

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

Papéis das vias do óxido nítrico e das prostaglandinas nos efeitos anti-hipertensivos sustentados em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular tratadas com extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC.

RHANANY ALAN CALLOI PALOZI

**Dourados - MS
2018**

RHANANY ALAN CALLOI PALOZI

Papéis das vias do óxido nítrico e das prostaglandinas nos efeitos anti-hipertensivos sustentados em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular tratadas com extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC.

Área do CNPq: Etnofarmacologia (2.10.06.00-8)

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof.^a Dr. Arquimedes Gasparotto Junior

Dourados - MS
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P181p Palozi, Rhanany Alan Calloi

Papéis das vias do óxido nítrico e das prostaglandinas nos efeitos anti-hipertensivos sustentados em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular tratadas com extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC. / Rhanany Alan Calloi Palozi -- Dourados: UFGD, 2017.

47f. : 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

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 RHANANY ALAN CALLOI PALOZI, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 16 DE NOVEMBRO DE 2017.

Ao décimo sexto dia do mês de novembro do ano de dois mil e dezessete (16/11/2017), às 14h, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Papéis das vias do óxido nítrico e das prostaglandinas nos efeitos anti-hipertensivos sustentados em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular tratadas com extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC" apresentada pelo mestrando RHANANY ALAN CALLOI PALOZI, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (Presidente/orientador), Dra. Raquel dos Santos Donatini (membro titular/externo) e Dra. Virginia Demarchi Kappel Trichez (membro titular/programa). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato 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 o candidato considerado **APROVADO**, 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, 16 de novembro de 2017.

Dr. Arquimedes Gasparotto Junior _____

Dra. Raquel dos Santos Donatini _____

Dr. Virginia Demarchi Kappel Trichez _____

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

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais especiais de minha vida: Minha mãe Cláudia e meu pai Clóvis, pelos exemplos de vida que são. Meu irmão, Gabriel, pelo incentivo direto ou indireto.

Meu grande amor, Zara, por estar ao meu lado nos melhores momentos de minha vida e me ajudar a remover as pedras que surgiram em nossa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Aos meus pais, Cláudia e Clóvis, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam o melhor de todos, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez entregar o melhor de mim. Obrigado pelo amor incondicional! A meu irmão, Gabriel, pois, a sua maneira, sempre confiou em meu trabalho.

À minha querida mulher, Zara, por ser tão importante em minha vida. Sempre ao meu lado, me fazendo acreditar que posso mais que imagino, sempre. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigado por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Ao amigo e Professor Arquimedes, que acreditou em meu potencial de uma forma que eu não acredito ser capaz de corresponder. Sempre disponível e disposto a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver todo e qualquer tipo de conhecimento. Bunka, obrigado por tudo!

Aos meus amigos do laboratório, Aniely, Lucas, Maysa, Fran, Cleide, Paulo, Aline e Suzana pelos momentos divididos. Obrigado por compartilharem comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens durante aquelas semanas intermináveis de experimentos. Foi muito bom poder contar com vocês!

Todos vocês proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

Agir, eis a inteligência verdadeira.
Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?

(FERNANDO PESSOA)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do estrogênio	17
Quadro 1- Isoformas da NOS e suas respectivas funções	18
Quadro 2 – Classes e fármacos mais utilizados para tratamento da hipertensão arterial sistêmica	19
Figura 2 – Exemplar e distribuição geográfica de <i>Acanthospermum hispidum</i> DC	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ENAL	Enalapril
HCTZ	Hidroclorotiazida
ESAH	Ethanol Soluble Fraction of <i>Acanthospermum hispidum</i> DC ou Fração Etanólica Solúvel de <i>Acanthospermum hispidum</i> DC
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ou <i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
NO	Óxido Nítrico
PG	Prostaglandinas
OVT	Ovariectomia

Papéis das vias do óxido nítrico e das prostaglandinas nos efeitos anti-hipertensivos sustentados de *Acanthospermum hispidum* DC em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular tratadas com extrato aquoso

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônica multifatorial, definida por pressão arterial sistólica/diastólica superior a 140/90 mm Hg, que apresenta grande prevalência na população mundial, para o seu tratamento, além da utilização de terapias farmacológicas, uma alternativa terapêutica é a associação de medicamentos convencionais com diferentes produtos naturais. Nesse contexto está a *Acanthospermum hispidum* DC, uma planta medicinal que pertence à família Asteraceae cujas partes aéreas são utilizadas popularmente com fins diurético e anti-hipertensivo. Apesar da relevância desta espécie em todo o país, não há estudos detalhados que avaliaram seus efeitos em um modelo de hipertensão renovascular associada a ovariectomia (2K1C mais OVT). Assim, este estudo investigou os mecanismos envolvidos nos efeitos anti-hipertensivos de uma fração solúvel em etanol obtida a partir de *A. hispidum* (ESAH) utilizando 2K1C mais OVT como modelo. Cinco semanas após a cirurgia, a ESAH foi administrada por via oral em doses de 30, 100 e 300 mg/kg, diariamente, durante 28 dias. Enalapril (15 mg/kg) e hidroclorotiazida (25 mg/kg) foram utilizados como fármacos padrão. A atividade diurética foi avaliada nos dias 1, 7, 14, 21 e 28. Foram registradas a pressão arterial sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca. Também foram mensurados os níveis séricos de creatinina, uréia, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, nitrosamina, nitrito, aldosterona, vasopressina e a atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina (ECA). A reatividade vascular e os papéis do óxido nítrico (NO) e das prostaglandinas (PG) na resposta vasodilatadora da ESAH em leito vascular mesentérico (LVM) também foram investigadas. O tratamento com ESAH induziu uma resposta salurética e anti-hipertensiva importante, recuperando a reatividade vascular em ratas 2K1C mais OVT. Este efeito foi associado à redução do estresse oxidativo e nitrosativo com possível aumento da biodisponibilidade de NO. Além disso, também foi observado um efeito vasodilatador dependente de NO e PG em LVM.

Palavras-chave: *Acanthospermum hispidum* DC. Hipertensão. Antioxidante

Roles of nitric oxide and prostaglandins in the sustained antihypertensive effects of *Acanthospermum hispidum* DC. on ovariectomized rats with renovascular hypertension

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension is a chronic multifactorial disease, defined by systolic/diastolic blood pressure above 140/90 mm Hg, which presents a high prevalence in the world population, for its treatment, besides the use of pharmacological therapies, a therapeutic alternative is the combination of conventional medicines with different natural products. In this context is *Acanthospermum hispidum* DC, a medicinal plant that belongs to the Asteraceae family whose aerial parts are popularly used for diuretic and antihypertensive purposes. Despite the relevance of this species throughout the country, there are no detailed studies that evaluated its effects in a model of renovascular hypertension associated with ovariectomy (2K1C plus OVT). Thus, this study investigated the mechanisms involved in the antihypertensive effects of a soluble ethanol fraction obtained from *A. hispidum* (ESAH) using 2K1C plus OVT as a model. Five weeks after surgery, ESAH was administered orally at doses of 30, 100 and 300 mg / kg daily for 28 days. Enalapril (15 mg / kg) and hydrochlorothiazide (25 mg / kg) were used as standard drugs. Diuretic activity was assessed on days 1, 7, 14, 21 and 28. Systolic, diastolic and mean blood pressure and heart rate were recorded. Serum levels of creatinine, urea, thiobarbituric acid, nitrosamine, nitrite, aldosterone, vasopressin and plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity were also measured. Vascular reactivity and the roles of nitric oxide (NO) and prostaglandins (PG) in the vasodilator response of ESAH to mesenteric vascular bed (MVB) were also investigated. Treatment with ESAH induced a significant saline and antihypertensive response, recovering vascular reactivity in 2K1C plus OTV rats. This effect was associated to the reduction of oxidative and nitrosative stress with possible increase of NO bioavailability. In addition, a vasodilatory effect dependent on NO and PG was also observed in LVM.

Keywords: *Acanthospermum hispidum* DC. Hypertension. Antioxidant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL	15
2.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA	15
2.3 ESTROGÊNIO E CLIMATÉRIO	16
2.4 ÓXIDO NÍTRICO	18
2.5 PROSTAGLANDINAS	19
2.6 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA HIPERTENSÃO	19
2.7 PLANTAS MEDICINAIS	20
2.8 <i>Acanthospermum hispidum</i> DC.	22
3 OBJETIVOS	23
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5 APÊNDICES	30
5.1 Artigo 1:	31
Roles of Nitric Oxide and Prostaglandins in the Sustained Antihypertensive Effects of <i>Acanthospermum hispidum</i> DC. on Ovariectomized Rats with Renovascular Hypertension – Publicado na revista “ Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM) ” (B1: Fator de Impacto = 1,740).	
6 ANEXOS	46
6.1 Aprovação do Comitê de ética (CEUA)	47

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença multifatorial crônica, definida por pressão arterial sistólica/diastólica superior a 140/90 mm Hg, que apresenta grande prevalência na população mundial. Os fatores de risco para o desenvolvimento da enfermidade são idade (idosos de uma forma geral), sexo (homens adultos e idosos e mulheres na pós-menopausa), histórico familiar, raça (principalmente negros), obesidade, estresse, vida sedentária, alcoolismo, tabagismo e alimentação rica em sódio e em gorduras saturadas (PESSUTO et al., 1998). Na tentativa de reduzir a incidência da HAS, terapias medicamentosas e não medicamentosas como o exercício físico, por exemplo, são empregadas rotineiramente (ZANESCO; ZAROS, 2009). Dentre as ações medicamentosas, uma alternativa terapêutica é a associação de medicamentos convencionais com diferentes produtos naturais, que vem se destacando nos últimos anos no campo científico (VII DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2016).

No Brasil, estudos populacionais apontam uma prevalência de HAS acima de 30% em adultos, já em idosos esse número sobe para mais de 60%. Além disso, 50% das mortes por doenças cardiovasculares tem participação direta ou indireta da HAS (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015). No que diz respeito aos idosos, o envelhecimento acarreta alterações estruturais e funcionais no sistema cardiovascular. Uma das consequências do envelhecimento é o estresse oxidativo, uma alteração do estado redox celular, apontado como a maior via de dano aos componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, provocando a morte celular e a instalação ou progressão das doenças cardiovasculares. (MULLER-SCHWEINITZER et al., 2010). Além das alterações fisiopatológicas genéticas relacionadas ao envelhecimento, as mulheres ainda enfrentam um outro fator agravante, a redução da produção do estrogênio, hormônio que além de outras funções, apresenta efeitos antioxidante e cardioprotetor muito importantes. A queda dos níveis séricos desse hormônio associada ao avanço da idade, a redução da atividade física e ao enrijecimento arterial podem ser os responsáveis pelo aumento da pressão arterial e do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em mulheres na menopausa (MASS; FRANKE, 2009).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido a pobreza e a falta de acesso à medicina moderna, cerca de 65% a 80% da população mundial que vive nos países em desenvolvimento depende essencialmente de produtos naturais para os cuidados primários de saúde. Além disso, é cada vez mais crescente o interesse que as indústrias farmacêuticas têm por plantas com uso medicinal tradicional para o desenvolvimento de fitoterápicos

(CALIXTO, 2000). O Brasil possui grande variedade de plantas medicinais que estão distribuídas por todo o território nacional. Muitas delas são utilizadas pela população sem a validação científica de sua eficácia, mecanismos de ação e aspectos toxicológicos. Dentre elas figura a *Acanthospermum hispidum* DC, espécie pertencente à família Asteraceae, que está distribuída por toda a América do Sul, inclusive o Brasil. A planta é conhecida popularmente como “carrapicho-de-carneiro”, “espinho-de-cigano” e “espinho-de-carneiro”; suas flores, caule e as folhas são amplamente utilizadas como medicamento popular, contudo, embora alguns efeitos farmacológicos da planta já tenham sido descritos, sabe-se muito pouco sobre a eficácia e o mecanismo de ação deste extrato vegetal e, ainda assim, é possível encontrar preparações com a planta em lojas que comercializam produtos naturais (ARAUJO et al., 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença multifatorial crônica e não transmissível, definida pela elevação sustentada da pressão arterial sistólica e diastólica para cifras iguais ou superiores a 140 e/ou 90 mm Hg, que apresenta grande prevalência na população mundial. Os fatores de risco para o desenvolvimento da enfermidade são idade (idosos de uma forma geral), sexo (homens adultos e idosos e mulheres na pós-menopausa), histórico familiar, raça (principalmente negros), obesidade, estresse, vida sedentária, além de múltiplos fatores genéticos (LEWINGTON et al, 2003; WEBER, 2014). As doenças crônicas representaram mais de 72% do total de mortes no Brasil em 2013, sendo que 40,9% do total, são óbitos em decorrência de doenças cardiovasculares (SIM/SVS/MS, 2015). No Brasil, a HAS atinge 32,5% dos indivíduos adultos, sendo que contribui direta ou indiretamente para 50% das mortes por doenças cardiovasculares (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015). Em pacientes portadores da HAS, devido ao aumento da pressão intra-arterial e consequentemente da distensão das paredes arteriais, ocorre um fenômeno conhecido como remodelamento vascular, evento que é caracterizado pela hipertrofia das paredes vasculares e tem a finalidade de se adaptar ao aumento da pressão gerada dentro do vaso sanguíneo, contudo, com o avanço da HAS, este acontecimento é seguido de alterações estruturais e funcionais, que contribuem para que a pressão arterial se mantenha elevada e gere importantes complicações vasculares como, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca, acidente vascular encefálico, infarto e insuficiência renal (BLACHER et al., 1998; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001; VII DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2016).

2.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é uma das ferramentas que nosso organismo dispõe para efetuar o controle da pressão arterial, sua cascata de reações tem início quando há uma queda na pressão arterial e consequentemente, a pressão de perfusão renal também é diminuída, ocorre então a síntese e posterior secreção da renina pelas células justaglomerulares que circundam a arteríola aferente do glomérulo renal. A renina é sintetizada como pró-renina, e posteriormente, formada pela remoção proteolítica de 43 aminoácidos da porção terminal N da pró-renina, então a renina é armazenada nas células

justaglomerulares e é liberada por exocitose, a secreção de renina é regulada por alguns fatores, como por exemplo: a) barorreceptores renais na arteríola aferente que detecta mudanças na pressão de perfusão renal, b) mudanças na concentração de cloreto de sódio detectadas pelas células da mácula densa do túbulo distal (que se encontram perto das células justaglomerulares e, juntas, formam o "aparelho ou aparato justaglomerular"), c) estimulação nervosa simpática através de receptores adrenérgicos do tipo beta-1 (BROWN, 2006). Uma vez na circulação sistêmica, a renina atua sobre o angiotensinogênio, sintetizado pelo fígado, para produzir a angiotensina I, que por ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), é transformada em angiotensina II. A ECA também inativa a bradicinina, reduzindo o nível sérico de vasodilatadores endógenos. A angiotensina II por sua vez, é que detém o efeito vasoconstritor gerado por esse sistema, a angiotensina II aumenta a pressão arterial por uma série de ações, sendo as mais importantes a vasoconstrição, estimulação nervosa simpática, aumento da síntese de aldosterona e conseqüentemente ações renais (FYHRQUIST; METSÄRINNE; TIKKANEN, 1995).

2.3 Estrogênio e climatério

Os estrogênios são sintetizados principalmente nos ovários, corpos lúteos e placenta, embora uma pequena, mas significativa, quantidade dos estrogênios também possam ser produzidos por órgãos como fígado, coração, pele e cérebro. Os estrogênios são divididos em três formas principais: estrona (E1), estradiol (E2 ou 17 β -estradiol) e estriol (E3). Cada forma apresenta diferentes produtos produzidos a partir de colesterol por reações em série ao longo da biossíntese de estrogênio. O E2 é o principal produto de todo o processo e é o estrogênio mais potente durante o período pré-menopausa na vida de uma mulher, enquanto que a E1 desempenha um papel maior após a menopausa. Já o E3 é o estrogênio menos potente e desempenha um papel maior durante a gravidez quando é produzido em grandes quantidades pela placenta. A síntese de estrogênios é uma característica essencialmente ovariana de mulheres saudáveis em fase reprodutiva, e a intensidade da síntese de estrogênio depende da fase reprodutiva em que a mulher se encontra e atinge seus níveis máximos durante o período de pós-menarca e pré-menopausa, e diminui consideravelmente durante o climatério e no período de pós-menopausa, onde os níveis séricos de E2 e E1 diminuem em 85 - 90% e 65 - 75% respectivamente (STRICKER et al, 2006; CUI; SHEN; LI, 2009).

O climatério é o período sintomático que surge na transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva, já a menopausa é a cessação permanente da menstruação e, por conseguinte, os níveis dos hormônios ovarianos (estrogênio e progesterona) também caem

significativamente (SHERWIN, 2001; SPINELLI, 2004). Este fenômeno ocorre entre os 45 e 60 anos de idade, e parece ser geneticamente determinado. Porém, fatores ambientais exercem representativo efeito, por exemplo, mulheres que fumam, entram na menopausa mais cedo quando comparadas àquelas que não fazem uso de tabaco (ADENA et al,1982). Mulheres que sofreram algum tipo de procedimento cirúrgico em seus ovários ou foram submetidas à uma histerectomia parcial, apesar da retenção de seus ovários, também podem sofrer menopausa precoce (SIDDLE; SARREL; WHITEHEAD, 1987). As principais consequências da menopausa estão relacionadas à deficiência de estrogênio (**Figura 1**). Os principais sintomas que atingem a saúde da mulher na menopausa incluem problemas vasomotores, atrofia urogenital, osteoporose, câncer, sintomas psiquiátricos, declínio cognitivo, problemas sexuais, doenças cardiovasculares, além de ser importante fator de risco para o aumento do estresse oxidativo (TREVISAN et al, 2001; BAQUER et al, 2009; AQUINO et al 2012; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ et al, 2012; DALAL; MANU, 2015).

De fato, compostos antioxidantes sugeriram efeito benéfico contra os sintomas da menopausa (MIQUEL et al, 2006). Além de atuar como hormônio sexual, o estrogênio contém um grupo fenol que foi eficaz ao reduzir o estresse oxidativo “in vitro” e “in vivo” (BEDNAREK-TUPIKOWSA et al, 2004; UNFER et al, 2006; WÓJCIK; KOSIOR-KORZECKA; BOBOWIEC, 2010; UNFER et al, 2014). Também já é bem estabelecido que a administração de estrogênio tem efeito cardioprotetor muito importante, não só no controle do estresse oxidativo, mas também na redução da progressão da placa aterosclerótica em aortas de coelho (FISCHER; SWAIN, 1985).

É também na fase de climatério onde a proporção de mulheres acometidas pela HAS é maior que a de homens, justamente pela queda da produção do estrógeno. O que ocorre é que, o sistema cardiovascular masculino se adapta às alterações fisiológicas que surgem durante toda a sua vida, já as mulheres não detém esse mecanismo fisiológico adaptativo, pois possuem a proteção exercida pelo estrógeno, uma vez que ocorre a cessação da produção do hormônio, ou seja, quando entram na fase de climatério e posteriormente na menopausa, o sistema cardiovascular feminino fica desprotegido e passa a sofrer mais das complicações impostas pela idade quando comparadas aos homens (KANNEL et al, 1976).

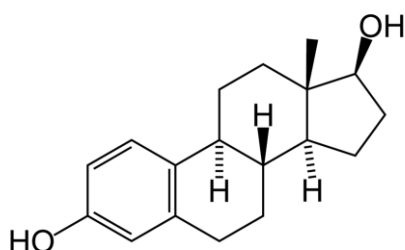


Figura 1 - Estrutura química do estrogênio

2.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é a menor molécula de sinalização biológica conhecida, é produzido pelas três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), sendo elas, NOS induzida (iNOS ou NOS II) e duas NOS constitutivas, a neuronal (nNOS ou NOS I) e a endotelial (eNOS ou NOS III). Todas isoformas utilizam a l-arginina e o oxigênio molecular como substratos. No sistema circulatório, em particular na coagulação sanguínea, o NO está envolvido com a cascata fibrinolítica e trombótica associados com dano endotelial, sendo que as propriedades antitrombóticas do NO resultam em parte da inibição da adesão e agregação plaquetária (KUROKI; SCHROEDER, 1995). A deficiência de NO foi associada com trombose arterial (LOSCALZO, 2001). As principais funções de cada isoforma das NOS estão apresentadas na **tabela 1**.

Isoforma da óxido nítrico sintase (NOS)	Principais funções
nNOS ou NOS I	Plasticidade sináptica, regulação central da pressão arterial, relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação através de nervos ou neurônios nitrérgicos (células nervosas onde as transmissões são mediadas pelo NO).
iNOS ou NOS II	Possui efeito citostático, causando fragmentação de DNA e atua em parasitas e células tumorais.
eNOS ou NOS III	Mantém os vasos sanguíneos dilatados, controla a pressão arterial e tem muitos outros efeitos vasoprotetores e antiateroscleróticos.

Quadro 1 – Isoformas da NOS e suas respectivas funções. (Adaptado de 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

A eNOS é uma enzima constitutiva e produz NO no endotélio vascular em condições fisiológicas normais, além disso, o estresse de cisalhamento produzido pelo fluxo sanguíneo pode aumentar sua produção. O NO liberado na luz vascular é um potente inibidor de adesão e agregação plaquetária na parede vascular e também inibe a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, inibe a proliferação de células da musculatura lisa vascular e, também é responsável pela regulação da pressão sanguínea e contratilidade do músculo cardíaco (FÖRSTERMANN et al, 1994; MURREL et al, 1996). Sua expressão é restrita a células endoteliais vasculares, embora existam relatos da sua localização no hipocampo (WONG; MARSDEN, 1996).

2.5 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) fazem parte de uma grande família de compostos endógenos, denominados eicosanoides que são encontradas em quase todos os tecidos de mamíferos. As diferenças estruturais entre as PGs são responsáveis por suas diferentes atividades biológicas. Uma prostaglandina pode ter efeitos diferentes e até mesmo opostos em diferentes tecidos em alguns casos. A capacidade da mesma PG em estimular uma reação em um tecido e inibir a mesma reação em outro tecido é determinada pelo tipo de receptor ao qual a PG se liga, além disso, atuam como fatores autócrinos ou parácrinos com suas células alvo presentes nas imediações do local de sua secreção, visto que sua meia vida é relativamente curta. As prostaglandinas diferem dos hormônios endócrinos pois não são produzidas em um local específico, mas em muitos lugares ao longo do corpo humano (VASQUEZ; MOUCLIS; DENNIS, 2017). A síntese das PGs inicia-se com a fosfolipase A2 (PLA2) hidrolisando fosfolipídios da membrana, formando assim o ácido araquidônico, que é utilizado como substrato para duas vias enzimáticas, a via das cicloxigenases (COXs), que desencadeiam a síntese das prostaglandinas e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases (LOXs), responsável pela síntese dos leucotrienos. Existem quatro principais prostaglandinas geradas nesse processo: prostaglandina E2 (PGE2), prostaciclina (PGI2), prostaglandina D2 (PGD2) e prostaglandina F2a (PGF2a) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Na maioria dos vasos sanguíneos, as PGE2 são potentes vasodilatadores, e este efeito envolve principalmente arteríolas, esfíncteres pré-capilares e vênulas pós-capilares, nos vasos mesentéricos, nas coronárias e nos rins.

2.6 Tratamentos disponíveis para hipertensão

Atualmente existe uma vasta gama de opções para o tratamento da HAS, sejam essas medicamentosas ou não. Entretanto, por se tratar de uma doença crônica cujo tratamento deve ser prolongado, alguns efeitos colaterais podem ser observados em parte dos pacientes. Dentre os tratamentos medicamentosos dispõe-se de vasto arsenal farmacológico (THOMOPOULOS; PARATI; ZANCHETTI, 2015) apresentados na tabela abaixo:

Anti-hipertensivos disponíveis	
Classe	Fármacos mais utilizados
Diuréticos	Hidroclorotiazida, clortalidona.

Inibidores adrenérgicos de ação central	Clonidina, metildopa.
Inibidores adrenérgicos de ação periférica	Carvedilol, nebivolol, propranolol, doxazosina, prazosina.
Vasodilatadores diretos	Minoxidil, hidralazina.
Inibidores da renina	Alisquireno.
Inibidores da enzima conversora da angiotensina	Captopril, enalapril.
Antagonistas dos canais de cálcio	Amlodipino, nifedipino, felodipino.
Antagonistas do receptor da angiotensina II	Valsartan, losartan, telmisartan.

Quadro 2 – Classes e fármacos mais utilizados para tratamento da hipertensão arterial sistêmica. (Adaptado de 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

Alguns efeitos adversos da terapêutica medicamentosa são fraqueza, câimbras, hipovolemia e disfunção erétil, hipocalemia, arritmias ventriculares, efeito rebote com a descontinuação do tratamento, astenia, cefaleia, broncoespasmo, tosse seca, dentre outros (VII DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2016). Quanto ao tratamento não medicamentoso estão balanço ponderal (relação estabelecida entre o gasto energético e as calorias ingeridas na dieta), padrão alimentar, controle do peso, diminuição do consumo de sódio (principalmente sal de cozinha), prática de atividades físicas, cessação do tabagismo, controle de estresse, redução do consumo de etanol, dentre outras. Algumas ações não medicamentosas têm efeito benéfico somente em pré-hipertensos (pressão sistólica entre 121 mm Hg até 139 mm Hg e pressão diastólica entre 81 mm Hg até 89 mm Hg) como é o caso de exercícios físicos dinâmicos e estáticos, já exercícios aeróbicos tem efeito tanto em hipertensos como em pré-hipertensos. A utilização dessa classe de exercícios físicos é importante tanto para a prevenção quanto para o tratamento da HAS (CORNELISSEN; SMART, 2013).

2.7 Plantas medicinais

Na última década, os produtos naturais à base de plantas ganharam mais popularidade, e agora são usados por aproximadamente 20% da população americana. Produtos à base de plantas são fitocomplexos compostos de substâncias químicas orgânicas oriundas de qualquer parte da planta, incluindo caule, folhas, flores, raízes ou sementes. Embora as plantas medicinais sejam muitas vezes vistas como produtos naturais e, portanto, sem risco à saúde, sua eficácia e possíveis efeitos tóxicos devem ser avaliados, pois podem conter compostos tóxicos e contaminantes que podem por si só gerar danos à saúde de quem os consome como

também causar interações com outras drogas (WACHTEL-GALOR; BENZIE, 2011). No ano de 2013 a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou a “Estratégia de Medicina Tradicional 2014 – 2023” um documento que trata de padronizar, identificar e definir conceitos ligados à medicina tradicional. Além disso, esse guia estabelece como implementar políticas de funcionamento e gestão dessas redes de processamento e distribuição de produtos naturais, fato muito importante, principalmente para países subdesenvolvidos, onde a maioria da população depende do uso de produtos de origem natural (animal, vegetal ou mineral) para sanar suas mazelas (WHO, 2013).

O comércio de produtos naturais possui substancial participação na economia de vários países. Em 2004 os sul-coreanos investiram 4,4 bilhões de dólares em produtos naturais, chegando a 7,4 bilhões de dólares em 2009 (WHO, 2012). Já nos Estados Unidos o gasto com produtos naturais foi de 14,8 bilhões de dólares em 2008 (NAHIN et al., 2009). A produção de matéria natural para fins medicinais na China foi estimada em 83,1 bilhões de dólares em 2012, um aumento de mais de 20% em relação ao ano anterior (NATIONAL DEVELOPMENT AND REFORM COMMISSION OF CHINA, 2013). Nesse contexto, o Brasil destaca-se no cenário mundial por possuir ampla extensão territorial e biodiversidade, porém, infelizmente devido aos poucos estudos na área, das mais de 300 mil espécies encontradas nas formações vegetais brasileiras, somente uma pequena porcentagem tem suas propriedades terapêuticas conhecidas e exploradas comercialmente.

No ano de 2011, a venda mundial de fitoterápicos compôs cerca de 3,2% do total de medicamentos vendidos no mundo, desses, 30% foram consumidos no mercado europeu e, por incrível que pareça, somente 5% ficaram por conta dos países da América Latina, que é composta por sete países com grande biodiversidade. No mesmo ano, a venda nacional de medicamentos foi de aproximadamente R\$ 58 bilhões. Já o comércio de fitoterápicos obteve uma tímida movimentação de R\$ 1,1 bilhão (WHO, 2012; ALVES, 2013; SINDUSFARMA, 2014) desse modo, a pesquisa por novas fontes de matérias-primas destinadas à obtenção de fármacos, embora imatura, constitui campo de trabalho de alta relevância no Brasil (CALIXTO, 2000; CARDOZO JUNIOR, 2008). O apelo popular das plantas medicinais pode atuar como coadjuvante na correta conduta do tratamento e conseqüentemente em melhor qualidade de vida de indivíduos hipertensos, visto que o controle da HAS é inadequado, seja por conta dos efeitos colaterais gerados pelos medicamentos ou pela baixa adesão ao tratamento farmacológico (de 40% a 60% dos pacientes hipertensos não fazem uso da medicação prescrita) (HIGGINS; REGAN, 2004).

2.8 *Acanthospermum hispidum* DC.

No Brasil, cerca de 64% do pantanal está localizado no estado de Mato Grosso do Sul-MS, onde diferentes populações indígenas e ribeirinhas coabitam neste ecossistema, e preservam profundo conhecimento sobre os benefícios de várias espécies medicinais nativas da região (OLIVEIRA; RESENDE; MARTINS, 2011). Este conhecimento etnofarmacológico é de fundamental importância para a descoberta de espécies que possuam atividade farmacológica, mas com o passar dos anos devido ao êxodo rural, falta de interesse dos jovens e do desenvolvimento tecnológico, vem sendo perdido (BIESKI et al., 2012). Uma espécie que figura dentre as várias existentes no pantanal é a *Acanthospermum hispidum* DC. (**Figura 2**), uma planta medicinal pertencente à família Asteraceae e popularmente conhecida como "carrapicho", "espinho-de-cigano" e "chifre-de-carneiro". No pantanal sul-mato-grossense, a infusão de suas partes aéreas é popularmente utilizada como agente antiespasmódico, antitussígeno e diurético (BIESKI et al., 2012; OLIVEIRA; RESENDE; MARTINS, 2011), em outras regiões do país, a planta é usada para tratar asma, bronquite, febre, hipertensão e dor intestinal (ARAÚJO et al., 2008), essa planta também possui outras atividades biológicas comprovadas como, antimicrobiana (FLEISCHER; AMEADE; SAWER, 2003; ARENA et al., 2011), antiviral (SUMMERFIELD et al., 1997), antidiarreica (AGUNU et al., 2005), antitumoral (MOTHANA et al., 2009) e antiparasitária (GANFON et al., 2012; KOUKOUKILA-KOUSSOUNDA et al., 2013). A *A. hispidum* apresenta diferentes metabólitos secundários, incluindo lactonas sesquiterpênicas (CARTAGENA et al., 2000), polióis, saponinas, alcalóides, polifenóis (NAIR; SUBRAMANAN; BOHLMANN, 1976; ODEBIYI; SOFOWORA, 1978; SULTANBAWA et al., 1978), óleos voláteis (ALVA et al., 2012) e compostos derivados do ácido clorogênico (TIRLONI et al., 2017). Embora estudos toxicológicos conduzidos com esta espécie apresentem alguns efeitos tóxicos como esteatose e necrose hepática, congestionamento e hemorragia cardíaca, pulmonar e esplênica (ALI; ADAM, 1978) além de efeitos teratogênicos (LEMONICA; ALVARENGA, 1994), não foi possível traçar um comparativo devido à falta de informações apresentadas nesses estudos, além disso, as condições experimentais e até mesmo o modo de preparo do extrato são diferentes. Um estudo publicado recentemente, utilizando o sobrenadante etanólico do infuso de *A. hispidum* como droga vegetal, não mostrou nenhum sinal de toxicidade aguda em ratos wistar que possa ser exercido pela espécie (TIRLONI et al., 2017).

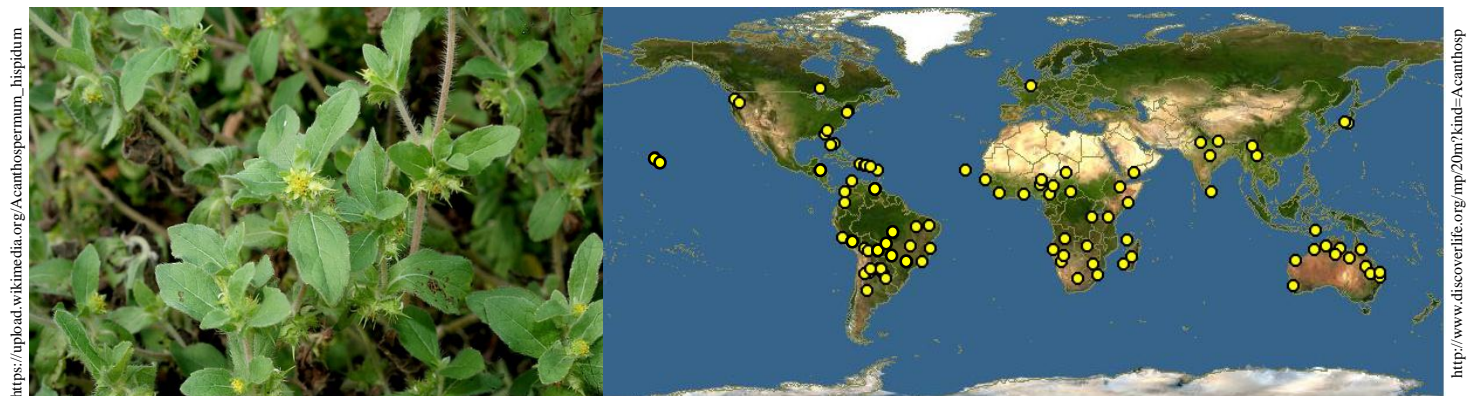


Figura 2 – Exemplar e distribuição geográfica de *Acanthospermum hispidum* DC

3 OBJETIVOS

GERAL

Investigar os efeitos renal e cardioprotetores do extrato aquoso obtido de partes aéreas de *Acanthospermum hispidum* DC em ratas ovariectomizadas e com hipertensão renovascular.

ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização fitoquímica do extrato aquoso obtido de *Acanthospermum hispidum* DC;
- Induzir a hipertensão arterial sistêmica e a ovariectomia em ratas da linhagem Wistar utilizando o modelo de Goldblatt (2K1C);
- Realizar tratamento oral das ratas por 28 dias com diferentes doses (30, 100 e 300 mg/kg) do extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC;
- Mensurar, semanalmente, a atividade diurética e a evolução da pressão arterial sistólica;
- Avaliar a pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca após o tratamento prolongado com o extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC;
- Dosar os níveis séricos de aldosterona, vasopressina, e a atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina (ECA);
- Avaliar a reatividade vascular em leito mesentérico isolado de animais tratados com diferentes doses do extrato aquoso de *Acanthospermum hispidum* DC, incluindo os seus mecanismos de ação;
- Analisar os níveis de marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo além dos níveis de nitrosamina e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico nos diferentes grupos experimentais.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adena M.A.; Gallagher H.G; Cigarette smoking and the age at menopause. **Annals of Human Biology**, v. 9, p. 121–130, 1982.

Agunu, A.; Yusuf S.; Andrew G.O.; Zezi A.U.; Abdurahman E.M. Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 27-30, 2005.

Ali B.; Adam S.; Toxicity of *Acanthospermum hispidum* to mice. **Journal of comparative pathology**, v. 88, p. 443-448, 1978.

Alva M.; Popich S.; Borkosky S.; Cartagena E.; Bardón A. Bioactivity of the essential oil of an argentine collection of *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae). **Natural Products Communications**, v. 7, p. 245-248, 2012.

Alves, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: Histórias, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 450-513, 2013.

Aquino E.M.; Barreto S.M.; Bensenor I.M.; Carvalho M.S.; Chor D.; Duncan B.B.; Lotufo P.A.; Mill J.G.; Molina Mdel C.; Mota E.L.; Passos V.M.; Schmidt M.I.; Szklo M. Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): Objectives and design. **American Journal of Epidemiology**, v. 175, p. 315-324, 2012.

Arena M.E.; Cartagena E.; Gobbato N.; Baigori M.; Valdez J.C.; Bardon A. In vivo and in vitro antibacterial activity of acanthospermal B, a sesquiterpene lactone isolated from *Acanthospermum hispidum*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 597-602, 2011.

Araújo E.L.; Randau K.P.; Sena-Filho J.G.; Pimentel R.M.M.; Xavier H.S. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 18, p.777-784, 2008.

Baquer N.Z.; Taha A.; Kumar P.; McLean P.; Cowsik S.M.; Kale R.K.; Singh R.; Sharma D. A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders. **Biogerontology**, v. 10, p. 377-413, 2009.

Bednarek-Tupikowska G.; Bohdanowicz-Pawlak A.; Bidzinska B.; Bohdanowicz-Pawlak A.; Antonowicz-Juchniewicz J.; Kosowska B.; Milewicz A. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. **Gynecological Endocrinology**, v. 19, p. 57-63, 2004.

Bieski I.G.; Rios Santos F.; Oliveira R.M.; Espinosa M.M.; Macedo M.; Albuquerque U.P.; Martins D.T.O. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.1-36, 2012.

Blacher J.; Pannier B.; Guerin A.P.; Marchais S.J.; Safar M.E.; London G.M. Carotid arterial stiffness as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease. **Hypertension**, v.32, p. 570-574, 1998.

Brown M.J. Direct renin inhibition—a new way of targeting the renin system. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, n. 6, p. 7-11, 2006.

Cartagena E.; Bardon A.; Catalan C.A.; Hernández Z.N.J.; Hernández L.R.; Joseph-Nathan P. Germacranolides and a new type of guaianolide from *Acanthospermum hispidum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1323-1328, 2000.

Calixto, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.

Cardozo Junior, E. L. 48° Congresso Brasileiro de Olericultura. **Projeto Itaipu de plantas medicinais**. 2008

Cornelissen V.A.; Smart N.A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, p. 1-39, 2013.

Cui J.; Shen Y.; Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. **Trends in molecular medicine**, n. 19(3), p. 197-209, 2013.

Dalal, P.K.; Manu A. Postmenopausal Syndrome. **Indian Journal of Psychiatry**, n. 57, p. 222-232, 2015.

Fischer G.M.; Swain M.L. Effects of estradiol and progesterone on the increased synthesis of collagen in atherosclerotic rabbit aortas. **Atherosclerosis**, v. 5, p. 177-185, 1985.

Förstermann U.; Closs E.I.; Pollock J.S.; Nakane M.; Schawarz P.; Gath I.; Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, n. 23(part 2), p. 1121-31, 1994.

Fleischer T.C.; Ameade E.P.; Sawyer I.K. Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 130-132. 2003.

Fyhrquist F.; Metsärinne K.; Tikkanen I. Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. **Journal of Human Hypertension**, n. 9 (5), p. 19-24, 1995.

Ganfou H.; Bero J.; Tchinda A.T.; Gbaguidi F.; Gbenou J.; Moudachirou M.; Frédéricichb M.; Quetin-Leclercq J. Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 411-417, 2012.

Higgins N.; Regan C. A systematic review of the effectiveness of interventions to help older people adhere to medication regimes. **Age and Ageing**, v. 33, n. 3, 2004

Intengan H.D.; Schiffrin E.L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**, v. 38, p. 581-587, 2001.

Kannel W.B.; Hjortland M.C.; McNamara P.M.; Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. **Annals of Internal Medicine**, v. 85, P. 447-52, 1976.

Koukouikila-Koussounda F.; Abena A.A.; Nzoungani A.; Mombouli J.V.; Ouamba J.M.; Kun J.; Ntoumi F. In vitro evaluation of antiplasmodial activity of extracts of *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) and *Ficus thonningii* Blume (Moraceae), two plants used in traditional medicine in the Republic of Congo. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 10, p. 270-276, 2013.

Kuo P.C.; Schroeder R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery**, n.221, p. 220-35, 1995.

Lemonica I.; Alvarenga C. Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC. and *Cajanus cajan* (L.) Millps. in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 39-44, 1994.

Lewington S.; Clarke R.; Qizilbash N.; Peto R.; Collins R. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual bloodpressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360(9349), p.1903-13, 2002. Erratum in: **Lancet**, v. 361(9362), p. 1060, 2003.

Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. **Circulatory Research**, n. 88, p. 756-62, 2001.

Maas A.H.E.M.; Franke H.R. Women's health in menopause with a focus on hypertension. **Netherlands Heart Journal**, n. 17(2), p. 68-72, 2009.

Miquel J.; Ramírez-Boscá A.; Ramírez-Bosca J.V.; Alperi J.D. Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 42, p. 289-306, 2006.

Mothana, R.A.; Lindequist U.; Gruenert R.; Bednarski P.J. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 1-11, 2009.

Muller-Schweinitzer E.; Müller S.E.; Reineke D.C.; Kern T.; Carrel T.P.; Eckstein F.S.; Grapow M.T. Reactive oxygen species mediate functional differences in human radial and internal thoracic arteries from smokers. **Journal of Vascular Surgery**, v. 51, p. 438-444, 2010.

Murrel G.A.C.; Dolan M.M.; Jang D.; Szabo C.; Warren R.F.; Hannafin J.A. Nitric oxide: an important articular free radical. **Journal of Bone and Joint Surgery**, n. 78-A, p. 265-74, 1996.

Nair A.R.; Subramanan S.S.; Bohlmann F. A new diterpene galactoside from *Acanthospermum hispidum*. **Phytochemistry** v. 15, p. 1776-1778, 1976.

National Development and Reform Commission of China. Analysis of the economic status of the medical industry in 2012. Place of publication, **National Development and Reform Commission of China**, 2013.

Nahin R.L.; Barnes P.M.; Stussman B.J.; Bloom B. Costs of Complementary and Alternative Medicine (CAM) and Frequency of Visits to CAM Practitioners: United States, 2007. **National health statistics reports**, n. 18, p. 1-15, 2009.

Odebiyi O.O.; Sofowora E.A. Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants II. **Lloydia** v. 41, p. 234-246, 1978.

Oliveira, A.K.M.O.; Resende, U.M.; Martins, P.F.R.B. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 283-289, 2011.

Pessuto J.; Carvalho E. C. Fatores de risco em indivíduos com hipertensão arterial. **Revista Latinoamericana de Enfermagem**, v. 6, p. 33-39, 1998.

Ricciotti E.; FitzGerald G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, n. 31(5), p. 986-1000, 2011.

Sánchez-Rodríguez M.A.; Zacarías-Flores M.; Arronte-Rosales A.; Correa-Muñoz E.; Mendoza-Núñez V.M. Menopause as risk factor for oxidative stress. **Menopause**, v. 9, p. 361-367, 2012.

Scala L.C.; Magalhães L.B.; Machado A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. In: Moreira SM, Paola AV; **Sociedade Brasileira de Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 2ª. ed. São Paulo: Manole, p. 780-785, 2015.

Siddle N.; Sarrel P.; Whitehead M. The effect of hysterectomy on the age at ovarian failure: Identification of a subgroup of women with premature loss of ovarian function and literature review. **Fertil Steril**, v. 47, p. 94-100, 1987.

Sindusfarma. Indicadores econômicos. **Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos no Estado de São Paulo**, 2014.

Spinelli M.G. Depression and hormone therapy. **Clinical Obstetrics Gynecology**, v. 47, p. 428-436, 2004.

Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) - Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde (MS) 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/671-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-chronicas-nao-transmissiveis/11232-situacao-epidemiologica-dados> acesso em 05/11/2017.

Sultanbawa M.; Wannigama G.; Bandaranayake W.; Kumar V.; Leslie Gunatilaka A.A.; Marikar F. A.; Balasubramaniam S.; Arsecularatne S. N. Chemical investigation of Ceylonese plants. Part XXIX. A survey of plants of Sri Lanka (Ceylon) for alkaloids I. **Journal of Natural Products**, v. 41, p. 597-633, 1978.

Summerfield A.; Keil G.M.; Mettenleiter T.C.; Rziha H.J.; Saalmüller A. Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. **Antiviral Research**, v. 36, p. 55-62, 1997.

Sherwin B. Menopause: Myths and realities. Psychological aspects of women's health care. *The Interface Between Psychiatry and Obstetrics and Gynecology*. **American Psychiatric Publishing**, v. 153, p. 241-259, 2001.

Stricker R.; Eberhart R.; Chevailler M.C.; Quinn F.A.; Bischof P. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, n. 44, p. 883–887, 2006.

Tirloni C.A.S.; Lívero F.A.R.; Palozi R.A.C.; Silveira R.C.A.; Vasconcelos P.C.P.; Souza R.I.C.; Santos A.C.; Almeida V.P.; Budel J.M.; Souza L.M.; Gasparotto Junior A. Ethnopharmacological investigations of the cardio-renal properties of a native species from the region of Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, p. 125-134, 2017.

The regional strategy for traditional medicine in the Western Pacific (2011–2020). Manila, **WHO Regional Office for the Western Pacific**, v. 1, p. 1-79, 2012.

Trevisan M.; Browne R.; Ram M.; Muti P.; Freudenheim J.; Carosella A.M.; Armstrong D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, p. 348-356, 2001.

Thomopoulos C.; Parati G.; Zanchetti A. Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: Effects of various classes of antihypertensive drugs - overview and meta-analyses. **Journal of Hypertension**, v. 33(2), p. 195-211, 2015.

Unfer T.C.; Conterato G.M.; Da Silva J.C.; Duarte M.M.; Emanuelli T. Influence of hormone replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women. **Clinica Chimica Acta**, v. 369, p. 73-77, 2006.

Unfer T.C.; Figueiredo C.G.; Zanchi M.M.; Maurer L.H.; Kemerich D.M.; Duarte M.M.F.; Konopka C.K.; Emanuelli T. Estrogen plus progestin increase superoxide dismutase and total antioxidant capacity in postmenopausal women. **Climacteric**, v. 17, p. 1-10, 2014.

Vasquez A.M.; Mouchlis V.D.; Dennis E.A. Review of four major distinct types of human phospholipase A2. **Advances in Biological Regulation**, p. 1-18, 2017.

Wachtel-Galor S.; Benzie I.F.F. Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. Chapter 1, 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011.

Weber M.A.; Schiffrin E.L.; White W.A.; Mann S.; Lindholm L.H.; Kenerson J.G.; Flack J.M.; Carter B.L.; Materson B.J.; Ram V.S.; Cohen D.L.; Cadet Jean-Claude.; Jean-Charles R.R.; Taler S.; Kountz D.; Townsend R.R.; Chalmers J.; Ramirez A.J.; Bakris G.L.; Wang J.; Schutte A.E.; Bisognano J.D.; Touyz R.M.; Sica D.; Harrap S.B. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 2, p. 3-15, 2014.

WHO. **Traditional medicine strategy: 2014-2023**. n. 1, p. 44-49, 2013.

Wong G.K.T.; Marsden P.A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, n. 11, p. 215-20, 1996.

Wójcik M.; Kosior-Korzecka U.; Bobowiec R. Cytoprotective action of 17 β -oestradiol against iron-induced hepatic oxidative stress in vitro. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 54, p. 259-263, 2010.

Zanesco A.; Zaros, P.R. Exercício físico e menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, vol.31, p.254-261 **2009**.

VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v. 107, Nº 3, 2016

5 APÊNDICES

5.1 Artigo: Roles of Nitric Oxide and Prostaglandins in the Sustained Antihypertensive Effects of *Acanthospermum hispidum* DC. on Ovariectomized Rats with Renovascular Hypertension – Publicado na revista “**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**” (B1: Fator de Impacto = 1,740).

Research Article

Roles of Nitric Oxide and Prostaglandins in the Sustained Antihypertensive Effects of *Acanthospermum hispidum* DC. on Ovariectomized Rats with Renovascular Hypertension

Rhanany Alan Calloi Palozzi,¹ Maysa Isernhagen Schaedler,¹
 Cleide Adriane Signor Tirloni,¹ Aniely Oliveira Silva,¹
 Francislaíne Aparecida dos Reis Lívero,² Roosevelt Isaias Carvalho Souza,¹
 Ariany Carvalho dos Santos,¹ Thiago Bruno Lima Prando,²
 Lauro Mera de Souza,³ and Arquimedes Gasparotto Junior¹

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, P.O. Box 533, 79.804.970 Dourados, MS, Brazil

²Laboratório de Pesquisa Pré-Clinica de Produtos Naturais, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes 4282, P.O. Box 224, 87.502-210 Umuarama, PR, Brazil

³Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Faculdades Pequeno Príncipe, Av. Iguçu 333, 80.230.020 Curitiba, PR, Brazil

Correspondence should be addressed to Arquimedes Gasparotto Junior; arquimedesgasparotto@gmail.com

Received 28 June 2017; Revised 10 August 2017; Accepted 16 August 2017; Published 20 September 2017

Academic Editor: Jian-Li Gao

Copyright © 2017 Rhanany Alan Calloi Palozzi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Although *Acanthospermum hispidum* is used in Brazilian folk medicine as an antihypertensive, no study evaluated its effects on a renovascular hypertension and ovariectomy model. So, this study investigated the mechanisms involved in the antihypertensive effects of an ethanol-soluble fraction obtained from *A. hispidum* (ESAH) using two-kidney-one-clip hypertension in ovariectomized rats (2K1C plus OVT). ESAH was orally administered at doses of 30, 100, and 300 mg/kg, daily, for 28 days, after 5 weeks of surgery. Enalapril (15 mg/kg) and hydrochlorothiazide (25 mg/kg) were used as standard drugs. Diuretic activity was evaluated on days 1, 7, 14, 21, and 28. Systolic, diastolic, and mean blood pressure and heart rate were recorded. Serum creatinine, urea, thiobarbituric acid reactive substances, nitrosamine, nitrite, aldosterone, vasopressin levels, and ACE activity were measured. The vascular reactivity and the role of nitric oxide (NO) and prostaglandins (PG) in the vasodilator response of ESAH on the mesenteric vascular bed (MVB) were also investigated. ESAH treatment induced an important saluretic and antihypertensive response, therefore recovering vascular reactivity in 2K1C plus OVT-rats. This effect was associated with a reduction of oxidative and nitrosative stress with a possible increase in the NO bioavailability. Additionally, a NO and PG-dependent vasodilator effect was observed on the MEV.

1. Introduction

In recent years, evidence has shown that there are significant differences between the genesis and the development of cardiovascular diseases between men and women [1]. In general, women are more affected by cardiovascular diseases, especially hypertension, after a pronounced drop in estrogen levels, a fact that usually occurs after menopause. It is now

known that one of the mechanisms by which blood pressure may be elevated in aging postmenopausal women is the activation of the renin-angiotensin system (RAS). Postmenopausal women exhibit an increase in plasma renin activity, suggesting activation of the RAS similarly to what occurs during renovascular hypertension [2]. Approximately 50% of menopausal women have hypertension, a condition that associated with other estrogen-related risk factors (such

as obesity and dyslipidemia) significantly contributes to acute cardiovascular events [3]. In contrast, although this condition is quite common, preclinical studies specifically designed for this type of population are still very restricted [4].

Recently, we have shown that the ethanol-soluble fraction obtained from *Acanthospermum hispidum* DC. (Asteraceae) (ESAH), an important medicinal species widely used in Brazil, has a significant acute hypotensive effect on normotensive male Wistar rats [5]. In addition, we have also shown that ESAH, rich in phenolic compounds, such as derivatives of caffeic acid and glycosylated flavonoids (quercetin glucoside and galactoside), does not produce any toxic effects after acute treatment [5]. So, despite the widespread use of *A. hispidum* as an antihypertensive by the Brazilian population [6], its prolonged diuretic and antihypertensive effects have not yet been scientifically evaluated.

Thus, in this work, the prolonged diuretic and antihypertensive effects of *A. hispidum* on ovariectomized rats with renovascular hypertension were investigated to simulate a broad part of the woman population aged over 50 years. In addition, the molecular mechanisms involved in *A. hispidum* antihypertensive response using isolated mesenteric vascular bed (MVB) were also evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs. The following drugs, salts, and solutions were used: xylazine and ketamine hydrochloride (from Syntec, São Paulo, SP, Brazil), heparin (from Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brazil), and acetylcholine chloride, phenylephrine, indomethacin, *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), sodium nitroprusside, NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, dextrose, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (all purchased from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

2.2. Phytochemical Study

2.2.1. Plant Material and Preparation of the Purified Aqueous Extract. Aerial parts of *Acanthospermum hispidum* were collected from the botanical garden of the Federal University of Grande Dourados (UFGD, Dourados, Brazil) at 458 m above sea level (S 22°11'42.7" and W 54°56'10.2"), in October 2015. A voucher specimen was authenticated by Dra. Maria do Carmo Vieira (DDMS number 5219) and deposited at the UFGD plant facility.

A. hispidum aqueous extract was obtained by infusion in a similar manner to that popularly used in Brazil [6] and prepared according to Tirloni et al. [5]. For this, *A. hispidum* leaves were air-dried in an oven at 40°C for 7 days and then the dried plant was cut and ground into powder form using mechanical milling. The extract was obtained by infusing 1 liter of boiling water for each 60 grams of dried and pulverized plant. Extraction was carried out until room temperature was reached (~5 h). The infusion was treated with 3 volumes of EtOH, which gave rise to a precipitate and an ethanol-soluble fraction (ESAH). ESAH was filtered, ethanol was totally removed by evaporation, and the resulting

fraction was lyophilized (yield of 8.05%). All preparations were kept in freezer until further analyses.

2.2.2. Sample Analysis (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)). Chromatography was performed in an ultra-performance liquid chromatography (UPLC™ Waters), using a reversed phase column HSS T3 C18 column, with 100 × 2.1 mm and 1.7 μm of particle size (Waters), with constant temperature of 60°C. The solvents were ultra-pure water (Milli-Q, Millipore) and acetonitrile (JT Baker) containing 0.1% (v/v) of formic acid 96% (Tedia), and the gradient was performed increasing the acetonitrile from 0 to 10%, in 6 min, then to 80% in 14 min, at flow rate of 0.4 ml/min. The solvent returned to the initial condition in 15 min and the system was reequilibrated for 2 min. The sample was prepared at 2 mg/mL in MeOH-H₂O (1:1, v/v), with injections of 5 μL.

The detection was provided by a high-resolution mass spectrometer, LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific). The ions were detected in the negative and positive modes. The ion source was held at 350°C and the desolvation was aided by nitrogen stream, at 40 arbitrary units in the sheath gas and 10 a.u. in the auxiliary gas. Negative ions provided best results for the sample, with the energies at 3.5 kV in the source, -46 V in the capillary, and -200 V in the tube lens. Fragmentations were performed by higher-energy collisional dissociation, with normalized collision energy of 25–35. For LC-MS analysis, the MS resolution was set at 15,000 FWHM mass accuracy which was obtained by external calibration, routinely performed.

2.3. Pharmacological Studies

2.3.1. Animals. Twelve-week-old female Wistar rats weighing 200–300 g were randomized and housed in plastic cages, with environmental enrichment, at 22 ± 2°C under a 12/12 h light dark cycle, 55 ± 10% humidity conditions, with *ad libitum* access to food and water. All procedures were approved by the ethical committee on animal use of the Federal University of Grande Dourados (UFGD) (number 45/2016), and experiments were performed in accordance with international standards and ethical guidelines on animal welfare.

2.3.2. Ovariectomy and Induction of Renovascular Hypertension. Rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) by intraperitoneal route. After ovariectomy (OVT), renovascular hypertension was induced using the Goldblatt model (two kidneys, one clip; 2K1C) as described by Umar et al. [7]. The left renal artery was exposed by retroperitoneal incision and dissected. A silver clip (lumen of 0.22 mm) was placed around the artery for partial occlusion. In the Sham-operated group (placebo surgery), the artery was not clipped and ovaries were not removed. After surgery, animals received saline for rehydration (2 ml/animal, subcutaneously, single administration), anti-inflammatory (indomethacin, 2 mg/kg, by oral route, every 12 hours, during 3 days), and antibiotic (enrofloxacin, 10 mg/kg, subcutaneously, single dose). Systolic blood pressure (SBP) was weekly measured (for 4 weeks) using the tail-cuff method.

Only hypertensive rats (SBP above 140 mm Hg) were used in experiments.

2.3.3. Experimental Groups. Five weeks after surgery, animals were randomized and divided into 7 groups ($n = 6-7$) for hemodynamic and renal function studies. Rats were treated once a day (by gavage), during 28 days, with vehicle (2K1C plus OVT = positive control group), hydrochlorothiazide (HCTZ, 25 mg/kg, standard diuretic drug), enalapril (ENAL, 15 mg/kg, standard antihypertensive drug), or ESAH (30, 100, or 300 mg/kg). The Sham-operated group received vehicle under the same conditions.

2.3.4. Diuretic Activity. The diuretic effects of ESAH were accessed according to methods previously described by Kau et al. [8] with some modifications [9]. Weekly (on days 1, 7, 14, 21, and 28), rats were fasted overnight (6 h) with free access to water. Animals received an oral load of isotonic saline (0.9% NaCl, 5 ml/100 g) to impose a controlled water and salt balance before treatments. Then, rats were immediately placed in metabolic cages. Urine samples were collected in a graduated cylinder and the volume was recorded 8 hours after treatment (expressed as ml per 100 g body weight). During the experiment, rats were food deprived. pH and density were determined on fresh urine samples using digital pH meter (Q400MT; Quimis Instruments, Brazil) and a handheld refractometer (NO107; Nova Instruments, Brazil), respectively. Urinary sodium (Na^+), potassium (K^+), chloride (Cl^-), and calcium (Ca^{++}) levels were quantified in automated analyzer (Roche® Cobas Integra 400 plus). Excretion load (El) of Na^+ , K^+ , Cl^- , and Ca^{++} was obtained according to the equation $\text{El} = U_x \times V$, where U_x is the concentration of electrolytes (mEq/L) and V is the urinary flow (mL/min). Results were expressed as $\mu\text{Eq}/\text{min}/100 \text{ g}$.

2.3.5. Blood Pressure and Heart Rate Evaluation. At the end of the trial period (day 28), rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) by intramuscular route. Immediately, a bolus injection of heparin (50 IU) was subcutaneously applied. The left carotid artery was cannulated and connected to a pressure transducer coupled to a PowerLab® recording system, and an application software (Chart, v 4.1; all from ADI Instruments, Castle Hill, Australia), recording systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), mean blood pressure (MBP), and heart rate (HR). After 15 minutes of stabilization, changes in blood pressure and HR were recorded for 5 min.

2.3.6. Mesenteric Vascular Reactivity. After systemic blood pressure and HR measurements, and before euthanasia, the mesenteric vascular bed (MVB) was isolated and prepared for perfusion as previously described [10]. The isolated MVBs were then placed in a water-jacketed organ bath maintained at 37°C and perfused with PSS (composition in mM: NaCl 119; KCl 4.7; CaCl_2 2.4; MgSO_4 1.2; NaHCO_3 25.0; KH_2PO_4 1.2; dextrose 11.1; and EDTA 0.03) gassed with 95% O_2 /5% CO_2 at constant flow rate of 4 ml/min through a peristaltic pump. Changes in the perfusion pressure (mm Hg) were measured by a pressure transducer connected to an acquisition system

(PowerLab) and its application software (Chart, v 7.1; both from ADI Instruments, Castle Hill, Australia). After setup in the perfusion apparatus, preparation was allowed to equilibrate for 30 to 45 min, and its viability was checked by a bolus injection of KCl (120 mmol). After a 30-minute stabilization period, a phenylephrine (PHE; 3, 10, and 30 nmol) dose-response administration was performed by injecting increasing doses into the perfusion system. After a 60-minute equilibration period, MVBs were continuously perfused with PSS containing 3 μM PHE, which was enough to induce a sustained increased perfusion pressure. Under these conditions, vasodilatory effects of acetylcholine (ACh; 3, 10, and 30 pmol) or sodium nitroprusside (SNP; 3, 10, and 30 pmol) were measured. A 15-minute equilibration period was allowed between each drug. All drugs were given into the perfusate as bolus injection of 100 μl .

2.3.7. Serum Biochemical Parameters. At the end of experiments, all animals were killed by suprapharmacological isoflurane dose and blood samples were collected. Serum was obtained by centrifugation (1,000 \times g for 10 min). Serum Na^+ , K^+ , urea, and creatinine were determined in automated biochemical analyzer (Roche Cobas Integra 400 plus). Serum nitrotyrosine (NT), aldosterone, and vasopressin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay kit according to manufacturer'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. [11]. Serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity was determined by indirect fluorimetry according to methods described by Santos et al. [12].

2.4. Investigation of the Molecular Mechanisms Involved in the Vasodilatory Response of ESAH

2.4.1. Evaluation of the Effects of ESAH on the Mesenteric Vascular Bed. Preparations (MVBs) with functional endothelium from normotensive and hypertensive (2K1C plus OVT) female rats, without any previous treatment, were continuously perfused with PSS containing PHE (3 μM). After stabilization of the increased perfusion pressure, preparations received bolus injections containing 0.0003, 0.001, 0.003, and 0.01 mg of ESAH, and the reduction in the perfusion pressure was evaluated. Each next dose was administered only after the return of the perfusion pressure to the same level recorded before injection, with minimal interval of 3 min between doses.

2.4.2. Investigation of the Mechanisms Involved in the Vascular Effects of ESAH. In these experiments, after recording the first dose-response curve to ESAH (0.001, 0.003, and 0.01 mg), the MVBs were left to equilibrate for an additional period of 30–45 min under perfusion with PSS. Then, different preparations were perfused with PSS containing 3 μM phenylephrine plus indomethacin (1 μM ; a nonselective

cyclooxygenase inhibitor) and L-NAME (100 μ M; a nonselective NO synthase inhibitor) alone or combined. After 15 min under perfusion with one of the previously mentioned solutions, ESAH (0.001, 0.003, and 0.01 mg) was injected again into the perfusion system. The ability of ESAH to reduce the perfusion pressure was compared with results obtained in control preparations, perfused with vehicle only.

2.5. Statistical Analyses. Data were analyzed for homogeneity of variance and normal distribution. Differences between means were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test. The level of significance was set at 95% ($p < 0.05$), and results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Graphs were drawn and statistical analysis was carried out using GraphPad® Prism software version 5.0 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Phytochemical Characterization. In a previous work [6], the composition of an extract of *Acanthospermum hispidum* was partially characterized, with identification of the family of monocaffeoylquinic acids (CQAs) and dicaffeoylquinic acids (diCQAs), observed as multiple isomers in the LC-MS analysis. However, these isomers have characteristic fragmentation profile that can be used for their identification [13, 14]. To confirm the isomer identity, an extract of *Ilex paraguariensis*, containing mono- and dicaffeoylquinic acids, previously characterized [13], was used as a reference sample.

The detailed chemical composition of ESAH obtained from *A. hispidum* is shown in Table 1. The negative ionization was better for the acidic compounds present in the extract, and the monocaffeoylquinic acids appeared at m/z 353.087. The carbons from the ring of quinic acid were numerated according to the chlorogenic acid structure, considered as 3-monocaffeoylquinic acid (3-CQA). Thus, based on the fragmentation profile (at collision energy of 25) and retention time, compared to *I. paraguariensis* extract, the isomers could be predicted as *neo*-chlorogenic acid (5-CQA at 2.30 min), with intense fragments at m/z 191.056, 179.035, and 135.045 but absent of m/z 173.45. The chlorogenic acid (3-CQA) appeared at 3.22 min, with a main fragment at m/z 191.056 and the *crypto*-chlorogenic acid (4-CQA at 3.54 min) produced fragments at m/z 191.056, 179.035, 173.045, and 135.045, detaching the most abundant fragment-ion at m/z 173.045 (Figure 1). These results are in accordance with the pioneer work of Carini et al. [15]. The peaks at 5.94 and 6.05 min were observed at m/z 463.088, with similar fragments at m/z 300.027, 271.024, 255.029, and 243.029, consistent with quercetin-hexosides, being consistent with quercetin galactoside and quercetin glucoside [16].

The main peaks on chromatogram were identified as dicaffeoylquinic acids (di-CQAs) at m/z 515.119, and similar to the CQAs, they differ in their fragmentation profile obtained with collision energy at 35. The peak at 6.43 min was consistent with 3,4-di-CQA, with fragments at m/z 353.087 due to the loss of a caffeoyl residue, and the fragment at m/z 335.076 (353.087, H₂O) was observed at a relative

intensity in only this isomer. The other fragments were m/z 191.056 (quinic acid, base peak), m/z 179.035 (caffeic acid), and m/z 173.045 (quinic acid, H₂O). The peaks at 6.67 and 7.07 min presented a quite similar fragmentation profile, containing almost all fragments observed for the peak at 6.43 min, except by the absence of ion at m/z 335.076. The chromatographic profile suggests the peak at 6.67 min as 3,5-di-CQA and the peak at 7.07 min as 4,5-di-CQA. However, other isomers may be eluted in very close retention time as previously observed [14], hindering the accurate isomer identification. Other peaks (7.28, 7.54, and 8.52 min) showed the main ion at m/z 337.238, which could be result of in-source fragmentation and remains unidentified and the peaks at 10.38, 10.67, 10.77, and 10.89 min presented multiple ions avoiding their identification.

3.2. Prolonged Treatment with ESAH Induced Significant Saluretic Effect on Sham-Operated and 2K1C Plus OVT-Rats. The values obtained for urinary volume and renal excretion of electrolytes are shown in Tables 2, 3, 4, 5, and 6. The mean urinary volumes of Sham-operated rats collected for 8 hours on days 1, 7, 14, 21, and 28 were, respectively, 5.64 ± 0.70 , 9.16 ± 1.09 , 10.36 ± 1.32 , 8.98 ± 0.93 , and 7.84 ± 0.55 ml/100 g/8 h. Similarly, 2K1C plus OVT-animals produced an estimated urinary volume of 4.99 ± 0.27 , 5.56 ± 0.21 , 7.11 ± 0.62 , 7.16 ± 0.42 , and 5.92 ± 0.32 ml/100 g/8 h on days 1, 7, 14, 21, and 28, respectively. None of the groups treated with ENAL or ESAH (30, 100, and 300 mg/kg) had any changes in urinary volume when compared to Sham-operated or 2K1C plus OVT-rats. As expected, animals that received HCTZ had a significant increase in urinary volume only on the 1st day of treatment.

On the 1st day of treatment, all animals treated with ESAH (30, 100, or 300 mg/kg) or HCTZ presented a significant increase in Na⁺ and Cl⁻ elimination, with saluretic index higher than 2.0 (Table 2). On the other hand, only animals treated with ESAH (30, 100, and 300 mg/kg) maintained this effect on the 7th day of treatment (Table 3). On the 14th, 21st, and 28th days of treatment, only animals receiving ESAH at the dose of 300 mg/kg had significant urinary Na⁺ and Cl⁻ levels (Tables 4, 5, and 6). In contrast, animals treated with HCTZ returned to significant Na⁺ levels only on the 28th day of treatment (Table 6). Groups receiving ENAL did not show any significant increase in urinary Na⁺, K⁺, Cl⁻, or Ca⁺⁺ when compared with positive controls or Sham-operated animals. Similarly, urinary pH and density or serum Na⁺, K⁺, urea, and creatinine values were not altered by any of the treatments (Tables 2, 3, 4, 5, 6, and 7).

3.3. ESAH Administration Reduces SBP, DBP, MBP, and HR in 2K1C Plus OVT-Rats. Figures 2(a), 2(b), 2(c), and 2(d) show the systemic blood pressure and HR values obtained after prolonged treatment with ESAH, ENAL, or HCTZ. All animals in the positive control group presented significant increase in SBP (144 ± 5.3 versus 111 ± 3.7 mm Hg), DBP (103 ± 2.8 versus 82 ± 2.9 mm Hg), MBP (110 ± 3.8 versus 92 ± 2.8 mm Hg), and HR values (251 ± 12 versus 202 ± 4.6 bpm) when compared to Sham-operated rats. Prolonged administration of ESAH at doses of 30 mg/kg was able to reduce SBP, DBP, and MBP to 90 ± 5.5 , 71 ± 4.4 , and 77 ± 5.5 mm Hg,

TABLE 1: Phytochemical composition of ESAH obtained from *A. hispidum* DC.

Peak	Rt (min)	MS ¹	MS ² (key fragments)	Tentative identification
1	2.30	353.08773 [M-H] ⁻	191.055, 179.034, 135.045	neo-Chlorogenic acid
2	3.22	353.08745 [M-H] ⁻	191.055	Chlorogenic acid
3	3.54	353.08773 [M-H] ⁻	191.055, 179.034, 173.045, 135.044	crypto-Chlorogenic acid
4	5.94	463.08838 [M-H] ⁻	300.027	Quercetin-galactoside
5	6.05	463.08804 [M-H] ⁻	300.027	Quercetin-glucoside
6	6.43	515.11964 [M-H] ⁻	353.087, 335.076, 191.055, 179.034, 173.045, 135.045	3,4-Dicaffeoylquinic acid
7	6.67	515.11970 [M-H] ⁻	353.087, 191.055, 179.034, 173.045, 135.044	3,5-Dicaffeoylquinic acid
8	7.07	515.11951 [M-H] ⁻	353.087, 191.055, 179.034, 173.045, 135.044	4,5-Dicaffeoylquinic acid
9	7.28	535.26876 [M+Cl] ⁻	337.238	C ₂₆ H ₄₄ O ₉ Cl
10	7.54	337.23821 [M-H] ⁻	—	C ₂₆ H ₃₃ O ₄
11	8.52	337.23840 [M-H] ⁻	—	C ₂₀ H ₃₃ O ₄

TABLE 2: Effects of oral administration of purified aqueous extract obtained from *A. hispidum* DC. (ESAH) on urinary volume and electrolyte excretion, pH, and density on 1st day of treatment.

Group	Urinary volume (ml/100 g/8 h)	El _{Na+} (μEq/min/100 g)	El _{K+} (μEq/min/100 g)	El _{Cl-} (μEq/min/100 g)	El _{Ca++} (μEq/min/100 g)	pH	Density
Sham	5.64 ± 0.70	0.37 ± 0.06	0.49 ± 0.06	0.46 ± 0.03	0.036 ± 0.0100	7.96 ± 0.15	1016 ± 1.89
C+	4.99 ± 0.27	0.36 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.046 ± 0.0058	7.91 ± 0.07	1019 ± 0.66
ESAH (30 mg/kg)	3.81 ± 0.46	1.06 ± 0.07 ^{ab}	0.67 ± 0.06	1.22 ± 0.08 ^{ab}	0.033 ± 0.0068	7.82 ± 0.19	1014 ± 2.23
ESAH (100 mg/kg)	3.96 ± 0.36	0.92 ± 0.19 ^{ab}	0.53 ± 0.07	1.08 ± 0.23 ^{ab}	0.034 ± 0.0041	7.81 ± 0.13	1019 ± 2.10
ESAH (300 mg/kg)	3.44 ± 0.26	0.80 ± 0.12 ^{ab}	0.49 ± 0.07	1.00 ± 0.08 ^{ab}	0.036 ± 0.0068	7.43 ± 0.14	1018 ± 1.76
ENAL	4.72 ± 0.59	0.27 ± 0.05	0.55 ± 0.03	0.37 ± 0.06	0.041 ± 0.0019	7.96 ± 0.15	1017 ± 0.97
HCTZ	7.61 ± 0.28 ^a	0.99 ± 0.24 ^{ab}	0.75 ± 0.17	1.18 ± 0.30 ^{ab}	0.030 ± 0.0069	7.80 ± 0.13	1015 ± 1.17

Values are expressed as mean ± SEM of 6-7 rats in each group in comparison with the positive control (C+; **p* < 0.05) or Sham-operated group (^b*p* < 0.05) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. El: excreted load; HCTZ: hydrochlorothiazide; ENAL: enalapril.

respectively, while HR levels were reduced to 165 ± 7.7 bpm. In addition, ESAH at doses of 100 and 300 mg was not able to change the SBP, DBP, MBB, or HR of normotensive or 2K1C plus OVT-rats. However, as expected, ENAL and HCTZ were able to significantly reduce SBP, DBP, and MBB levels in positive controls or Sham-operated animals. Values obtained with ENAL or HCTZ administration on the arterial pressure levels were not statistically different from those observed after treatment with ESAH (30 mg/kg).

3.4. Prolonged Treatment with ESAH Restores Vascular Reactivity in MVBs from 2K1C OVT-Rats. In MVBs from 2K1C plus OVT-rats, the administration of ACh or SNP was able to induce a vasodilatory response approximately 35% lower than that in Sham-operated rats (Figures 3(a) and 3(b)). Similarly, the vasoconstrictor response of PHE was significantly higher in the 2K1C plus OVT-group when compared to Sham-operated animals (Figure 3(c)). On the other hand, in animals that received ESAH (30 mg/kg) or ENAL (15 mg/kg), the effects of ACh, SNP, or PHE were not different from those observed in Sham-operated animals. Treatments with HCTZ (25 mg/kg) or ESAH at doses of 100 and 300 mg/kg were not able to reverse the changes in vascular reactivity observed in 2K1C plus OVT-animals (Figures 3(a)–3(c)).

3.5. ESAH Reduces Oxidative and Nitrosative Stress without Affecting Aldosterone, Vasopressin Levels, or Serum ACE Activity. The effects of ESAH, ENAL, and HCTZ on TBARS, NT,

and nitrite levels are shown in Figures 4(a), 4(b), and 4(c). Ovariectomy associated with renovascular hypertension increases TBARS and NT levels in ~104 and 60%, respectively. Treatment with ESAH (30, 100, and 300 mg/kg) or ENAL reduced TBARS and NT levels to values close to those found in Sham-operated animals.

At baseline, nitrite concentration was significantly lower in positive control animals when compared with Sham-operated ones (63 ± 5.3 versus 94 ± 5.0 μM). On the other hand, treatment with ESAH (at all doses) or ENAL increased the nitrite levels by ~50%.

On the other hand, only ENAL was able to reduce the aldosterone levels and serum ACE activity (Figures 4(a)–4(c)), without affecting serum vasopressin. Treatment with ESAH (30, 100, and 300 mg/kg) or HCTZ did not significantly change the aldosterone and vasopressin concentrations or serum ACE activity (Figures 5(a)–5(c)).

3.6. ESAH Induce Vasodilatory Response in MVBs from Normotensive and 2K1C Plus OVT-Rats in Dependence on Endothelial NO and Prostaglandins. The continuous perfusion of the MVBs (from normotensive or 2K1C plus OVT-rats) with phenylephrine resulted in a sustained increase in the vascular perfusion pressure, which was significantly reduced by ESAH (0.001, 0.003, and 0.01 mg) (Figures 6(b) and 6(d)). The characterization of a typical experiment shown in Figure 6(a) (normotensive) or Figure 6(c) (2K1C plus OVT-rats) reveals that when the highest ESAH dose was

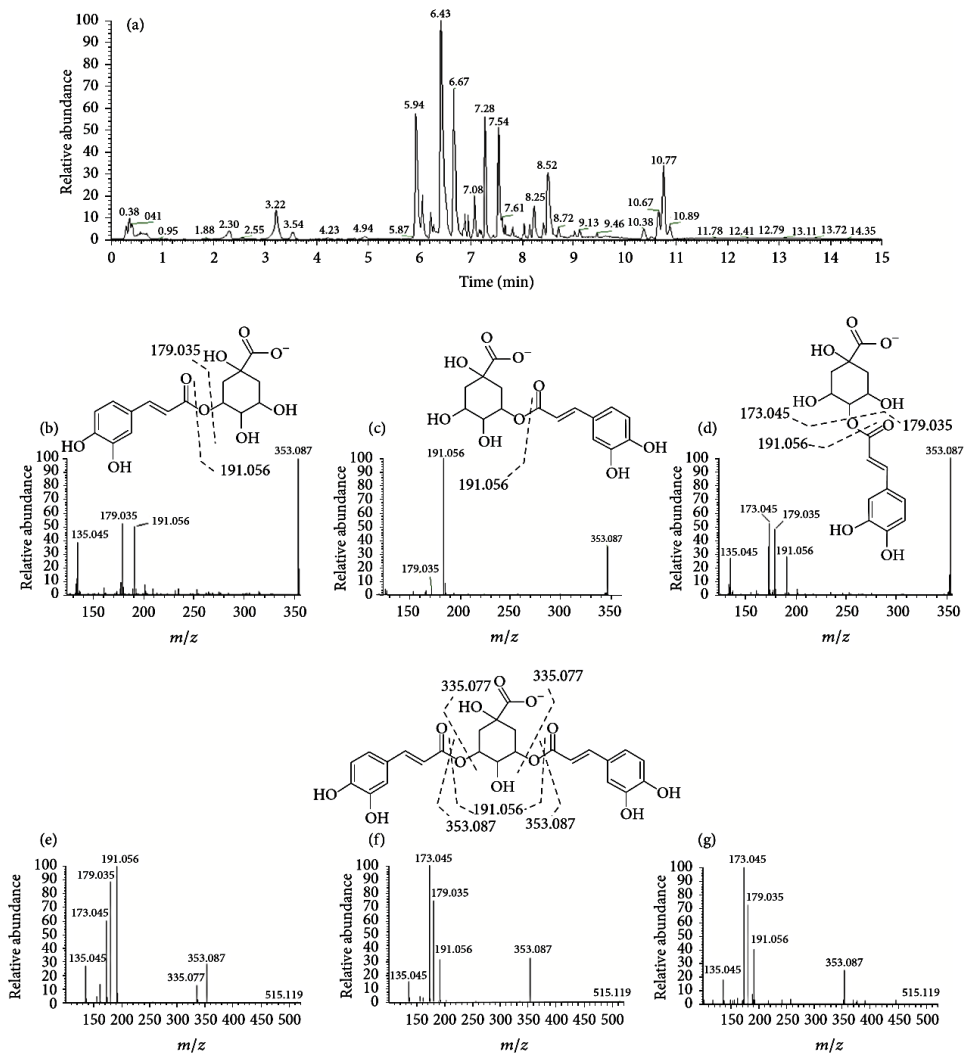


FIGURE 1: Phytochemical analysis of ESAH obtained from *A. hispidum* DC. (a) Base peak chromatogram obtained by UPLC detected by HR-MS in the negative ionization and the fragmentation profile of moncaffeoylquinic acids, tentatively identified as *neo*-chlorogenic acid (5-CQA) (b), chlorogenic acid (3-CQA) (c), and *crypto*-chlorogenic acid (4-CQA) (d). The main breakdown site for dicaffeoylquinic acids is depicted in the 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-di-CQA) and the fragmentation profile observed for peak 6.43 min (e), 6.67 min (f), and 7.07 min (g).

used (0.01 mg), the vasodilatory effects of ESAH had response intensity similar to that of acetylcholine.

Previous infusion with L-NAME significantly reduced part of the effect on the MVBs obtained with ESAH. The peak effect of 0.001, 0.003, and 0.01 mg of ESAH was decreased from $28 \pm 4\%$, $54 \pm 6\%$, and $68 \pm 7\%$ to $11 \pm 3\%$, $22 \pm 9\%$, and

$26 \pm 11\%$ in normotensive and from $24 \pm 3\%$, $50 \pm 7\%$, and $62 \pm 9\%$ to $9 \pm 2\%$, $18 \pm 7\%$, and $16 \pm 6\%$ in 2K1C plus OVT-rats, respectively (Figures 7(a) and 7(d)). In a similar way, the vasodilatory effect of ESAH at doses of 0.001, 0.003, and 0.01 mg was reduced to $20 \pm 7\%$, $25 \pm 8\%$, and $27 \pm 9\%$ in normotensive and to $14 \pm 3\%$, $21 \pm 6\%$, and $20 \pm 7\%$ in 2K1C

TABLE 3: Effects of oral administration of purified aqueous extract obtained from *A. hispidum* DC. (ESAH) on urinary volume and electrolyte excretion, pH, and density on 7th day of treatment.

Group	Urinary volume (ml/100 g/8 h)	El _{Na+} (μ Eq/min/100 g)	El _{K+} (μ Eq/min/100 g)	El _{Cl-} (μ Eq/min/100 g)	El _{Ca++} (μ Eq/min/100 g)	pH	Density
Sham	9.16 \pm 1.09	0.43 \pm 0.04	0.40 \pm 0.06	0.47 \pm 0.04	0.036 \pm 0.0064	7.96 \pm 0.14	1009 \pm 0.70
C+	5.56 \pm 0.21	0.49 \pm 0.06	0.64 \pm 0.08	0.59 \pm 0.07	0.050 \pm 0.0034	8.06 \pm 0.07	1011 \pm 1.18
ESAH (30 mg/kg)	4.72 \pm 0.57	1.05 \pm 0.08 ^{ab}	0.44 \pm 0.04	1.12 \pm 0.07 ^{ab}	0.037 \pm 0.0061	7.48 \pm 0.16	1014 \pm 1.80
ESAH (100 mg/kg)	4.85 \pm 0.71	0.98 \pm 0.18 ^{ab}	0.73 \pm 0.11	1.28 \pm 0.25 ^{ab}	0.059 \pm 0.0032	7.95 \pm 0.18	1011 \pm 1.87
ESAH (300 mg/kg)	4.87 \pm 0.61	0.83 \pm 0.11	0.49 \pm 0.08	0.94 \pm 0.13 ^{ab}	0.032 \pm 0.0089	7.55 \pm 0.12	1014 \pm 1.82
ENAL	6.03 \pm 0.46	0.37 \pm 0.03	0.48 \pm 0.04	0.53 \pm 0.03	0.009 \pm 0.0018	8.05 \pm 0.14	1009 \pm 1.02
HCTZ	6.85 \pm 0.47	0.60 \pm 0.07	0.72 \pm 0.05	0.79 \pm 0.08	0.013 \pm 0.0048	7.85 \pm 0.11	1011 \pm 0.84

Values are expressed as mean \pm SEM of 6-7 rats in each group in comparison with the positive control (C+; ^a p < 0.05) or Sham-operated group (^b p < 0.05) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. El: excreted load; HCTZ: hydrochlorothiazide; ENAL: enalapril.

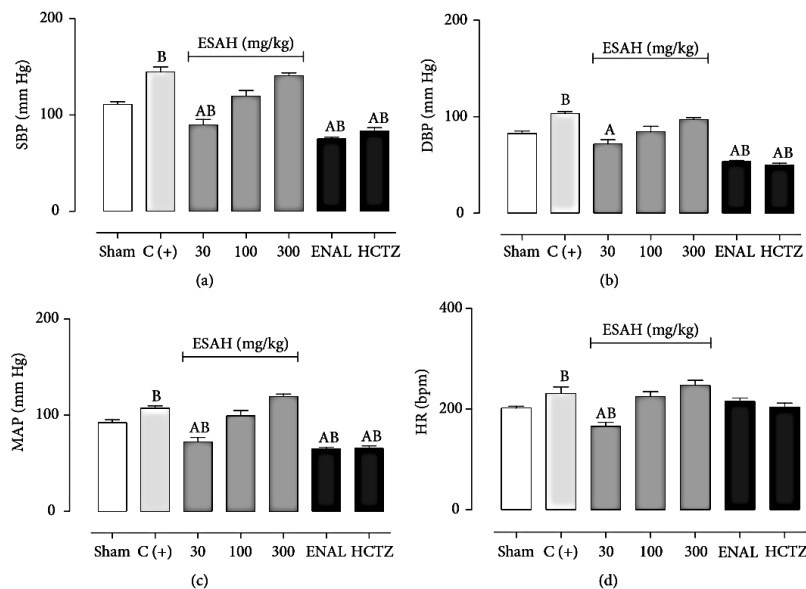


FIGURE 2: Prolonged administration of ESAH obtained from *A. hispidum* reduces SBP (a), DBP (b), MAP (c), and HR (d) in 2K1C plus OVT-rats. Vehicle, ESAH (30, 100, and 300 mg/kg), ENAL (15 mg/kg), or HCTZ (25 mg/kg) was given orally for 28 days. The letter "C+" indicates the effect measured after administration of vehicle only. The results show the mean \pm SEM ($n = 6-7$). Statistical analyses were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. ^a p < 0.05 when compared to 2K1C plus OVT-rats (C+). ^b p < 0.05 when compared to Sham-operated group. ENAL: enalapril; DBP: diastolic blood pressure; HCTZ: hydrochlorothiazide; HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; SBP: systolic blood pressure; Sham: placebo surgery.

plus OVT-rats, in preparations perfused with indomethacin (Figures 7(b) and 7(e)). Interestingly, simultaneous treatment (coadministration) with L-NAME and indomethacin (Figures 7(c) and 7(f)) vanished the vasorelaxation effect induced by all ESAH doses in MVBs from normotensive or 2K1C plus OVT-rats.

4. Discussion

In the present study, it was demonstrated that 28-day ESAH treatment was effective in inducing an important saluretic and antihypertensive response in 2K1C plus OVT-rats. This favorable effect induced by ESAH is associated with a parallel

TABLE 4: Effects of oral administration of purified aqueous extract obtained from *A. hispidum* DC. (ESAH) on urinary volume and electrolyte excretion, pH, and density on 14th day of treatment.

Group	Urinary volume (ml/100 g/8 h)	El _{Na+} (μ Eq/min/100 g)	El _{K+} (μ Eq/min/100 g)	El _{Cl-} (μ Eq/min/100 g)	El _{Ca++} (μ Eq/min/100 g)	pH	Density
Sham	10.36 \pm 1.32	0.53 \pm 0.06	0.50 \pm 0.06	0.60 \pm 0.08	0.050 \pm 0.0056 ^b	7.96 \pm 0.16	1014 \pm 0.70
C+	7.11 \pm 0.62	0.36 \pm 0.04	0.41 \pm 0.03	0.42 \pm 0.05	0.052 \pm 0.0049	7.60 \pm 0.08	1014 \pm 0.86
ESAH (30 mg/kg)	5.66 \pm 0.23	0.50 \pm 0.04	0.68 \pm 0.06	0.60 \pm 0.04	0.030 \pm 0.0052	8.07 \pm 0.05	1017 \pm 0.89
ESAH (100 mg/kg)	4.78 \pm 0.64	0.88 \pm 0.20	0.50 \pm 0.06	1.01 \pm 0.24	0.036 \pm 0.0083	7.61 \pm 0.20	1018 \pm 2.12
ESAH (300 mg/kg)	5.76 \pm 0.57	1.16 \pm 0.03 ^{ab}	0.74 \pm 0.07	1.33 \pm 0.04 ^{ab}	0.036 \pm 0.0069	7.95 \pm 0.08	1019 \pm 0.88
ENAL	6.01 \pm 0.73	0.53 \pm 0.08	0.56 \pm 0.03	0.71 \pm 0.08	0.026 \pm 0.0046	8.04 \pm 0.03	1015 \pm 1.02
HCTZ	6.55 \pm 0.33	0.74 \pm 0.11	0.65 \pm 0.10	0.92 \pm 0.15	0.055 \pm 0.0232	8.06 \pm 0.03	1014 \pm 1.15

Values are expressed as mean \pm SEM of 6-7 rats in each group in comparison with the positive control (C+; ^a $p < 0.05$) or Sham-operated group (^b $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. El: excreted load; HCTZ: hydrochlorothiazide; ENAL: enalapril.

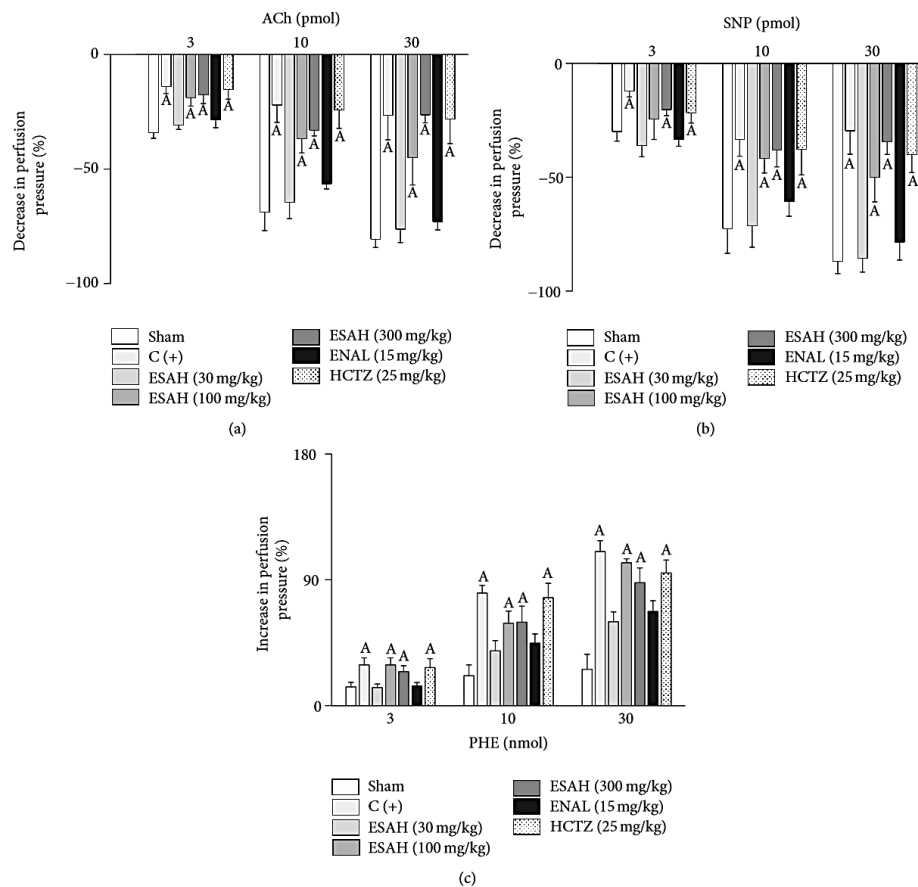


FIGURE 3: Prolonged treatment with ESAH restores vascular reactivity in MVBs from 2K1C plus OVT-rats. Effects of ACh (3, 10, and 30 pmol; (a)), SNP (3, 10, and 30 pmol; (b)), or PHE (3, 10, and 30 nmol; (c)) on the perfusion pressure of the MVBs from normotensive (Sham) or 2K1C plus OVT-rats in the presence or absence of prolonged treatment with ESAH (30, 100, 300 mg/kg), ENAL (15 mg/kg), or HCTZ (25 mg/kg). Values in panel are expressed as mean \pm SEM of 5 experiments. A indicates $p < 0.05$ compared with the perfusion pressure in Sham-operated rats. All experiments were performed in endothelium-intact preparations. ACh: acetylcholine; ENAL: enalapril; HCTZ: hydrochlorothiazide; SNP: sodium nitroprusside; OVT: ovariectomy; PHE: phenylephrine.

TABLE 5: Effects of oral administration of purified aqueous extract obtained from *A. hispidum* DC. (ESAH) on urinary volume and electrolyte excretion, pH, and density on 21st day of treatment.

Group	Urinary volume (ml/100 g/8 h)	El _{Na+} (μ Eq/min/100 g)	El _{K+} (μ Eq/min/100 g)	El _{Cl-} (μ Eq/min/100 g)	El _{Ca++} (μ Eq/min/100 g)	pH	Density
Sham	8.98 \pm 0.93	0.46 \pm 0.06	0.48 \pm 0.05	0.52 \pm 0.07	0.041 \pm 0.0070	7.87 \pm 0.12	1015 \pm 2.72
C+	7.16 \pm 0.42	0.59 \pm 0.07	0.76 \pm 0.11	0.74 \pm 0.10	0.068 \pm 0.0078	8.10 \pm 0.08	1014 \pm 1.11
ESAH (30 mg/kg)	6.73 \pm 0.72	0.73 \pm 0.12	0.72 \pm 0.18	0.99 \pm 0.17	0.043 \pm 0.0054	8.25 \pm 0.17	1014 \pm 2.01
ESAH (100 mg/kg)	4.82 \pm 0.33	0.77 \pm 0.16	0.75 \pm 0.20	0.75 \pm 0.19	0.046 \pm 0.0054	8.30 \pm 0.09	1018 \pm 0.85
ESAH (300 mg/kg)	5.20 \pm 1.23	1.21 \pm 0.20 ^{ab}	0.74 \pm 0.06	1.47 \pm 0.21 ^{ab}	0.039 \pm 0.0033	7.85 \pm 0.07	1019 \pm 1.70
ENAL	5.30 \pm 0.25	0.30 \pm 0.06	0.51 \pm 0.05	0.47 \pm 0.06	0.038 \pm 0.0091	8.02 \pm 0.06	1017 \pm 1.72
HCTZ	6.22 \pm 0.48	0.45 \pm 0.06	0.41 \pm 0.02	0.55 \pm 0.05	0.019 \pm 0.0058	7.88 \pm 0.06	1014 \pm 0.95

Values are expressed as mean \pm SEM of 6-7 rats in each group in comparison with the positive control (C+; ^a $p < 0.05$) or Sham-operated group (^b $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. El: excreted load; HCTZ: hydrochlorothiazide; ENAL: enalapril.

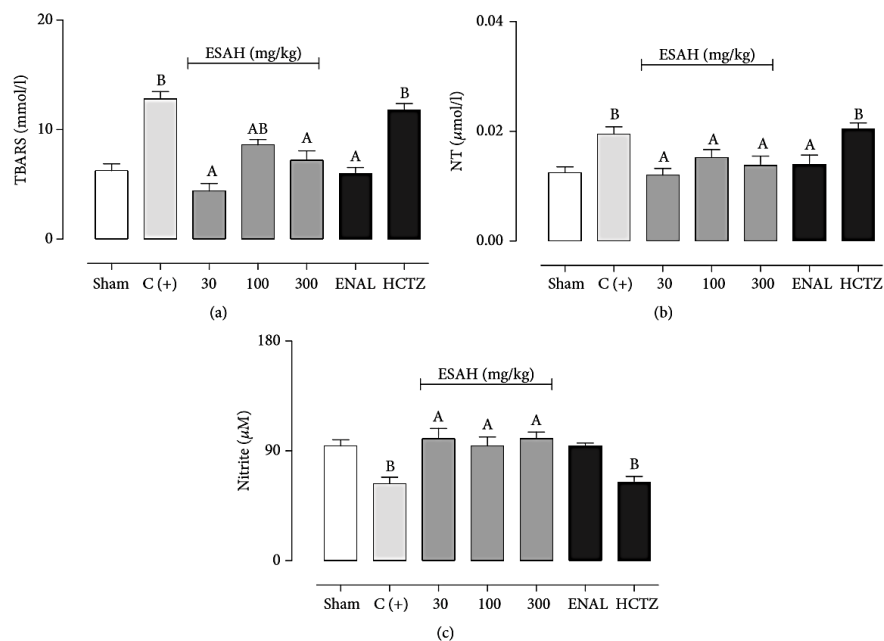


FIGURE 4: ESAH treatment reduces TBARS (a) and NT (b) levels and increases NO bioavailability (c). The serum samples were obtained after 28 days of treatment with vehicle, ESAH (30, 100, and 300 mg/kg), ENAL (15 mg/kg), or HCTZ (25 mg/kg). The results show the mean \pm SEM ($n = 6-7$). Statistical analyses were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. ^a $p < 0.05$ when compared to 2KIC plus OVT-rats (C+). ^b $p < 0.05$ when compared to Sham-operated group. ENAL: enalapril; HCTZ: hydrochlorothiazide; NT: nitrosamine; Sham: placebo surgery; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

reduction of oxidative and nitrosative stress biomarkers, in addition to a possible increase in NO bioavailability. Additionally, an important NO and prostaglandin-dependent vasodilator effect was observed in mesenteric vascular bed, a finding that indicates a potential mechanism for the cardiovascular effects of ESAH.

In the first stage of our study, we decided to use ENAL and HCTZ as standard cardioprotective drugs. The choice of

HCTZ was based on the need to compare the diuretic and natriuretic effects of ESAH with a first-line diuretic drug in the treatment of hypertension [17]. On the other hand, as the renovascular hypertension model used in our study (2KIC) induces a sustained activation of the renin-angiotensin system (RAS), we chose another classic drug (ENAL) capable of effectively blocking activation and preventing the installation of renovascular hypertension. In addition, data indicated that

TABLE 6: Effects of oral administration of purified aqueous extract obtained from *A. hispidum* DC. (ESAH) on urinary volume and electrolyte excretion, pH, and density on 28th day of treatment.

Group	Urinary volume (ml/100 g/8 h)	El _{Na+} (μ Eq/min/100 g)	El _{K+} (μ Eq/min/100 g)	El _{Cl-} (μ Eq/min/100 g)	El _{Ca++} (μ Eq/min/100 g)	pH	Density
Sham	7.84 \pm 0.55	0.44 \pm 0.03	0.49 \pm 0.03	0.53 \pm 0.04	0.034 \pm 0.0020	8.02 \pm 0.04	1016 \pm 1.36
C+	5.92 \pm 0.32	0.28 \pm 0.02	0.37 \pm 0.07	0.34 \pm 0.04	0.027 \pm 0.0047	8.00 \pm 0.20	1018 \pm 0.92
ESAH (30 mg/kg)	4.85 \pm 0.41	0.52 \pm 0.04	0.66 \pm 0.07	0.58 \pm 0.04	0.037 \pm 0.0135	8.41 \pm 0.05	1015 \pm 1.08
ESAH (100 mg/kg)	4.68 \pm 0.63	0.29 \pm 0.02	0.43 \pm 0.04	0.40 \pm 0.03	0.027 \pm 0.0069	8.34 \pm 0.07	1017 \pm 2.04
ESAH (300 mg/kg)	3.94 \pm 0.49	0.82 \pm 0.09 ^{ab}	0.77 \pm 0.05	1.14 \pm 0.12 ^{ab}	0.042 \pm 0.0060	8.01 \pm 0.08	1019 \pm 1.08
ENAL	5.13 \pm 0.61	0.72 \pm 0.13	0.67 \pm 0.10	0.88 \pm 0.13	0.046 \pm 0.0061	8.31 \pm 0.05	1014 \pm 1.64
HCTZ	6.89 \pm 0.45	0.80 \pm 0.09 ^{ab}	0.62 \pm 0.07	0.96 \pm 0.11	0.032 \pm 0.0133	8.04 \pm 0.05	1017 \pm 0.62

Values are expressed as mean \pm SEM of 6-7 rats in each group in comparison with the positive control (C+; ^a $p < 0.05$) or Sham-operated group (^b $p < 0.05$) using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. El: excreted load; HCTZ: hydrochlorothiazide; ENAL: enalapril.

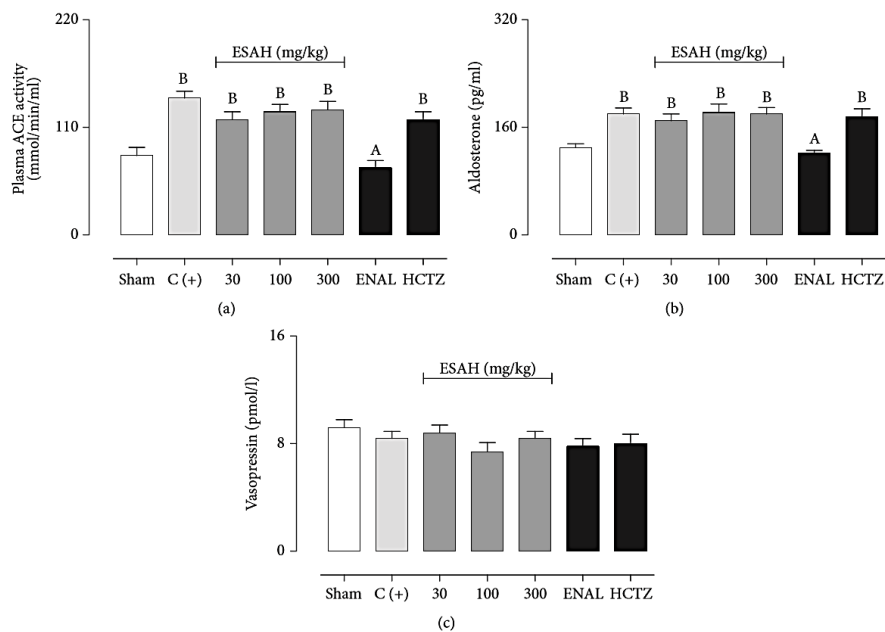


FIGURE 5: Prolonged treatment with ESAH does not affect plasma ACE activity (a) or serum levels of aldosterone (b) and vasopressin (c). The serum samples were obtained after 28 days of treatment with vehicle, ESAH (30, 100, and 300 mg/kg), ENAL (15 mg/kg), or HCTZ (25 mg/kg). The results show the mean \pm SEM ($n = 6-7$). Statistical analyses were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. ^a $p < 0.05$ when compared to 2K1C plus OVT-rats (C+). ^b $p < 0.05$ when compared to Sham-operated group. ACE: angiotensin converting enzyme; ENAL: enalapril; HCTZ: hydrochlorothiazide; Sham: placebo surgery.

ACE inhibitors, including ENAL, would exert cardioprotective effects regardless of the hypotensive action [18]. Current findings have indicated that ACE inhibitors may increase NO bioavailability and reduce oxidative and nitrosative stress parameters during hypertension. These effects provide an additional cardioprotective response to the sustained anti-hypertensive effect [19]. Therefore, considering our findings, ENAL was presented as a standard drug for comparison with the cardioprotective potential of ESAH.

Another point that deserves attention is the initiation of treatments with ESAH, ENAL, and HCTZ only 4 weeks after the surgical procedure. This option stems from the need to submit animals to a previous period of sustained activation of RAS and estrogen deprivation, a limiting step in oxidative/nitrosative imbalance and in the establishment of hypertension. In fact, all 2K1C plus OVT-rats had a high degree of oxidative/nitrosative stress, accompanied by increased vascular reactivity to PHE and a reduced vasodilatory

TABLE 7: Effects of oral administration of purified aqueous extract obtained from *A. hispidum* DC. (ESAH) on serum Na^+ , K^+ , urea, and creatinine on 28th day of treatment.

Group	Na^+ (mmol/L)	K^+ (mmol/L)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Sham	136.0 ± 0.35	4.81 ± 0.21	53.37 ± 1.37	0.37 ± 0.01
C+	119.1 ± 3.83	4.47 ± 0.20	55.07 ± 4.73	0.36 ± 0.02
ESAH (30 mg/kg)	131.7 ± 1.70	6.16 ± 0.50	63.68 ± 3.58	0.44 ± 0.03
ESAH (100 mg/kg)	131.2 ± 5.54	4.95 ± 0.47	54.43 ± 2.90	0.34 ± 0.01
ESAH (300 mg/kg)	119.4 ± 8.89	4.74 ± 0.41	49.40 ± 2.08	0.36 ± 0.01
ENAL	134.4 ± 1.36	5.21 ± 0.10	63.90 ± 1.35	0.40 ± 0.01
HCTZ	136.5 ± 0.63	4.85 ± 0.21	62.15 ± 2.64	0.35 ± 0.03

Values are expressed as mean ± SEM of 6-7 rats in each group in comparison with the positive control (C+) or Sham-operated group using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. HCTZ: hydrochlorothiazide; ENAL: enalapril.

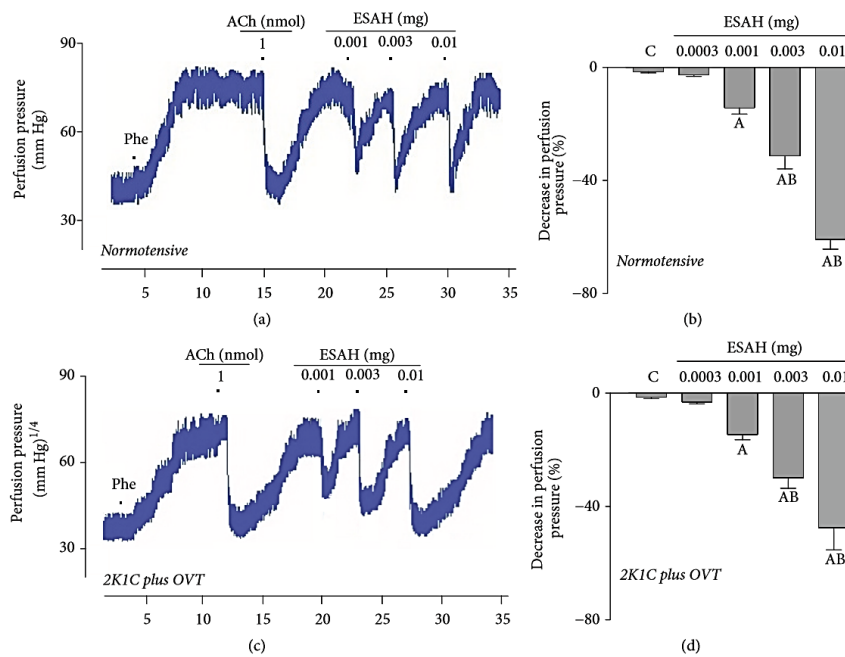


FIGURE 6: ESAH induces vasodilatory response in MVBs from normotensive and 2K1C plus OVT-rats. Effects of ESAH (0.001, 0.003, and 0.01 mg) on the perfusion pressure of the MVBs from normotensive (b) and 2K1C plus OVT-rats (d), perfused with physiological saline solution containing 3- μM phenylephrine (PHE). Trace recording of the MVBs pressure showing the effects of the administration of acetylcholine and ESAH in normotensive (a) and 2K1C plus OVT-rats (c). Values in panel are expressed as mean ± SEM of 5 experiments. A indicates $p < 0.05$ compared with the perfusion pressure recorded before ESAH. B indicates $p < 0.05$ compared with the previous dose. All experiments were performed in endothelium-intact preparations.

response to ACh and SNP, showing a significant change in endothelial and vascular smooth muscle function. In addition, we observed a significant increase in ACE activity and aldosterone levels, which may have contributed directly to the onset of hypertension. Treatment with ESAH significantly reduced TBARS and NT levels and increased nitrite concentration (an indirect marker of NO bioavailability),

showing important antioxidant and antinitrosant properties. In addition, ESAH treatment restored vascular reactivity to PHE, ACh, and SNP, demonstrating its significant vasoprotective effects in 2K1C plus OVT-rats. In fact, this response may play a central role in the cardiorenal effects of ESAH, since, unlike ENAL, ESAH did not affect ACE activity and aldosterone levels.

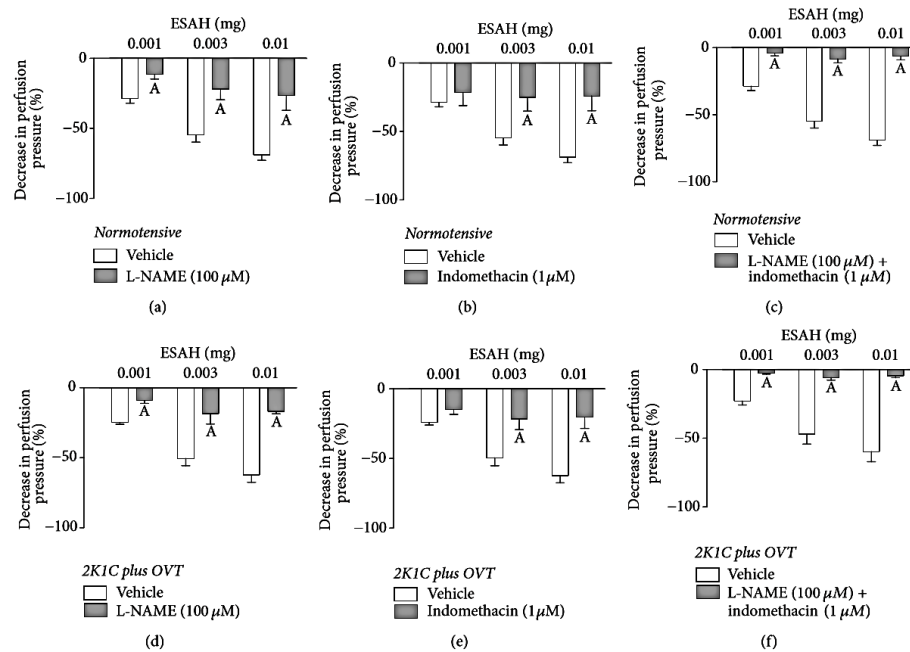


FIGURE 7: Role of NO and prostaglandins on the vasorelaxant effect of ESAH in MVBs from normotensive and hypertensive rats (2K1C plus OVT). Effects of ESAH (0.001, 0.003, and 0.01 mg) on endothelium-intact MVBs continuously perfused with L-NAME ((a) and (d)), indomethacin ((b) and (e)), or coadministration of L-NAME and indomethacin ((c) and (f)). The results show the mean \pm SEM of 5 preparations per group. A indicates $p < 0.05$ compared with the effects of ESAH on the respective vehicle group.

When we look closely at the renal effects of ESAH, we will see that while HCTZ showed an expected diuretic response, with an increase in water and electrolyte elimination after first administration, followed by a reduction of the diuretic effect by compensatory mechanisms, ESAH did not affect the urine volume eliminated. On the other hand, an important saluretic effect was evident, especially on the elimination of Na^+ and Cl^- throughout the experimental period. In fact, at the lowest doses (30 and 100 mg/kg), the saluretic effect was evident only on the 1st and 7th days of treatment, while renal Na^+ and Cl^- elimination continued significantly only at the highest dose tested (300 mg/kg). If we look at the antihypertensive effect of ESAH, we will see that the most significant reduction in blood pressure levels also occurred at the lowest dose used. This fact may explain in part the reduction of the saluretic response observed after the 7th day of treatment, since an eventual reduction of renal hydrostatic pressure, due to the sustained reduction of blood pressure, can reduce glomerular filtration rate and renal salt and water elimination. This effect was also evident with HCTZ, a classic antihypertensive drug that, despite inducing significant diuretic effect in the first dose, showed an important reduction in its efficacy after prolonged treatment.

It is known that cardiorenal regulation may involve several endogenous mediators, including prostaglandins, NO, and the endothelium-derived hyperpolarizing factor, synergistically acting in a complex hemodynamic and neuro-humoral interaction [20]. In our study, it has been shown that the cardiorenal effects induced by ESAH appear to be influenced by an expressive antioxidant activity, which could influence the increase in the bioavailability of NO and consequently the vascular reactivity. Although suggestive, there is still some doubt whether the effect is due to direct release of NO by secondary metabolites present in ESAH or a consequence of the potent antioxidant activity. The fact is that substances that reduce reactive oxygen species may increase the bioavailability of NO and prostaglandins and consequently induce systemic vasodilator responses [21].

In order to prove this hypothesis, we evaluated the ability of ESAH to reduce perfusion pressure in the MVBs from normotensive and 2K1C plus OVT-rats in the absence and presence of L-NAME and indomethacin, two drugs capable of inhibiting NO and prostaglandin synthase, respectively. The putative blockade of NO and prostaglandin synthesis prevented the reduction of perfusion pressure induced by ESAH in the MVBs, suggesting that the release of NO and

prostaglandins could be involved in this effect. A data that reinforces our findings was described in a recent study [5] where it shows that an extract with a similar phytochemical profile was able to induce a NO-dependent acute hypotensive response in normotensive rats, evidencing the importance of NO in the cardiovascular effects of ESAH. Although we believe that the cardiorenal effects presented in this study result from a complex interaction among different secondary metabolites present in the ESAH, the fact that there may be one or more agents involved cannot be ruled out. Biomonitoring studies can help answer these questions and, if possible, identify the agent that stands out in this process.

5. Conclusions

A 28-day ESAH treatment reduces the blood pressure levels in 2K1C-ovariectomized rats. These effects are associated with an important antioxidant and antinitrosant action, in addition to a significant saluretic effect. Probably, this response has a direct contribution of the reduction in vascular resistance, possibly mediated by the release of NO and prostaglandins.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil, 59/300.046/2015), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, 449464/2014-8). The authors are grateful to Department of Biochemistry and Molecular Biology of Federal University of Paraná and University Hospital of the Federal University of Grande Dourados for mass spectrometry and biochemical analysis, respectively.

References

- [1] A. Sarma and N. S. Scott, "Assessing and modifying coronary artery disease risk in women," *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, vol. 19, no. 7, 2017.
- [2] R. Lima, M. Wofford, and J. F. Reckelhoff, "Hypertension in postmenopausal women," *Current Hypertension Reports*, vol. 14, no. 3, pp. 254–260, 2012.
- [3] M. L. Muesan, M. Salvetti, C. A. Rosei, and A. Paini, "Gender Differences in Antihypertensive Treatment: Myths or Legends?" *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*, vol. 23, no. 2, pp. 105–113, 2016.
- [4] P. Rufus, N. Mohamed, and A. N. Shuid, "Beneficial effects of traditional Chinese medicine on the treatment of osteoporosis on ovariectomized rat models," *Current Drug Targets*, vol. 14, no. 14, pp. 1689–1693, 2013.
- [5] C. A. Tirloni, F. A. Livero, R. A. Palozi et al., "Ethnopharmacological investigations of the cardio-renal properties of a native species from the region of Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 206, pp. 125–134, 2017.
- [6] I. G. C. Bieski, F. Rios Santos, R. M. De Oliveira et al., "Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 272749, 36 pages, 2012.
- [7] A. Umar, G. Imam, W. Yimin et al., "Antihypertensive effects of *Ocimum basilicum* L. (OBL) on blood pressure in renovascular hypertensive rats," *Hypertension Research*, vol. 33, no. 7, pp. 727–730, 2010.
- [8] S. T. Kau, J. R. Keddie, and D. Andrews, "A method for screening diuretic agents in the rat," *Journal of Pharmacological Methods*, vol. 11, no. 1, pp. 67–75, 1984.
- [9] A. Gasparotto Jr., M. A. Boffo, E. L. B. Lourenço, M. E. A. Stefanello, C. A. L. Kassuya, and M. C. A. Marques, "Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 122, no. 3, pp. 517–522, 2009.
- [10] D. D. McGregor, "The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat," *The Journal of Physiology*, vol. 177, no. 1, pp. 21–30, 1965.
- [11] H. H. H. W. Schmidt, P. Wilke, B. Evers, and E. Böhme, "Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 165, no. 1, pp. 284–291, 1989.
- [12] R. A. S. Santos, E. M. Krieger, and L. J. Greene, "An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme," *Hypertension*, vol. 7, no. 2, pp. 244–252, 1985.
- [13] N. Dartora, L. M. De Souza, A. P. Santana-Filho et al., "UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing," *Food Chemistry*, vol. 129, no. 4, pp. 1453–1461, 2011.
- [14] J. Carlotto, L. M. Da Silva, N. Dartora et al., "Identification of a dicaffeoylquinic acid isomer from *Arctium lappa* with a potent anti-ulcer activity," *Talanta*, vol. 135, pp. 50–57, 2015.
- [15] M. Carini, R. Maffei Facino, G. Aldini, M. Calloni, and L. Colombo, "Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 12, no. 22, pp. 1813–1819, 1998.
- [16] L. M. de Souza, N. Dartora, C. T. Scoparo, P. A. J. Gorin, M. Iacomini, and G. L. Sasaki, "Differentiation of flavonol glucoside and galactoside isomers combining chemical isopropylideneation with liquid chromatography-mass spectrometry analysis," *Journal of Chromatography A*, vol. 1447, pp. 64–71, 2016.
- [17] D. Cooney, S. Milfred-LaForest, and M. Rahman, "Diuretics for hypertension: Hydrochlorothiazide or chlorthalidone?" *Cleveland Clinic journal of medicine*, vol. 82, no. 8, pp. 527–533, 2015.
- [18] P. P. Toth, "Pleiotropic effects of angiotensin receptor blockers: addressing comorbidities by optimizing hypertension therapy," *Journal of Clinical Hypertension*, vol. 13, no. 1, pp. 42–51, 2011.
- [19] A. Wzgarda, R. Kleszcz, M. Prokop et al., "Unknown face of known drugs – what else can we expect from angiotensin converting enzyme inhibitors?" *European Journal of Pharmacology*, vol. 797, pp. 9–19, 2017.

- [20] M. Feletou and P. M. Vanhoutte, "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?" *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 6, pp. 1215–1225, 2006.
- [21] P. Zizkova, M. Stefek, L. Rackova, M. Prnova, and L. Horakova, "Novel quercetin derivatives: from redox properties to promising treatment of oxidative stress related diseases," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 265, pp. 36–46, 2017.

6 ANEXOS



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, 4 de dezembro de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Investigação dos efeitos reno e cardioprotetores de Acanthospermum hispidum DC em ratas ovariectomizadas com hipertensão renovascular”**, registrada sob o protocolo de nº 45/2016, sob a 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 aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 30/09/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/12/2016 a 01/11/2018
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus/ Wistar
Nº de animais	70
Peso/idade	60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFGD

Melissa Negrão Sepulvida

Melissa Negrão Sepulvida
Coordenadora CEUA