

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Avaliação do efeito hipolipêmico e anti-
inflamatório do extrato de butiá (*Butia odorata*)
em ratos tratados com tyloxapol**

Vanessa Plasse Ramos

Pelotas, Março de 2018.

Vanessa Plasse Ramos

Avaliação do efeito hipolipêmico e anti-inflamatório do extrato de butiá (*Butia odorata*) em ratos tratados com tyloxapol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Francieli Moro Stefanello

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rejane Giacomelli Tavares

Pelotas, Março de 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R175a Ramos, Vanessa Plasse

Avaliação do efeito hipolipêmico e anti-inflamatório do extrato de butiá (*Butia odorata*) em ratos tratados com tyloxapol / Vanessa Plasse Ramos ; Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Rejane Giacomelli Tavares, coorientadora. — Pelotas, 2018.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Hiperlipidemia. 2. *Butia odorata*. 3. Compostos fenólicos. 4. Parâmetros metabólicos. 5. Parâmetros inflamatórios. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Tavares, Rejane Giacomelli, coorient. III. Título.

CDD : 664

Vanessa Plasse Ramos

Avaliação do efeito hipolipêmico e anti-inflamatório do extrato de butiá (*Butia odorata*) em ratos tratados com tyloxapol

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data de defesa: 07.03.2018

Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (orientadora) – Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. Augusto Schneider – Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas



Prof. Dr. Rafael Guerra Lund – Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho a minha mãe, minha melhor amiga pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela compreensão e incentivo ao longo de minha trajetória

Agradecimentos

Agradeço, em especial, a minha mãe, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Aos integrantes do Laboratório Biomarcadores, em especial Pâmela, Thiane, Natália e Pathise por me ajudarem nos experimentos necessários para o desenvolvimento desse trabalho.

A Pathise pela paciência e auxílio tanto nos experimentos como na realização dos cálculos dos resultados.

As minhas orientadora e co-orientadora, Dra. Francieli Moro Stefanello e Dra. Rejane Giacomelli Tavares pela orientação, confiança, oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho, bem como pelas suas correções e incentivo.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de entusiasmo compartilhados em conjunto.

Finalmente, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho. OBRIGADA!!!

"O segredo da força está na vontade"
(Giuseppe Mazzini)

RESUMO

RAMOS, Vanessa Plasse. **Avaliação do efeito hipolipêmico e anti-inflamatório do extrato de butiá (*Butia odorata*) em ratos tratados com tyloxapol.** 2018. 66f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

A hiperlipidemia é uma das condições metabólicas que determina o aparecimento de doenças degenerativas crônicas, como a aterosclerose. A formação das lesões iniciais parece estar intimamente ligada ao aumento focal do conteúdo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) dentro de regiões da camada íntima, devido não só às alterações na permeabilidade do endotélio, mas principalmente porque essas se ligam a constituintes da matriz celular, aumentando o tempo de permanência das partículas ricas em lipídios dentro da parede arterial. Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do extrato de fruto de *Butia odorata* sobre parâmetros metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos submetidos a um modelo experimental de hiperlipidemia induzida por tyloxapol. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: (1) solução salina, (2) solução salina e tyloxapol e (3) extrato hidro-alcoólico de *B. odorata* e tyloxapol, os quais foram tratados durante 15 dias com solução salina ou extrato (200 mg/kg por gavagem) e a hiperlipidemia foi induzida pela administração intraperitoneal de tyloxapol (300 mg/kg) no 15º dia. O soro e o fígado foram utilizados para as análises bioquímicas. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o extrato de *B. odorata* reduziu os níveis de triglicerídeos e de colesterol total, e aumentou os níveis de colesterol HDL, quando comparado ao grupo tyloxapol. A atividade da enzima PON-1 aumentou em soro de animais que receberam o extrato de *B. odorata* em relação aos tratados com tyloxapol. Por outro lado, os níveis séricos de proteína C-reativa, bem como as atividades da adenosina deaminase e butirilcolinesterase tiveram uma redução significativa devido ao tratamento com extrato. Não foram observadas diferenças nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados em fígado. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados por LC-MS. Nossos achados sugerem que o consumo crônico de extrato de *B. odorata* tem efeitos hipolipêmicos e anti-inflamatórios em um modelo animal de hiperlipidemia.

Palavras-chave: Hiperlipidemia, *Butia odorata*, Compostos Fenólicos, Parâmetros Metabólicos, Parâmetros Inflamatórios

ABSTRACT

RAMOS, Vanessa Plasse. Evaluation of hypolipidemic and anti-inflammatory effects of *Butia odorata* fruit extract in rats treated with tyloxapol. 2018. 66f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Hyperlipidemia is one of the metabolic conditions that determine the onset of chronic degenerative diseases, such as atherosclerosis. The formation of the initial lesions seems to be closely linked to the focal increase of the low density lipoprotein (LDL) content within regions of the intima, due not only to changes in the permeability of the overlying endothelium, but mainly because they bind to constituents of the cell matrix, increasing the durability of the lipid-rich particles inside the arterial wall. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of *Butia odorata* fruit extract on metabolic, inflammatory and oxidative stress parameters in rats submitted to an experimental model of hyperlipidemia induced by tyloxapol. Animals were divided into 3 experimental groups: (1) saline, (2) saline and tyloxapol and (3) *B. odorata* hydro-alcoholic extract and tyloxapol. The animals were treated for 15 days with saline or extract (200 mg/kg by gavage) and hyperlipidemia was induced by intraperitoneal administration of tyloxapol (300 mg/kg) on day 15. Serum and liver were used for biochemical analyses. Our results showed that *B. odorata* extract treatment reduced triglyceride levels and total cholesterol, and increased HDL-cholesterol, when compared with tyloxapol group. PON-1 activity (HDL-cholesterol related) increased in serum of animals that received *B. odorata* extract compared with tyloxapol-treated animals. On other hand, serum C-reactive protein levels, as well as adenosine deaminase and butyrylcholinesterase activities had a significant reduction due to extract treatment. No differences were observed in hepatic oxidative stress parameters. Phenolic compounds were identified and quantified by LC-MS. Our findings suggest that chronic consumption of *B. odorata* extract has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in a hyperlipidemia animal model.

Key words: Hyperlipidemia, *Butia odorata*, Phenolic Compounds, Metabolic parameters, Inflammatory parameters

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Neutralização de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (LDL oxidada) por paraoxonases (PONs)

Figura 2: Frutos, Palmeiras e Folhas de *B. odorata*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh - Acetilcolina

ADA - Adenosina Deaminase

ADP - Adenosina difosfato

ALT - Alanina aminotransferase

AMP - Adenosina monofosfato

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Trifosfato de adenosina

B. odorata – *Butia odorata*

BuChE - Butirilcolinesterase

CAT – Catalase

CE - Células endoteliais

CK - Creatina cinase

DCVs - Doenças Cardiovasculares

e5NT, CD73 - ecto-5'-nucleotidase

eADA – ecto-ADA

eNTPD 1,CD39 ecto - Nucleosideo trifosfato difosfohidrolase

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FAL - Fosfatase Alcalina

GGT - Gama glutamil transferase

GLI – Glicose

GPx - Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HDL-C - HDL-Colesterol

HMG-CoA reductase - Hidroximetilglutaril-CoA reductase

hsCRP - Proteína C Reativa Ultra - Sensível

IAM - Infarto agudo do miocárdio

IL – Interleucina

iNOS - Inibição da óxido nítrico sintase

LDL-C - LDL-Colesterol

LDL-ox - LDL-oxidado

LDLR - Receptor de lipoproteínas de baixa densidade

MPO - Mieloperoxidase

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização mundial da saúde

PCSK9 - Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9

PON1 - Paraoxonase-1

SH – Sulfidrila

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TG – Triglicerídeos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
Objetivo Geral.....	16
Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
Hiperlipidemia	17
Modelo animal de Hiperlipidemia	18
Aterosclerose	20
Estresse oxidativo, Atividade da Paraoxonase (PON1) e HDL-C.....	24
<i>Butia odorata</i> (Butiá)	28
4. MANUSCRITO	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS	59
ANEXO.....	65

1. INTRODUÇÃO

A hiperlipidemia é caracterizada por níveis de triglicerídeos plasmáticos (TG) e LDL-colesterol (LDL-C) aumentados, acompanhados de níveis reduzidos de colesterol HDL (HDL-C). É conhecida como um dos fatores de risco para a progressão da aterosclerose e doença cardiovascular (DCVs) (De Sousa et al., 2017).

As DCVs são uma consequência do processo de aterosclerose, que é uma doença inflamatória crônica que ocorre em resposta à agressão endotelial, deposição de lipídios, migração de células musculares e calcificação (Faria e Souza et al., 2017), além dos níveis reduzidos de HDL-C (Zsíros et al., 2016). Desta forma, as alterações nos marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa (hsCRP) mostraram-se associadas ao risco de DCVs, morbidade e mortalidade; e as elevações, mesmo que modestas, dos níveis deste marcador também estão presentes em condições inflamatórias crônicas, como a aterosclerose (Velloso et al., 2013; Wedell-Neergaard et al., 2018). Além disso, enzimas da classe das colinesterases como adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) ou butirilcolinesterase (BuChE, E.C. 3.1.1.8,) podem estar envolvidas na resposta inflamatória relacionado com as DCVs, através de mecanismos desencadeadores e/ou propagadores da inflamação. A ADA é uma enzima importante na degradação da adenosina endógena e nas respostas inflamatórias agudas e prolongadas. Já a BuChE é uma enzima colinesterase não específica, que atua sobre a butirilcolina, acetilcolina (ACh) e vários ésteres de colina, desempenhando papel importante na modulação da atividade da célula imune, estando aumentada na obesidade (Goliasch et al., 2012; De Bona et al., 2013; Kim et al., 2016). Embora seu papel biológico não tenha sido claramente estabelecido, os marcadores acima descritos têm sido associados com inflamações e alterações do metabolismo lipídico, bem como no desenvolvimento de aterosclerose (Pytel et al., 2016).

Adicionalmente, o processo de estresse oxidativo também está intimamente relacionado com patologias como DCVs e aterosclerose. Esse se caracteriza como uma condição biológica em que ocorre o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes que removem ou reparam os danos causados (Baldissera et al., 2016).

Nesse sentido, a hiperlipidemia causa também um comprometimento no sistema antioxidante hepático, como o aumento dos marcadores hepáticos do dano oxidativo, aumento da peroxidação lipídica e a perda no sistema de defesa enzimático antioxidante, primariamente relacionado com a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), resultando em dano celular (Baldissera et al., 2016).

Além das enzimas classicamente relacionadas com o sistema redox celular, outras enzimas também parecem ter suas atividades relacionadas com o desequilíbrio entre a produção de ERO e antioxidantes. Um exemplo é a mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma peroxidase que merece destaque na hiperlipidemia, visto ser uma geradora de radicais livres, além de possuir grande importância na promoção da oxidação em lipoproteínas *in vivo*, conforme já bem descrita na literatura (Haraguchi et al., 2014; Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017).

Outro ponto de extremo interesse no âmbito das hiperlipidemias refere-se ao papel do HDL-C, que apresenta um papel importante no efluxo do colesterol dos tecidos para o fígado, além de propriedades anti-inflamatórias e antiapoptóticas (Zsíros et al., 2016). Estas propriedades, especialmente relacionadas com o papel antioxidante do HDL-C, têm sido bastante investigadas e os estudos demonstram que esta é originada através da associação do HDL-C com a enzima paraoxonase-1 (PON1) (Zsíros et al., 2016). Esta é uma enzima da classe das hidrolases, dependente do cálcio, que é produzida pelo fígado e liberada no soro. PON-1 é uma enzima associada ao HDL-C, principalmente por ser associada à apo-AI. Experimentos mostraram que a PON1 pode inibir a geração de LDL-C oxidado (LDL-ox) e prevenir a peroxidação de ésteres de colesterol (Argani et al., 2016). Devido ao papel fundamental da oxidação de LDL-C na indução de aterosclerose, a atividade sérica reduzida de PON1 pode explicar um dos mecanismos essenciais para o aumento do risco de aterosclerose e DCVs em pacientes hiperlipidêmicos (Argani et al., 2016).

Com base nos conhecimentos acerca das patologias resultantes da condição de hiperlipidemia, diversos esforços são feitos no sentido de diminuir estes efeitos, seja com o uso de terapia farmacológica ou com alterações em estilo de vida. Dentre os alimentos, aqueles que possuem altas taxas de flavonóides, compostos fenólicos, atividade antioxidante, antocianinas e

carotenóides parecem ser promissores para o tratamento e até mesmo para a prevenção de patologias (Pereira et al., 2013). Diversos estudos demonstram múltiplas funções biológicas para estes grupos de metabólitos especializados, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-hipertensivas, anti-hiperlipidêmicas e hipoglicêmicas (Del Rio et al., 2012; Gazal et al., 2015; Oliveira et al., 2017; Limmongkon et al., 2017). Khamis et al (2017) mostraram que os flavonóides inibem a enzima HMG-CoA redutase hepática *in vitro* e *in vitro*, contribuindo para níveis de redução do colesterol total (Khamis et al., 2017).

Butia odorata (*B. odorata*), popularmente conhecida como Butiá, é uma fruta nativa brasileira, ocorrendo com maior prevalência na região sul do país. Pesquisadores relataram que esta fruta apresenta uma variedade de propriedades farmacológicas dentre elas, atividade antimicrobiana e antioxidante, atuando diretamente na peroxidação lipídica, bem como anti-inflamatório, sendo estas características atribuídas a grandes quantidades de compostos fenólicos identificados em seu conteúdo (Beskow et al., 2015; Schneider et al., 2017; Oliveira et al., 2017; Cardoso et al., 2017).

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito hipolipêmico, anti-inflamatório e antioxidante do extrato hidroalcoólico da fruta de *B. odorata* em modelo animal de hiperlipidemia induzida por tyloxapol. É importante destacar que este é um estudo pioneiro nos relatos de efeitos biológicos do extrato de frutos de *B. odorata* no modelo proposto.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos de extratos de frutos de *Butia odorata* sobre parâmetros bioquímicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo animal de hiperlipidemia induzida pelo tyloxapol.

Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da administração do extrato de *Butia odorata* sobre parâmetros bioquímicos séricos como colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FAL), glicose (GLI) e proteína C-reativa (hsCRP) em animais submetidos ao modelo de hiperlipidemia induzida por tyloxapol.

Determinar o efeito da administração do extrato de *Butia odorata*, sobre a atividade da adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4), butirilcolinesterase (E.C. 3.1.1.8, BuChE) e da paraoxonase-1 (PON1) em soro de animais submetidos ao modelo de hiperlipidemia induzida por tyloxapol.

Determinar o efeito da administração de *Butia odorata* sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, como as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), níveis de nitrito, conteúdo total de grupamentos sulfidrilas e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx) em fígado de animais submetidos ao modelo de hiperlipidemia induzida por tyloxapol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Hiperlipidemia

O fígado desempenha um papel importante no metabolismo lipídico, removendo grande parte do colesterol do soro, processando-o intracelularmente e levando à excreção biliar, por exemplo, essencial para a eliminação do colesterol em excesso (Baldissera et al., 2016). Embora o colesterol seja essencial para diversas sínteses biológicas, como síntese de membranas, precursor da síntese de ácidos biliares, vitaminas e hormônios, é sabido que altos níveis desta partícula podem estar associados a distúrbios metabólicos, como por exemplo, a hiperlipidemia. Esta patologia é extremamente ocorrente e afeta mais de 180 milhões de pessoas em todo o mundo (Baldissera et al., 2016).

Além do aumento do colesterol, a hiperlipidemia é caracterizada também por níveis elevados de TG e LDL-C, acompanhados por níveis reduzidos de HDL-C (De Souza et al., 2017). Os níveis séricos elevados de LDL-C são conhecidos como um dos fatores de risco mais importantes para as doenças cardiovasculares (DCVs). De uma maneira geral, as DCVs são uma consequência do processo aterosclerótico, caracterizada como uma doença inflamatória crônica, que ocorre em resposta à agressão endotelial, deposição lipídica, migração de células musculares e calcificação, afetando, principalmente, a camada íntima das artérias de grande e médio calibre (Baldissera et al., 2016; Faria e Souza et al., 2017).

Dessa forma, a redução do colesterol total e LDL-C, bem como a proteção endotelial, são medidas importantes para o controle da doença aterosclerótica e suas complicações como o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a hipertensão arterial sistêmica (HAS). Da mesma forma, o impacto da DCVs relacionados com a sua alta morbidade e mortalidade tem levado a comunidade científica a desenvolver diversos estudos metabólicos e toxicológicos na tentativa de elucidar os fatores de risco para a hiperlipidemia e suas consequências patológicas, como por exemplo, lesões no sistema cardiovascular, cérebro, entre outros (Faria e Souza, 2017).

A via biossintética endógena do colesterol é controlada principalmente pela enzima limitante 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, a qual

catalisa a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico. Assim, esta enzima é o alvo de medicamentos amplamente disponíveis no mercado, que atuam através da redução dos níveis séricos de colesterol. A principal classe destes medicamentos são as estatinas, que diminuem a síntese de colesterol por inibir a atividade da HMG-CoA redutase (Rony et al., 2014; De Sousa et al., 2017).

Entretanto, vários efeitos adversos foram associados ao uso destes fármacos, dentre eles: elevação assintomática da creatina cinase (CK) nos músculos, rabdomiólise, problemas gastrintestinais e hepáticos, provocando a procura por estratégias seguras e eficazes para tratar a hiperlipidemia, inclusive com alimentos (De Sousa et al, 2017).

Muitos alimentos funcionais têm sido investigados por suas potenciais propriedades hipolipemiantes, através de uma abordagem global da redução de lipídeos, especialmente daquelas frações sabidamente aterogênicas como LDL-C. Aqueles com efeitos bioquímicos promissores sobre os níveis plasmáticos de lipídeos incluem: proteína de soja, chá verde, esteróis vegetais, probiótico, iogurte, ácidos graxos ômega-3, arroz vermelho fermentado (Marinangeli et al., 2010; Hunter & Hegele, 2017). Esses alimentos funcionais apresentam uma atividade antioxidante capaz de reduzir a oxidação de LDL-C (Hunter & Hegele, 2017).

Modelo Animal de Hiperlipidemia

Os modelos animais são ferramentas de grande importância tanto na pesquisa básica, quanto na aplicada. Estes modelos permitem o estudo da biologia humana e das doenças, além do desenvolvimento de medicamentos e a investigação do impacto de um determinado tratamento, no intuito de melhorar e promover a saúde humana. Para praticamente todas as doenças humanas, pode-se encontrar modelos que tentam induzir aspectos semelhantes nos animais, no intuito de replicar o sistema humano (Greek, 2001).

Entretanto, com a utilização de modelos animais é impossível recriar fielmente todos os aspectos de uma determinada doença, mesmo que os modelos experimentais mimetizem um ou alguns dos sintomas associados à doença ou sejam sensíveis aos fármacos utilizados clinicamente (Fagundes & Taha, 2004). O modelo experimental de indução de hiperlipidemia, com o uso

de surfactante, é amplamente utilizado para diversos objetivos: avaliar a eficácia de substâncias naturais ou sintéticas com possíveis efeitos hipolipemiantes, estudar afecções patológicas que possam ser induzidas pela hiperlipidemia, como por exemplo, a aterosclerose (Castro et al, 2012).

Neste contexto, para induzir a hiperlipidemia em ratos tem sido utilizado Triton WR-1339® (Tyloxapol) (Bertges et al., 2011). O surfactante tyloxapol é um detergente não iônico capaz de inibir diretamente as enzimas lipolíticas responsáveis pela hidrólise de lipídeos plasmáticos, tais como lipases de lipoproteínas, bloqueando assim a absorção de lipídeos da circulação para tecidos extra-hepáticos, resultando em aumento da concentração de lipídeos no sangue, colesterol total e TG séricos (Bertges et al., 2011; Catro et al., 2012). O tyloxapol aumenta os níveis plasmáticos de colesterol total por promover a síntese hepática deste, particularmente através de uma maior indução da atividade de HMG-CoA redutase (Bertges et al., 2011; Catro et al., 2012).

Atualmente, estudos dietéticos, toxicológicos e metabólicos são extensivamente elaborados na tentativa de elucidar os fatores de risco para hiperlipidemia e suas conseqüências patológicas, tais como lesões no sistema cardiovascular, cérebro, entre outros. As vantagens da indução de hiperlipidemia experimental são a geração de lesões ateromatosas em curto espaço de tempo, controle dietético adequado aliado a fatores ambientais, a possibilidade de estudos sobre a reversibilidade de lesões ateroscleróticas e ensaios pré-clínicos de substâncias hipolipemiantes (Castro et al., 2012).

O aumento do colesterol total é considerável e ocorre em, no máximo, 24 horas, porem após esse período os valores voltam ao normal (Castro et al., 2012; Khamis et al., 2017). No estudo de Castro et al (2012) foi demonstrado que a administração parenteral do tyloxapol em ratos adultos induziu a hiperlipidemia e os níveis máximos de colesterol total e TG plasmático foram alcançados em 20 horas após sua aplicação, seguido por uma redução aos valores normais logo após. Resultados similares também foram evidenciados por outros autores (Harnfi et al., 2007; Bertges et al., 2011).

Eventualmente estudos com tyloxapol são conduzidos de forma crônica, devido ao fato dos valores de colesterol total e TG plasmático retornarem à faixa de normalidade rapidamente após sua administração (Castro et al, 2012). No mesmo sentido, as doses de tyloxapol descritas para indução de

hiperlipidemia em ratos variam de acordo com os estudos e estão descritas em intervalos de 100 a 600 mg/kg, a partir da solução previamente diluída com solução fisiológica a 10% (Bertges et al., 2011; Castro et al., 2012).

No estudo de Bertges e colaboradores (2011) foi induzida a hiperlipidemia através da administração de 200 mg/Kg do tyloxapol e os valores de colesterol atingiram em torno de 300 mg/dL, em até 3 dias. Em adição, Castro e colaboradores (2012) utilizaram esse surfactante, na dose de 500 mg/kg, e também encontraram valores elevados de colesterol, porém a elevação persistiu por até 4 semanas.

Aterosclerose

A hiperlipidemia e os distúrbios das lipoproteínas séricas têm sido conhecidos como fatores de risco para a progressão da aterosclerose e DCVs. E nesse sentido as DCVs são uma consequência do processo de aterosclerose, que é uma doença inflamatória crônica que ocorre em resposta a agressão endotelial, deposição de lipídeos, migração de células inflamatórias, oxidação do LDL-C e calcificação e níveis reduzidos de HDL-C na camada íntima das artérias provocando a formação da placa aterosclerótica (Rony et al., 2014; Argani et al., 2017; Faria e Souza, 2017).

As moléculas de LDL-C depositadas nas artérias são facilmente oxidadas à LDL-ox, quando na presença de ERO (Cerchiaro & Honório, 2011; Tabas et al., 2015). Estas moléculas provocam um ataque ao tônus endotelial, ocasionando uma resposta inflamatória na região (Cerchiaro & Honório, 2011; Tabas et al., 2015). LDL-ox impulsionam a expressão de moléculas de adesão e ligação posterior às células inflamatórias, assim como sua migração no espaço subendotelial (Cerchiaro & Honório, 2011; Tabas et al., 2015). As consequências disso são a disfunção endotelial, agregação plaquetária, expressão de metaloproteinase e trombogênese. Com o acúmulo progressivo de LDL-ox, os macrófagos modulam seu fenótipo, tornando-se as chamadas células espumosas (Cerchiaro & Honório, 2011; Tabas et al., 2015).

Para reduzir à oxidação de LDL-ox, a adoção de estilos de vida saudáveis são as principais medidas não farmacológicas que devem ser elaboradas antes de qualquer outra medida farmacológica. Existe uma gama de terapias hipolipemiantes disponíveis no mercado, onde as mais utilizadas

são as estatinas. Apesar disto, as terapêuticas existentes, por vezes, mostram ser insuficientes ou até mesmo ineficazes. Dessa forma, estudos recentes permitiram a descoberta de um novo alvo terapêutico, especialmente relacionada aos altos níveis de LDL-C, para tentar minimizar a formação de placa de ateroma: a pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) (Tang et al., 2017).

A relação direta da PCSK9 com o mecanismo principal de metabolização de LDL-C tem sido demonstrada, e consiste na degradação hepática desta fração do colesterol total, cuja endocitose das lipoproteínas é mediada através de apolipoproteínas, como Apo-E, que se liga a receptores específicos. A PCSK9 é a nona proteína da família pró-proteína convertase, e foi descoberta em 2003 e identificada como um novo contribuinte para a homeostase do colesterol (Tang et al., 2017). Estudos demonstraram também que a PCSK9 tem uma função fundamental na degradação do receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) (Tavori et al., 2016; Tang et al., 2017)

Assim, a variação genética no locus PCSK9 diminui moderadamente os níveis de LDL-C, mas não reduz significativamente o risco de doença vascular em uma população idosa (Tang et al., 2017). Ainda assim, a superexpressão de PCSK9 acelera a aterosclerose sem afetar os níveis lipídicos de ratos (Tang et al., 2017). Com isso, a PCSK9 poderia acelerar a aterosclerose através de mecanismos além da degradação de LDLR hepático (Tang et al., 2017).

A inflamação subclínica crônica é uma característica intrínseca da aterosclerose, e durante a inflamação sistêmica pode-se observar o aumento de alguns marcadores inflamatórios como a hsCRP e enzimas como a adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) e butirilcolinesterase (BuChE, E.C. 3.1.1.8,) que também podem estar envolvidas no patogênese das DCVs (De bona et al., 2013; Kim et al., 2016).

A hsCRP é uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado e regulada por citocinas, predominantemente interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) (Volp et al., 2008; Pereira et al., 2006). Embora o fígado seja a principal fonte de hsCRP, adipócitos e tecido arterial também sintetizam esta proteína. Seus níveis são aumentados em resposta a infecções ou ao processo subclínico crônico (Velloso et al., 2013).

As elevações modestas dos níveis de hsCRP também estão presentes em condições inflamatórias crônicas, como a aterosclerose, e seus níveis

triplicaram aproximadamente na presença de risco de doenças vasculares periféricas (Velloso et al., 2013). Assim, embora inespecíficos, os valores séricos de hsCRP são passíveis de utilização como marcadores de para eventos cardiovasculares (Velloso et al., 2013).

As colinesterases são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, uma reação essencial que permite o retorno do neurônio colinérgico ativado ao estado de repouso. Dentro dessa classe de enzimas podemos citar a AChE e BuChE (Pytel et al., 2016). Essas enzimas têm diferentes preferências para os substratos, acetilcolina e butirilcolina, respectivamente. AChE, também chamado de colinesterase de glóbulos vermelhos, é mais abundante nas membranas dos eritrócitos, sistema nervoso central e músculo esquelético, enquanto BuChE, também chamado de colinesterase plasmática, é secretado em plasma e sintetizado no fígado (Pytel et al., 2016; Sicinska et al., 2017).

BuChE é uma enzima colinesterase não específica que atua sobre a butirilcolina, ACh e vários ésteres de colina, desempenhando papel importante na modulação da atividade da célula imune, estando aumentada em casos de obesidade, sabidamente uma condição inflamatória crônica (Goliasch et al., 2012; De Bona et al., 2013; Kim et al., 2016; Pytel et al., 2016). Estudos demonstraram relações diretas significativas entre a atividade da colinesterase e os TG, o HDL-C e LDL-C (Vanzin et al., 2015; Kim et al., 2016).

Os pacientes com doença arterial coronariana demonstraram um aumento de 47% na atividade de BuChE e um nível elevado de colesterol. Kalman e colaboradores (2004) relataram associações entre a atividade BuChE e o aumento dos níveis de colesterol sérico e TG em humanos. Sugeriram também que o colesterol elevado pode mudar a estrutura espacial da enzima e afetar o aumento da atividade BuChE. Outros estudos associados ao metabolismo lipídico também relataram aumento da atividade BuChE (Kalman et al., 2004; Boderg et al., 2010).

Outra importante enzima relacionada com o processo inflamatório é a ADA, enzima conversora de adenosina em inosina, envolvida no metabolismo das purinas. Está distribuída em todo organismo, apresentando um papel importante no sistema imunológico, além de possuir alta atividade nos linfócitos T e macrófagos (Pytel et al., 2016).

Essas alterações nas vias de sinalização ocorrem através do desenvolvimento de patologias vasculares, incluindo as controladas por nucleotídeos extracelulares e nucleosídeos, tais como trifosfato de adenosina (ATP) e adenosina. A importância da sinalização purinérgica é reconhecida na inflamação e o tráfico de células e vários estudos recentes sugeriram um importante papel dos nucleotídeos extracelulares e adenosina na aterosclerose (Kutryb-Zajac et al., 2016; Pytel et al., 2016).

Os nucleotídeos podem ser liberados de qualquer tipo de célula, incluindo células endoteliais (CE), células musculares lisas vasculares, células imunes e até mesmo de plaquetas, e esse processo é controlado por fatores fisiopatológicos e estímulos fisiopatológicos (Kutryb-Zajac et al., 2016). Os nucleotídeos são considerados como mediadores pró-ateroscleróticos, que atuam no nível célula-célula e exercem suas atividades desencadeando receptores P2 amplamente expressados no sistema cardiovascular (Kutryb-Zajac et al., 2016).

As concentrações vasculares de nucleotídeos extracelulares e seus metabólitos são modulados pelo plasma e ecto-enzimas da superfície celular. A hidrólise sequencial de ATP extracelular via adenosina difosfato (ADP) para adenosina monofosfato (AMP) é mediada por ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (eNTPD 1, CD39). Em seguida, AMP extracelular é catabolizado para adenosina por ecto-5'-nucleotidase (e5NT, CD73). A adenosina por sua vez, por meio da estimulação de receptores P1, neutraliza uma inflamação aterosclerótica inicial, a acumulação de células espumosas e a formação do trombo (Kutryb-Zajac et al., 2016).

O tempo de meia vida da adenosina no sangue é definido por duas reações importantes: a fosforilação de adenosina pela adenosina cinase e a sua desaminação pela ADA (Kutryb-Zajac et al., 2016). Embora a fosforilação da adenosina seja quase um processo exclusivamente intracelular e sua taxa seja limitada pela membrana extracelular de transporte de adenosina, a desaminação de adenosina intracelular poderia desempenhar um papel equivalente (Kutryb-Zajac et al., 2016).

O ecto-ADA (eADA) é particularmente importante na remoção de adenosina do compartimento extracelular, uma vez que não requer um transporte de membrana (Kutryb-Zajac et al., 2016; Pytel et al., 2016). Dessa forma, estudos evidenciam que os níveis circulantes de ATP E ADP são

aumentados nas atividades de aterosclerose. No entanto, mudanças nas atividades das ecto-enzimas presentes na parede do vaso não são totalmente caracterizado no processo aterosclerótico (Kutryb-Zajac et al., 2016; Pytel et al., 2016).

Também a ativação patológica de CE durante uma inflamação poderia levar uma redução nas atividades ecto-nucleotidases, enquanto a hipóxia estimula um aumento da ADA, derivada do endotélio (Kutryb-Zajac et al., 2016). Essas mudanças poderiam ter efeitos importantes na oxidação lipídica e acumulação, inflamação vascular e extensa ativação de plaquetas observada na aterosclerose (Kutryb-Zajac et al., 2016). Além disso, células do sistema imune, como células T e macrófagos, que aderem e infiltram a parede do vaso durante os estágios iniciais da aterosclerose, exibem atividades substanciais de ectoenzimas (Kutryb-Zajac et al., 2016). Kutryb-Zajac e colaboradores (2016) sugeriram que o processo aterosclerótico pode ser associado a mudanças profundas no metabolismo de nucleotídeos extracelulares na parede do vaso, através da observação de que a taxa de desaminação de adenosina era significativamente maior em aortas ateroscleróticas, quando comparados com ratos com aortas intactas, sem formação de placa aterosclerótica.

A associação da obesidade com IAM e outros fatores de risco cardiovasculares, como resistência à insulina, intolerância à glicose, e dislipidemias é resistente e freqüente. Esse conjunto de fatores de risco, em alguns pacientes é caracterizado como síndrome metabólica e tem alta prevalência em adultos (Sippel et al., 2014). Os mecanismos envolvidos nas doenças cardiovasculares resultante da associação de fatores de risco incluem o aumento de citocinas, como interleucinas, principalmente 1 e 6, o TNF- α e moléculas de adesão (Sippel et al., 2014).

Estresse Oxidativo, Atividade da Paraoxonase (PON1) e HDL-C

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes, a favor do primeiro. Estudos demonstraram que o estresse oxidativo contribui significativamente para o desenvolvimento e a progressão de uma grande variedade de doenças como diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, e doenças pulmonares (Toullec et al., 2010). Os radicais livres são um fator importante na patogênese da

aterosclerose (Zírios et al., 2016). Pacientes com aterosclerose apresentam vários sinais de ataques de radicais livres, como a peroxidação lipídica, oxidação protéica, dano ao DNA mitocondrial e nuclear (Zírios et al., 2016). Além disso, o papel crucial da produção de superóxido na patogênese da aterosclerose também foi apontado (Zírios et al., 2016).

Diversas enzimas parecem ter suas atividades diretamente relacionadas com este desequilíbrio oxidativo, sendo que uma delas é a mieloperoxidase (MPO). Essa peroxidase é uma heme proteína geradora de radicais livres e secretada por células mononucleares ativadas, incluindo os macrófagos originados das placas ateroscleróticas (Haraguchi et al., 2014; Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017). Ela é uma enzima liberada pela ativação e pela degranulação dos leucócitos polimorfonucleares na microcirculação coronariana nas síndromes coronarianas agudas, sendo um marcador de estresse oxidativo endotelial (Haraguchi et al., 2014; Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017). Estudos apontam os prováveis mecanismos pelos quais a MPO é capaz de promover a oxidação de lipoproteínas *in vivo*, sendo liberada durante os estados de inflamação aumentada, além de catalisar a formação de várias espécies reativas. A MPO é enriquecida dentro das lesões ateroscleróticas avançadas em seres humanos, sugerindo um grande papel na aterosclerose (Haraguchi et al., 2014; Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017). Este papel no processo aterosclerótico parece ser mediado através das partículas de LDL-C, modificações oxidativas e funcionais, bem como promoção da formação de células espumosas subendoteliais, decorrentes da oxidação de LDL-C.

Em modelos animais, a MPO demonstrou catalisar o início da peroxidação lipídica em locais de inflamação *in vivo*, quando incubados com LDL-C *in vitro* (Khine et al., 2017). Nesse sentido, inicialmente os macrófagos utilizam NADPH oxidase para produzir superóxido, que pode dismutar e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A MPO catalisa reações com H_2O_2 para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como o HOCL (ácido hipocloroso) e radical tirosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCL. Por meio de ensaios de alta sensibilidade e especificidade, diversos produtos finais estáveis gerados por essas espécies têm sido detectados em placas ateroscleróticas (Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017).

A MPO tem também a habilidade de modificar oxidativamente o aminoácido tirosina da apolipoproteína B-100 (apo B-100) utilizando H_2O_2 e íon

Cl⁻ para gerar 3-clorotirosina (Haraguchi et al., 2014; Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017). Pode também nitratar a tirosina oxidando nitrito, produto final do metabolismo do óxido nítrico, gerando 3-nitrotirosina (Haraguchi et al., 2014; Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017). Além de marcadores da atividade da MPO, a 3-clorotirosina e 3-nitrotirosina têm importância clínica por promover dano oxidativo, o que contribui para a aterosclerose, prejudicando o efluxo de colesterol e eventos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (Haraguchi et al., 2014; Zsíros et al., 2016; Long & Song, 2017). Segundo Zríros et al (2016) o aumento dos níveis de MPO foi associado a progressão aterosclerótica também em pacientes diabéticos.

A MPO por sua vez, também oxida HDL-C, tornando-o disfuncional. A MPO ligada ao HDL-C mantém sua atividade enzimática e a modificação do HDL-C, aumentando consideravelmente a ligação de afinidade de HDL-C para MPO, levando a um ciclo vicioso de modificações em locais de inflamação crônica (Zríros et al., 2016).

Por outro lado, o HDL-C é conhecido por proteger contra a aterosclerose, através de anticorpos antioxidantes, mecanismos antiaterogênicos, agente anti-apoptótico e anti-trombótico. HDL-C protege os vasos da disfunção estimulando a produção de óxido nítrico (NO) e inibição da produção de endotelina-1, um potente vasodilatador. Além desses efeitos, o HDL-C impede o dano oxidativo do endotélio e a indução da inflamação (Chistiakov et al., 2017). Segundo Chistiakov et al (2017), ao contrário do LDL-C, os níveis de HDL-C mostram correlação inversa com a progressão da aterogênese. As estimativas mostraram que cada aumento de 1 mg/dL de HDL-C estão associadas a queda de 3% no risco cardiovascular.

Com base nas atividades propostas para HDL-C, estudos têm demonstrado a estreita relação entre a atividade antioxidante dessa fração do colesterol (HDL-C) e a da enzima paraoxonase-1 (PON1) (Zsíros et al., 2016). Essa é uma esterase cálcio-dependente sintetizada e secretada no fígado, que aparece associada com a apolipoproteína A-I (ApoA-I), indicando uma interação específica com o HDL-C (Zsíros et al., 2016). Seu mecanismo está relacionado com a prevenção da oxidação de lipídios em lipoproteínas, permitindo que o HDL-C exerça ações ateroprotetoras e anti-inflamatórias (Zsíros et al., 2016). A família gênica da PON está localizada no cromossomo humano sete e é composta por 3 genes (PON1, PON2, PON3) (Zsíros et al.,

2016). Dentro dessa família, a PON1 foi a primeira enzima a ser descoberta em 1946. No entanto, o interesse pela enzima aumentou somente em 1991, quando Mackness et al (1991) a associaram a doenças cardiovasculares.

Zsíros et al (2016) demonstraram que PON1 mostra-se associada com o menor HDL3, o qual é uma partícula antioxidante HDL mais potente. Verificou-se ainda que a atividade PON1 diminui em pacientes com aterosclerose avançada, incluindo aqueles com complicações cardiovasculares e doenças renais (Zsíros et al., 2016). Já a geração de LDL-ox aumenta o risco de disfunção endotelial e promove mudanças pró-aterogênicas, incluindo infiltrações por leucócitos, formação de células espumosas e indução de processo inflamatório. E sugerindo que o HDL-C hidrolisa os fosfolipídeos oxidados em LDL-C e depois transfere os fosfolipídeos para si próprio, enfraquecendo assim a geração de LDL-ox em vasos ateroscleróticos (Figura 1). No entanto, em doenças inflamatórias crônicas, como a aterosclerose, o HDL-C é submetido a modificações patológicas pela MPO, que incluem a redução no HDL-C de partículas de PON-1, portanto, levam a diminuição da capacidade protetora do HDL-C contra oxidações (Zsíros et al., 2016; Chistiakov et al., 2017).

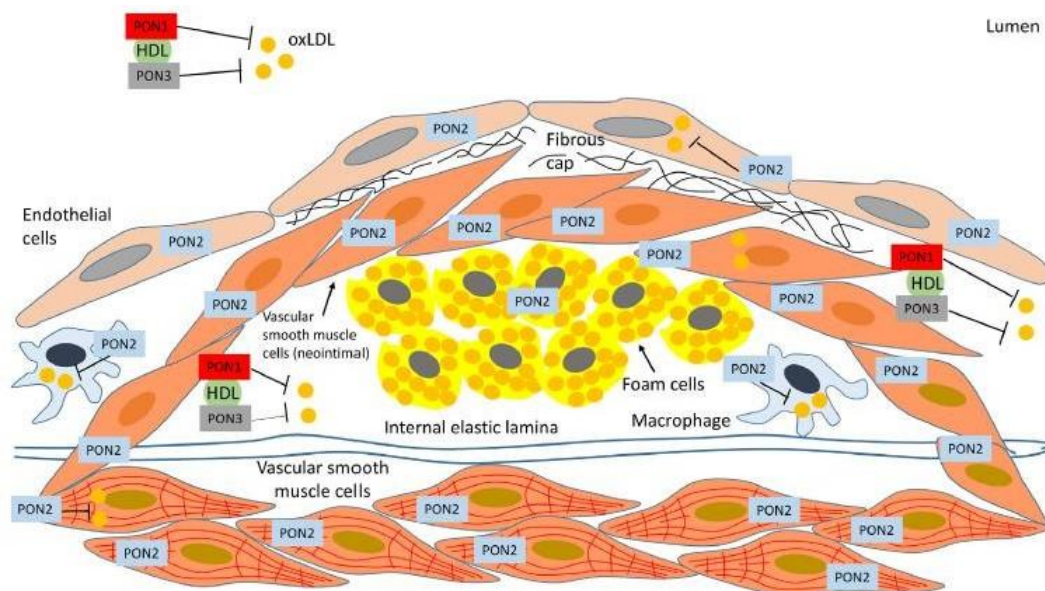


Figura 1: Neutralização de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (LDL oxidada) por Paraoxonases (PONs) (Chistiakov et al, 2017).

Butia odorata (Butiá)

O gênero Butiá (Arecaceae) contém 20 espécies que ocorrem naturalmente na América do Sul, particularmente no sul do Brasil e Uruguai. Na região sul do Brasil, ocorrem oito espécies de Butiá, e são distribuídas em grupos de populações chamadas “butiazais”. Entre essas espécies, *Butia odorata* tem um rendimento estimado de 22.048 kg ha⁻¹ com 53 kg de fruta por ano e uma polpa com 55% de rendimento (Hoffmann et al., 2017).

Butiá são palmas com uma única haste que podem chegar a 10 metros, possuem fruto ovóide que vão da cor amarela à laranja, e apresenta um sabor doce (Beskow et al., 2015). As palmeiras de Butiá são usadas em paisagismo e suas folhas secas são usadas na fabricação de chapéus, vassouras, cestas e outros produtos (Hoffmann et al., 2016).

A fruta (também conhecida como butiá) é apreciada por seu aroma e são usadas para fazer suco, geléia, licor, e outros produtos alimentares (Hoffmann et al., 2017). Segundo Beskow et al. (2015), os frutos de *Butia odorata* apresentam uma diversidade de substâncias, dentre elas ácido L-ascórbico, antocianinas, compostos fenólicos, carotenóides e fibras. Algumas dessas substâncias possuem um alto potencial antioxidante que podem auxiliar no tratamento e até mesmo prevenção de muitas doenças.

Os principais ácidos fenólicos relatados nas espécies de butiá (*B. odorata* e *B. eriosphata*) são ácido gálico, ácidos protocatécico, caféico, clorogênico, hidroxibenzóico, cumárico e ferúlico, enquanto que os principais flavonóides incluem catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol e rutina. Alguns desses compostos foram considerados marcadores de origem geográfica e diferenciação de espécies (Beskow et al., 2015; Hoffmann et al., 2017).

O perfil carotenóide relatado para a polpa e suco de *B. odorata* incluem r-criptoxantina (2.0 a 2.7 mg 100g⁻¹), r-caroteno (0.553 a 1.1 mg 100g⁻¹) e luteína (0.07 a 0.10 mg 100g⁻¹) (Beskow et al., 2015; Hoffmann et al., 2017).

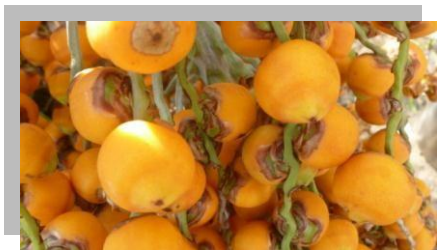
A colheita dos frutos ocorre durante os meses quentes, de dezembro à março, sendo altamente perecível. Portanto, a pasteurização da polpa de butiá, combinada com um armazenamento frio permite a disponibilidade durante todo o ano para ser usado na confecção de néctar, sorvete, geléia e iogurte.

Contudo, a estabilidade do conteúdo bioativo sob estas condições pós-colheita ainda não é conhecido (Hoffmann et al., 2017).

A alta acidez, aliada ao baixo teor de açúcar e alto teor de fibras são fatores que desencorajam o seu consumo generalizado como fruta seca, e justifica a procura de produtos derivados com alta aceitação sensorial. Sucos e néctares de frutas são exemplos de produtos derivados de frutas com elevado valor agregado (Hoffmann et al., 2017). A produção de néctar também pode envolver processos de aquecimento e filtração, que podem influenciar o conteúdo de compostos bioativos (Hoffmann, et al., 2017).

Com base na composição de metabólitos especializados, o fruto butiá tem atraído a atenção para estudos que buscam identificar a sua possível ação biológica (Schneider et al., 2017). A grande variedade de compostos fenólicos presente nestes frutos pode indicar uma possível ação antioxidante, minimizando os danos do estresse oxidativo, eliminando de maneira direta os radicais livres e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes. Ao mesmo tempo, estes compostos atuam como quelantes de íons metálicos, evitando a formação de radicais livres (Shahidi et al., 1992) e podem atuar como anti-inflamatórios, conforme já relatado em estudos com outras fontes de polifenóis, como o chá verde. O estudo de Ding et al (2017) demonstrou a utilização do polifenol de chá verde evidenciou epidemiologicamente os efeitos benéficos destas substâncias na prevenção de doenças cardiovasculares, pela sua grande atividade antioxidante. Os resultados desses estudos demonstraram que o tratamento com polifenol de chá verde de 15 semanas melhorou o processamento de lesões ateroscleróticas, que podem estar envolvidas na diminuição da oxidação do LDL-C.

Atualmente, existem poucos estudos sobre o efeito terapêutico do Butiá, no entanto, acredita-se que o Butiá tenha algum efeito em algumas doenças. Estudos demonstraram que o *Butia sp.* apresentou diversas atividades, dentre elas: anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antineoplásica (Pereira et al., 2013; Schneider et al., 2017).



A



B



C

Figura 2: Frutos de Butiá (A), Palmeiras de Butiá (B) e Folhas de Butiá (C).

MANUSCRITO

Todos os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de manuscrito que será submetido ao periódico internacional *Journal of Functional Foods*

Hypolipidemic and anti-inflammatory property of *Butia odorata* fruit extract in Wistar rat with hyperlipidemia induced by tyloxapol

Vanessa Plasse Ramos¹, Pamela Gonçalves da Silva¹, Pathise Souto Oliveira¹, Natália Pontes Bona¹, Mayara Sandrielly Pereira Soares², Jessica Fernanda Hoffmann³, Fábio Clasen Chaves³, Augusto Schneider⁴, Roselia Maria Spanevello², Claiton Leoneti Lencina¹, Francieli Moro Stefanello¹, Rejane Giacomelli Tavares^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

²Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

⁴Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

*Address reprint requests to: Rejane Giacomelli Tavares, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil

Phone: 55 53 32757355

Fax: 55 53 32757354

Email: tavares.rejane@gmail.com

Abstract

This study investigates the effect of *Butia odorata* fruit extract on metabolic, inflammatory, and oxidative stress parameters in rats submitted to a model of hyperlipidemia induced by tyloxapol. Animals were divided into 3 groups: saline, saline plus tyloxapol, and *B. odorata* extract plus tyloxapol. The animals were treated for 15 days with saline or *B. odorata* fruit extract and on day 15, the hyperlipidemia was induced by tyloxapol. Treatment with *B. odorata* extract reduced serum triglyceride, total cholesterol, C-reactive protein, adenosine deaminase and butyrylcholinesterase activities when compared with tyloxapol group. HDL-cholesterol and paraoxonase 1 activity was higher in animals that received extract compared with tyloxapol-treated animals. No differences were observed in hepatic oxidative stress parameters. Phenolic compounds present in *B. odorata* fruit extract were identified and quantified by LC-MS. These findings indicate that chronic consumption of phenolic rich *B. odorata* extract has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in a hyperlipidemic model.

Keywords: Phenolic Compounds, Animal model system, Cardiovascular disease

1. Introduction

Hyperlipidemia and serum lipoprotein disorders are diagnosed when plasma levels of triglycerides (TG) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) are high, and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) is low. They have long been known as risk factors for the progression of atherosclerosis and cardiovascular disease (CVDs) (De Sousa et al, 2017).

CVDs originate from chronic inflammatory disorders that occur in response to endothelial aggression, lipid deposition, migration of muscle cells and calcification, and reduction in HDL-C levels (E Souza et al, 2017; Zsíros et al, 2016) as well as redox alterations (Augusti et al, 2012b). Thus, alterations in inflammatory markers, such as C-reactive protein (hs-CRP) have been associated with risk of CVDs and mortality (Wedell-Neergaard et al, 2018). Additionally, enzymes such as adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C. 3.1.1.8) may be involved in the CVDs' trigger. ADA is important in the degradation of endogenous adenosine and in the acute and protracted inflammatory responses and BuChE is a non-specific cholinesterase, acting on butyrylcholine, acetylcholine, and various choline esters, playing an important role in the modulation of immune cell activity and its activity is high in obese individuals (Goliasch et al, 2012; De Bona et al, 2013; Kim et al, 2016). Although their biological role has not been clearly established, these markers have been associated with inflammation and lipid metabolism alterations (Kutryb-Zajac et al, 2016; Kim et al, 2016).

It is well known that HDL-C has an important role in cholesterol efflux and presents anti-inflammatory and antiapoptotic properties (Zsíros et al, 2016). Human paraoxonase (PON) is a calcium-dependent hydrolase, which is produced by the liver and released into serum. PON1 is an HDL-associated enzyme mainly linked with the apolipoprotein AI (apo-AI) and it was shown to be primarily related with the smaller HDL3 particle, which is a more potent antioxidant of the HDL particle (Zsíros et al, 2016). *In vitro* experiments have shown that PON1 can inhibit oxidized LDL (ox-LDL) generation and prevent cholesterol ester peroxidation (Argani et al, 2016). Because of the key role of LDL-C oxidation in inducing atherosclerosis, reduced serum activity of PON1 may explain one of the essential mechanisms for increased risk of atherosclerosis and CVDs in hyperlipidemic patients.

Hyperlipidemia treatment is limited in part due to patient adherence (Casula et al, 2012) and alternative therapies using bioactive natural products that may provide patient life quality improvements have been investigated (E Souza et al, 2017; Baghdadi, 2014). Flavonoids for example, have been shown to possess multiple biological functions, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-hypertensive, anti-hyperlipidemic, and hypoglycemic (Del Rio et al, 2013; Oliveira et al, 2017; Gazal et al, 2015; Limmongkon et al, 2018). In addition, phenolic compounds can inhibit hepatic HMG-CoA reductase *in vitro* and *in vivo*, contributing for cholesterol reduction (Ademosun et al, 2015; Khamis et al, 2017).

B. odorata is an autochthonous fruit from Southern Brazil that has shown a variety of pharmacological properties including antimicrobial, antioxidant (acting directly on lipid peroxidation), anti-inflammatory, and hepatoprotective (Beskow et al, 2015; Hoffmann et al, 2018). Therefore, the objective of the present study was to evaluate the hypolipidemic, anti-inflammatory, and antioxidant effect of the hydro-alcoholic extract of the *B. odorata* fruit in a hyperlipidemic animal model.

2. Materials and Methods

Phytochemicals

Extraction

B. odorata fruit (5 kg) were collected in the municipality of Capão do Leão, Rio Grande do Sul State, Brazil (31°52'00" S, 52°21'24" W, and altitude of 13 m). Unprocessed frozen *B. odorata* fruits (30 g) were sonicated for 30 min at 25°C in 90 mL of 70:30 v/v ethanol-water for each cycle. The extracts were filtered; the ethanol removed under reduced pressure and then lyophilized. These procedures were performed in triplicate and sheltered from light.

LC-MS analysis

To determine individual phenolic composition by LC-MS, 100 mg of lyophilized extract were suspended in 1 mL of 75% methanol containing 0.1% formic acid in water. The solution was vortexed, sonicated in a water bath at room temperature for 15 min, centrifuged ($9,900 \times g$ for 15 min), and the supernatant was collected. The process was repeated once and the

supernatants were combined, filtered through 0.2 μm nylon membrane (Merck Millipore Corporation, Germany) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

LC-MS analysis was performed on a Prominence UFLC system (Shimadzu, Japan) coupled to a mass spectrometer Impact HD (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Identification and quantification of phenolic compounds in *B. odorata* extract were performed according to Hoffmann et al. (2018) by mass spectra in the negative ionization mode, MS/MS fragmentation, and retention time relative to external standards. Results were expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry weight (dw), as mean $\pm$ standard deviation of four replicates.

Animals and drug treatments

Twenty-seven male Wistar rats (60-day-old) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained under controlled environment ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12h-light/dark cycle) and handled according to the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology guidelines upon approval by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, Brazil (4609-2015). The hydro-alcoholic extracts of *B. odorata* were dissolved in water and administered by gavage once a day during 15 days of treatment. Tyloxapol (Triton WR-1339) was dissolved in water and administered intraperitoneally (i.p) at day 15. Euthanasia was performed 24 hours after tyloxapol administration. Extract dose (200 mg/kg) and tyloxapol (300 mg/kg) used in the present study were chosen based on results from previous studies (Castro et al., 2012).

Sample preparation

Rats were euthanized after 24 hours of tyloxapol injection. Blood samples were collected in tubes without anticoagulant and, after clot formation the samples were centrifuged at $400 \times g$ for 10 min at room temperature. The resultant serum was used for the estimation of biochemical profile and PON1, ADA, and BuChE activities. Rat livers were dissected and homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4°C . The pellet was discarded, and the supernatant was immediately separated and used to measure oxidative stress parameters. Protein content was quantified by the

method of Lowry et al. (1951) or Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

Serum biochemical parameters

Total CHOL, HDL-C, LDL-C, TG, glucose, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkalinephosphatase (ALP), gamma glutamyl transferase (GGT), and hsCRP levels were determined using commercial kit assays based on spectrophotometry absorbance measurements.

Paraoxonase (PON1) activity was determined based on the method described by Browne et al. (2007) and expressed as kU/l.

Adenosine deaminase (ADA) activity was measured by the method of Giusti and Galanti (1984). The specific activity was reported as U/L. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia from adenosine per minute at standard assay conditions.

Butyrylcholinesterase (BuChE) activity was determined according the method described by Ellman et al. (1961). The method is based on the formation of DTNB measured at 412 nm. The reaction was initiated by adding butyrylthiocholine iodide (BuSCh). BuChE activity was expressed in $\mu\text{mol BuSCh/h/mg}$ of protein.

Liver oxidative stress parameters

Thiobarbituric acid reactive species formation (TBARS), which provides a measure of lipid peroxidation, was determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). TBARS were reported as nmol TBARS per mg of protein.

Total sulfhydryl content was determined as described by Aksenov and Markesbery (2001). Results were reported as nmol TNB per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured with the method described by Misra and Fridovich (1972). The specific activity of SOD was reported as enzyme units per mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using commercially available diagnostic kits supplied by RANDOX (Brazil). The specific activity was reported as enzyme units per mg of protein.

Catalase (CAT) activity was assayed according to Aebi (1984) based on the decomposition of H_2O_2 monitored at 240 nm. The specific activity was reported as units/mg protein.

Nitrite levels were measured using the Griess reaction as described by Huang et al. (2009) and reported as μM nitrite per mg of protein.

2.6. Statistical analysis

All experimental results are given as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test. A value of $P \leq 0.05$ was considered to be significant. Analyses were performed using the GraphPad PRISM 5® software.

3. Results

Twenty-one phenolic compounds were identified and quantified in *B. odorata* extracts (Table 1). The major groups of phenolic compounds found in the extract were flavanols ((+)-catechin and (-)-epicatechin), hydroxycinnamic acids (chlorogenic acid), and flavonols (rutin and quercetin-3-O-glucoside) (Table 1).

Table 2 shows that T+ vehicle group had a significantly higher levels of CHOL ($F(2,12) = 18.08$; $P < 0.001$), TG ($F(2,16) = 21.97$; $P < 0.001$), LDL-C ($F(2,11) = 6.71$; $P < 0.05$) and extract treatment prevents these alterations. HDL-C ($F(2,23) = 47.89$; $P < 0.001$) had a significant increase in T + extract group. There was no significant difference in AST, ALT, GGT, FAL, and glucose levels between the control group, T + vehicle group and compared with T + extract group ($P > 0.05$).

PON1 activity was reduced by T + vehicle and extract treatment was able to prevent this alteration ($F(2,9) = 11.3$; $P < 0.01$) (Figure 1). Also, there was significant decrease in the hsCRP concentrations ($F(2,20) = 17.2$; $P < 0.001$; Figure 2A), ADA ($F(2,16) = 13.90$; $P < 0.001$; Figure 2B), and BuChE ($F(2,21) = 7.45$; $P < 0.01$; Figure 2C), when compared the T + vehicle with T + extract group.

Hepatic oxidative stress parameters were not affected by treatments (Table 3).

4. Discussion

Hyperlipidemia is induced by tyloxapol due to an increase in lipid synthesis and/or decrease in lipid clearance from blood to tissues (Castro et al, 2012). Tyloxapol is a nonionic detergent that inhibits lipoprotein lipase, induces increase in CHOL and TG serum contents, and promotes the activity of HMG-CoA reductase, a key intracellular enzyme in the synthesis of hepatic cholesterol. Tyloxapol has been widely used to block lipoproteins rich in TG and thus induce acute hyperlipidemia in several animal models (Bertges et al., 2011; Castro et al, 2012; Toppo et al, 2017). Previous studies have produced controversial results about the effects of tyloxapol on HDL-C levels, some of which indicated its reduction instead of increase (Rony et al., 2014; Iqbal et al., 2016), while others concluded that HDL-C content remained within the normal range (Harnafi et al., 2007; Adeneye et al., 2010; De Souza et al, 2017). In this study, acute tyloxapol-induced hyperlipidemia lead to an increase in CHOL, TG, LDL-C and HDL-C; however *B. odorata* treatment suppressed the highest levels of CHOL, TG and LDL-C levels and, in the same time, greatly increases HDL-C levels. HDL-C (i) promotes CHOL efflux and reverse CHOL transport, thereby removing cholesterol from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions; (ii) HDL-C can inhibit the oxidation of native LDL thereby preventing the formation of pro-atherosclerotic and pro-inflammatory LDL particles; and (iii) HDL-C has potent anti-inflammatory activity (Ebtehaj et al., 2017).

The most abundant HDL associated apolipoproteins A-I (apoA-I) and apoA-II and other proteins, including paraoxonase, a cotransporter with HDL in plasma, are well-known antioxidants (Singh et al, 2017). Paraoxonase 1 (PON1) is primarily synthesized in the liver, and secreted in association with HDL to the circulatory system, suggesting that PON1 is responsible for the anti-oxidative properties of HDL and retarding the oxidation of LDL and phospholipids in cell membranes (Aviram & Rosrnblat, 2004; Alvi et al, 2017; Singh et al, 2017). In ox-LDL, PON1 has been shown to hydrolyze 19% of lipid peroxides and up to 90% cholesteryl linoleate hydroperoxides suggesting a key atheroprotective role of this enzyme by releasing LDL from lipid peroxides (Chistiakov et al, 2017). While hyperlipidemia reduces PON1 activity, *B. odorata* prevented this effect, together with an HDL-C increase, indicating an associative effect between the highest HDL-C levels and PON1 activity increase. Low plasma PON1 activity

was strongly associated with the increased risk of CVDs, related to the increase in oxidized LDL levels in plasma and in plaque or oxidation of lipoproteins, destabilization of atherosclerotic plaques and inhibition of cholesterol efflux (Aviram & Vaya, 2013; Argani et al, 2016; Harisa et al, 2016; Chistiakov et al, 2017; Singh et al, 2017). Dyslipidemia inhibits PON1 activity, and statins-like treatments improve this condition (Augusti et al., 2012a; Harisa et al, 2016). Singh and colleagues (2017) also observed a significant linear positive correlation between the HDL-C and PON1, with significantly lower PON1 in CVDs patients with Type 2 diabetes mellitus. It is possible that an increase in serum PON1 is associated with the high levels of HDL-C induced by *B. odorata* fruit extract.

hsCRP, a global marker of low-grade inflammation, was measured in order to investigate the anti-inflammatory properties of *B. odorata*. The hyperlipidemic group showed high hsCRP content upon *B. odorata* treatment, indicating an impact of HDL function on inflammation; however no direct mechanistic role has been established for hsCRP in affecting HDL's atheroprotective abilities (Ebtehaj et al, 2017). The findings of this study are in agreement with Toutouzas et al (2017) who have shown an increase in low grade inflammatory activation on dyslipidemic individuals when compared to normolipidemic, as demonstrated by higher serum levels of hsCRP and fibrinogen. In addition, it is well known that a raise in circulating lipids concentrations, with hepatic overproduction of TG and apolipoprotein-B-rich lipoproteins, have pro-inflammatory activation (Toutouzas et al, 2017).

Increasing evidences suggested a role for the cholinergic system in the regulation of the inflammatory pathway. One of the consequences of changes in the acetylcholine (ACh) balance concerns the immune-regulatory function of cholinergic signaling through the action of ACh on cells involved in immune responses (Polachini et al, 2014; Reale et al, 2018). In this sense, altered serum BuChE activity might indicate a disrupted ACh hydrolysis, which would, in turn, indirectly signal an imbalance between the pro- and anti-inflammatory systemic responses mediated by non-neuronal cholinergic activity (Zivkovic et al, 2016). Human BuChE and PON1 are two major scavenging enzymes associated with inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism (Sicinska et al, 2017). Patients with coronary artery disease exhibited an increase in BuChE activity and an elevated CHOL level, suggesting a correlation between these

parameters (Pytel et al, 2016). Association between lipid metabolism disorders, pathological conditions in which low grade systemic inflammation, and increased BuChE activity were also reported (Kálmán et al, 2004; Randell et al, 2005; Boberg et al, 2010; Vanzin et al, 2015). *B. odorata* extract promoted a decrease in BuChE activity, indicating a possible anti-inflammatory action. Corroborating this finding, Mansour et al (2011) showed that phenolic rich extracts of *Rhus pentaphyllum*, also inhibit BuChE activity. Additionally, Kim et al (2016) demonstrated that (-)-epicatechin derivate from *Orostachys japonicas*, inhibits human BuChE.

Alterations in signaling pathways, including those controlled by extracellular nucleotides and nucleosides, such as adenosine triphosphate (ATP) and adenosine are involved in inflammation and atherosclerosis. In fact nucleotides are considered proatherosclerotic mediators (Kutryb-Zajac et al, 2016). The half-life of adenosine in blood is defined by kinase phosphorylation and deamination by ADA, which is important in the degradation of endogenous adenosine and in the acute and protracted inflammatory responses. Furthermore, ADA activity is high in diabetic and hyperglycemic subjects and is important for modulating insulin action (De bona et al. 2013; (Kutryb-Zajac et al, 2016). In this study, ADA activity was higher in the hyperlipidemic group when compared to the control group, according to the inflammatory profile induced by hyperlipidemia. However, *B. odorata* treatment was able to decrease ADA levels. Similar effect was observed in the flavonoid (catechin, quercetin, rutin, and kaempherol) suppression of ADA activity in cell culture (Melzig, 1996; Durak et al, 2015; Kutryb-Zajac et al, 2016).

Considering that hyperlipidemia and inflammation cause oxidative imbalance (Augusti et al, 2012b), *B. odorata* extracts were tested on liver oxidative stress parameters. No differences were observed between treatments. Perhaps due to the acute hyperlipidemia model used and/or the short duration of the treatment. Similar results were reported by Da Rocha et al (2009), in which neither oxidative stress nor antioxidant effect was observed in mice liver when using a similar experimental protocol. However, other studies reported that a hypercholesterolemic diet changes the *in vivo* oxidant and antioxidant status, mainly by the increase in oxygen free radicals, causing lipid peroxidation (Baldissera et al, 2016; Rony et al, 2014).

The above-mentioned effects may be attributed to the high phenolic content of *B. odorata* extract. Common phenolics in the diet are flavanols, flavanones, anthocyanins, and hydroxycinnamates. Many intervention studies, mechanistic *in vitro* data, and epidemiological studies support a role for phenolics against the development of chronic diseases. For example, flavanols decrease endothelial dysfunction, lower blood pressure and CHOL, and modulate energy metabolism (Williamson, 2017; Ding et al, 2017; Kong et al, 2017; Amarowicz & Pegg, 2017). Chlorogenic acid has been investigated for its positive effect on glucose regulation, strong antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities (Kong et al, 2017). Rutin, a glycosylated flavonoid widely spread in plants, has beneficial effects on cardiovascular diseases, possibly due to its antioxidant and anti-inflammatory properties (Monika & Geetha, 2015). This compound prevents hyperlipidemia induced by high cholesterol diet and promotes the excretion of fecal sterols, decreases the absorption of dietary cholesterol and lowers the plasma and hepatic cholesterol concentration (Monika & Geetha, 2015). Rutin can reduce blood insulin and leptin contents, as well as inhibit glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an enzyme linked to glycerol and triacylglycerol conversion in adipose tissue and liver (Hossain et al, 2016). Quercetin has potential anti-obesity effects because it inhibits pre-adipocytes differentiation, induces apoptosis of mature adipocytes (Hossain et al, 2016), and presents anti-inflammatory and hypolipidemic effects (Braun et al, 2017; Boruah et al, 2014; Khamis et al, 2017; Williamson, 2017; Toppo et al, 2017). Oliveira et al (2017) demonstrated that the extract of *Eugenia uniflora* prevented the increase of TG, glucose, CHOL, and LDL-C after a metabolic syndrome induced with a highly palatable diet lasting 150 days. Additionally, Cardoso et al (2017) showed that the extract of *E. uniflora* and *P. cattleianum* prevented the increase in glucose and TG levels in an animal model of insulin resistance induced by dexamethasone.

5. Conclusion

The treatment with *B. odorata* fruit extract effectively decreased hyperlipidemia (TG, CHOL, and LDL-C levels), increased HDL-C and PON1 activity, and decreased serum inflammation markers in an animal model of hyperlipidemia. The exhibited biological activities can be associated with the

properties of phenolics compounds present in the *B. odorata* extract. The findings reveal the importance of native fruits in the treatment of dyslipidemia, contributing to promote a commercial exploration and consumption of native fruits.

Acknowledgments

To the research funding agencies FAPERGS, CAPES, and CNPQ (FCC - 457947/2014-4).

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest regarding this study.

References

- Ademosun, A. O., Oboh, G., Passamonti, S., Tramer, F., Ziberna, L., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2015). Phenolics from grapefruit peels inhibit HMG-CoA reductase and angiotensin-I converting enzyme and show antioxidative properties in endothelial EA. Hy 926 cells. *Food Scienci Human Well*, 4, 80-85.
- Adeneye, A. A., Adeyemi, O. O., & Agbaje, E. O. (2010). Anti-obesity and antihyperlipidaemic effect of *Hunteria umbellata* seed extract in experimental hyperlipidaemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 307-314.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzimology*, 105,121-126.
- Aksenov, M. Y., & Markesbery, W. R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 302, 141-145.
- Alvi, S. S., Ansari, I. A., Ahmad, M. K., Iqbal, J., & Khan, M. S. (2017). Lycopene amends LPS induced oxidative stress and hypertriglyceridemia via modulating PCSK-9 expression and Apo-CIII mediated lipoprotein lipase activity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96, 1082-1093.

- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2017). The Potential Protective Effects of Phenolic Compounds against Low-density Lipoprotein Oxidation. *Current Pharmaceutical Design*, 23, 2754-2766.
- Argani, H., Ghorbanihaghio, A., Vatankhahan, H., Rashtchizadeh N., Raeisi, S., & Ilghami, H. (2016). The effect of red grape seed extract on serum paraoxonase activity in patients with mild to moderate hyperlipidemia. *Sao Paulo Medical Journal*, 3, 234-239.
- Augusti, P. R., Quatrin, A., Somacal, S., Conterato, G. M., Sobieski, R., Ruviaro, A. R., Mauer, L. H., Duarte, M. M., Roehrs, M., & Emanuelli, T. (2012a). Astaxanthin prevents changes in the activities of thioredoxin reductase and paraoxonase in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 51, 42-49.
- Augusti, P.R., Ruviaro, A.R., Quatrin, A., Somacal, S., Conterato, G.M.M., Vicentini, J.T., Duarte, M.M.F., & Emanuelli, T. (2012b) Imbalance in superoxide dismutase/thioredoxin reductase activities in hypercholesterolemic subjects: relationship with low density lipoprotein oxidation. *Lipids in Health and Disease*, 11, 79-87.
- Aviram, M. & Vaya, J. (2013). Paraonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion. *Current Opinion in Lipidology*, 24, 339-344.
- Aviram, M. & Rosrnblat, M. (2004). Paraonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology & Medicine*, 37,1304-1316.
- Baghdadi H. H. (2014) Antioxidant potential of quercetin remarkable protection against hypercholesterolemia in rats. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 4, 4382-4391.
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Grando, T. H., Doleski, P. H., Boligon, A. A., Stefani, L. M., & Monteiro, S. G. (2016). Hypolipidemic effect of β -caryophyllene

to treat hyperlipidemic rats. *Naunyn Schmiedebergs Archives Pharmacology*, 390, 215-223.

Bertges, L. C., Mourão, C. A., Souza, J. B., & Cardoso, A; C. (2011). Hyperlipidemia induced by triton WR1339 (Tyloxapol) in wistar rats. *Revista Brasileira de Ciências Medicas da Saúde*, 1, 32-34.

Beskow, G.T., Hoffmann, J. F., Teixeira, A. M., Fachinello, J. C., Chaves, F. C., & Rombaldi, C. V. (2015). Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). *Food Chemistry*. 1, 699-704.

Boberg, D. R., Furtado-Alle, L., Souza, R. L., & Chautard-Freire-Maia, E. A. (2010). Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 452-454.

Boruah, D. C., Devi, R., Tamuli, S., Kotoky, J., & Sharma, D. K. (2014). Hypolipidemic activity of crude polyphenols from the leaves of *Clerodendron colebrookianum* Walp in cholesterol fed rats. *Journal Food Science Technology*, 11, 3333-3340.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Braun, J. B. S., Ruchel, J. B., Manzoni, A. G., Abdalla, F. H., Casalli, E. A., Castilhos, L. G., Passos, D. F., & Leal, D. B. R. (2017). Pretreatment with quercetin prevents changes in lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in hyperlipidemic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. In press.

Browne, R.W., Koury, S. T., Marion, S., Wilding, G., Muti, P., & Trevisan, M. (2007). Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clinical Chemistry*, 53, 310-317.

- Cardoso, J. S., Oliveira, P. S., Bona, N. P., Vasconcellos, F. A., Baldissarelli, J., Vizzotto, M., Soares, M. S. P., Ramos, V. P., Lencina, C. L., Tavares, R. G., & Stefanello, F.M. (2017). Antioxidant, antihyperglycemic and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in animal models of insuline resistance. *Redox Report*, 23, 41-46.
- Casula, M., Tragni, E., & Catapano, A.L. (2012) Adherence to lipid-lowering treatment: the patient perspective. *Patient Prefer Adherence*, 6, 805-814.
- Castro, K. F., Artoni, S. M. B., & Pacheco, M. R. (2012). Perfil lipídico sérico de ratos tratados com surfactante. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 49, 193-201.
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, 132, 19-27.
- Da Rocha, J. T., Sperança, A., Nogueira, C. W., & Zeni, G. (2009). Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1673-1679.
- De Bona, K. S., Bonfanti, G., Bitencourt, P. E., Cargnelutti, L. O., da Silva, P. S., De Lucca, L., Pimentel, V. C., Tatsch, E., Gonçalves, T. L., Premaor, M., Moresco, R. N., & Moretto, M. B. (2013). Butyrylcholinesterase and γ -Glutamyltransferase Activities and Oxidative Stress Markers Are Altered in Metabolic Syndrome, But Are Not Affected by Body Mass Index. *Inflammation*, 36, 1539-1547.
- De Souza, J. A., Pereira, P., Allgayer, M. D. C., Marroni, N. P., de Barros, F. F. A., & Picada, J. N. (2017). Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Experimental and Molecular Pathology*, 103, 51-55.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures,

- Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8,1818-1892.
- Ding, S., Jiang, J., Yu, P., Zhang, G., & Liu, X. (2017). Green tea polyphenol treatment attenuates atherosclerosis in high-fat diet-fed apolipoprotein E-knockout mice via alleviating dyslipidemia and up-regulating autophagy. *Plos One*, 12, e0181666.
- Durak, Z. E., Buber, S., Bahadir, O., & Kocaoglu, H. (2015). Effects of Aqueous Extracts from Grape and Grape Seed on Adenosine Deaminase Activity in Cancerous and Non cancerous Human Gastric and Colon Tissues. *Food & Nutrition Report*, 1, 6-9.
- Ebtehaj, S.; Gruppen, E. G., Parvizi, M., Tietge, U. J. F., & Dullaart, R. P. F. (2017). The anti-inflammatory function of HDL is impaired in type 2 diabetes: role of hyperglycemia, paraoxonase 1 and low grade inflammation. *Cardiovascular Diabetology*, 16, 132-140.
- Ellman, G. L., Courtney, D. K., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- E Souza, B. S. F., Carvalho, H. O., Ferreira, I. M., da Cunha, E. L., Barros, A. S., Taglialegna, T., & Carvalho, J. C. T. (2017). Effect of the treatment with Euterpe oleracea Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 542-547.
- Gazal, M., Kaufmann, F. N., Acosta, B. A., Oliveira, P. S., Valente, M. R., Sturbelle, R., Lencina, C. L., Stefanello, F. M., Kaster, M. P., Reginatto, F. H., & Ghisleni, G. (2015). Preventive Effect of Cecropia pachystachya Against Ketamine-Induced manic bahavior and Oxidative Stress in rats. *Neurochemical Research*, 40, 1421-1430.
- Giusti, G., & Galanti, B. (1984).Colorimetric method.Adenosine deaminase.In H. U. Bergmeyer (Eds.), *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed (pp. 315-3233). Weinheim: VerlagChemie.

- Goliasch, G., Haschemi, A., Marculescu, R., Endler, G., Maurer, G., Wagner, O., Huber, K., Mannhalter, C., & Niessner, A. (2012). Butyrylcholinesterase Activity Predicts Long-Term Survival in Patients with Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry*, 6, 1055-1058.
- Harisa, G. I., Alomrani, A. H., & Badran, M. M. (2016). Simvastatin-loaded nanostructured lipid carriers attenuate the atherogenic risk of erythrocytes in hyperlipidemic rats. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 96, 62-71.
- Harnafi, H., Bouanani, N. H., Aziz, M., Serghin, C. H., Ghalim, N., & Amrani, S. (2007). The hypolipidaemic activity of aqueous Erica multiflora flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: a comparison with fenofibrate. *Journal Ethnopharmacology*, 109, 156-60.
- Hoffmann, J. F., Crizel, R. L., Madruga, N. A., Barbieri, R. L., Rombaldi, C. V., & Chaves, F. C. (2018). Flavan-3-ol, flavanone, flavone, flavonol, phenolic acid, and stilbene contents of four Butia species (Arecaceae). *Fruits*. Accepted manuscript. In press.
- Hossain, K. M., Dayem, A. A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Saha, K. S., Yang, G. M., Choi, H. Y., & Cho, S. G. (2016). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International Journal of Molecular Science*, 7, 569-600.
- Huang, W. C., Lin, Y. S., Tsai, C. C., Tseng, H. C., Chen, C. L., Lu, P. J., Chen, P. S., Qian, L., Hong, J. S., & Lin, C. F. (2009). Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. *Immunology*, 28, 275- 286.
- Iqbal, S., Zaidi, S. Z., Motabi, I. H., Alshehry, N. F., & Alghamdy, M. S. (2016). Thrombotic thrombocytopenic purpura - analysis of clinical features, laboratory characteristics and therapeutic outcome of 24 patients treated at a Tertiary Care Center in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Medical Science*, 32, 1494-1499.

- Kálmán J., Juhasz, A., Rakonczay, Z., Abraham, G., Zana, M., Boda, K., Farkas, T., Penke, B., & Janka, Z. (2004). Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. *Life Science*, 75, 195-204.
- Khamis, A. A., Salama, A. F., Kenawy, M. E., & Mohamed, T. M. (2017). Regulation of hepatic hydroxy methyl glutarate – CoA reductase for controlling hypercholesterolemia in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1242-1250.
- Kim, J. H., Lee, S. H., Lee, H. W., Sun, Y. N., Jang, W. H., Yang, S. Y., Jang, H. D., & Kim, Y. H. (2016). (-)-Epicatechin derivate from *Orostachys japonicus* as potential inhibitor of the human butyrylcholinesterase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1033-1039.
- Kong, F., Su, Z., Guo, X., Zeng, F., & Bi, Y. (2017). Antidiabetic and Lipid-Lowering Effects of the Polyphenol Extracts from the Leaves of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels on Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats. *Journal of Food Science*, 1, 212-202.
- Kutryb-Zajac, B., Mateuszuk, L., Zukowska, P., Jasztal, A., Zabielska, M. A., Toczek, M., Jablonska, P., Zakrzewska, A., Sitek, B., Rogowski, J., Lango, R., Slominska, E. M., Chlopicki, S., & Smolenski, R. T. (2016). Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovascular Research*, 112, 590-605.
- Limmongkon, A., Nopprang, P., Chaikandee, P., Somboon, T., Wongshaya, P., & Pilaisangsuee, V. (2018). LC-MS/MS profiles and interrelationships between the anti-inflammatory activity, total phenolic content and antioxidant potential of Kalasin 2 cultivar peanut sprout crude extract. *Food Chemistry*, 239, 569-578.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & [Randall, R. J.](#) (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Mansour, H. B., Yatouji, S., Mbarek, S., Houas, I., Delai, A., Dridi, D. (2011). Correlation between antibutyrylcholinesterasic and antioxidant activities of three

- aqueous extracts from Tunisian *Rhus pentaphyllum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, 32-40.
- Melzig, M. F. (1996) Inhibition of Adenosine Deaminase Activity of Aortic Endothelial Cells by Selected Flavonoids. *Planta Medica*. 62, 20-21.
- Misra H. P., & Fridovich I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170-3175.
- Monika, P., & Geetha, A. (2015) The modulating effect of *Persea americana* fruit extract on the level of expression of fatty acid synthase complex, lipoprotein lipase, fibroblast growth factor-21 and leptin - A biochemical study in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. *Phytomedicine*, 22, 939-945.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annual Review Medicine*, 95, 351-358.
- Oliveira, P. S., Chaves, V. C., Bona, N. P., Soares, M. S. P., Vasconcellos, F. A., Tavares, R. G., Vizzoto, M., Silva, L. M. C. D., Grecco, F. B., Gamaro, G. D., Spanevello, R. M., Lencina, C. L., Reginatto, F. H., & Stefanello, F. M. (2017). *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 935-941.
- Polachini, C. R., Spanevello, R. M., Casali, E. A., Zanini, D., Pereira, L. B., Martins, C. C., Baldissareli, J., Cardoso, A. M., Duarte, M. F., da Costa, P., Prado, A. L., Schetinger, M. R., & Morsch, V. M. (2014). Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience*, 266, 266-274.
- Pytel, E., Bukowka, B., Koter-Michalak, M., Olszewska-Banaszczyk, M., Gorzelak-Pabis, P., & Broncel, M. (2016). Effect of intensive lipid lowering therapies on cholinesterase activity in patients with coronary artery disease. *Pharmacological Reports*, 69, 150-155.

- Randell, E. W., Mathews, M. S., Zhang, H., Serai, J. S., & Sun, G. (2005). Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clinical Biochemistry*, 38, 799-805.
- Reale, M., Costantini, E., Di Nicola, M., D'Angelo, C., Franchi, S., D'Aurora, M., Di Bari, M., Orlando, V., Galizia, S., Ruggieri, S., Stuppia, L., Gasperini, C., Tata, A. M., & Gatta, V. (2018). Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase polymorphisms in Multiple Sclerosis patients: implication in peripheral inflammation. *Science Report*, 8: 1319-1327.
- Rony, T. A., Ajith, T. A., Nima, N., & Janardhanan, K. K. (2014). Hypolipidemic activity of *Phellinus rimosus* against triton WR-1339 and high cholesterol diet induced hyperlipidemic rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 482-492.
- Sicinska P., Bokowska, B., Paiak, A., Koceva-Chyla, A., Pietras, T., Nizinkowski, P., Gorski, P., & Koter-Michalak, M. (2017). Decreased activity of butyrylcholinesterase in blood plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Archives of Medical Science*, 13, 645-651.
- Singh, K., Singh, R., & Tyaqi, S. (2017). Paraoxonase-1 is a better indicator than HDL of Atherosclerosis – A pilot study in North Indian population. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 17, 30381-30388.
- Toppo E., Darvin, S. S., Esakkimuthu, S., Balakrishna, K., Sivasankaran, K., Pandikumar, P., Ignacimuthu, S., & Al-Dhabi, N. A. (2017). Antihyperlipidemic and hepatoprotective effects of Gardenin A in cellular and high fat diet fed rodent models. *Chemico Biological Interactions*, 269, 9-17.
- Toutouzas, K., Skoumas, J., Koutagiar, I., Benetos, G., Pianou, N., Georgakopoulos, A., Galanakis, S., Antonopoulos, A., Drakopoulou, M., Oikonomou, E. K., Kafouris, P., Athanasiadis, E., Metaxas, M., Spyrou, G., Pallantza, Z., Galiatsatos, N., Aggeli, C., Antoniadis, C., Keramida, G., Peters, A. M., Anagnostopoulos, C. D., & Tousoulis, D. (2017). Vascular inflammation and metabolic activity in hematopoietic organs and liver in familial combined

hyperlipidemia and heterozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*, 12, 33-43.

Vanzin, C. S., Mescka, Cp. P., Donida, B., Hammerschmidt, T. G., Ribas, G. S., Kolling, J., Scherer, E. B., Vilarinho, L., Nogueira, C., Coitinho, A. S., Wajner, M., Wyse, A. T., & Vargas, C. R. (2015). Lipid, Oxidative and Inflammatory Profile and Alterations in the Enzymes Paraoxonase and Butyrylcholinesterase in Plasma of Patients with Homocystinuria Due CBS Deficiency: The Vitamin B12 and Folic Acid Importance. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35, 899-911.

Wedell-Neergaard, A., Eriksen, L., Gronbaek, M., Klarlund, P., Krog-Madsen, R., & Tolstrup, J. (2018) Low fitness is associated with abdominal adiposity and low-grade inflammation independent of BMI. *PLoS One*, 13, e0190645.

Williamson G. (2017) The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin*, 42, 226-235.

Zivkovic, A. R., Bender, J., Brenner, T., Hofer, S., & Schmidt, K. (2016). Reduced butyrylcholinesterase activity is an early indicator of trauma-induced acute systemic inflammatory response. *Inflammation Research*, 18, 221-230.

Zsíros N., Koncsos, P., Lorincz, H., Seres, I., Katko, M., Szentpeterj, A., Varga, V. E., Fulop, P., Paragh, G., & Harangi, M. (2016). Paraoxonase-1 arylesterase activity is an independent predictor of myeloperoxidase levels in overweight patients with or without cardiovascular complications. *Clinical Biochemistry*, 49, 862-867.

Table 1. Phenolic content ($\mu\text{g g}^{-1}$) of hydro-alcoholic *B. odorata* fruit extract

Compounds	Content ($\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>Hydroxybenzoic acids</i>	
Hydroxybenzoic	1.09 $\pm$ 0.16
Syringic	1.65 $\pm$ 0.06
Vanillic	1.21 $\pm$ 0.03
<i>Hydroxycinnamic acids</i>	
Chlorogenic	4.68 $\pm$ 0.02
Caffeic	1.53 $\pm$ 0.05
<i>p</i> -Coumaric	1.12 $\pm$ 0.06
Ferulic	1.04 $\pm$ 0.04
<i>Flavanol</i>	
Catechin	24.75 $\pm$ 0.64
(-)-Epicatechin	22.57 $\pm$ 0.31
Catechin/Epicatechin dimmer	7.73 $\pm$ 1.04
<i>Flavonol</i>	
Isorhamnetin- <i>O</i> -rutinoside	3.60 $\pm$ 0.12
Kaempferol-3- <i>O</i> -6-acetylglucoside	0.21 $\pm$ 0.01
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	0.37 $\pm$ 0.02
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	0.12 $\pm$ 0.01
Quercetin	0.92 $\pm$ 0.02
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	4.75 $\pm$ 0.06
Quercetin-3- <i>O</i> -malonylglucoside	1.47 $\pm$ 0.04
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin)	15.40 $\pm$ 0.3
<i>Flavone</i>	
Luteolin	1.11 $\pm$ 0.00
<i>Flavanone</i>	
Hesperetin	0.56 $\pm$ 0.06
Pinocembrin	0.92 $\pm$ 0.03

Table 2. Effect of *Butia odorata* fruit extract treatment in rats with tyloxapol-induced hyperlipidemia on metabolic parameters

	Vehicle	T+Vehicle	T+extract
Weight gain (g)	72.2±7.2	84.8±3.1	66±3.9
Glucose (mg/dL)	129.4±3.1	128.8±2.4	117.0±3.0
TG (mg/dL)	160.6±3.9	1284.0±246.2***	115.0±5.8###
CHOL (mg/dL)	50.8±2.3	211.5±3.8***	111.0±16.8##
LDL-C (mg/dL)	23.0±1.0	115.3±8.4*	16.3±1.0 [#]
HDL-C (mg/dL)	33.1±1.6	62.6±6.0*	93.4±1.4***,###
AST (U/L)	225.0±11.8	220.9±20.3	205.4±14.1
ALT (U/L)	86.9±22.5	77.2±4.5	79.3±8.1
GGT (U/L)	22.9±1.1	22.4±1.4	19.9±1.2
ALP (U/L)	151.1±13.7	142.0±9.5	145.0±11.3

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=4-9). (***) $P < 0.001$ as compared with Control/Vehicle. (*) $P < 0.05$ as compared with Control/Vehicle. (###) $P < 0.001$ as compared to Tyloxapol/Vehicle. (##) $P < 0.01$ as compared with Tyloxapol/Vehicle. (#) $P < 0.05$ as compared with Tyloxapol/Vehicle. One-way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test. TG: Triglycerides; CHOL: Cholesterol; LDL-C: Cholesterol-LDL; HDL-C: Cholesterol-HDL; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; GGT: Gamma-Glutamyl Transferase.

Table 3. Effect of *Butia odorata* fruit extract treatment in rats with tyloxapol-induced hyperlipidemia on hepatic oxidative stress parameters

	Vehicle	T + Vehicle	T + Extract
CAT (U/mg protein)	242.3±53.2	325.5±75.1	216.4±19.7
SOD (U/mg protein)	17.3±0.9	17.5±1.4	17.2±1.7
GPx (U/mg protein)	108.6±14.1	158.1±16.7	144.9±16.9
TBARS (nmol/mg protein)	9.7±0.8	11.6±0.8	11.4±0.8
SH (nmol/mg protein)	28.6±4.5	31.1±3.2	37.4±7.8
Nitrite (µM/mg protein)	2.1±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n =5-12). No statistically significant difference was found between groups (one-way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test). CAT: Catalase; SOD: Superoxide Dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; SH: Sulfhydryl.

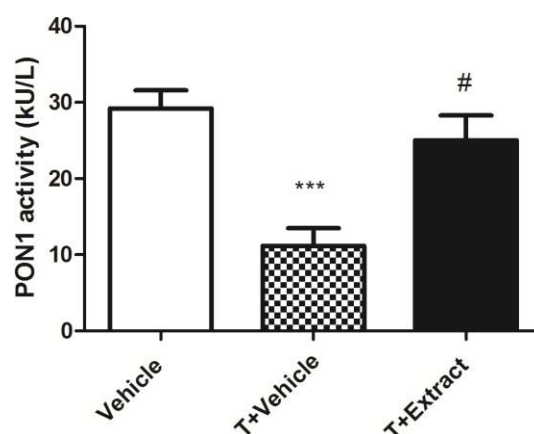


Figure 1. Effect of *Butia odorata* fruit extract treatment in rats with tyloxapol-induced hyperlipidemia on serum paraoxonase (PON1) activity. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n = 4-5). (***) $P < 0.001$ as compared with Control/Vehicle. (#) $P < 0.05$ as compared with Tyloxapol/Vehicle. One-way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test.

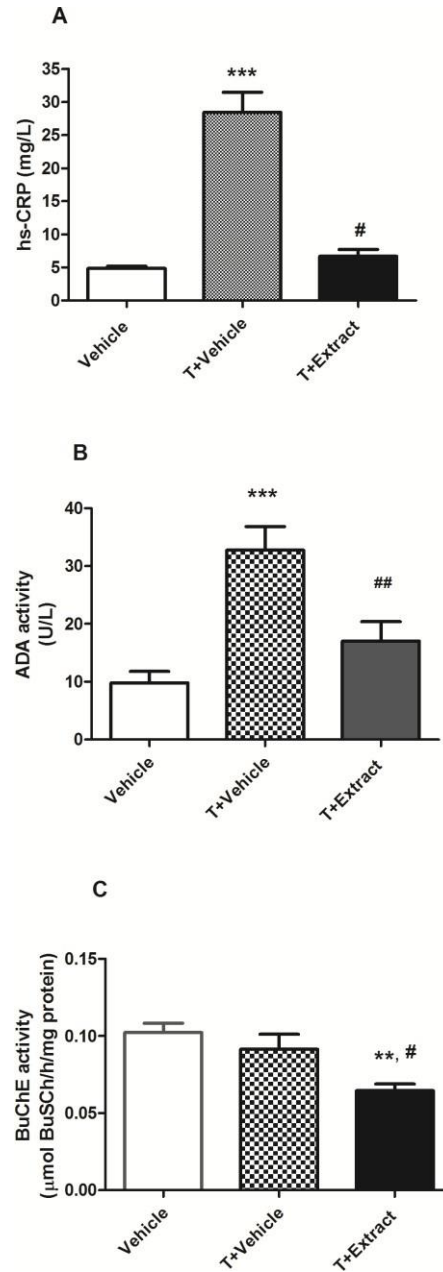


Figure 2. Effect of *Butia odorata* fruit extract treatment in rats with tyloxapol-induced hyperlipidemia on C-reactive protein (A), adenosine deaminase (B) and butyrylcholinesterase (C) activities. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n = 5-8). (***) $P < 0.001$ as compared with Control/Vehicle. (**) $P < 0.01$ as compared with Control/Vehicle. (##) $P < 0.01$ as compared with Tyloxapol/Vehicle. (#) $P < 0.05$ as compared with Tyloxapol/Vehicle. One-way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou que o tratamento com o extrato de fruto de *Butia odorata* foi capaz de reduzir efetivamente a hiperlipidemia (TG, colesterol e níveis de LDL-C), aumentar os níveis de HDL-C e a atividade da PON1, bem como diminuir marcadores séricos de inflamação em um modelo animal de hiperlipidemia, sugerindo uma potencial atividade hipolipemiante e anti-inflamatória desse extrato.

Em conjunto, nossos achados indicam que o extrato de *B. odorata* atua como um promissor agente terapêutico, auxiliar no tratamento ou até mesmo na prevenção da hiperlipidemia. Dentro desse contexto, estudos complementares são necessários para melhor elucidar os efeitos benéficos deste fruto, inclusive em outros modelos animais, como diabetes e síndrome metabólica.

REFERÊNCIAS

Argani, H., et al. The effect of red grape seed extract on serum paraoxonase activity in patients with mild to moderate hyperlipidemia. *Sao Paulo Med J.* 134(3): 234-239, 2016.

Baldissera, M. D., et al. Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 390(2): 215-223, 2016.

Bertges, L. C., et al. Hyperlipidemia induced by triton WR1339 (Tyloxapol) in wistar rats. *Rev Bras Cien Med Saúde.* 1(1): 32-34, 2011.

Beskow, G.T. et al. Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). *Food Chemistry.* 1(172): 699-704, 2015.

Boderg, D. R., et al. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. *Genet Mol Biol.* 33(3): 452-54, 2010.

Castro, K. F., et al. Perfil lipídico sérico de ratos tratados com surfactante. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 49(3): 193-201, 2012.

Cerchiaro, D. C. S. G. & Honório, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e aterosclerose. *Qui. Nov.* 34(2): 300-305, 2011.

Cheng, J. M., et al. PCSK9 in relation to coronary plaque inflammation: results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis.* 248: 117-122, 2016.

Chistiakov, D. A., et al. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie.* 132: 19-27, 2017.

De Bona, K. S., et al. Butyrylcholinesterase and γ -Glutamyltransferase Activities and Oxidative Stress Markers Are Altered in Metabolic Syndrome, But Are Not Affected by Body Mass Index. *Inflammation.* 36(6): 1539-1547, 2013.

De Sousa, J. A., et al. Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Exp Mol Pathol*. 103(1): 51-55, 2017.

Del Rio, D., et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxd Redox Signal*. 18(14): 1818-92, 2013.

Ding, S., et al. Green tea polyphenol treatment attenuates atherosclerosis in high-fat diet-fed apolipoprotein E-knockout mice via alleviating dyslipidemia and up-regulating autophagy. *PLoS One*. 12(8), 2017.

Fagundes, D. J., Taha, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta. Cir. Bras*. 19(1): 59-65, 2004.

Faria e Souza, B. S., et al. Effect of the treatment with *Euterpe oleracea* Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. *Biomed Pharmacother*. 90: 542-547, 2017.

Gazal, M., et al. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced manic behavior and Oxidative Stress in rats. *Nurochem Res*. 40(7): 1421-30, 2015.

Gencer, B., et al. Prognostic value of PCSK9 levels in patients with acute coronary syndromes. *Eur. Heart J*. 37(6): 546-553, 2016.

Goliasch, G., et al. Butyrylcholinesterase Activity Predicts Long-Term Survival in Patients with Coronary Artery Disease. *Clin Chem*. 58(6): 1055-1058, 2012.

Greek, R. & Shanks, S. Animal Models in Light of Evolution. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 24, 2002.

Haraguchi, Y., et al. Serum myeloperoxidase/para-oxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 234(2): 288-94, 2014.

Harnafi, H., et al. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: a comparison with fenofibrate. *J Ethnopharmacol.* 109(1): 156-60, 2007.

Hoffmann, J. F., et al. *Butia* spp. (Arecaceae) LC-MS-Based Metabolomics for Species and Geographical Origin Discrimination. *J Agric Food Chem.* 65(2): 523-532, 2017.

Hoffmann, J. F., et al. Stability of bioactive compounds in *butiá* (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. *Food Chem.* 237: 638-644, 2017.

Hunter P. M. & Hegele, R. A. Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidemia. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13(5): 278-288. 2017.

Kálmán J., et al. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. *Life Sci.* 75(10): 1195-204, 2004.

Khamis, A. A., et al. Regulation of hepatic hydroxy methyl glutarate – CoA reductase for controlling hypercholesterolemia in rats. *Biomed Pharmacother.* 95: 1242-1250, 2017.

Khine, H. W., et al. Association of the serum myeloperoxidase/high-density lipoprotein particle ratio and incident cardiovascular events in a multi-ethnic population: Observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis.* 263:156-162, 2017.

Kim, J. H., et al. (-)-Epicatechin derivate from *Orostachys japonicus* as potential inhibitor of the human butyrylcholinesterase. *Int J Macromol.* 91: 1033-1039, 2016.

Kutryb-Zajac, B., et al. Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovasc Res.* 112(2): 590-605, 2016.

Lan, H. L., et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) affects gene expression pathways beyond cholesterol metabolism in liver cells. *J. Cell. Physiol.* 224(1): 273-281, 2010.

Li, S., et al. Association of plasma PCSK9 levels with white blood cell count and its subsets in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 234(2): 441-445, 2014.

Li, S., et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as a biomarker for the severity of coronary artery disease. *Ann. Med.* 47(5): 386-393, 2015.

Limmongkon, A., et al. LC-MS/MS profiles and interrelationships between the anti-inflammatory activity, total phenolic content and antioxidant potential of Kalasin 2 cultivar peanut sprout crude extract. *Food Chem.* 239: 569-578, 2018.

Long L. & Song Y. Myeloperoxidase: A promising therapeutic target in prevention of atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 1(256): 15, 2018.

Mackness, M. I., et al. Serum paraoxonase activity familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 86(2-3): 193-199, 1991.

Marinangeli, C. P., et al. Policosanols as nutraceuticals: fact or fiction. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50(3): 259-267, 2010.

Pereira, F., et al. Obesidade e inflamação: o elo reconhecido. *Nutricias*. 6(40): 40-43, 2006.

Pereira, M.C. et al. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. *J Agric Food Chem.* 60(12): 3061-3067, 2013.

Pytel, E., et al. Effect of intensive lipid-lowering therapies on cholinesterase activity in patients with coronary artery disease. *Pharmacol Rep.* 69(1): 150-155, 2017.

Rony, T. A., et al. Hypolipidemic activity of *Phellinus rimosus* against Triton WR-1339 and high cholesterol diet induced hyperlipidemic rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 37(2): 482-492, 2014.

Schneider, L. R., et al. The phytochemistry and pharmacology of *Butia* sp.: A systematic review and an overview of the technological monitoring process. *Phytother. Res.* 31 (10): 1495-1503, 2017.

Shahidi, F. & Wanasundara, P. K. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32(1): 61-103, 1992.

Sicinska P., et al. Decreased activity of butyrylcholinesterase in blood plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Med Sci.* 13(3): 645-651, 2016.

Sippela, C., et al. Processos inflamatórios da obesidade. *Rev. Bras. Cienc. Saúde.* 12(42): 48-56, 2014.

Tabas, I. et al. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell. Biol.* 209(1): 13-22, 2015.

Tavori, H., et al. Human PCSK9 promotes hepatic lipogenesis and atherosclerosis development via apoE- and LDLR-mediated mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 110(2): 168-278, 2016.

Toullec, N., et al. Oxidative Stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *Mol. Med.* 2(6): 211-230, 2010.

Vazin, C. S., et al. Lipid, Oxidative and Inflammatory Profile and Alterations in the Enzymes Paraoxonase and Butyrylcholinesterase in Plasma of Patients with Homocystinuria Due CBS Deficiency: The Vitamin B12 and Folic Acid Importance. *Cell Mol Neurobiol.* 35(6): 899-911, 2015.

Velloso, J. C. R., et al. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. *Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.* 34(3): 305-312, 2013.

Volp, A. C. P., et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 52(3): 537-549, 2008.

Wedell-Neergaard, A., et al. Low fitness is associated with abdominal adiposity and low-grade inflammation independent of BMI. PLoS One. 13(1), 2018.

Zsíros N., et al. Paraoxonase-1 arylesterase activity is an independent predictor of myeloperoxidase levels in overweight patients with or without cardiovascular complications. Clin Biochem. 49(12): 862-867, 2016.

ANEXO

Pelotas, 16 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Francieli Moro Stefanello

Bioquímica - Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou a solicitação o projeto intitulado: “**Avaliação das atividades antioxidante, hipocolesterolêmica e/ou hipoglicemiante de produtos naturais**”, processo nº23110.005747/2015-05, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº **CEEA 5747-2015**).

Vigência do Projeto: 16/11/2015 a 10/11/2018

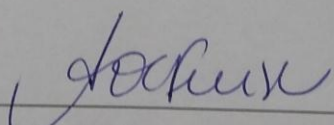
Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/ Wistar

Nº de animais: 329

Idade: 60 dias

Sexo: Machos

Origem: Biotério Central – UFPel


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável: _____

Ciente em: 23 / 11 / 2015