (4.90 min) and crypto-chlorogenic acid (5.00 min). Series of dicafeylquinic acids were observed at m/z 515.119 [M-H]<sup>-</sup>, confirmed by fragment-ions at m/z 135.044, 173.045, 179.034, 191.056 and 353.087. Similar to monocateoylquinic acids, the distribution of these fragments is characteristic of each isomer, allowing their identification as 3,4-dicafeylquinic acid (8.45 min), 3,5-dicafeylquinic acid (8.65 min) and 4,5-dicafeylquinic acid (9.17 min). Some glycosides of flavonoids were also identified, but only rutin has appeared at high abundance, observed at m/z 609.14605 (7.76 min). Other minor phenolics and glycosides observed are summarized in Table 1.

Although saponins have appeared in the negative ionization with good intensities, mainly adducted by HCOO<sup>-</sup> [M + 45]<sup>-</sup>, their fragment-ions were poorly produced. Thus, for the identification of saponins, positive ionization adducted by Li<sup>+</sup> was carried out, and lithiated ions produced good fragments, allowing their identification. Since the Li<sup>+</sup> complex is higher with glycans than with terpenoid moieties, abundant fragment-ions from oligosaccharides were observed, with the main cleavage occurring at the carbonyl site (C28), allowing identifying oligosaccharides linked to C28 and those linked to C3 glycosylation sites (Fig. 2). Aglycone moieties were consistent with ursolic and oleanolic acids. Saponin structures are summarized in Table 1.

### Pharmacological study

#### n-BFIP does not affect serum lipids levels

The effects of n-BFIP and SIMV on serum lipid levels are shown in Table 2. TC levels of C+ group (1985  $\pm$  203 mg/dl) were increased when compared with negative control group (baseline 57  $\pm$  6.4 mg/dl) after 8 weeks of CRD. Treatment with SIMV lowered TC levels to 1021  $\pm$  117 mg/dl when compared to C+. Similarly, reduction in the non-HDL-C (C+: 1629  $\pm$  196 mg/dl; SIMV: 750  $\pm$  128 mg/dl) and TG (C+: 200  $\pm$  41 mg/dl; SIMV: 112  $\pm$  15 mg/dl) levels was evident in rabbits treated with SIMV. Body weight, HDL-C, non-HDL-C or TG of animals treated with n-BFIP showed no significant changes when compared with C+ group.

#### n-BFIP produces antiatherogenic effects on aorta segments

*Macroscopic evaluation.* The intensity of lesions in the aortic arch and thoracic segment was used as an index of disease severity (Fig. 3). Sudanophilic blue lesions (average area) in aortic arch and thoracic segment of C+ were increased (57,955  $\pm$  5845 and 39,856  $\pm$  3664  $\mu$ m<sup>2</sup>) when compared with negative controls ( $\sim$  65  $\mu$ m<sup>2</sup>) (Fig. 3(A) and Fig. 3(B), respectively). On the other hand, sudanophilic lesions in aortic arch were reduced to 26,910  $\pm$  3562 and 20,674  $\pm$  4138  $\mu$ m<sup>2</sup> in animals that received 30 and 100 mg/kg, respectively (Fig. 3(A)). Similarly, n-BFIP (100 mg/kg) reduced

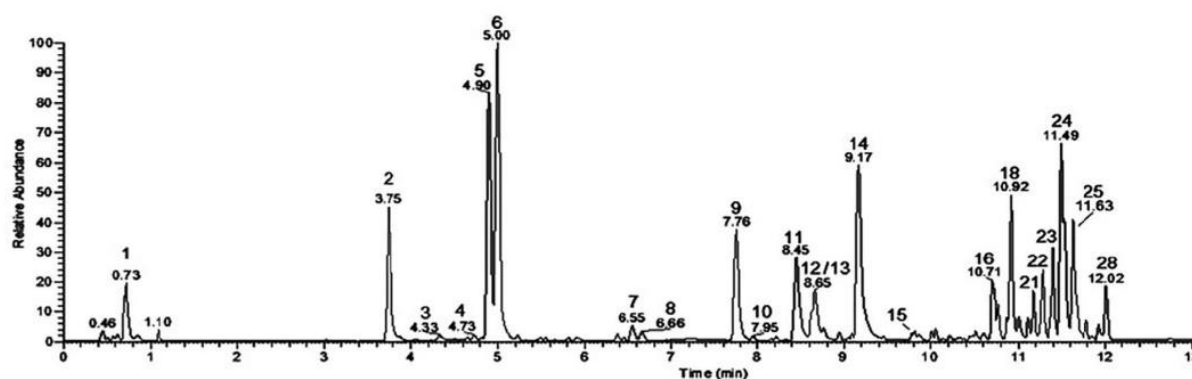


Fig. 1. Phytochemical analysis of the n-BFIP obtained by LC-MS/MS.



**Table 1**  
Phytochemical composition of n-BFIP obtained by LC-PDA-MS.

Peak	MS <sup>1</sup> (M-H) <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (key fragments)	Identification	Ref
1	191.05578		Quinic acid	1, 2
2	353.08766	191.056, 179.034, 135.044	neo-Chlorogenic acid	1, 2
3	341.08683	179.034	Caffeoyl-glucoside	1, 2
4	341.08689	179.034	Caffeoyl-glucoside	1, 2
5	353.08760	191.056	Chlorogenic acid	1, 2
6	353.08763	191.056, 179.034, 173.045, 135.044	crypto-Chlorogenic acid	1, 2
7	367.10304	193.050, 173.045	Feruloylquinic acid	1, 2
8	367.10298	191.055, 173.045	Feruloylquinic acid	1, 2
9	609.14605	463.08813, 300.027	Rutin	1, 2
10	463.08736	300.027	Quercetin-glucoside	1, 2
11	515.11963	353.087, 191.056, 179.034, 173.045, 135.044	3,4-Dicaffeoylquinic acid	1, 2
12	593.15066	447.092, 284.032	Kempferol-diglycoside	1, 2
13	515.11939	353.087, 191.055, 179.034	3,5-Dicaffeoylquinic acid	1, 2
14	515.11945	353.087, 191.056, 179.034, 173.045	4,5-Dicaffeoylquinic acid	1, 2
15	529.13474	364.103, 193.050, 173.045	Caffeoylferuloylquinic acid	1, 2
	[M + Li] <sup>+</sup>		<b>Saponins</b>	
16	1081.57702	919.523, 773.462, 447.168, 301.111	Glc-(Rha)-Ara-Agly(OH)-Glc	2
17	1389.68964	903.529, 757.471, 493.174, 447.168, 331.121	Glc-(Rha)-Ara-Agly-(Glc) <sub>3</sub>	2
18	1227.63527	903.528, 757.471, 447.168, 331.120, 301.111	Glc-(Rha)-Ara-Agly-(Glc) <sub>2</sub>	2
19	1081.57873	919.524, 757.471, 463.163, 301.111	(Glc) <sub>2</sub> -Ara-Agly-Glc	2
20	1285.64013	961.535, 799.481, 505.174, 343.121, 331.121	(Ac)(Glc) <sub>2</sub> -Ara-Agly-(Glc) <sub>2</sub>	2
21	1255.62876	931.524, 799.482, 475.163, 343.121, 331.121	Xyl-Glc-(Ac)Ara-Agly-(Glc) <sub>2</sub>	2
22	1065.58183	741.476, 595.417, 331.121	Rha-Ara-Agly-(Glc) <sub>2</sub>	2
23	1123.58803	799.482, 343.121, 331.121	(Ac)Glc-Ara-Agly-(Glc) <sub>2</sub>	2
24	1065.58244	903.529, 757.469, 447.168, 301.110	Glc-(Rha)-Ara-Agly-Glc	2
25	919.52384	757.471, 319.121, 301.110	Glc-Ara-Agly-Glc	2
26	1093.57765	931.524, 799.482, 493.174, 475.164, 343.121	Xyl-Glc-(Ac)Ara-Agly-Glc	2
27	903.52975	741.476, 595.419, 303.126	Rha-Ara-Agly-Glc	2
28	961.53387	799.482, 637.429, 361.131, 343.121, 199.079	Glc-(Ac)Ara-Agly-Glc	2

Agly – Aglycone (Ursolic or Oleanolic acid), Ac – Acetyl, Ara – Arabinose, Glc – Glucose, Rha – Rhamnose, Xyl – Xylose.

sudanophilic lesions by  $8672 \pm 1097 \mu\text{m}^2$  in the thoracic segment (Fig. 3(B)). The effects obtained with SIMV (aortic arch:  $18,490 \pm 3997 \mu\text{m}^2$ ; thoracic segment:  $8915 \pm 951 \mu\text{m}^2$ ) were similar with those observed with n-BFIP treatment.

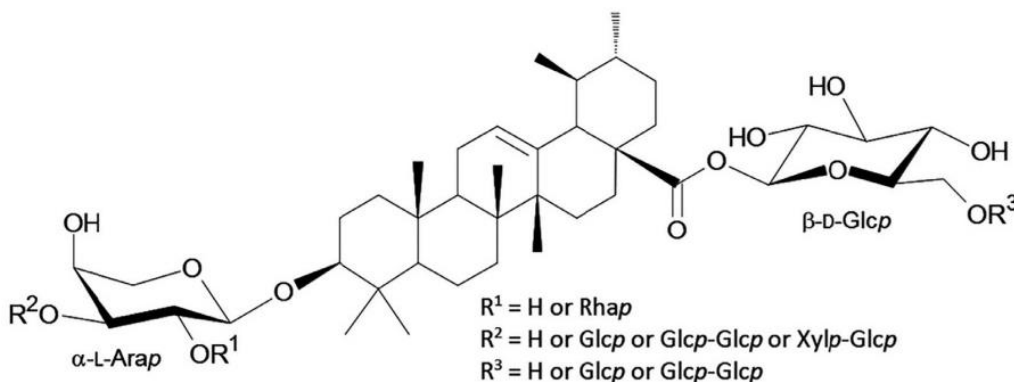
**Microscopic evaluation and morphometric analysis.** Representative images of the effects of CRD and treatments with n-BFIP and SIMV on the atherosclerosis development in the aortic arch of rabbits are shown in Fig. 4. In C- group, endothelial cells were intact and adhesive to the internal elastic lamina in single layers, and smooth muscle cells were orderly arranged in the tunica media. In contrast, tunica intima of C+ animals experienced more evident thickening and edema with several foam cell layers. Smooth muscle cells were reduced in the tunica media, which were accompanied by disorganized, twisted, and structurally undefined elastic fibers, and there were scattered atherosclerotic plaques. Animals treated with n-BFIP showed a dose-dependent reduction in the inflammatory infiltrate and foam cell layers, with smooth muscle cells relatively orderly arranged. Treatment with SIMV produced a similar response pattern to animals treated with n-BFIP at dose of 100 mg/kg.

Morphometric measures of the intima and media layer of aortic arch and thoracic segment are shown in Fig. 5. Histopathological examination of aortic segments showed thickness in intima layer after 8 weeks of CRD (aortic arch:  $118 \pm 9.4 \mu\text{m}$ ; thoracic segment  $109 \pm 8.0 \mu\text{m}$ ) when compared to C- (aortic arch:  $46 \pm 3.2 \mu\text{m}$ ; thoracic segment  $52 \pm 5.3 \mu\text{m}$ ). Treatment with n-BFIP (30 and 100 mg/kg) prevented thickening, with values close to those of groups that received treatment with SIMV, which were close to those observed for negative controls (Fig. 5(A) and (D)).

Although values of media layers did not present significant differences among experimental groups (Fig. 5(B) and (E)), treatments with 30 and 100 mg/kg of n-BFIP prevented increases in the intima-media ratio ( $0.18 \pm 0.02$  and  $0.13 \pm 0.02$  to aortic arch, and  $0.18 \pm 0.02$  and  $0.13 \pm 0.02$  to thoracic segment, respectively) and values were similar to those found in SIMV or C- (Fig. 5(C) and (F)).

#### n-BFIP reduces oxidative stress and increases NO-cGMP pathway in rabbit aortic rings

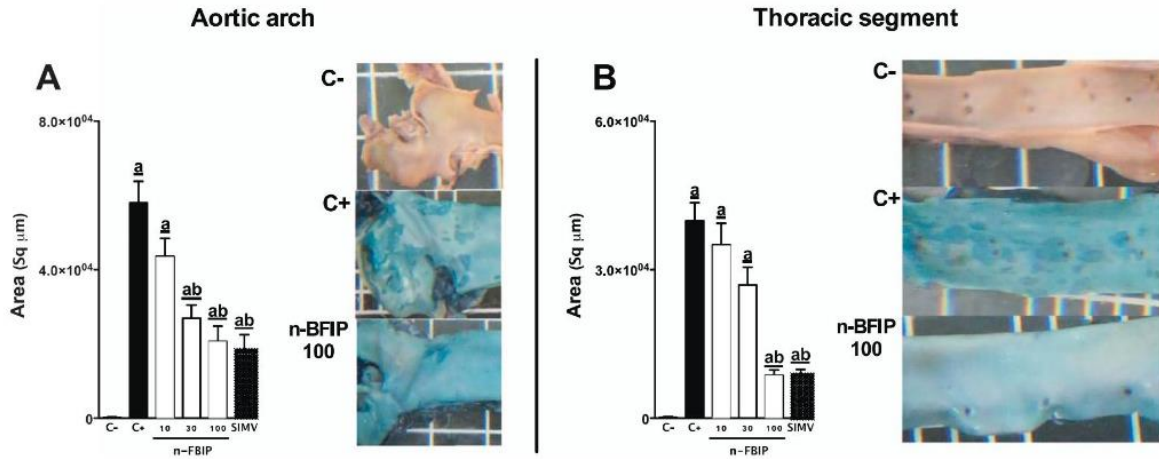
The effects of n-BFIP and SIMV on T-BARS and NT levels of rabbits are shown in Fig. 6(A) and Fig. 6(B), respectively. CRD for 8 weeks



**Fig. 2.** General structures for the saponins found in n-BFIP. Although ursolic acid depicted in the structure being the main terpenoid nucleus, oleanolic acid was also reported. In the R2, acetylated oligosaccharides were also found.





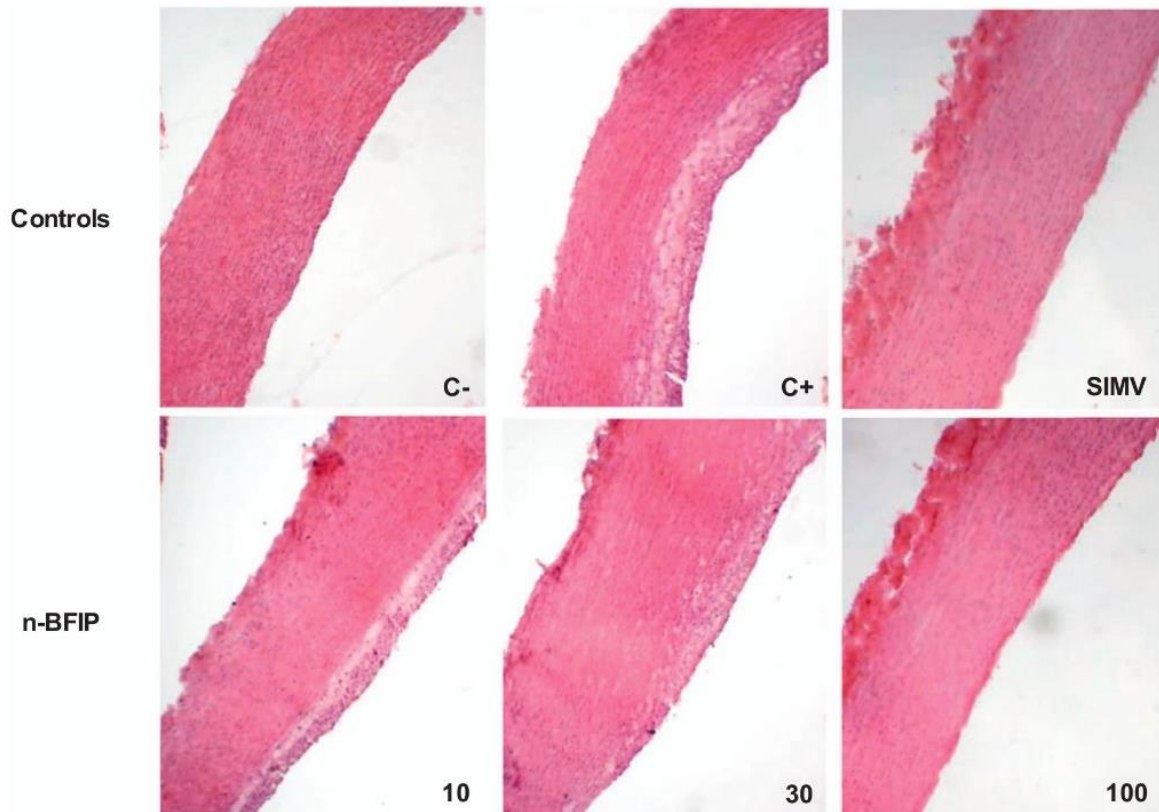


**Fig. 3.** n-BFIP treatment reduces sudanophilic lesions in the aortic arch and thoracic segment from rabbits undergoing cholesterol-rich diet (CRD). Macroscopic observations and average area of atherosclerotic lesions in the aortic arch (A) and thoracic segment (B) are shown. Images in 4 x scale. Values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6) in comparison to the negative control (\*p < 0.05) or positive control (†p < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni test. C-: negative control group, C+: positive control group.

Alteration in endothelial function precedes the development of morphological atherosclerotic changes and may have a direct relationship with the reduction of endothelial NO production. The endothelium damaged by the accumulation of oxidized LDL-C becomes activated, promoting the release of different inflammatory mediators, including interleukins IL-1β and IL-6, and expressing different adhesion molecules (like sICAM-1 and sVCAM) (Steinberg, 2002). The activation of endothelial cells by some inflammatory cytokines, including IL-1β, induces the expression of the several adhesion molecules that are fundamental for adhesion, rolling and migration of leukocytes from the bloodstream to the lesion site (Khan et al., 2015). So, with the adhesion of monocytes to the activated endothelial layer, their transmigration

among intact cells takes place, initiating the atheromatous process (Swystun and Liaw, 2016). In this context, we believe that prolonged treatment with n-BFIP can reduce lipid and protein oxidation, and increase endothelial nitric oxide levels. These effects could significantly reduce endothelial damage and, consequently, the expression of IL-1β, IL-6, sICAM-1 and sVCAM-1, reducing the progression of the atherosclerotic disease (Fig. 8).

A potential limitation of our study was the lack of accurate identification of the secondary metabolites directly involved in the cardioprotective effects of n-BFIP. It has been shown that n-BFIP concentrates large amounts of CGAs, glycosylated flavonoids and ursolic acid saponins. Studies have shown that the interaction among CGAs, flavonoids



**Fig. 4.** Representative cross-sections of the aortic arch stained with hematoxylin-eosin after 8 weeks of CRD and 4 weeks of treatment with n-BFIP (10, 30, 100 mg/kg) or simvastatin. Images in 40 x scale. C-: negative control group, C+: positive control group.

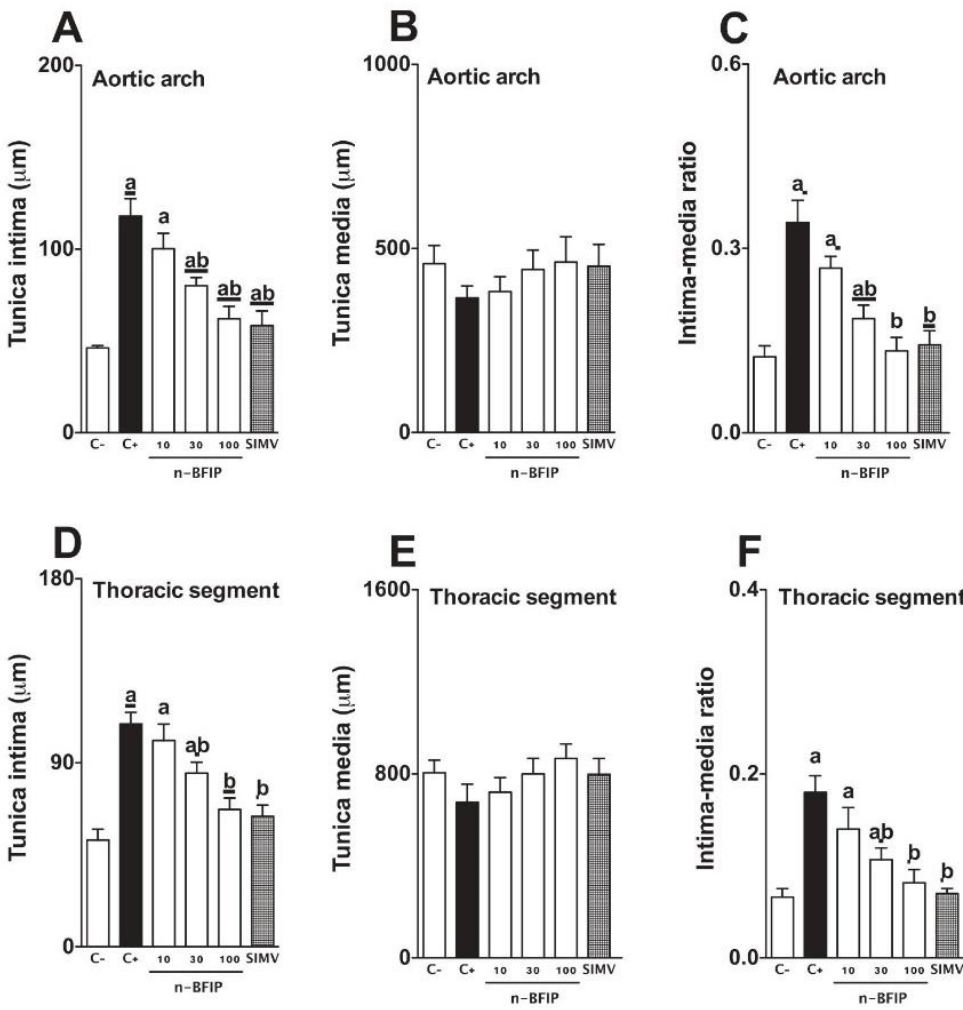


Fig. 5. n-BFIP treatment reduces arterial thickness in the aortic arch and thoracic segment from rabbits undergoing cholesterol-rich diet (CRD). Histomorphometric analyses of arterial tunica intima (A and D), media (B and E), and intima-media ratio (C-F) are disclosed. Values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6) in comparison to the C- (<sup>a</sup>p < 0.05) or C+ (<sup>b</sup>p < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni test. C-: negative control group, C+: positive control group.

and saponins can reduce serum lipid levels, have important antioxidant effects, and induce significant anti-inflammatory responses, reducing the production of interleukins IL-1β and IL-6 (for review see Bracesco et al., 2011; Cardozo Junior and Morand, 2016). Although we believe that the antiatherosclerotic effects presented in this study result from a

complex interaction among different secondary metabolites present in n-BFIP, the fact that there may be one or more responsible agents cannot be ruled out. Biomonitoring studies can help answer these questions and, if possible, identify the agent that stands out in this process.

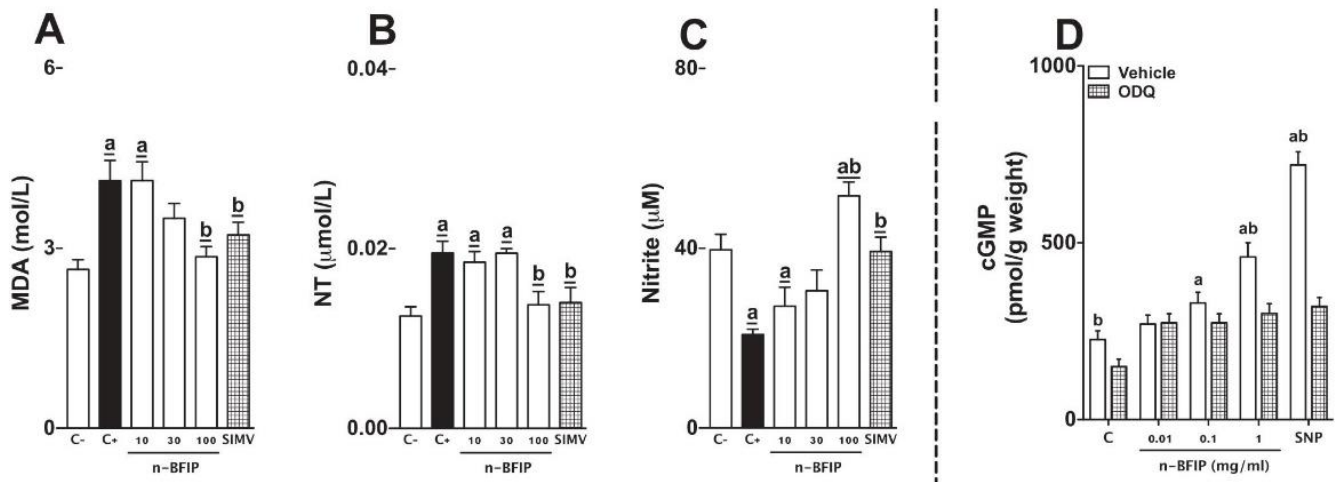


Fig. 6. N-BFIP reduces oxidative and nitrosative stress markers and increases NO-cGMP pathway in rabbit aortic rings. Serum concentration of MDA (A), nitrotyrosine (NT; B), nitrite (C), and intracellular cGMP levels (D) are presented. For MDA, NT, and nitrite levels values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6) in comparison with C- (<sup>a</sup>p < 0.05) or C+ (<sup>b</sup>p < 0.05) using one-way ANOVA followed by Bonferroni test. C-: negative control group, C+: positive control group. For cGMP levels data represent mean ± S.E.M. (n = 5) and were expressed in pmol/weight. p < 0.05 vs <sup>a</sup>control (C) or after incubation with <sup>b</sup>ODQ.



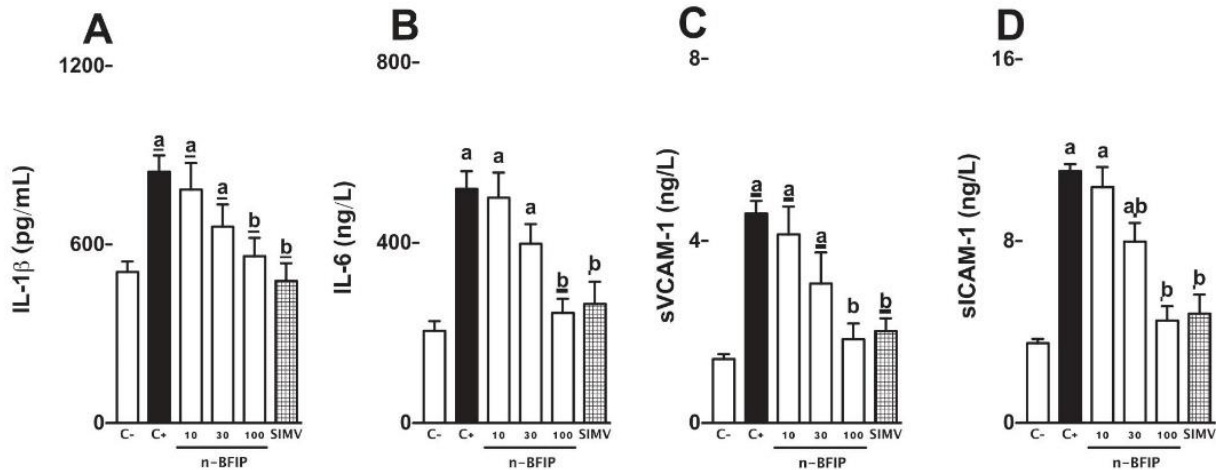


Fig. 7. Effects of n-BFIP on the interleukins and soluble adhesion molecules levels. Serum concentration of L-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), sVCAM-1 (C), and sICAM-1 (D) are presented. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ) in comparison with C- ( $^a p < 0.05$ ) or C+ ( $^b p < 0.05$ ) using one-way ANOVA followed by Bonferroni test. C-: negative control group, C+: positive control group.

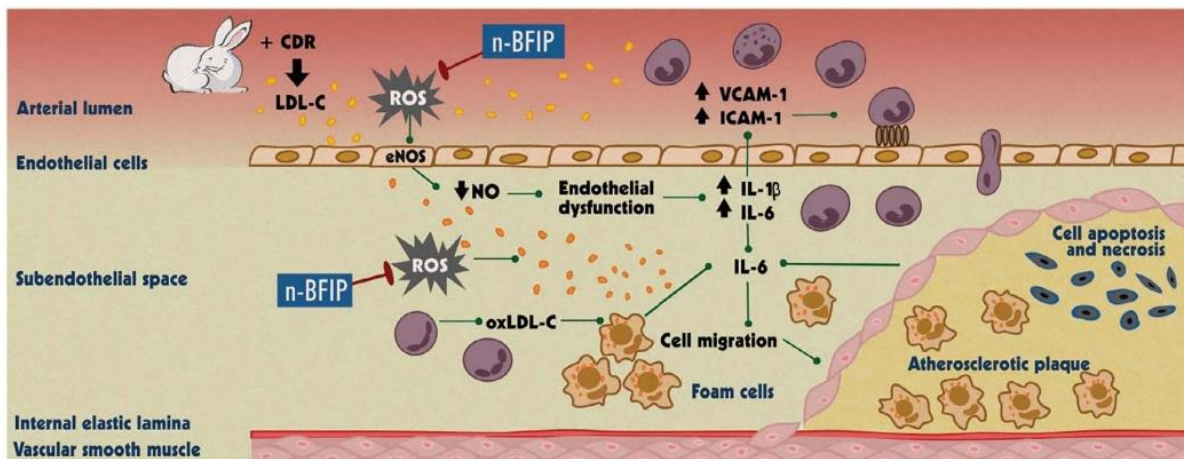


Fig. 8. Diagram showing the pathogenesis of atherosclerosis and the likely sites of n-BFIP action. CDR: cholesterol-rich diet; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; IL-1: interleukin 1; IL-6: interleukin 6; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; n-BFIP: butanolic fraction from *Ilex paraguariensis*; NO: nitric oxide; oxLDL-C: oxidized low density lipoprotein cholesterol; ROS: reactive oxygen species; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1.

In summary, the results presented allow us to highlight three important points. Firstly, it was shown that n-BFIP has secondary metabolites with antioxidant and antinitrosant properties, and as a consequence, may reduce the progression of the atherosclerotic disease. Secondly, the use of plasma markers as an indicator of progression or reduction of the atherosclerotic disease provides basic data that compose the first of three pillars of translational medicine (benchside, bedside and community), opening a perspective for its routine use in the medical clinic, as well as in population studies. Finally, this study presents n-BFIP as a plant-based new drug for the future development of a phytopharmaceutical, especially when a marked antioxidant effect is required.

## Conclusion

A 4-week n-BFIP treatment reduces the progression of the atherosclerotic disease in New Zealand rabbits. These effects are associated with an antioxidant and antinitrosant action, affecting IL-1 $\beta$ , IL-6, sICAM-1 and sVCAM-1 levels.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

We are grateful to Erva Mate Bitumirim Co. (Ivaí/PR) by assistance in collecting samples and to Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência, Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil, process no. 59/300.046/2015, and 88887.103413/2015-01), CAPES, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, process no. 449464/2014-8) for the financial support.

## References

- Andersen, T., Fogh, J., 2001. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *J. Hum. Nutr. Diet.* 14, 243–250.
- Arçari, D.P., Bartchewsky, W., dos Santos, T.W., Oliveira, K.A., Funck, A., Pedrazzoli, J., de Souza, M.F., Saad, M.J., Bastos, D.H., Gambero, A., Carvalho, P.O., Ribeiro, M.L., 2009. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 17, 2127–2133.
- Balzan, S., Hernandez, A., Reichert, C.L., Donaduzzi, C., Pires, V.A., Gasparotto Junior, A., Cardozo Junior, E.L., 2013. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. *Fitoterapia* 86, 115–122.
- Barboza, L.N., Lívero, F.A.R., Prando, T.B.L., Ribeiro, R.C.L., Lourenço, E.L.B., Budel, J.M., de Souza, L.M., Acco, A., Dalsenter, P.R., Gasparotto Junior, A., 2016. Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. in New Zealand rabbits fed with cholesterol-rich diet. *J. Ethnopharmacol.* 187, 134–145.
- Bracceso, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A., 2011. Recent



- advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J. Ethnopharmacol.* 136, 378–384.
- Cardozo Junior, E.L., Morand, C., 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. *J. Funct. Foods* 21, 440–454.
- Conceição, E.P., Kaezer, A.R., Peixoto-Silva, N., Felzenszwalb, I., de Oliveira, E., Moura, E.G., Lisboa, P.C., 2017. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) on the hypothalamic signalling of insulin and leptin and liver dysfunction in adult rats overfed during lactation. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 8, 123–132.
- Estancial, C.S., Rodrigues, R.L., De Nucci, G., Antunes, E., Mónica, F.Z., 2015. Pharmacological characterisation of the relaxation induced by the soluble guanylate cyclase activator, BAY 60-2770 in rabbit corpus cavernosum. *BJU Int.* 116 (4), 657–664.
- Gamboa-Gómez, C.I., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Moreno-Jiménez, M.R., Vázquez-Cabral, B.D., González-Laredo, R.F., 2015. Plants with potential use on obesity and its complications. *EXCLI J.* 14, 809–831.
- Gao, H., Liu, Z., Wan, W., Qu, X., Chen, M., 2013. Aqueous extract of Yerba Mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. *Phytother. Res.* 27, 1225–1231.
- Grigioni, G., Carduza, F., Irurueta, M., Pensel, N., 2004. Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. *J. Sci. Food Agric.* 84, 427–432.
- Heck, C.L., de Mejía, E.G., 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*), a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci* 72 R138–R151.
- Iliodromitis, E.K., Andreadou, I., Prokavas, E., Zoga, A., Farmakis, D., Fotopoulou, T., Ioannidis, K., Paraskevaidis, I.A., Kremastinos, D.T., 2010. Simvastatin in contrast to postconditioning reduces infarct size in hyperlipidemic rabbits: possible role of oxidative/nitrosative stress attenuation. *Basic. Res. Cardiol.* 105 (2), 193–203.
- Khan, R., Spagnoli, V., Tardif, J.C., L'Allier, P.L., 2015. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 240, 497–509.
- Kim, S.Y., Oh, M.R., Kim, M.G., Chae, H.J., Chae, S.W., 2015. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *BMC Complement. Altern. Med.* 15 (338), 1–8.
- Messina, D., Soto, C., Méndez, A., Corte, C., Kemnitz, M., Avena, V., Del Balzo, D., Pérez Elizalde, R., 2015. Lipid - lowering effect of mate tea intake in dyslipidemic subjects. *Nutr. Hosp.* 31, 2131–2139.
- Miller, S.J., 2001. Emerging mechanisms for secondary cardioprotective effects of statins. *Cardiovasc. Res.* 52 (1), 5–7.
- Mosimann, A.L.P., Wilhelm-Filho, D., Silva, E.L., 2006. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. *Biofactors* 26, 59–70.
- Muñoz-Culla, M., Sáenz-Cuesta, M., Guereca-Barandiaran, M.J., Ribeiro, M.L., Otaegui, D., 2016. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. *Food Funct* 7, 4556–4563.
- Olthof, M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131, 66–71.
- Pereira, A.A., Tirapeli, K.G., Chaves-Neto, A.H., da Silva Brasilino, M., da Rocha, C.Q., Belló-Klein, A., Llesuy, S.F., Dormelles, R.C., Nakamune, A.C., 2017. *Ilex paraguariensis* supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. *Exp. Gerontol.* 90, 14–18.
- Schmidt, H.H.H.W., Wilke, P., Evers, B., Böhme, E., 1989. Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 165, 278–284.
- Steinberg, D., 2002. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.* 8, 1211–1217.
- Swystun, L.L., Liaw, P.C., 2016. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood* 128, 753–762.

## 6. CONCLUSÕES

- Nesta pesquisa experimental, obtivemos uma fração butanólica da *I. paraguariensis* e caracterizamos quimicamente seus componentes bioativos responsáveis por suas atividades. Os compostos fenólicos predominaram no extrato e atribuímos sua atividade ao sinergismo de seus componentes.

- A análise das artérias demonstrou resultados bastante promissores quanto ao efeito antiaterogênico, sendo comparados aos efeitos da sinvastatina, fármaco amplamente utilizado no tratamento de hiperlipidemias com efeitos ateroprotetores.

- O mecanismo de ação pelo qual a n-FBIP atua na aterogênese pode ser atribuído às suas atividades antioxidante e anti-inflamatórias observadas durante o tratamento. Nesse âmbito, a n-FBIP demonstrou ser um candidato promissor para a formulação de futuros medicamentos fitoterápicos para a ateroproteção, podendo atuar também como coadjuvante no tratamento com as estatinas.

**7. ANEXO**

## 7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**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, 12 de agosto de 2015.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação das propriedades antiaterogênicas de uma fração enriquecida e padronizada de *Ilex paraguariensis* A. St-Hil. em coelhos Nova Zelândia submetidos à dieta hipercolesterolêmica”**, protocolo nº 09/2015, 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/UFGRD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 02 de junho de 2015.

Vigência do Projeto	Setembro/2015 – Abril/2016
Espécie/linhagem	Oryctolagus cuniculus / Var. Nova Zelândia
Nº de animais	36
Peso/idade	1,5 Kg/ 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Universidade Federal do Paraná - UFPR



---

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.  
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br