

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Sabrina Somacal

**POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA *IN VIVO* E *IN VITRO***

Santa Maria, RS  
2016

**Sabrina Somacal**

**POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR (A) EM FARMACOLOGIA.**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Emanuelli  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Paula Rossini Augusti

Santa Maria, RS, Brasil  
2016



Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Somacal, Sabrina  
Potencial antiaterogênico da bixina in vivo e in vitro / Sabrina Somacal.- 2016.  
145 p.; 30 cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli  
Coorientadora: Paula Rossini Augusti  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Carotenoides 2. Enzimas antioxidantes 3. Inflamação  
4. Lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) 5.  
Aterosclerose I. Emanuelli, Tatiana II. Rossini Augusti, Paula III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Sabrina Somacal. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Avenida Roraima, n. 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP: 97105-900

Fone (0xx)55 3220 8547; e-mail:s\_somacal@hotmail.com

**Sabrina Somacal**

**POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR (A) EM FARMACOLOGIA.**

**Aprovado em 25 de Agosto de 2016:**

---

**Tatiana Emanuelli, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)**

---

**Eliseu Rodrigues, Dr. (UFRGS)**

---

**Greicy Michele Marafiga Conterato, Dra. (UFSC)**

---

**Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

Dedico esse trabalho às “mulheres da minha vida”: minha mãe Suelir Somacal, por seu amor e sua dedicação, pelo exemplo de luta e por incansavelmente batalhar pela minha educação e de minha irmã; à minha irmã Simara Somacal, por seu amor e por ser minha companheira para todas as horas e à minha adorável sobrinha/filha Sofia Somacal, por sua ternura e por ser esse raio de sol constante na vida de todos nós.

## AGRADECIMENTOS

A toda a minha família por sempre me estimularem na busca dos meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente durante toda a minha caminhada. Agradeço em especial meus pais, Suelir Somacal e Eduvar J. Somacal, por seu cuidado e por sempre me oferecerem um porto seguro e a minha irmã, Simara Somacal, por seu apoio e seu companheirismo. A vocês meu eterno amor e gratidão.

Ao meu namorado Jairo L. Meneghel de Melo, por estar comigo nessa jornada em tempo integral, por ter “segurado as pontas” na minha ausência e por todo o seu cuidado e seu amor. Você é e sempre será importante para mim. Te amo e obrigada!

A minha princesa Sofia Somacal, por tornar os meus dias mais felizes e o meu mundo um lugar mais alegre e cheio de amor.

À minha orientadora Tatiana Emanuelli, pelo constante ensinamento, pela disponibilidade apesar de seus inúmeros afazeres, pela oportunidade de continuar meus estudos sob sua orientação. A você o meu agradecimento e profunda admiração pela pessoa e pesquisadora que és.

À minha co-orientadora e amiga Paula Augusti, por, simplesmente, tudo! Por me acompanhar desde o meu primeiro dia no laboratório, pela paciência, por todo ensinamento e todos os conselhos científicos e para a vida. Tenho muito orgulho de ter você por perto, mesmo especialmente estando longe.

À professora Andreza Fabro de Bem, que abriu as portas de seu laboratório na UFSC e me “adotou” como sua aluna. Obrigada por me fazer sentir parte do seu grupo de pesquisa e permitir que eu pudesse aprender tanto em pouco tempo. A você a minha admiração pela pessoa e orientadora que és e minha gratidão.

À minha querida “equipe” Andréia Quatrin, Amanda R. Ruviano, Cassieli G. Figueiredo, Lisiane Conte, Dariane T. Silva, Matheus Viegas e Miguel Roehrs, por sua disposição e zelo para com os meus experimentos e por sua alegria (contagante) que nos acompanhou por diversas tardes de árduo trabalho. Serei eternamente grata a todos vocês.

Aos meus colegas e amigos do NIDAL, que por serem muitos não citarei nomes para não cometer a falha de esquecer alguém. Obrigado pela companhia, o apoio, a ajuda nas horas necessárias, as risadas, o café e o mate.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Neurociências I da UFSC, Jade de Oliveira, Gabriela C. de Paula, Daiane Engel, Cristine de Paula, Ruth L. Q. Gaspar, Marcos R. Stralio, Gianni Mancini e Daniel da Silva. Obrigada por todo o ensinamento, auxílio, litros

de café e as muitas alegrias que compartilhei com vocês. Em especial à minha querida Luana C. S. da Silva por me ensinar e acompanhar na arte da cultura celular. Levo vocês no coração. Ao professor Marcelo Farina (UFSC) e ao seu grupo de pesquisa por todo suporte e auxílio em meus experimentos.

Aos meus amigos Bruna G. Milbradt, Luciele Milani, Roberta Scremin, Rodrigo Gindri, Alisson Ferreira, Virgínia B. Tomasini e Leandro B Geraldo, por seus conselhos, por vibrarem com as minhas conquistas e entenderem as minhas ausências.

À professora Ione Denardin por ceder gentilmente o local para o experimento com coelhos e á professora Marta Duarte pela ajuda inestimável com os parâmetros inflamatórios.

Ao professor Marcelo L. da Veiga pela contribuição nas inúmeras análises histológicas.

Aos professores, Liliane de F. Bauermann, Eliseu Rodrigues, Greicy M. M. Conterato, Maria R. C. Schetinger, Roselei Fachinetto e Maria Beatriz Moretto por aceitarem avaliar esse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, e especialmente à secretária Zeli Carvalho, por sua competência e sua disposição em sempre nos ajudar. Obrigada!

À Universidade Federal de Santa Maria, por possibilitar minha pós-graduação em uma universidade pública e de tamanha excelência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa CAPES/FAPERGS para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

### POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA *IN VIVO* E *IN VITRO*

AUTORA: Sabrina Somacal

ORIENTADORA: Tatiana Emanuelli

CO-ORIENTADORA: Paula Rossini Augusti

A aterosclerose é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos na túnica íntima das artérias de médio e grande calibre. A inflamação, o estresse oxidativo e a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) possuem um papel importante no desenvolvimento dessa doença. Assim, a inclusão de antioxidantes na dieta poderia modular o início e a progressão da aterosclerose. O carotenoide bixina, presente nas sementes de urucum, possui excelente atividade antioxidante já demonstrada em diversos modelos de dano oxidativo. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antiaterogênico da bixina e os mecanismos envolvidos neste efeito em modelos *in vivo* e *in vitro*. Primeiramente avaliou-se a administração de uma dieta aterogênica (0,5% de colesterol) sozinha ou suplementada com bixina (10, 30 ou 100 mg/kg) ou sinvastatina (15 mg/kg) por 60 dias em coelhos Nova Zelândia. A dieta aterogênica aumentou os níveis séricos de lipídios, além de induzir oxidação lipídica (TBARS) no tecido aórtico. A suplementação com bixina ou sinvastatina (medicamento hipocolesteremiante de referência) atenuou o aumento induzido pela dieta aterogênica nos níveis de triglicérides séricos e nos níveis de TBARS no tecido aórtico e somente a bixina foi capaz de melhorar o índice aterogênico e aumentar os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL). A suplementação com bixina ou sinvastatina restaurou as alterações nos níveis de NPSH e na atividade das enzimas antioxidantes induzidas pela dieta aterogênica. A bixina reduziu os níveis séricos de interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a razão entre a espessura da íntima e da média no arco aórtico. Assim, o efeito antiaterosclerótico da bixina *in vivo* parece estar está associado a uma melhora no perfil lipídico, diminuição do estresse oxidativo e da resposta inflamatória, bem como prevenção de alterações no sistema antioxidante. Considerando o efeito promissor da bixina *in vivo*, na segunda parte deste estudo investigou-se *in vitro* os possíveis mecanismos relacionados ao efeito antiaterogênico da bixina, como: o potencial para prevenir a oxidação da LDL e os efeitos citotóxicos da LDL oxidada (LDLox) em macrófagos cultivados. A bixina inibiu de modo concentração-dependente a oxidação lipídica e proteica da LDL humana isolada, sendo mais potente que o licopeno. A partir de 0,1  $\mu$ M, a bixina preveniu a fragmentação da apolipoproteína B-100 (apo B-100), avaliada através da destruição do triptofano, e a partir de 2.5  $\mu$ M causou inibição significativa na formação de dienos conjugados, demonstrando que a bixina possui efeitos antioxidantes diretos. Considerando o envolvimento da LDLox na patogênese da aterosclerose, investigamos o efeito protetor da bixina sobre danos citotóxicos induzidos pela exposição de macrófagos J774A.1 à LDLox (100  $\mu$ g/mL). O pré-tratamento por 24 h com bixina reduziu os efeitos citotóxicos desencadeados pela LDLox em macrófagos J774A.1 *in vitro*, incluindo: a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, distúrbio na homeostase do óxido nítrico, disfunção mitocondrial, depleção de glutatona e formação de células espumosas. Os prováveis mecanismos da bixina sobre vias de sinalização também foram investigados em cultura de macrófagos, demonstrando que os efeitos antiaterogênico da bixina estão relacionados com a modulação das vias antioxidante e anti-inflamatória, através da ativação do Nrf2 e inativação do NF $\kappa$ B. Tomados em conjunto, os resultados deste estudo indicam que os efeitos antiaterogênicos da bixina estão relacionados a prevenção da oxidação da LDL, melhora do perfil lipídico e do equilíbrio redox celular, além de ação anti-inflamatória e redução na formação das células espumosas e das lesões ateroscleróticas. Esses dados sugerem um novo papel para o carotenoide bixina como potencial agente antiaterogênico.

**Palavras-chave:** Carotenoides. Enzimas antioxidantes. Inflamação. Lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox). Aterosclerose

## ABSTRACT

### ANTIATHEROGENIC POTENTIAL OF BIXIN *IN VIVO* AND *IN VITRO*

AUTHOR: Sabrina Somacal  
ADVISOR: Tatiana Emanuelli  
CO-ADVISOR: Paula Rossini Augusti

Atherosclerosis is a chronic disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in the intima layer of medium and large caliber arteries. Inflammation, oxidative stress as well as low density lipoprotein (LDL) oxidative modification plays an important role in the development of this disease. Thus, the inclusion of antioxidants in the diet may prevent the atherosclerosis progression. The carotenoid bixin, found in annatto seeds, has excellent antioxidant activity as demonstrated in several models of oxidative damage. In this context, the objective of this study was to evaluate the antiatherogenic potential of bixin and the mechanisms involved in this effect in models *in vivo* and *in vitro*. First, we evaluated the administration of an atherogenic diet (0.5% cholesterol) alone or supplemented with bixin (10, 30 or 100 mg/kg) or simvastatin (15 mg/kg) for 60 days in New Zealand rabbits. The atherogenic diet increased lipid serum levels, besides inducing lipid oxidation (TBARS) in aortic tissue. Supplementation with bixin or simvastatin (hypocholesterolemic reference drug) reduced serum triglycerides and TBARS levels induced by atherogenic diet in the aortic tissue but only bixin reduced the atherogenic index and increased HDL levels. Supplementation with bixin or simvastatin restored changes in NPSH levels and antioxidant enzymes activity induced by the atherogenic diet. Bixin reduced the serum levels of interleukin 6 (IL -6), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and the ratio between the thickness of the intima and media in the aortic arc. Thus, the *in vivo* antiatherosclerotic effect of bixin seems to be associated with an improvement in the lipid profile, decreased oxidative stress and inflammatory response and prevention of changes in the antioxidant system. Considering the promising effect of bixin *in vivo*, in the second part of this study we investigated the possible mechanisms related to antiatherogenic effect of bixin, such as potential to prevent the oxidation of LDL *in vitro* and the cytotoxic effects of oxidized LDL (oxLDL) in cultured macrophages. Bixin inhibited lipid and protein oxidation of isolated human LDL in a concentration-dependent manner, and was more potent than lycopene. From 0.1  $\mu$ M onwards, bixin prevented apolipoprotein B-100 (apo B-100) fragmentation, assessed by tryptophan destruction, and from 2.5  $\mu$ M onwards bixin caused inhibited the formation of conjugated dienes, demonstrating that bixin has direct antioxidant effects. Considering the involvement of oxLDL in the pathogenesis of atherosclerosis, we investigated the protective effect of bixin against cytotoxic damage induced by exposure of macrophages J774A.1 to oxLDL (100  $\mu$ g/mL). Bixin pretreatment for 24 h reduced the cytotoxic effects triggered by oxLDL in J774A.1 macrophages *in vitro*, including the generation of reactive oxygen and nitrogen species, disturbance in the nitric oxide homeostasis, mitochondrial dysfunction, glutathione depletion and foam cell formation. The probable mechanisms of bixin on signaling pathways have also been investigated in cultured macrophages, demonstrating that the antiatherogenic effects of bixin are related to modulation of antioxidant and anti-inflammatory pathways through activation of Nrf2 and inactivation of NF $\kappa$ B pathways. Taken together, the results of this study indicate that the antiatherogenic effects of bixin are related to the prevention of LDL oxidation, improved lipid profile and cellular redox balance, as well as anti-inflammatory action and a reduction of foam cell formation and atherosclerotic lesions. These data suggest a new role for the carotenoid bixin as a potential anti-atherogenic agent.

**Keywords:** Carotenoids. Antioxidant enzymes. Inflammation. Oxidized low density lipoprotein (LDL<sub>ox</sub>). Atherosclerosis



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 – Cinética da oxidação da LDL.....	17
Figura 2 – Dano oxidativo à LDL .....	18
Figura 3 – Estágio inicial da aterosclerose .....	20
Figura 4 – Progressão do ateroma .....	22
Figura 5 – Ativação do fator nuclear Nrf2 .....	27
Quadro 1 – Antioxidantes <i>versus</i> fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose ...	30
Figura 6 – Estrutura química dos principais carotenoides.....	32
Quadro 2 – Efeito da ingestão/suplementação com carotenoides sobre os marcadores de aterosclerose em humanos .....	34
Figura 7 – Exemplar de urucuzeiro e do corante de urucum extraído de forma artesanal .....	36
Figura 8 – Medida ilustrativa do consumo de O <sub>2</sub> usando diferentes inibidores/indutores farmacológicos.....	49

### ARTIGO 1

Figura 1 – Chemical structure of bixin.....	54
Figura 2 – Lipid profile and atherogenic index in serum from rabbits fed with cholesterol and/or bixin-enriched diet.....	57
Figura 3 – Intima layer/media layer ratio and representative histology of aortic arch of rabbits fed cholesterol and/or bixin-enriched diet .....	58
Figura 4 – TBARS and NPSH levels in aortic tissue and serum TNF- $\alpha$ and IL-6 levels from rabbits fed a cholesterol and/or bixin-enriched diet .....	59
Figura 5 – Antioxidants enzymes and paraoxonase-1 activities from aortic tissue of rabbits fed a cholesterol and/or bixin-enriched diet .....	59

### MANUSCRITO 1

Figura 1 – Bixin is more potent than lycopene to prevent Cu <sup>2+</sup> -induced lipid peroxidation in isolated human LDL .....	102
Figura 2 – Bixin is more potent than lycopene to prevent Cu <sup>2+</sup> -induced tryptophan oxidation in isolated human LDL .....	103
Figura 3 – Effect of bixin and lycopene on viability of macrophage cells determined by MTT assay.....	103
Figura 4 – Bixin and lycopene decrease the intracellular production of ROS and RNS but only bixin prevents mitochondrial dysfunction induced by macrophage exposure to oxLDL.....	104
Figura 5 – Effect of bixin and lycopene on cellular GSH content and protein expression of Nrf2 in macrophages exposed to oxLDL. ....	105
Figura 6 – Bixin and lycopene prevent oxLDL-induced nitrite production and protein expression of iNOS in macrophages.....	106
Figura 7 – Bixin and lycopene prevent the activation of NF- $\kappa$ B in macrophages exposed to oxLDL.....	106
Figura 8 – Bixin and lycopene inhibit foam cell formation induced by exposure of macrophages to oxLDL. ....	107
Figura S1 – Linear regression of lag phase and V <sub>máx</sub> was used in order to verify the concentration-dependent effects of bixin and lycopene . ....	108

## **DISCUSSÃO**

Figura 9 – Representação esquemática do potencial antiaterogênico da bixina..... 120

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 – Energy and composition of the experimental diets.....	55
--	----

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 Referencial teórico</b> .....	13
1.1.1 Aterosclerose .....	13
1.1.2 Patogênese da aterosclerose.....	14
1.1.2.1 Disfunção endotelial .....	15
1.1.2.2 Oxidação da LDL .....	16
1.1.2.3 Inflamação .....	19
1.1.2.4 Estrias gordurosas.....	20
1.1.2.5 Lesões avançadas e ruptura da placa .....	21
1.1.3 Modelos experimentais para o estudo da aterosclerose.....	22
1.1.4 Estresse oxidativo e aterosclerose .....	23
1.1.5 Tratamento da aterosclerose .....	28
1.1.6 Antioxidantes no tratamento da aterosclerose .....	30
1.1.6.1 Carotenoides .....	31
1.1.2.1 Urucum e bixina .....	35
<b>1.2 Objetivos</b> .....	38
1.2.1 Objetivo geral .....	38
1.2.1.1 Objetivos específicos.....	39
<b>1.3 Materiais e métodos</b> .....	39
1.3.1 Bixina .....	39
1.3.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....	40
1.3.3 Ensaio <i>in vitro</i> .....	43
1.3.4 Determinação dos níveis de proteínas .....	51
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	52
<b>2.1 Artigo 1</b> .....	52
<b>2.2 Manuscrito 1</b> .....	64
<b>3 DISCUSSÃO</b> .....	109
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	121
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	122
<b>ANEXO A – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE BIXINA</b> .....	137
<b>ANEXO B – CROMATOGRAMA EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i></b> .....	138
<b>ANEXO C – AUTORIZAÇÃO PARA USO DAS FIGURAS</b> .....	139
<b>ANEXO D – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DO ARTIGO</b> .....	145

## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese está apresentada no formato de artigos científicos integrados, seguindo as normas do Manual de Dissertações e Teses da UFSM, versão 2015.

O trabalho está organizado da seguinte forma: primeiramente é apresentada a **INTRODUÇÃO**, contendo o referencial teórico, os objetivos e os materiais e métodos utilizados para a execução dessa tese. A seguir é apresentado o **DESENVOLVIMENTO**, que traz os resultados que fazem parte deste documento e que serão apresentados sob a forma de um artigo e um manuscrito. As seções **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão dos Resultados** e **Referências Bibliográficas**, encontram-se nos próprios artigos e representam na íntegra este estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO**, dispostos após o item **DESENVOLVIMENTO**, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados aos artigos científicos deste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** são relacionadas às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

## INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) tornaram-se no último século as principais causas de mortalidade e morbidade mundial (WHO, 2015). Enquanto no início do século XX as DCV representavam menos que 10% das mortes em todo o mundo, no início do século XXI passaram a representar cerca de 50% de todas as mortes por doenças ocorridas mundialmente (WHO, 2011). Nas últimas décadas, observou-se uma pequena, mas animadora, redução na mortalidade por DCV nos países desenvolvidos, enquanto consideráveis elevações desses índices foram observados nos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil (SBC, 2013a). As estimativas indicam que as DCV permanecerão como a principal causa de mortalidade e incapacidade chegando a 23,6 milhões de mortes em 2030. Estima-se ainda que 80 a 90% dos casos ocorrerão nos países de baixa e média renda (WHO, 2015).

No Brasil, aproximadamente 400 mil mortes associadas a DCV foram registradas entre junho de 2009 e julho de 2010 (BRASIL, 2011). As projeções da WHO apontam que o país terá um aumento de 250% no número de mortes por DCV entre 2030 e 2040 (WHO, 2015). Estimasse que em 2011 foram quase 100 mil hospitalizações e procedimentos hospitalares associados as DCV no Brasil, com custos diretos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e Sistema Suplementar de Saúde (SSS) de mais de 1 bilhão de reais. Os custos indiretos podem ter ultrapassado os 2,8 bilhões de reais (TEICH; ARAUJO, 2011). Estima-se que os custos correspondentes ao grupo de pacientes com DCV aumentem significativamente à medida que a população envelheça e a prevalência de casos graves aumente (AZAMBUJA et al., 2008). As DCVs incluem a doença arterial coronariana, gangrena isquêmica, aneurisma abdominal, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (HANSSON et al., 2006).

### 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1.1.1 Aterosclerose

A aterosclerose é a principal condição patológica associada às DCV e caracteriza-se pelo acúmulo de material lipídico, especialmente lipoproteína de baixa densidade (LDL), e de elementos celulares, como macrófagos e células musculares lisas, na túnica íntima das artérias de médio e grande calibre. Esse acúmulo leva à formação de placas ateroscleróticas e a diminuição gradual do lúmen dos vasos (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). Habitualmente as lesões ateroscleróticas são

observáveis na aorta a partir da primeira década de vida, nas artérias coronárias na segunda década, e nas artérias cerebrais na terceira ou quarta década de vida (GRUNDY et al., 2014). O processo aterosclerótico pode ser completamente insidioso durante décadas até que o depósito se rompe por forças físicas do fluxo sanguíneo, expondo os componentes da parede arterial à corrente sanguínea, resultando em eventos trombóticos e no comprometimento do suprimento de oxigênio para os órgãos alvos com o coração e o cérebro (GRUNDY et al., 2014; LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011).

Diversos estudos epidemiológicos, como o Estudo do Coração de Framingham (KANNEL et al., 1961), forneceram valiosas informações acerca dos fatores de risco potencialmente envolvidos com o surgimento e a progressão da aterosclerose. Entre esses fatores, o grande destaque é para as dislipidemias, por exemplo, altos níveis sanguíneos de LDL constituem um fator de risco independente para o desenvolvimento da aterosclerose (GRUNDY et al., 2014; LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Além disso, uma baixa concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma sanguíneo também constitui um fator de risco independente para desordens coronarianas (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011) e a elevação de apenas 1% nos níveis dessa lipoproteína pode reduzir em até 3% o risco de desenvolvimento de aterosclerose (RUBINS et al., 1999). Os níveis séricos de triglicerídeos também estão relacionados com as DCV, pois quanto mais altos os níveis de triglicerídeos maior será o predomínio das partículas pequenas de LDL (HIRAYAMA, MIIDA, 2012). É importante ressaltar que existem dois tipos de LDL. Uma LDL é pequena e altamente aterogênica (contribui para a formação do ateroma) e a outra é grande e menos aterogênica. A LDL pequena penetra mais facilmente na parede da artéria e também se oxida mais facilmente, o que contribui para a formação da placa aterosclerótica (HIRAYAMA, MIIDA, 2012). Adicionalmente, a hipertensão arterial sistêmica, o tabagismo, a idade avançada e o diabetes mellitus também contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose (GRUNDY et al., 2014). A história familiar de DCV em homens com idade inferior a 55 anos e mulheres com 65 anos, sedentarismo, estresse, depressão, dieta inadequada (alta ingestão de açúcar, colesterol, gorduras saturadas e excesso de calorias) e obesidade também estão associados a um maior risco de aterosclerose e suas complicações (SBC, 2013b).

### **1.1.2 Patogênese da Aterosclerose**

Ainda hoje, a causa exata para o desenvolvimento dessa patologia é desconhecida e por isso admite-se que a aterosclerose é uma doença multifatorial crônica, envolvendo: a

disfunção do endotélio arterial, surgimento de eventos oxidativos e resposta inflamatória. Os eventos oxidativos e inflamatórios intermediarão a relação entre os fatores de risco e a formação da placa aterosclerótica (LIBBY et al., 2010; RADOMSKA-LEŚNIEWSKA et al., 2016; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015). Assim, estudos patológicos em conjunto com estudos *in vitro* e *in vivo* permitiram estabelecer uma sequência de eventos celulares que conduzem à formação das lesões.

#### 1.1.2.1 Disfunção endotelial

A integridade funcional do endotélio é um elemento fundamental na preservação da saúde vascular. Muitos estudos têm demonstrado que a disfunção endotelial não é apenas um iniciador, mas pode também ser um fator importante na progressão da doença cardiovascular aterosclerótica (PARK; PARK, 2015).

O endotélio, constituído por uma monocamada de células endoteliais, além de funcionar como uma barreira seletiva permeável entre o sangue e os tecidos, também desempenha um papel crucial na manutenção do tônus vascular (KASPRZAK; KŁOSIŃSKA; DROZDZ, 2006). A vasodilatação é mediada por vários fatores, mas principalmente pelo óxido nítrico ( $\text{NO}$ ). O  $\text{NO}$  mantém a homeostase da parede vascular pela sua capacidade em inibir a agregação plaquetária, processo inflamatório, estresse oxidativo, migração e proliferação de células musculares lisas além de controlar a adesão de leucócitos às células endoteliais (MONCADA; HIGGS, 2006; TOUSOULIS et al., 2014). A síntese de  $\text{NO}$  no endotélio se dá pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3), forma constitutiva e ativa, que gera  $\text{NO}$  em resposta a estímulos fisiológicos ou algum estressor e pela forma induzível NOS2 (iNOS) estimulada pela resposta inflamatória (MONCADA; HIGGS, 2006).

A disfunção endotelial é resultante de quebra da homeostase vascular, caracterizada pelo aumento do estresse oxidativo e diminuição da biodisponibilidade do  $\text{NO}$ , resultando em comprometimento do tônus vascular e da função cardiovascular (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). Vários fatores têm sido implicados nesse processo, como o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) causado pela hipertensão, diabetes e tabagismo, concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína, infecções (como o vírus da herpes e *Chlamydia pneumoniae*) e o fluxo sanguíneo turbulento e oscilatório. No entanto, os níveis de LDL circulantes são um fator de destaque, pois níveis elevados de LDL é o único fator capaz de, por si só, induzir a aterosclerose em modelos animais (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011;



SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015). O aumento da permeabilidade do endotélio facilita o acúmulo de LDL na matriz subendotelial, que neste local estarão sujeitas a modificações, incluindo formação de complexos insolúveis por interação com células vasculares e macromoléculas (proteoglicanos, colágeno e elastina) e modificação oxidativa (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016; STEINBERG et al., 1989).

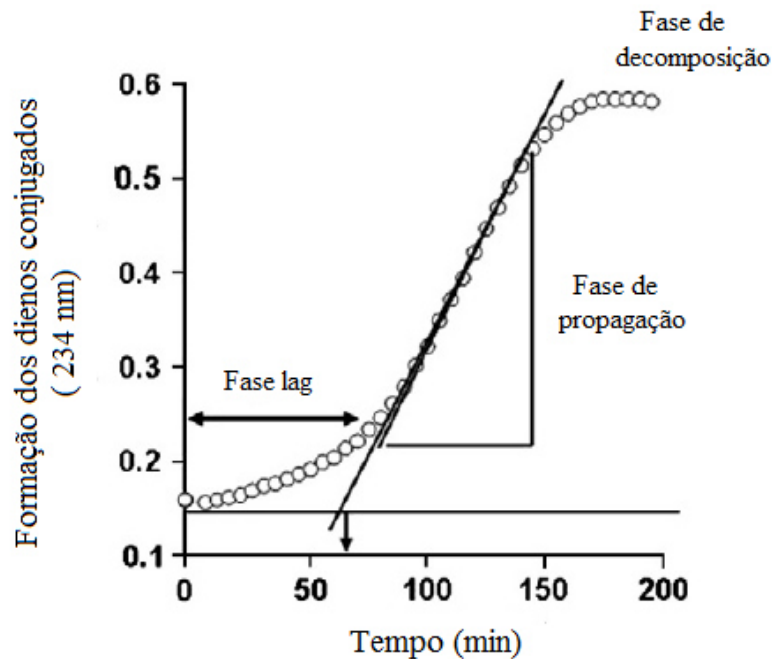
#### 1.1.2.2 Oxidação da LDL

A hipótese da modificação oxidativa da LDL, proposta há mais de 25 anos por Steinberg et al. (1989), propõe que processos oxidativos promovem modificações na LDL, dando origem a LDL oxidada (LDL<sub>ox</sub>), que desempenharia um papel fundamental no processo aterogênico, sendo que essa hipótese constitui a base para as discussões atuais sobre a patogênese da aterosclerose (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011; SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016).

Uma vez no espaço subendotelial, a LDL pode ser oxidada por substâncias secretadas pelas células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos. Tal processo de oxidação parece ser mediado por espécies reativas e catalisado por metais de transição como ferro e cobre (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). Os mecanismos das modificações das lipoproteínas *in vivo* ainda não estão completamente esclarecidos, todavia, os estudos *in vitro* utilizando LDL isolada e metais de transição fornecem evidências que auxiliam no entendimento desse evento. Inicialmente a LDL contém a apo B-100 como polipeptídeo intacto, nenhum peróxido lipídico ou aldeído e é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e antioxidantes. O início da oxidação lipídica começa lentamente e durante a chamada fase lag (Figura 1), os antioxidantes presentes na partícula de LDL são consumidos e a peroxidação lipídica observada é mínima. Já na fase de propagação, a peroxidação dos lipídeos é o principal alvo dos radicais livres, particularmente, fosfolipídeos e ésteres de colesterol, os quais contêm PUFAs (Figura 2). Um dos produtos da oxidação dos ácidos graxos são os dienos conjugados, que reagem muito rapidamente com o oxigênio molecular iniciando uma reação auto-catalítica que leva a formação de hidroperóxidos (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016). Finalmente, durante a fase de decomposição os hidroperóxidos lipídicos já formados podem dar origem a fragmentos de cadeia curta com 3 a 9 carbonos, incluindo aldeídos (malondialdeído e 4-hidroxinonanal) e cetonas, que ampliam o processo oxidativo ao conjugar-se com outros lipídeos ou proteínas (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; NEGRE-SALVAYRE

et al., 2008). Ainda, durante a oxidação da LDL ocorre a geração de uma variedade de oxisteróis, provenientes tanto da oxidação do colesterol livre como dos ésteres de colesterol (POLI et al., 2009).

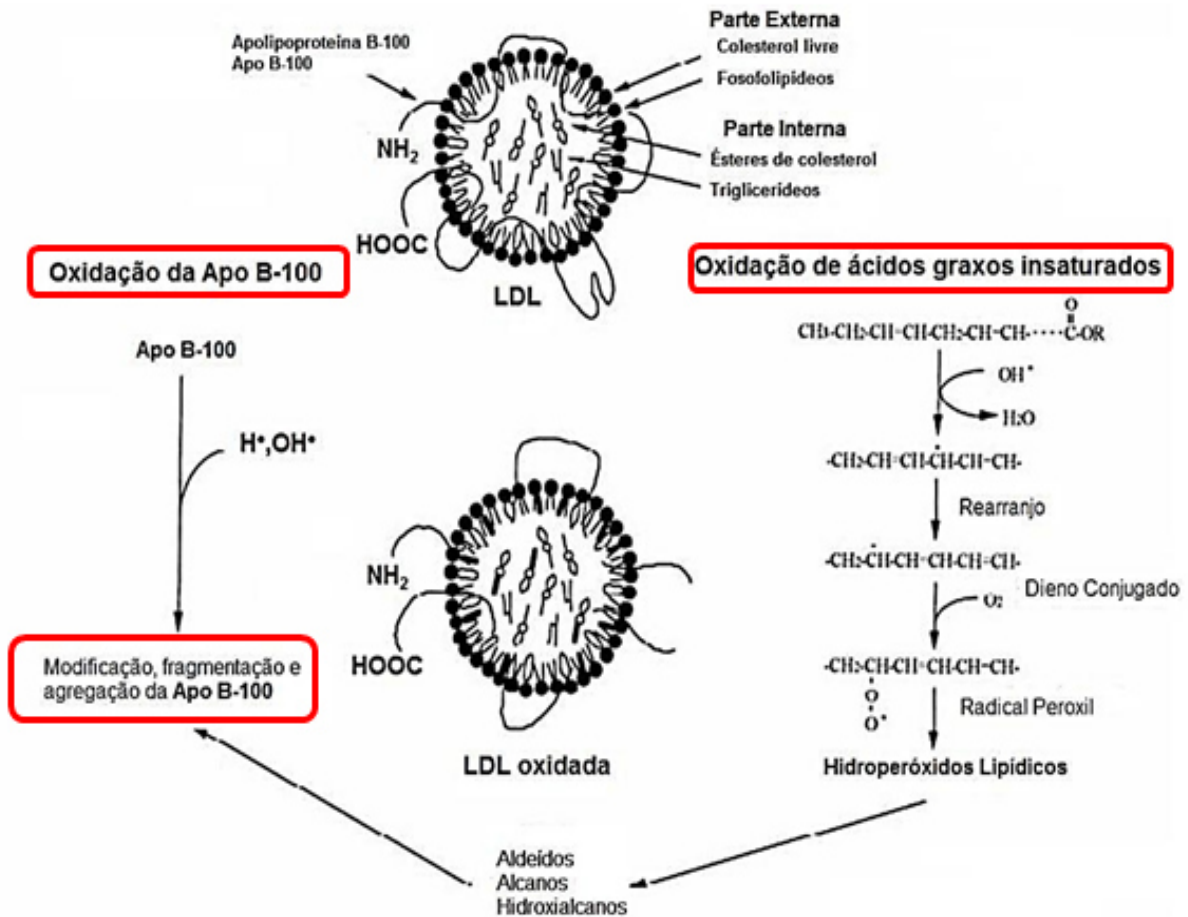
Figura 1 – Cinética de oxidação da LDL



Fonte: Adaptado de Yoshida and Kisugi (2010).

Adicionalmente à oxidação lipídica, a apo B-100, a principal apolipoproteína presente na LDL, fragmenta-se por cisão oxidativa. Os produtos formados na lipoperoxidação reagem com resíduos de lisina da apo B-100, formando bases de Schiff (NEGRE-SALVAYRE et al., 2008; YAMAGUCHI; KUNITOMO; HAGINAKA, 2002). As alterações conformacionais causadas pela perda da estrutura secundária ou alterações de carga elétrica, resultam em uma proteína com carga negativa aumentada, que por sua vez aumenta o reconhecimento da apo B-100 pelos receptores *scavenger* dos macrófagos (STEINBERG; WITZTUM, 2010). Como consequência da propagação desses processos, ocorre um acúmulo de subprodutos tóxicos no tecido aórtico, tais como os aldeídos malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HABERLAND; FONG; CHENG, 1988; JÜRGENS et al., 1993).

Figura 2 – Dano oxidativo à LDL



Fonte: Adaptado de Yamaguchi et al. (2002). Legenda: LDL – lipoproteína de baixa densidade; Apo B-100 – apolipoproteína B-100.

A oxidação de LDL é um processo progressivo, que converte, primeiramente, a LDL nativa em LDL minimamente oxidada (LDLmox) com baixo teor de peróxidos e pequenas modificações na apo B-100. Nesta etapa, o colesterol ainda é o esterol predominante, a apo B-100 ainda liga aos receptores de LDL e a incubação com macrófagos não resulta na formação de células espumosas. Posteriormente, a LDL passará para o estágio de LDL levemente oxidada, com teor de peróxido moderado e alguma modificação na apo B-100. O processo de oxidação prossegue até a LDL estar completamente oxidada (LDLox), contendo alto teor de peróxido, com a maioria dos PUFA oxidados, e a apo B-100 fragmentada, com conformação alterada devido as modificações promovidas pelos aldeídos formados no processo de oxidação lipídica (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016).

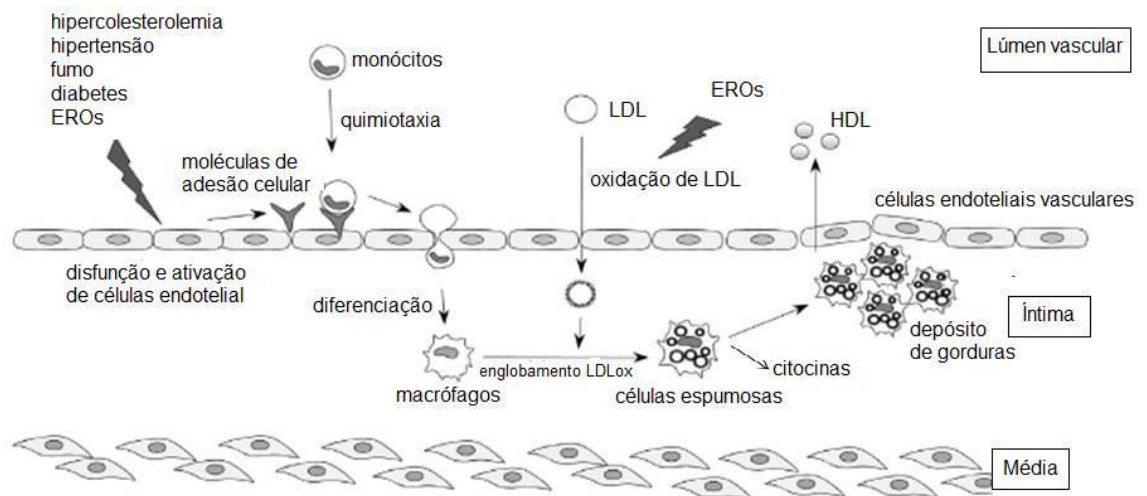
### 1.1.2.3 Inflamação

Atualmente, está estabelecido que a aterosclerose não é uma simples e inevitável consequência degenerativa do envelhecimento, mas uma condição inflamatória, que pode ser convertida em um evento clínico ocasionado pela ruptura da placa e formação de trombos (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Sabe-se que os mediadores inflamatórios possuem função importante na patogênese da aterosclerose e que citocinas, fatores de crescimento e células inflamatórias são encontradas em abundância nas placas de ateroma (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

Mediante qualquer um dos fatores de risco já referidos anteriormente, o endotélio sofre uma disfunção, possibilitando a infiltração de LDL para o espaço subendotelial, onde esta sofre oxidação e libera fosfolipídios bioativos que podem ativar as células endoteliais e desencadear uma resposta inflamatória (LIBBY et al., 2010; SKALÉN et al., 2002). Assim, as células endoteliais ativadas permitem a entrada de monócitos e linfócitos para o espaço subendotelial através das moléculas de adesão (Figura 3). Com destaque para a molécula de adesão vascular (VCAM-1), a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), a P e E-selectina (LIBBY et al., 2010; WONG et al., 2012). Acredita-se que a secreção dessas moléculas de adesão é regulada por citocinas pró-inflamatórias sintetizadas em pequenas concentrações pelo endotélio arterial, dentre as quais salientam-se a interleucina (IL) -1 $\beta$ , a IL-4, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TFN- $\alpha$ ) e o interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (TEDGUI, 2006). Na disfunção endotelial, eleva-se a concentração destas citocinas, estimulando a produção de moléculas de adesão, o que favorece o recrutamento e adesão de monócitos à superfície endotelial. Adicionalmente, as plaquetas também se aderem às células endoteliais ativadas. A inibição da adesão plaquetária reduz a infiltração de leucócitos e a aterosclerose em camundongos hipercolesterolêmicos (MASSBERG et al., 2002).

A migração dos monócitos para o espaço subendotelial e sua subsequente maturação em macrófagos ocorrem pela expressão de moléculas quimiotáticas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), o fator estimulante de colônia de monócitos (M-CSF) e a IL-8 nas células que constituem a parede arterial, principalmente as células endoteliais (GERSZTEN et al., 1999; HANSSON, 2002). A diferenciação em macrófagos é uma etapa fundamental no desenvolvimento da aterosclerose e está associada à regulação positiva dos receptores *scavenger* (HANSSON, 2002).

Figura 3 - Estágio inicial da aterosclerose.



Fonte: Adaptado de Mimura and Itoh (2015). Vários estressores induzem disfunção endotelial e aumentam a expressão de moléculas de adesão celulares que recrutam monócitos para a íntima. Os monócitos se diferenciam em macrófagos e englobam LDLox formando células espumosas que passam a secretar citocinas inflamatórias. Legenda: LDL – lipoproteína de baixa densidade; HDL – lipoproteína de alta densidade; EROs – espécies reativas de oxigênio; LDLox – LDL oxidada.

As síndromes coronarianas agudas são acompanhadas de valores aumentados de marcadores inflamatórios como proteína C reativa ultrasensível (PCR) e IL-6, que se correlacionam de maneira direta com prognóstico adverso ligado a maior lesão isquêmica e/ou instabilidade da placa ateromatosa (PAFFEN; DEMAAT, 2006). Indivíduos aparentemente saudáveis também podem exibir valores aumentados de certos marcadores inflamatórios, porém esse aumento pode representar valor preditivo para eventos cardiovasculares futuros. Estudos epidemiológicos prospectivos indicaram risco cardiovascular aumentado associado a níveis basais elevados de citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$  e moléculas de adesão celular como ICAM-1, selectina P e selectina E e ainda, proteínas de fase aguda como PCR, fibrinogênio e proteína amilóide sérica A (HANSSON, 2002, 2014).

#### 1.1.2.4 Estrias gordurosas

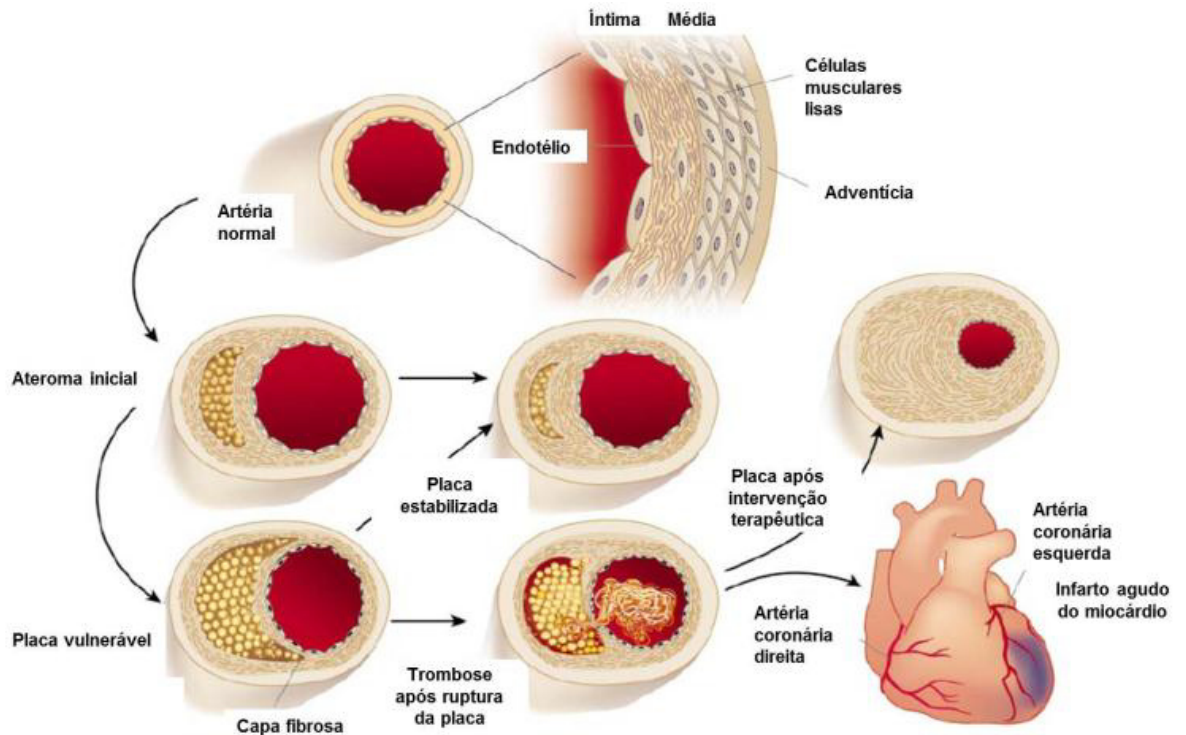
A evolução dos macrófagos para células contendo elevada quantidade de ésteres de colesterol, armazenados na forma de gotículas lipídicas, designadas células espumosas, é um evento característico das lesões precoces (reversíveis), mas também ocorre nas lesões tardias (irreversíveis) da aterosclerose. A deposição de colesterol nos macrófagos é essencialmente mediada pela captação da LDLox por receptores denominados *scavenger*, que reconhecem

uma grande variedade de ligantes e cujo número aumenta na presença de M-CSF (KZHYSHKOWSKA; NEYEN; GORDON, 2012). Dentre os receptores *scavenger* envolvidos no processo aterogênico, os receptores do tipo SR-AI/SR-AII, CD36, SR-B1 e LOX-1 têm sido foco de muitos estudos (ASHRAF; GUPTA, 2011; MOORE; FREEMAN, 2006). Esses receptores, ao contrário dos receptores para LDL nativa (apo B/E), que não reconhecem a LDLox, não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol. Desta forma, ocorre a captação de grandes quantidades de LDLox pelos macrófagos e, conseqüentemente, a sua transformação em células espumosas, pois a LDL captada é citotóxica e leva a morte celular por apoptose (STEINBERG; WITZTUM, 2010). Um conjunto de células espumosas forma as estrias gordurosas, lesões fisiopatológicas primárias da aterosclerose (Figura 4).

#### *1.1.2.5 Lesões avançadas e ruptura da placa*

A transição das estrias gordurosas para lesões fibrosas mais complexas, caracteriza-se pela migração das células musculares lisas da camada média da parede arterial para o espaço subendotelial, seguida da sua proliferação e produção de matriz extracelular rica em colágeno, que resultará em uma capa fibrosa (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). Sob a capa fibrosa, encontra-se um centro necrótico constituído por lipídeos e fragmentos celulares. Esse núcleo, assim como as áreas circundantes, é rico em macrófagos que secretam enzimas proteolíticas, principalmente metaloproteinases, que podem degradar a matriz extracelular da capa fibrosa levando a ruptura dessa placa. O sangue circulante, que contém o fator tecidual pró-coagulante, entrará em contato com o conteúdo da placa levando à formação de um trombo sobrejacente. O trombo pode obstruir parcial ou totalmente o vaso sanguíneo e é a principal causa dos eventos clínicos coronários agudos, como o infarto agudo do miocárdio (IAM) (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Esses eventos estão ilustrados na Figura 4.

Figura 4 - Progressão do ateroma.



Fonte: Adaptado de Libby (2002). No ateroma inicial, o recrutamento de células inflamatórias e o acúmulo de lipídeos promovem uma expansão da parede arterial em direção ao lúmen do vaso. Se as condições inflamatórias e os fatores de risco, tais como a dislipidemia, persistirem, o núcleo lipídico aumenta e a capa fibrosa torna-se menos espessa, formando uma lesão vulnerável e susceptível à ruptura. Quando esta ruptura acontece, o sangue entra em contato com o conteúdo da lesão promovendo a formação de um trombo, que pode por sua vez obstruir o vaso de maneira persistente e resultar em IAM.

### 1.1.3 Modelos experimentais para o estudo da aterosclerose

Diferentes espécies animais têm sido utilizadas como modelos de hipercolesterolemia e aterosclerose, entre elas destacam-se camundongos com deleções gênicas e coelhos. Os camundongos com deleção gênica da apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>) ou do receptor de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) são amplamente empregados pois desenvolvem lesões ateroscleróticas mesmo quando submetidos a uma dieta padrão (DAUGHERTY, 2002; GETZ; REARDON, 2012; ISHIBASHI et al., 1993; KOWALA et al., 2000), fornecendo uma ferramenta prática para o estudo da hipercolesterolemia e aterosclerose e suas consequências. O modelo utilizando camundongos LDLr<sup>-/-</sup> é mais utilizado em comparação com apoE<sup>-/-</sup>, uma vez que desenvolve grau de dislipidemia intermediário e lesões menos avançadas do que os camundongos apoE<sup>-/-</sup> (GETZ; REARDON, 2012; ZADELAAR et al., 2007).

Coelhos da raça Nova Zelândia não desenvolvem aterosclerose espontaneamente, no entanto são bastante utilizados como modelos dessa doença por serem muito responsivos à

ingestão de colesterol e desenvolverem lesões em curto prazo, sendo utilizados classicamente como modelo experimental para a aterosclerose (AUGUSTI et al., 2009; CHEN et al., 2013; PRASAD, 2008). Este modelo foi proposto por Anitschkow, que demonstrou que a administração de colesterol era capaz de induzir alterações ateroscleróticas na túnica íntima de coelhos da raça Nova Zelândia e que estas alterações eram muito semelhantes à aterosclerose humana (FINKING; HANKE, 1997). Anitschkow observou a formação tanto de lesões iniciais (estrias gordurosas) quanto de lesões avançadas (placas de ateroma) por meio da adição de diferentes doses de colesterol na dieta dos coelhos e descobriu que a quantidade de colesterol absorvido era diretamente proporcional ao grau de formação da aterosclerose. Assim, coelhos que recebem 0,5% de colesterol na dieta, durante 9 semanas, têm predomínio de macrófagos nas lesões localizadas na íntima arterial e essas lesões são comparáveis às lesões humanas iniciais. Já coelhos que recebem doses de colesterol maiores que 0,5% na dieta, durante o mesmo período experimental, apresentam semelhança com a placa aterosclerótica humana avançada, pois apresentam características mais fibromusculares (BOCAN et al., 1993). Dessa forma, os coelhos Nova Zelândia alimentados com colesterol podem ser usados para investigar os aspectos fisiopatológicos que contribuem para a aterosclerose humana, como as lipoproteínas, o diabetes, os fatores de crescimento, as moléculas de adesão, a função endotelial, os receptores, as plaquetas, entre outros (FINKING; HANKE, 1997).

#### **1.1.4 Estresse oxidativo e aterosclerose**

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são naturalmente produzidos por reações enzimáticas nas células. Esses radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo. Um radical pode ser formado pela perda ou ganho de um elétron de um não radical, mediante fissão homolítica de uma ligação covalente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Espécies reativas é um termo coletivo utilizado para designar espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, respectivamente. São espécies químicas altamente reativas, geralmente com propriedades oxidantes. No entanto, algumas espécies reativas podem não apresentar necessariamente elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Em condições fisiológicas normais ERO/ERN são produzidas em níveis baixos e são necessárias para a manutenção de funções celulares como a produção de



energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas. As ERO/ERN mais relevantes originadas nos sistemas biológicos incluem: o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $\bullet OH$ ),  $\bullet NO$ , peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Numerosas evidências têm demonstrado que a formação aumentada de ERO e ERN e/ou depleção dos sistemas antioxidantes, que gera um estado conhecido como estresse oxidativo, contribui para o início e a progressão do processo aterosclerótico (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016; SITI; KAMISAH; KAMSIHAH, 2015). Todas as células envolvidas no processo aterogênico produzem ERO e ERN, por meio de diversos sistemas enzimáticos e não-enzimáticos, tais como a xantina oxidase, NADPH oxidase (NOX), citocromo P450, fontes mitocondriais (cadeia transportadora de elétrons) e as NOS (RADOMSKA-LEŚNIEWSKA et al., 2016). Na mitocôndria, os complexos I e III da cadeia respiratória são as principais fontes produtoras de  $O_2^{\bullet-}$  (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014).

Os macrófagos e neutrófilos quando ativados (*burst oxidativo*) produzem uma grande quantidade de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  e seus radicais derivados, principalmente, pela atividade da NOX. Essa enzima, por meio de reações combinadas com a mieloperoxidase, produz  $HOCl$ , que é um oxidante fisiológico altamente potente (KARDEH; ASHKANI-ESFAHANI; ALIZADEH, 2014). Já as células endoteliais produzem espécies reativas através da NOX e da xantina oxidase, que são as principais fontes de  $O_2^{\bullet-}$  no ambiente vascular, e a NOS, a qual produz  $\bullet NO$ . Embora o  $\bullet NO$  seja uma molécula antiaterogênica devido aos seus efeitos benéficos no endotélio vascular, ele pode reagir rapidamente com  $O_2^{\bullet-}$ , levando a formação do  $ONOO^-$ , um potente agente nitrante e oxidante (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014). Com a formação de  $ONOO^-$ , não apenas os benefícios das ações protetoras mediadas pelo  $\bullet NO$  são perdidas, mas muitas biomoléculas são oxidadas e/ou nitradas pelo  $ONOO^-$  ou seus produtos, incluindo proteínas, tióis de baixo peso molecular, lipídeos, DNA e cofatores enzimáticos (SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007). O envolvimento do  $ONOO^-$  na aterosclerose tem sido sugerido pela identificação de 3-nitrotirosina em lesões ateroscleróticas (SUCU et al., 2003).

É importante mencionar que as mitocôndrias representam o sítio primário de formação, reação e efeitos nocivos do  $ONOO^-$  (RADI et al., 2001), uma vez que essas organelas são as principais fontes celulares de  $O_2^{\bullet-}$  (HILL et al., 2012). A oxidação e nitração de biomoléculas mitocondriais pelo  $ONOO^-$  pode levar a disfunção dessa organela caracterizada por uma inibição da respiração celular, um declínio acentuado na concentração

de ATP, e por fim morte celular apoptótica, uma vez que este agente nitrante afeta irreversivelmente a atividade dos complexos da cadeia respiratória (principalmente complexos I e III) e ATPase (BOCZKOWSKI et al., 2001; SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007). Uma alteração na bioenergética mitocondrial e homeostase do cálcio induz ainda uma geração adicional de  $O_2^{\cdot-}$ , resultando numa amplificação do processo nitrooxidativo (CASSINA et al., 2000).

Além da inativação do  $\cdot NO$ , a produção aumentada de espécies reativas em situações de estresse oxidativo, pode induzir outros eventos celulares tóxicos, como a ativação de monócitos, modificações oxidativas do DNA e proteínas, oxidação de lipídeos, apoptose de células vasculares e macrófagos, e aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, tais como receptores para LDLox e moduladores da resposta inflamatória e antioxidante, moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, reguladores do ciclo celular e metaloproteínas de matriz (REZZANI et al., 2008; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

A modificação biológica mais relevante da partícula de LDL é causada por reações de oxidação, das quais participam espécies reativas como o  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e  $ONOO^-$ . A oxidação da LDL, mediada por ERO/ERN envolve a peroxidação de ácidos graxos e modificação covalente da apo B-100 por produtos da peroxidação lipídica (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016). Admite-se que a liberação do  $O_2^{\cdot-}$  e  $\cdot OH$  pelas células endoteliais e musculares lisas, no processo de formação de endoperóxidos cíclicos e prostaglandinas, pela via da ciclooxigenase, pode ser responsável pelo início da oxidação em algumas condições, enquanto a atividade aumentada da lipoxigenase em macrófagos poderia aumentar os hidroperóxidos lipídicos (MORROW, 2005; RADOMSKA-LEŚNIEWSKA et al., 2016). A LDLox, por sua vez, também pode induzir estresse oxidativo, através do aumento da produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelas células endoteliais e musculares lisas, o que intensifica a disfunção endotelial e vascular (GALLE et al., 2006).

A detoxificação de agentes oxidativos e nitrosativos é, portanto, fundamental para proteção contra os seus efeitos citotóxicos nas células e por este motivo as células possuem sistemas de defesa antioxidantes, tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona transferase (GST), catalase (CAT) e as enzimas que sintetizam glutaciona reduzida (GSH), além de outras (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016). Sendo que as peroxiredoxinas (PRx), são o principal mecanismo antioxidante endógeno na detoxificação do  $ONOO^-$  (FERRER-SUETA; RADI, 2009). Distúrbios nestes sistemas de defesa podem levar ao acúmulo de ERO/ERN e acelerar o desenvolvimento da aterosclerose (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015). Por outro lado, a

expressão e a atividade aumentada de enzimas, como a GPx, SOD e a CAT, pode retardar o aparecimento de lesões em modelos animais de aterosclerose (YANG et al., 2009; ZRELLI et al., 2011). Além das enzimas antioxidantes citadas, Hagg et al. (2006) e World et al. (2006) sugerem a participação da enzima antioxidante tioredoxina redutase (TrxR) nas defesas antioxidantes durante a aterosclerose. De acordo com esses autores, a LDLox induz a ativação do sistema tioredoxina em macrófagos humanos, enquanto um aumento na expressão da proteína tioredoxina foi observado em placas ateroscleróticas (HÄGG et al., 2006; WORLD; YAMAWAKI; BERK, 2006) e coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentaram aumento da atividade da TrxR no tecido aórtico (AUGUSTI et al., 2009) e no sangue (AUGUSTI et al., 2012).

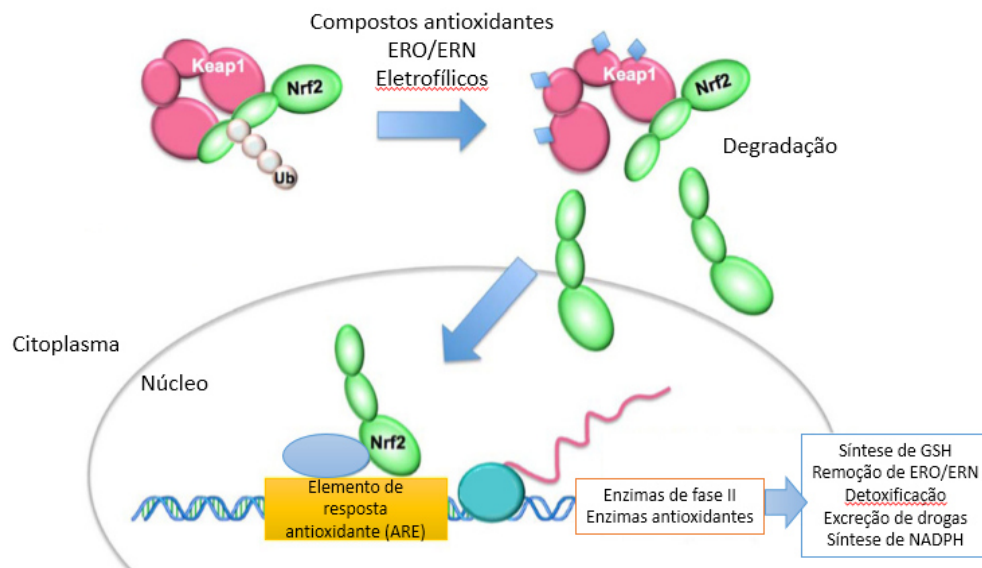
Adicionalmente à ação das enzimas antioxidantes, a enzima paraoxonase (PON1) também contribui para a defesa antioxidante e proteção contra doenças coronarianas (GARELNABI; LITVINOV; MAHINI, 2012). A PON1 encontra-se associada à estrutura da HDL, exercendo propriedades antioxidantes e protegendo a LDL dos danos oxidativos, uma vez que esta enzima tem a capacidade de hidrolisar hidroperóxidos lipídicos (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001). Essa capacidade tem sido associada à atividade de esterase, peroxidase e fosfolipase, que permite a PON1 inibir a formação de lipídios oxidados ou degradá-los se houver sua formação. Assim, a PON1 modula a oxidação lipídica tanto na HDL quanto na LDL (MACKNESS; MACKNESS, 2012). Contudo, fatores pró-oxidantes como a disfunção endotelial, hiperglicemia e hipercolesterolemia, podem reduzir a atividade desta enzima. A relação inversa entre a atividade da PON1 sérica e o risco de doenças ateroscleróticas sugere que a atividade hidrolítica desta enzima em relação à oxidação da LDL pode responder pelo seu efeito antiaterogênico (GARELNABI; LITVINOV; MAHINI, 2012).

Os antioxidantes não enzimáticos como os compostos endógenos GSH, ácido úrico, ubiquinona e bilirrubina colaboram para manter a homeostase redox celular (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012). Em células endoteliais e macrófagos, a GSH e as enzimas relacionadas, como a GPx, constituem um importante sistema de defesa antioxidante e alterações neste sistema podem acelerar o processo aterogênico (BLANKENBERG et al., 2003; MIMURA; ITOH, 2015).

Adicionalmente, antioxidantes exógenos como as vitaminas A, E e C também colaboram para manter a homeostase redox celular (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012). Estudos *in vitro* e em modelos animais de aterosclerose demonstraram que o consumo de alimentos ou extratos contendo vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno e polifenóis resulta em

uma redução do estresse oxidativo e dos biomarcadores de DCV, mediante a prevenção da oxidação da LDL, da disfunção endotelial e a regulação de fatores de transcrição e genes envolvidos no processo aterosclerótico (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006; SITI; KAMISAH; KAMSAH, 2015), sugerindo que a modulação do estresse oxidativo pode resultar em uma melhora no quadro das DCV. Essas ações benéficas sobre a saúde provenientes do consumo de compostos antioxidantes estão relacionadas a sua capacidade de modular vias de sinalização da resposta antioxidante (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012). Um dos principais mecanismos de regulação da resposta antioxidante é a via do fator de transcrição nuclear eritróide-2 (Nrf2), que regula a expressão de diversos de genes que aumentam a capacidade antioxidante celular (TEBAY et al., 2015). Em condições basais, o Nrf2 citosólico está fortemente ligado à proteína Keap1, sendo que a oxidação ou fosforilação da Keap1 acarreta na dissociação do Nrf2, que se transloca para o núcleo. No núcleo, o Nrf2 liga-se ao sítio promotor ARE (elementos de resposta antioxidante) e regula a expressão de diversas enzimas antioxidantes (Figura 5) (MIMURA; ITOH, 2015)

Figura 5 – Ativação do fator nuclear Nrf2.



Fonte: Adaptado de Mitsuishi et al (2012). Compostos antioxidantes, ERO e ERN e compostos eletrolíticos podem promover a degradação do Keap 1, por oxidação ou fosforilação, liberando o Nrf2 no citoplasma. Uma vez livre, o Nrf2 transloca para o núcleo onde se liga a uma região do DNA conhecida como Elemento de Resposta Antioxidante (ARE). Essa ligação leva ao aumento da expressão gênica de enzimas de fase II e de enzimas antioxidantes, que irá resultar no aumento da detoxificação de xenobióticos e melhora na resposta antioxidante celular. Legenda: Nrf2 – fator nuclear eritróide-2; ERO – espécies reativas de oxigênio; ERN – espécies reativas de nitrogênio; GSH – glutationa reduzida; NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

### 1.1.5 Tratamento da aterosclerose

Uma das indicações para o tratamento das DCV é a redução dos fatores de risco, com ênfase na redução do colesterol total sérico. A preferência pelo consumo de alimentos ricos em fibra, antioxidantes e ácidos graxos insaturados, em detrimento daqueles com alto teor de gorduras, além do aumento da atividade física colaboram para a redução dos níveis plasmáticos de colesterol (SBC, 2013b). De acordo com a última diretriz publicada pela SBC, a recomendação, para adultos maiores de 20 anos, é que os níveis séricos de colesterol total não devem ser maiores que 200 mg/dL, os níveis de triglicérides devem ser menores que 50 mg/dL, os níveis de LDL devem ficar abaixo de 100 mg/dL e os níveis ideais de HDL devem ser superiores a 60 mg/dL. Essa diretriz propõe metas lipídicas mais rígidas com base em evidências de que reduções de cerca de 40 mg/dL nos níveis de LDL são acompanhados de taxas de eventos cardiovasculares 20% menores, e reduções entre 80 a 120 mg/dL podem reduzir os eventos cardiovasculares na ordem de 40 a 50%. As mudanças no estilo de vida e na alimentação são a primeira linha de defesa contra o colesterol elevado. A redução do peso, e menor ingestão de gordura saturada e gordura trans desempenham um papel importante neste contexto. Como também, a ingestão de fibras solúveis e fitoesteróis que são aliados na redução do colesterol alto. A Organização Mundial da Saúde estima que  $\frac{3}{4}$  das mortes por DCV podem ser reduzidos através de mudanças no estilo de vida (WHO, 2013). Os hipolipemiantes devem ser empregados sempre que não houver efeito satisfatório das mudanças de estilo de vida ou impossibilidade de aguardar os efeitos do tratamento não medicamentoso por prioridade clínica. A escolha da classe terapêutica está condicionada ao tipo de dislipidemia presente. Assim, dentre os tratamentos farmacológicos propostos para a aterosclerose, os que apresentam maiores evidências de benefícios são as estatinas para o tratamento da hipercolesterolemia e os fibratos para o tratamento da hipertrigliceridemia (SBC, 2013a).

As estatinas são substâncias capazes de diminuir a síntese intracelular do colesterol por competirem com a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA) havendo, portanto, inibição apenas parcial da síntese de colesterol, preservando o colesterol para mecanismos essenciais à vida humana como a preservação da membrana celular, síntese hormonal e da vitamina D. Para compensar a redução nos níveis intracelulares de colesterol causada pelas estatinas, ocorre um aumento no número de receptores de LDL nos hepatócitos que então removem mais lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e LDL da circulação para repor o colesterol intracelular

aumentando, assim, o clearance plasmático do LDL (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). A redução nos níveis séricos de LDL pode variar de 25% a 55%, de acordo com a droga utilizada. Também pode haver efeito sobre os níveis de triglicerídeos, que diminuem em média 15 a 25%, e de HDL, que podem sofrer uma elevação de cerca de 10% (SBC, 2013a).

Os fibratos são derivados do ácido fíbrico e têm ação estimulante nos receptores dos peroxissomos do tipo  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), que são fatores de transcrição nuclear (FRANCIS, 2003; STAELS et al., 1998). Quando os receptores PPAR- $\alpha$  são ativados pelos fibratos, ocorre um aumento na expressão do gene que sintetiza a lipase lipoprotéica e diminui a expressão da apo CIII, o que potencializa o catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Os fibratos aumentam a expressão das apo AI e AII, elevando os níveis de HDL. Aumentam a excreção do colesterol hepático pelas vias biliares e a afinidade da LDL pelos receptores B/E (STAELS et al., 1998). Os fibratos além de reduzirem a lipemia pós-prandial, diminuem os níveis de triglicerídeos de 30 a 60%, aumentam HDL de 7 a 11% e a ação sobre o LDL é variável, podendo diminuí-lo, não modificá-lo ou até aumentá-lo (SBC, 2013a). O aumento dos níveis de LDL em pacientes com hipertrigliceridemia tratados com fibrato, em decorrência da redução de triglicerídeos das VLDL, forma LDL grandes, menos densas e menos aterogênicas, uma vez que as LDL com menor densidade têm uma maior afinidade para o receptor de LDL, demonstrando elevado potencial antiaterogênico quando comparada a redução de LDL e triglicerídios sozinhos (WINKLER et al., 2004).

A interrupção da terapia com estatinas, principalmente em pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico, oferece um risco considerável de deterioração cardiológica e neurológica precoces, com desfechos graves. A suspensão das estatinas induz uma elevada ativação das proteínas G, desencadeando a produção de ERO e a supressão na biodisponibilidade do  $\text{NO}$ , induzindo a um estado pró-oxidante, pró-inflamatório e pró-trombótico, com deterioração da função endotelial. Em resumo, a suspensão do tratamento com estatinas resulta em rápido retorno à disfunção endotelial inicial e à amplificação dos processos oxidativos e inflamatórios, aumentando os riscos da ocorrência de eventos vasculares (CUBEDDU; SEAMON, 2006; HEESCHEN et al., 2002), principalmente em pacientes idosos devido a baixa aderência ao tratamento (JACKEVICIUS, 2002). O uso das estatinas também está associado ao aumento assintomático das enzimas hepáticas e com mialgias, que podem evoluir para rabdomiólise, reforçando a necessidade de mais investigação, em especial com grupos de idosos, pacientes com co-morbidades graves usuários de altas doses e/ou de outras terapias farmacológicas concomitantes (KASHANI et al., 2006). Com relação aos fibratos, os efeitos colaterais

incluem intolerância gástrica, diarreia, litíase biliar, fraqueza muscular, mialgia, diminuição da libido, erupção cutânea, cefaleia e insônia e acometem cerca de 5 a 10% dos pacientes tratados com este tipo de fármaco. Também pode ocorrer elevação das enzimas hepáticas, creatinina fosfoquinase, creatinina e homocisteína (JACOBSON; ZIMMERMAN, 2006).

### 1.1.6 Antioxidantes no tratamento da aterosclerose

Diversas evidências de estudos *in vitro* e em modelos animais sustentam a validade da hipótese oxidativa da aterosclerose, isto é, que a modificação oxidativa da LDL é o principal evento para o início e a evolução das placas ateroscleróticas (STEINBERG; WITZTUM, 2010; STEINBERG et al., 1989) Um desdobramento dessa hipótese é que, compostos antioxidantes aumentariam a resistência da LDL ao processo oxidativo e, potencialmente, poderiam exercer efeitos benéficos contra o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016). Como consequência, esses compostos têm atraído considerável atenção como agentes preventivos e terapêuticos. O Quadro 1 sintetiza estudos *in vitro* e em modelos animais, que demonstram que o consumo de antioxidantes previne a progressão da aterosclerose.

Quadro 1 – Antioxidantes versus fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose

Compostos antioxidantes	Modelo experimental	Tempo de exposição (semanas)	Efeitos
$\alpha$ -Tocoferol e carotenoides (óleo de oliva)	<i>In vitro</i>	-	Prevenção da oxidação da LDL <sup>1</sup>
Fucoxantina			Prevenção da oxidação da LDL e geração de ERO/ERN e formação de células espumosas em macrófagos expostos à LDLox <sup>2</sup>
Polifenóis extraídos da cevada	Camundongos hiperlipidêmicos	6	Melhora do perfil lipídico e redução do índice aterogênico <sup>3</sup>
Astaxantina	Coelhos hiperlipidêmicos	8	Melhora do status oxidativo no tecido aórtico <sup>4</sup>
Quercetina		12	Redução da aterosclerose e de parâmetros inflamatórios <sup>5</sup>
Compostos fenólicos do óleo de palma		13	Redução das lesões ateroscleróticas e redução do estresse oxidativo <sup>6</sup>

Probucol	Coelhos hiperlipidêmicos	16	Redução de 56% nas lesões ateroscleróticas <sup>7</sup>
Extrato de <i>Marrubium alysson</i>		8	Redução da oxidação da LDL, estabilização da placa e redução da produção do O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> <sup>8</sup>
Licopeno		16	Redução da aterosclerose <sup>9</sup>
Norbixina		8	Melhora do status antioxidante, redução da oxidação da LDL e da placa aterosclerótica <sup>10</sup>
Resveratrol		12	Redução da aterosclerose <sup>11</sup>

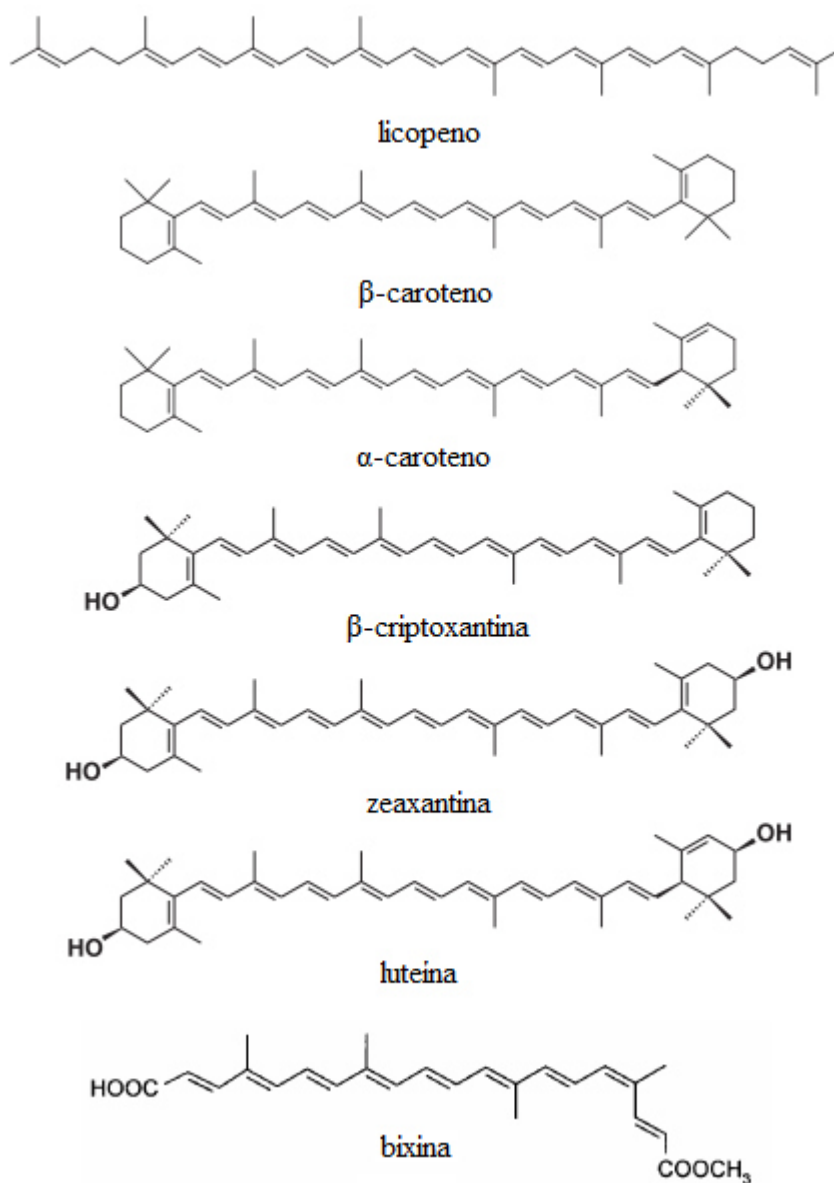
Fonte: <sup>1</sup> Andrikopoulos et al.(2002); <sup>2</sup> Silva LCS (2016); <sup>3</sup> Shen et al (2016); <sup>4</sup> Augusti et al (2009); <sup>5</sup> Bhaskar et al. (2013); <sup>6</sup> Che Idris et al. (2014); <sup>7</sup> Chen et al. (2013); <sup>8</sup> Essawy (2014); <sup>9</sup> Frederiksen et al. (2007); <sup>10</sup> Somacal S (2012); <sup>11</sup> Wang et al. (2005). Legenda: ERO – espécies reativas de oxigênio; ERN – espécies reativas de nitrogênio; LDL – lipoproteína de baixa densidade; LDLox – LDL oxidada; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânion radical superóxido.

#### 1.1.6.1 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais, sintetizados por plantas e micro-organismos, e possuem extenso sistema de duplas ligações conjugadas, geralmente contendo 40 átomos de carbono (BOHN, 2008). Quimicamente os carotenoides se dividem em dois grupos: os carotenos, que são carotenoides hidrocarbonados e com características apolares e as xantofilas, que são carotenoides oxigenados e que apresentam comportamento polar (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Algumas das principais fontes de carotenoides são cenouras e abóboras ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno), tomates e seus produtos derivados, como extrato, polpa e molhos (licopeno), espinafre (luteína) e laranja ( $\beta$ -criptoxantina) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Os carotenoides são constituintes normais do sangue e tecidos de humanos, sendo distribuídos primariamente no tecido adiposo (80-85%), fígado (8-12%), músculo (2-3%) e com pequenas quantidades em outros tecidos. O soro humano contém  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno e luteína como os principais carotenoides, com baixas concentrações de zeaxantina (BOHN, 2008; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012).



Figura 6 – Estrutura química dos principais carotenoides.



Fonte: Adaptado de Fernández-García (2012).

A presença da cadeia poliênica conjugada é a responsável pela cor dos carotenoides e por algumas de suas funções biológicas, como a excelente capacidade desativadora de espécies reativas, o que lhe confere a propriedade de ser classificado como antioxidante (BOHN, 2008; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). A desativação dos radicais livres, como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) ou  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , por exemplo, pode ocorrer através de processos físicos ou químicos, envolvendo diversos mecanismos como: a doação de elétrons ou hidrogênio, a

quelação de metais, a desativação de  $^1\text{O}_2$  e a formação de adutos (DI MASCIO et al., 1990; RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009; STRATTON; SCHAEFER; LIEBLER, 1993).

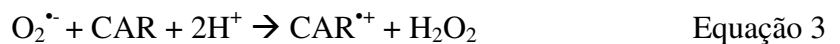
A desativação física (Equação 1) envolve a transferência da energia de excitação do radical livre, por exemplo  $^1\text{O}_2$ , para o carotenoide ( $^1\text{CAR}$ ), resultando em oxigênio no seu estado fundamental  $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$  e estado triplete excitado do carotenoide ( $^3\text{CAR}^*$ ). A energia do  $^3\text{CAR}^*$  é dissipada mediante interações rotacionais e vibracionais entre o carotenoide e o solvente, para recuperar o estado fundamental do mesmo, sem ocorrer degradação (STAHL; SIES, 1993).



Já no processo químico (Equação 2), a reação do carotenoide com a espécie reativa através da transferência de elétrons resulta em destruição do cromóforo e formação de produtos de oxidação do carotenoide (EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997).



Radicais de oxigênio, como por exemplo  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , podem ser reduzidos por diferentes carotenoides, como o licopeno e  $\beta$ -caroteno, devido a capacidade desses compostos em doar elétrons para as espécies reativas de oxigênio (Equação 3), formando novas espécies reativas como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , menos prejudiciais aos sistemas biológicos (DI MASCIO et al., 1990; EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997).



A presença de grupos substituintes, a extensão do cromóforo e o tipo de estrutura da cadeia do carotenoide são um parâmetro eficiente para avaliar sua capacidade em desativar espécies reativas (RODRIGUES et al., 2012). Carotenoides com cadeia acíclica apresentam melhor habilidade de remoção de espécies reativas quando comparado aos que possuem cadeia cíclica. Avaliando a estrutura e a capacidade de desativação do radical peroxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) exibida pelo  $\beta$ -caroteno, licopeno e  $\beta$ -criptoxantina observou-se que a abertura do anel  $\beta$ -ionona aumenta o potencial sequestrante, como no caso do licopeno (RODRIGUES et al., 2012). A presença de grupamentos hidroxila ligados ao anel, como na luteína e zeaxantina, tornam o carotenoide mais efetivo como desativador de ERO quando comparado a

carotenoides que não possuem esses grupamentos, como o  $\beta$ -caroteno. No entanto, a ausência de grupos hidroxil no anel  $\beta$ -ionona confere maior capacidade de remoção do ONOO<sup>-</sup> quando comparado àqueles que os possuem (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2012). Já a presença de grupamentos cetônicos melhora a capacidade de remoção, quando comparado a presença de substituintes epóxidos ou metil, sugerindo que as propriedades dos carotenoides não residem apenas no comprimento do sistema conjugado de duplas ligações, mas também nos grupos funcionais e na estrutura da cadeia (BRITTON, 1995; EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997).

A maioria dos carotenoides tem propriedades lipofílicas e por isso são transportados pelas lipoproteínas – especialmente pela LDL – na corrente sanguínea, o que aumenta o interesse por essas substâncias na prevenção das DCV (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016). Baseado nos resultados promissores de estudos com licopeno, pesquisadores da Universidade de Cambridge, na Inglaterra, através do CamNutra (Biociências Nutracêuticas de Cambridge) disponibilizaram para comercialização um suplemento a base de licopeno (Ateron<sup>TM</sup>), indicado para a prevenção e tratamento das DCV e não disponível no Brasil até o momento.

O Quadro 2 apresenta alguns estudos onde o consumo de carotenoides por humanos foi associado à melhora na saúde cardiovascular.

Quadro 2 – Efeito da ingestão/suplementação com carotenoides sobre os marcadores de aterosclerose em humanos

Carotenoide	Período de trat.	Modelo	Dose suplementada	Efeito
Licopeno	8 sem.	Humanos (saudáveis ou com DCV)	7 mg de licopeno/dia	Melhora na função endotelial <sup>1</sup>
$\beta$ -criptoxantina + luteína	5 anos	Humanos (saudáveis e com IAM)	-	Níveis séricos elevados de $\beta$ -criptoxantina e luteína estavam associados a uma menor incidência de doença arterial coronariana <sup>2</sup>
Licopeno	12 sem.	Humanos (com sobrepeso)	70 mg de licopeno/semana	Aumento dos níveis de HDL e da atividade da PON e redução da inflamação <sup>3</sup>

$\beta$ -caroteno + $\alpha$ -tocoferol + ác. ascórbico	12 sem.	Oxidação da LDL – <i>ex vivo</i>	800 UI de $\alpha$ -tocoferol + 1000 mg de ác. ascórbico + 24 mg de $\beta$ -caroteno/dia	Aumento resistência da LDL à oxidação <sup>4</sup>
Licopeno	3 anos	Humanos	-	Licopeno sérico inversamente associado com a razão íntima/média na artéria carótida <sup>5</sup>
Licopeno	6 sem.	Humanos (saudáveis)	27 mg de licopeno/dia	Redução dos níveis de colesterol total e LDL e aumento de 13% na resistência da LDL à oxidação <sup>6</sup>
$\alpha$ -tocoferol + luteína + $\beta$ -caroteno + licopeno + $\alpha$ -caroteno	2 sem.	Humanos (saudáveis)	43 mg de $\alpha$ -tocoferol + 0,225 mg de luteína + 0,11 mg de $\beta$ -caroteno + 0,075 mg licopeno + 0,045 mg $\alpha$ -caroteno/dia	Redução da oxidação da LDL <sup>7</sup>
Licopeno	2 sem.	Humanos (saudáveis)	33,3 mg de licopeno/dia	Melhora na função endotelial e no estatus oxidativo <sup>8</sup>

Fonte: <sup>1</sup> Gajendragadkar et al (2014); <sup>2</sup> Koh et al. (2011); <sup>3</sup> McEneny et al. (2013); <sup>4</sup> McKechnie et al. (2002); <sup>5</sup> Rissanen et al. (2003); <sup>6</sup> Silate et al (2007); <sup>7</sup> Upritchard et al. (2003); <sup>8</sup> Xaplanteris et al (2012).  
 Legenda: DCV – doença cardiovascular; IAM – infarto agudo do miocárdio; PON – paraoxonase; LDL – lipoproteína de baixa densidade; HDL – lipoproteína de alta densidade; UI – unidades internacionais.

#### 1.1.6.2 Urucum e bixina

O corante do urucum ou anatto é obtido por meio do extrato da camada resinosa externa das sementes da *Bixa orellana* L. (Bixaceae), uma planta tropical conhecida popularmente como urucum ou simplesmente urucu (Figura 7). O urucuzeiro tem origem na América do Sul e se difundiu para a América Central, África e Índia. O urucum é uma das principais fontes naturais de corantes vermelhos e destaca-se economicamente por ser um dos corantes naturais mais utilizado pela indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, devido a sua baixa toxicidade e seu baixo custo de obtenção (SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016).

Figura 7 - Exemplar de urucuzeiro e do corante de urucum extraído de forma artesanal.



Fonte: [www.emepa.org.br](http://www.emepa.org.br)

O carotenoide bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ) (Figura 5) representa 80% dos carotenoides presentes nas sementes do urucum. Este carotenoide contém 2 grupos carboxílicos, sendo que um é um éster monometílico (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). Adicionalmente à bixina, nas sementes de urucum também é encontrada em pequenas proporções (1-3%) o carotenoide norbixina, que apresenta características mais hidrossólúveis e é proveniente da remoção hidrolítica de um grupamento éster metílico da bixina – reação (saponificação) que também pode ser realizada industrialmente para a obtenção da norbixina (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001).

Como característica de todos os carotenoides, a bixina é formada por uma cadeia de duplas ligações conjugadas alternadas, as quais condicionam algumas características, como cor e sua atividade antioxidante. É um composto lipossolúvel, estável frente à luz e tem boa estabilidade frente à oxidação, mudança de pH, ataque microbiano e temperaturas de até 100°C (LYNG; PASSOS; FONTANA, 2005). A ingestão diária aceitável (IDA) para a bixina é de até 12 mg/kg de peso corporal. Esse limite de IDA é estabelecido como seguro para humanos e foi calculado a partir da maior dose de bixina que não produziu efeitos tóxicos em animais (NOEL). Assim, o valor de IDA para a bixina foi estabelecido com base em um valor de NOEL de 1311 mg/kg de peso corporal/dia, obtido a partir de um estudo de 90 dias em que ratos machos foram alimentados com um extrato de bixina a 92%, corrigido com o teor de pigmento e aplicando um fator de segurança de 100, com o objetivo de estrapolar os valores obtidos para humanos (JECFA, 2006).

Além disso, o Comitê Conjunto FAO/WHO de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA, 2006) avaliou a exposição alimentar humana à bixina, com base nos níveis normais de uso (fornecido pela indústria) dos extratos de urucum, expresso em bixina, considerando uma pessoa de 60 kg. A comissão estabeleceu que se diariamente todos os pigmentos ingeridos na dieta forem bixina, a exposição estimada seria de 1,5 mg/dia, o que resultaria em uma ingestão de 26 µg/kg de peso corporal/dia, correspondente a aproximadamente 0,2% da IDA (até 12 mg/kg de peso corporal).

O uso principal do urucum pelo homem é baseado em suas propriedades corantes e a maioria dos estudos publicados sobre os pigmentos do urucum se concentram na melhoria dos protocolos de extração ou na determinação dos carotenoides do urucum em alimentos (ALBUQUERQUE et al., 2015; MORAES; ZABOT; MEIRELES, 2015; RIOS; MERCADANTE, 2004; TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015; TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). Pouca atenção tem sido dada às propriedades biológicas de bixina, particularmente para o seu potencial antioxidante e antiaterogênico.

O carotenoide bixina isolado, assim como os extratos de urucum ricos em bixina e obtidos com solventes de diferentes polaridades foram efetivos na desativação de espécies reativas como  $H_2O_2$ ,  $ROO^\bullet$ ,  $HOCl$ ,  $^1O_2$ ,  $^\bullet NO$  e  $ONOO^-$ , com  $IC_{50}$  na faixa de µg/mL (CHISTÉ et al., 2011) A bixina é um excelente removedor de ERO com ação mais efetiva que o β-caroteno na desativação do  $ROO^\bullet$  (RODRIGUES et al., 2012) e com ação similar ao licopeno e ao β-caroteno na remoção do  $^1O_2$ , (DI MASCIO et al., 1990; RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009), sendo eficiente também em sistemas biológicos, onde contribuiu para a redução dos níveis de MDA no cérebro de ratos expostos a ciclofosfamida (OBOH et al., 2011) e para a prevenção da peroxidação lipídica e depleção de GSH renal induzida por cisplatina em ratos (SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001) e no fígado de ratos expostos ao paracetamol (RAO et al., 2014), demonstrando um papel protetor nesses tecidos contra os danos promovidos pelos radicais livres. Além do potencial antioxidante, a bixina tem efeito anticarcinogênico e antimutagênico (ANANTHARAMAN et al., 2016; ANTUNES et al., 2005; SANTOS et al., 2012; REDDY; ALEXANDER-LINDO; NAIR, 2005), além de reduzir, em ratos, a hepatotoxicidade do paracetamol (RAO et al., 2014) e a nefrotoxicidade da cisplatina (SOUZA et al., 2016). A bixina é capaz de reduzir a fragmentação do DNA induzida por cisplatina em células neuronais (SANTOS et al., 2012) e em hepatócitos de animais expostos a 1,2-dimetilhidrazina (OLIVEIRA et al., 2014), além de proteger queratinócitos da radiação ultravioleta (TAO et al., 2015). Adicionalmente, a bixina apresenta promissora atividade anti-inflamatória ao inibir as enzimas COX-1 e COX-2 em ensaio *in vitro* utilizando as enzimas

purificadas e ácido araquidônico como substrato (REDDY; ALEXANDER-LINDO; NAIR, 2005) e reduzir os efeitos inflamatórios da cisplatina ao modificar o número de neutrófilos (SOUZA et al., 2016).

Apesar dos diversos estudos existentes sobre o potencial da bixina nos mais variados modelos de dano oxidativo, são escassos os estudos avaliando o potencial antioxidante desse carotenoide em modelos de aterosclerose. Além disso, a distribuição tecidual da bixina e sua afinidade pelas lipoproteínas plasmáticas ainda são desconhecidas. Consta na literatura científica reduzido número de publicações avaliando os efeitos da bixina sobre os níveis de lipídeos séricos: a bixina reduziu os níveis de LDL e triglicerídeos em coelhos normolipidêmicos (LIMA et al., 2008) e preveniu a elevação dos níveis de colesterol total em coelhos hipercolesterolêmicos (LIMA et al., 2010). A bixina também foi capaz de melhorar o perfil lipídico em modelo experimental diabetes, outra condição fisiopatológica na qual ocorre dislipidemia (ROEHRS et al., 2014). Esse efeito pode estar relacionado a ativação de receptores PPAR, uma vez que a bixina atuou como agonista do receptor PPAR $\gamma$  em cultura de adipócitos (TAKAHASHI et al., 2009). Este receptor nuclear regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e carboidratos e possui atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e anti-aterosclerótica (LOVISCAH, 2000). A interação da bixina com o receptor PPAR $\gamma$ , aumentou a sensibilidade da cultura de adipócitos à insulina fazendo com que houvesse maior captação de glicose (TAKAHASHI et al., 2009). Além disso, a bixina liga-se a outro receptor nuclear, o PPAR $\alpha$ , que regula a expressão dos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, melhorando o metabolismo de carboidratos e lipídios (GOTO et al., 2012). Nesse sentido, as características farmacológicas da bixina tornam esse carotenoide uma droga com potencial promissor para a modulação de eventos associados à aterosclerose, tais como a hiperlipidemia e a oxidação lipídica.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos antiaterogênicos do carotenoide bixina em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* elucidando os mecanismos que contribuem para estes efeitos.

### 1.2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da suplementação oral de bixina sobre os níveis séricos de lipídios, marcadores inflamatórios, marcadores de estresse oxidativo, status antioxidante e lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica;
- Investigar o efeito protetor *in vitro* da bixina contra a oxidação da LDL humana isolada, relacionando o possível mecanismo de ação;
- Investigar se a bixina protege contra a toxicidade induzida pela exposição de macrófagos murinos J774A.1 à LDLox, avaliando os mecanismos químicos e moleculares envolvidos na proteção.

## 1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.3.1 Bixina

O carotenoide bixina foi fornecido pela empresa Christian-Hansen (Dinamarca) e caracterizado no Núcleo Integrado em Análises Laboratoriais (NIDAL) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) de acordo com os protocolos descritos a seguir.

#### 1.3.1.1 Teor e pureza da bixina

De acordo com o laudo fornecido pela Christian-Hansen, o teor de bixina nos extratos era de 10%. A título de confirmação, o extrato foi dissolvido em clorofórmio e sua absorvância foi determinada por espectrofotometria a 470 nm (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). A concentração de bixina foi calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$A = acb$$

Onde:

$A$  = absorvância da solução clorofórmica do extrato, lida no espectrofotômetro,

$a$  = coeficiente de absorção da bixina em  $\text{CHCl}_3$  (2826) no  $\lambda_{\text{max}}$  470 nm

$b$  = caminho ótico (1 cm),

$c$  = concentração de bixina na solução (g/L).

Para a determinação de pureza do extrato de bixina, alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do extrato foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (Shim-pack CLC ODS, 25 cm x 4,6 mm), pré-coluna (Shim-pack GODS, 10



x 4 mm, 5µm) e detector de arranjo de diodos (DAD) operando em 460 nm. Para a eluição, foi utilizado acetonitrila:ácido acético 2% (65: 35, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>(LEVY et al., 1997). A identificação da bixina e dos demais compostos presentes no extrato foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de DAD com os dados descritos na literatura, sob as mesmas condições experimentais (LEVY et al., 1997; SCOTTER et al., 1998). O limite de detecção do método foi de 0,02 µg/mL e o limite de quantificação de 0,07 µg/mL.

### **1.3.2 Ensaio *in vivo***

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal UFSM - parecer nº 28/2010.

#### *1.3.2.1 Local de desenvolvimento da pesquisa*

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

#### *1.3.2.2 Tratamento dos animais e dietas*

Foram utilizados coelhos machos da raça Nova Zelândia, pesando aproximadamente 2 Kg. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, sob um ciclo de claro/escuro de 12:12 h e acesso diário a 50 g de ração por Kg de peso corporal e água à vontade. Os animais foram separados em 7 grupos (n=6) e alimentados durante 60 dias com as seguintes dietas:

- Dieta padrão (SUPRA – ALISUL, São Leopoldo, RS, Brasil) (Controle);
- Dieta hipercolesterolêmica (0,5% de colesterol);
- Dieta hipercolesterolêmica (0,5% de colesterol) + bixina 10 mg/Kg
- Dieta hipercolesterolêmica (0,5% de colesterol) + bixina 30 mg/Kg
- Dieta hipercolesterolêmica (0,5% de colesterol) + bixina 100 mg/Kg
- Dieta hipercolesterolêmica (0,5% de colesterol) + sinvastatina 15 mg/kg
- Dieta padrão + bixina 100mg/Kg

A sinvastatina foi utilizada como um controle positivo, uma vez que é a medicação de escolha para o tratamento da hipercolesterolêmica (SBC, 2013a). A maior dose de bixina (100 mg/Kg) utilizada nesse estudo foi suplementada em coelhos normocolesterolêmicos para verificar a presença de efeitos *per se*. O colesterol (Vetec, RJ, Brasil), a sinvastatina e a bixina foram dissolvidos em éter etílico e pulverizados na dieta. A dieta controle também foi

pulverizadas com éter etílico. Todas as dietas foram preparadas semanalmente, mantidas durante 24 h a temperatura ambiente e protegidas da luz para a evaporação do éter etílico e armazenadas sob refrigeração.

### *1.3.2.3 Coleta do material biológico*

Antes do início do experimento e após o período experimental, os animais foram privados de ração por 12 h e então anestesiados com dose intramuscular de uma mistura de 12,5 mg/Kg de ketamina para 2,5 mg/Kg de xilasina. O sangue foi coletado em tubos sem anticoagulante, por punção na artéria marginal da orelha e centrifugado a 3000 x g por 10 minutos para obtenção do soro que foi utilizado nas análises dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, HDL, e colesterol não HDL (não-HDL) e bixina.

No fim do período experimental e após a coleta de sangue os animais foram decapitados para remoção da aorta (do arco aórtico até bifurcação ilíaca). O tecido adventício foi removido e as aortas foram lavadas com PBS pH 7,4 gelado. Imediatamente após, uma secção de 0,5 cm da aorta ascendente foi removida para a análise histopatológica. O restante do tecido aórtico foi homogeneizado com 5 volumes de PBS. O homogeneizado foi utilizado para as determinações dos níveis de TBARS e NPSH e após centrifugação a 3000 x g por 10 minutos, o sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C até a realização das demais análises.

### *1.3.2.4 Análises*

#### *1.3.2.4.1 Lipídios séricos e marcadores pró-inflamatórios*

Os níveis de colesterol total, HDL e triglicerídeos foram determinados utilizando kits comerciais (Doles, GO, Brasil). Os níveis de n-HDL foram calculados pela diferença entre colesterol total e HDL. O índice aterogênico foi calculado de acordo com a seguinte equação:  $(\text{colesterol total} - \text{HDL}) / \text{HDL}$ . Os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 foram determinados por ELISA (eBIOSCIENCE, San Diego, USA).

#### *1.3.2.4.2 Indicadores de estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes*

A lipoperoxidação no tecido aórtico foi determinada através da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

Os níveis de tióis não proteicos (NPSH) foram determinados a 412 nm (ELLMAN, 1959), após desproteinização e reação com DTNB.

A atividade da GR foi determinada utilizando glutationa oxidada e NADPH (CARLBERG; MANNERVIK, 1979). A atividade da enzima CAT foi avaliada por espectrofotometria, utilizando peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984). A atividade da SOD foi determinada por espectrofotometria utilizando epinefrina (MISRA; FRIDOVICH, 1972). A atividade da enzima TrxR foi avaliada por espectrofotometria, utilizando ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) (HOLMGREN; BJÖRNSTEDT, 1995).

#### 1.3.2.4.3 Atividade da PON1

A atividade da enzima PON1 foi determinada através do monitoramento da formação do p-nitrofenol, produto da hidrólise do paraoxon (substrato da enzima), a 412 nm e a 25°C (BOLAYIRLI et al., 2007).

#### 1.3.2.4.4 Análise histopatológica

Para realização da análise histopatológica, o tecido aórtico foi fixado em solução de formol tamponado a 10%, processados e embebidos em parafina e seccionados a 5 µm em micrótomo rotativo. Secções foram coradas com hematoxilina e eosina. As laminas foram analisadas em microscópio por um patologista sem conhecimento dos grupos experimentais. A espessura da lamina íntima e média foi determinada e a sua razão foi usada como um índice da formação de placas ateroscleróticas (AUGUSTI et al., 2009). Devido ao fato das lesões não serem uniformes, os resultados de cada amostra foram expressos como a média de cinco diferentes medidas ao longo da secção aórtica.

#### 1.3.2.4.5 Níveis séricos de bixina

A análise dos níveis séricos de bixina presentes no soro dos coelhos antes e após o período experimental foram realizadas por cromatografia líquida. Primeiramente foram adicionados 100 µL de solução metanólica de Sudan I (100 µg/mL) como padrão interno (LEVY et al., 1997; SCOTTER, 2009) a 100 µL de soro em eppendorf âmbar. Após 1 minuto de agitação em vórtex, foi adicionado 600 µL de metanol à mistura. O eppendorf foi agitado novamente em vórtex por 1 minuto e posteriormente centrifugado a 3500 rpm a 4°C por 10

minutos. A fase orgânica foi coletada e a extração foi realizada novamente com 600 µL de metanol. As fases orgânicas das extrações sequenciais foram misturadas em tubo de ensaio e submetidas à secagem à vácuo a 25°C protegido da luz. Quando necessário, as amostras eram armazenadas a -18°C, após introdução de nitrogênio no eppendorf. Anteriormente à injeção, as amostras eram reconstituídas com 100 µL de fase móvel. Foram injetados 20 µL de amostra no cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC ODS, 25 cm x 4,6 mm), pré-coluna (Shim-pack GODS, 10 x 4 mm, 5µm) e detector de arranjo de diodos (DAD) operando em 460 nm. Para a eluição, foi utilizado acetonitrila:ácido acético 2% (65: 35, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> (LEVY et al., 1997). A identificação da bixina e dos demais compostos presentes no extrato foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de DAD com os dados descritos na literatura, sob as mesmas condições experimentais (LEVY et al., 1997; SCOTTER et al., 1998). O limite de detecção do método foi de 0,02 µg/mL e o limite de quantificação de 0,07 µg/mL.

### **1.3.3 Ensaios *in vitro***

#### *1.3.3.1 Local de desenvolvimento da pesquisa*

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica I do Departamento de Bioquímica da UFSC sob a supervisão da professora Dr<sup>a</sup> Andreza Fabro de Bem.

#### *1.3.3.2 Preparo da bixina para os protocolos experimentais*

Para a realização dos experimentos *in vitro*, a bixina (conforme descrito no item 1.3.1) foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO). Nos protocolos utilizando cultura de células, a concentração final de DMSO não foi maior que 0,05 %.

#### *1.3.3.3 Licopeno*

Utilizamos em todos os experimentos *in vitro* o carotenoide licopeno, como um controle positivo. O licopeno (pureza 99%) foi fornecido pela empresa farmacêutica Galena (São Paulo/BR) e para a realização dos experimentos foi solubilizado em DMSO.

#### *1.3.3.4 Isolamento da LDL humana*

A fração LDL foi isolada a partir de plasma humano proveniente do banco de sangue do Hospital Universitário da UFSC. Os procedimentos experimentais para utilização de plasma humano e isolamento da LDL foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (parecer 943/10, FR 363814).

O isolamento da LDL foi realizado por ultracentrifugação do plasma fresco utilizando gradiente de densidade descontínua (KLEINVELD et al., 1992). Resumidamente, foi adicionado EDTA (1 mg/mL) e sacarose (concentração final de 0,5%) ao plasma para evitar a agregação da LDL. Cinco mL de plasma-EDTA foram ajustados a uma densidade de 1,22 g/mL com KBr (0,326 g/mL) e em seguida, sobre o plasma-EDTA, foi adicionado 5 mL de cloreto de sódio (1,006 g/mL). A ultracentrifugação foi executada a  $191.000 \times g$  por 2 h à 4°C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor P80AT 0147. Após este processo, a camada contendo LDL (banda amarelo/laranja localizada na interface entre a amostra de plasma e a solução salina) foi coletada e dialisada durante 16 h à 4°C em tampão fosfato 148 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4). A concentração de proteína na solução de LDL foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e as LDL isoladas foram armazenadas a -20°C por no máximo 2 semanas.

#### *1.3.3.5 Oxidação da LDL*

Amostras de LDL isolada (1 mg/mL) foram oxidadas na presença de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 10  $\mu\text{M}$  por 16 h a 37°C sob agitação constante. Posteriormente, foi adicionado EDTA (2,5 mM) e as amostras foram dialisadas em tampão fosfato 148 mM por 16 h a 4°C. Após a diálise, as alíquotas de LDLox foram estocadas a -20°C por no máximo 2 semanas.

#### *1.3.3.6 Ensaios de oxidação da LDL humana isolada*

##### *1.3.3.6.1 Dienos conjugados*

A oxidação da parte lipídica da LDL nativa isolada foi analisada pela formação dos dienos conjugados. As amostras de LDL (50  $\mu\text{g}$  de proteína/mL) foram pré-incubados a 37°C em meio contendo PBS 10 mM (pH 7,4) e diferentes concentrações de bixina (0 – 7,5  $\mu\text{M}$ ) ou licopeno (0 – 40  $\mu\text{M}$ ), que foi utilizado nos experimentos como controle positivo, uma vez

que existem diversas evidências de que este carotenoide protege a LDL da oxidação e modula diversos outros eventos envolvidos no processo aterosclerótico (MORDENTE et al., 2011). Após 60 min, a oxidação da LDL foi iniciada pela adição de  $\text{CuSO}_4$  ( $10 \mu\text{M}$ ) e monitorada ao longo de 6,5 h através da medição do aumento da absorvância em 234 nm devido a formação dos dienos conjugados (GIESEG; ESTERBAUER, 1994).

É importante destacar que no ensaio de formação de dienos conjugados, diversos parâmetros podem ser obtidos através da análise da formação dos dienos *versus* tempo. O valor da fase *lag* é comumente determinado graficamente pela intercepção das tangentes ao aumento da absorvância dos dienos. Outro parâmetro analisado é a taxa de oxidação, determinada através da derivada da curva da absorvância durante a fase de propagação em função do tempo (GIESEG; ESTERBAUER, 1994)

#### 1.3.3.6.2 Fluorescência do triptofano (Trp)

Os espectros de fluorescência da LDL nativa exibem uma única banda centrada em aproximadamente 332 nm, que é atribuída aos resíduos de Trp, que estão localizados na apoB-100. A perda de fluorescência do Trp é um marcador da oxidação protéica da LDL. A fluorescência do Trp foi medida em uma solução de LDL ( $50 \mu\text{g}$  proteína/mL) em diferentes tempos (0 – 390 minutos) com o uso de um espectrofluorímetro (Spectramax Paradigm) com excitação em 282nm e emissão em 332 nm (GIESSAUF; STEINER; ESTERBAUER, 1995). A cinética da oxidação da LDL foi acompanhada por medição da diminuição da fluorescência do Trp após a adição de  $3,3 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  na presença ou ausência de diferentes concentrações de bixina (0 –  $7,5 \mu\text{M}$ ) ou licopeno (0 –  $40 \mu\text{M}$ ) (controle positivo). Os dados são apresentados como redução percentual de fluorescência de Trp em cada amostra. O tempo necessário para decair a metade da fluorescência do Trp ( $t_{1/2}$ ) também foi calculado (GIESSAUF; STEINER; ESTERBAUER, 1995; REYFTMANN et al., 1990).

#### 1.3.3.7 Ensaios com cultura de macrófagos

Para realização dos experimentos envolvendo cultura celular, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774 A.1 obtidos do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). As células foram cultivadas e replicadas em placas de Petri contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, glicose 4,5g/L, bicarbonato de sódio 1,5 g/L, Hepes 1 M, penicilina 10.000

UI e estreptomicina 10.000 UI, em pH 7,4. As células foram mantidas em atmosfera umidificada (estufa) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os procedimentos experimentais, as células foram plaqueadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para adesão. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por DMEM sem SFB e mantido durante os tratamentos com bixina ou licopeno ou LDLox, conforme descrito a seguir. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 1.3.3.7.1 Ensaio de citotoxicidade celular

A fim de selecionar concentrações de bixina e licopeno que não causassem toxicidade aos macrófagos, foi realizado o teste de citotoxicidade celular, avaliando o efeito de concentrações variando de 0,001 – 40 µM sobre a viabilidade celular. Essa avaliação foi realizada através do método do MTT, que mede a atividade da desidrogenase mitocondrial através da redução do (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em formazan, nas células viáveis (MOSMANN, 1983). As células foram cultivadas em placas de 96 poços (12.000 células/poço) e colocadas em estufa incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por 24 h para adesão. Após este período, as células foram tratadas com concentrações crescentes (0,001 – 40 µM) de bixina ou licopeno ou veículo e incubadas por 24 h. Ao final deste período, o meio foi removido e 100 µL de MTT 0,5 mg/mL foi adicionado a cada poço, seguido de uma nova incubação de 2 h a 37°C. Terminada esta etapa, o MTT foi removido e adicionado 100 µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan em uma incubação sob agitação por 30 min. Esse composto, que possui coloração violeta, é formado pela redução do MTT através de desidrogenases presentes em células viáveis. As placas foram então submetidas à leitura de densidade óptica (540 nm) e a porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (células não tratadas).

#### 1.3.3.7.2 Medida da produção de ERO

A geração intracelular de ERO foi medida utilizando a sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetato (DCFH-DA). Quando aplicada a células intactas, a DCFH-DA passa pela membrana celular e é hidrolisada enzimaticamente por esterases formando um produto não fluorescente, o DCFH. Na presença de ERO, o DCFH é oxidada gerando o composto altamente fluorescente DCF, cuja fluorescência pode ser quantificada

fluorimetricamente (WANG; JOSEPH, 1999). Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) e mantidas em estufa incubadora ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) por 24 h.

Para verificar os efeitos da bixina e do licopeno sobre a produção de ERO induzida pela LDL oxidada, as células foram pré-tratadas com bixina (0,03-0,3  $\mu\text{M}$ ) ou licopeno (0,001-0,1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 h. A fim de avaliar a cinética de formação das ERO induzida pela exposição à LDLox, as células foram tratadas com DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ) e imediatamente expostas à LDLox (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Em seguida a intensidade de fluorescência foi medida em um leitor de placas (Spectramax Paradigm) durante 1 hora (480 nm de excitação e 525 nm de emissão) em intervalos de 1 minuto.

#### 1.3.3.7.3 Medida da produção de ERN

Para verificar a produção de ERN, principalmente o peroxinitrito, nos macrófagos, foi avaliada a oxidação da sonda fluorescente dihidrorodamina (DHR), que reage com radicais derivados do peroxinitrito, mas não com  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ou  $\cdot\text{NO}$  diretamente (RADI et al., 2001; WRONA; PATEL; WARDMAN, 2005). As células foram cultivadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poços) e mantidas em estufa incubadora ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) por 24 h.

Para examinar a cinética de formação de ERN induzida pela exposição à LDLox, assim como o possível efeito protetor da bixina e do licopeno frente a exposição à LDLox, as células foram pré-tratadas com bixina (0,03-0,3  $\mu\text{M}$ ) ou licopeno (0,001-0,1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 h. Após esse período, foram incubadas com LDLox (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e DHR (10  $\mu\text{M}$ ) simultaneamente e a intensidade de fluorescência foi medida em um leitor de placas (Infinite M200, TECAN, Mannedorf, Suíça) durante 60 minutos com excitação a 485 nm e emissão a 525 nm e 590 nm em intervalos de 1 minuto.

#### 1.3.3.7.4 Determinação da concentração intracelular de GSH

Os níveis intracelulares de GSH foram determinados por ensaio fluorimétrico conforme descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas modificações. Esse ensaio baseia-se no princípio de que os grupos tióis (-SH) da GSH reagem especificamente com o orto-ftalaldeído (OPT) em pH 8,0, resultando um produto fluorescente excitado a 350 nm e com emissão a 420 nm (HISSIN; HILF, 1976). As células foram semeadas em placas de 24 poços ( $2,5 \times 10^5$  células/poço), mantidas em estufa incubadora ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) por 24 h. Para



analisar os efeitos da bixina e do licopeno, as células foram pré-tratadas com bixina (0,03  $\mu\text{M}$ ) ou licopeno (0,003  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 h, e posteriormente expostas à LDLox (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou veículo por 24 h adicionais. Após, as células foram lavadas com PBS, coletadas com ácido perclórico 0,6 M e PBS 100 mM/EDTA 5 mM (0,5 mL), pH 8,0 a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 14.000 g, a 4°C por 10 minutos. Volume de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubado com 100  $\mu\text{L}$  de orto-ftalaldeído (0,1% p/v em metanol) e 1,8 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM, por 15 min a temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi medida em leitor de placas (350 nm de excitação e 420 nm de emissão). O conteúdo intracelular de GSH foi calculado utilizando uma curva padrão de GSH e expresso como nmoles de GSH por miligrama de proteína.

#### 1.3.3.7.5 Determinação dos níveis de nitrito ( $\text{NO}_2$ )

A produção de nitrito, um indicador de produção de óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), foi mensurada pela reação de Griess (SCHULZ; KERBER; KELM, 1999). As células foram semeadas em placas de 624 poços ( $2,5 \times 10^5$  células/poço), mantidas em estufa incubadora (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) por 24 h. Após, as células foram pré-tratadas com bixina (0,03  $\mu\text{M}$ ) ou licopeno (0,003  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 h, e posteriormente expostas à LDLox (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou veículo por 24 h adicionais. Após o tratamento, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado a 6.000 rpm por 3 minutos. Após, 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi adicionado a 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (volumes iguais de ácido sulfanílico em ácido acético e N-(1-naftil) etilenediamina em ácido acético), incubado a temperatura ambiente por 30 minutos, e a absorvância foi medida em 540 nm em leitor de placas (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria). A quantificação do nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão preparada com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio de cultura.

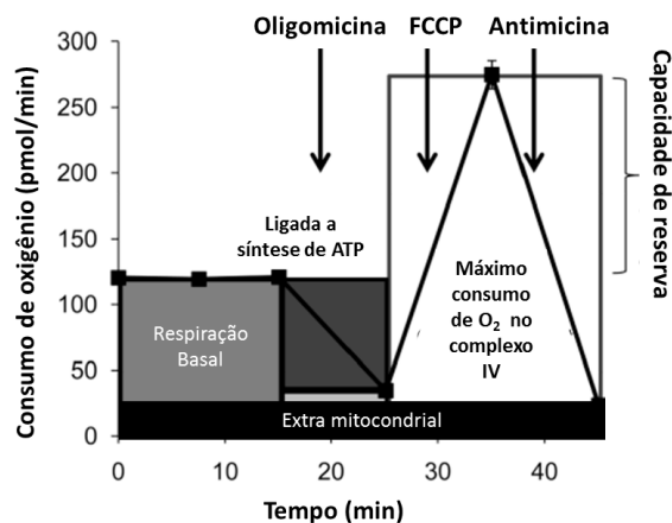
#### 1.3.3.7.6 Respirometria de alta resolução em células intactas

A fim de avaliar a função mitocondrial frente à exposição das células à LDLox, as taxas de consumo de oxigênio foram medidas polarograficamente utilizando respirometria de alta resolução (Oroboros Oxygraph-O2K). As células foram pré-tratadas com bixina (0,03  $\mu\text{M}$ ) ou licopeno (0,003  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 24 h seguido da exposição à LDLox 100  $\mu\text{g/mL}$  por adicionais 24 h. Após esse período, as células foram coletadas com um raspador de células (*scraper*), centrifugadas a 1200g por 3 minutos e ressuspensas em DMEM isento

de SFB. Foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células/mL para a realização das medições do consumo de  $O_2$  em uma câmara respiratória fechada (2 ml/câmara).

O protocolo experimental foi iniciado com a respiração basal, que é definido como a respiração com os substratos presentes no meio de cultura, observando um estado estacionário do fluxo respiratório das células. Em seguida, a ATP sintase foi inibida com oligomicina (1  $\mu\text{g/ml}$ ), a fim de estimar a proporção de consumo de oxigênio acoplada a síntese de ATP. Para determinar o máximo consumo de oxigênio atingido pelas células, o ionofóro de prótons carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), desacoplador da fosforilação oxidativa, foi titulado como previamente descrito (100 nM por injeção) (HORT et al., 2014). Após a titulação com FCCP, a cadeia transportadora de elétrons foi bloqueada com antimicina (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e o fluxo de oxigênio detectado nesta condição foi definido como consumo de oxigênio extra mitocondrial (Figura 8). O DatLab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) foi utilizado para aquisição de dados e análise. Entre os parâmetros que podem ser calculados estão: (1) a taxa de controle respiratório (RCR - taxa de respiração para oligomicina na presença ou ausência de FCCP) que reflete o grau de acoplamento entre respiração e fosforilação oxidativa; (2) o consumo de oxigênio ligado à síntese de ATP (respiração leak (quando oligomicina é injetada) – respiração basal) fornece informações a respeito da geração de energia celular; (3) a capacidade de reserva (respiração máxima – respiração basal) indica a capacidade da resposta da célula frente ao estresse oxidativo.

Figura 8 – Medida ilustrativa do consumo de  $O_2$  usando diferentes inibidores/indutores farmacológicos.



Fonte: Adaptado de Dranka, Hill e Darley-Husmar (2010).

#### 1.3.3.7.7 Ensaio de formação de células espumosas

Para verificar a formação de células espumosas através da exposição dos macrófagos à LDLox, previamente tratadas com bixina ou licopeno ou veículo, realizou-se o método de coloração com *Red Oil O*, conforme previamente descrito (KOOPTMAN; SCHAART; HESSELINK, 2001). Inicialmente, os macrófagos foram semeados em placas de 12 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço), sobre lamínulas de vidro estéreis. Após 24 h para a adesão, em incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), foi adicionado bixina (0,03 µM) ou licopeno (0,003 µM) ou veículo e incubado por 24 h adicionais. Posteriormente, as células foram tratadas com LDLox 100 µg/mL ou veículo por mais 3 h. Ao final do tratamento, as lamínulas contendo as células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS (10mM) e fixadas com paraformaldeído 4% a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, as células foram coradas com *Oil Red O* 0,3% por 10 minutos, lavadas em PBS e contra-coradas com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas e as imagens das células foram obtidas utilizando um microscópio de luz (Olympus, Bx41) conectado a uma câmara digital (3.3 Mpixel QCOLOR3C, Qimaging™) e software para captura de imagens (Qcapture Pro 5.1, QImaging™). A intensidade total de pixels (densidade óptica) foi determinada utilizando o software NIH ImageJ 1.36 e o teor de lipídeos foi expresso por densidade óptica. Os experimentos foram realizados em triplicata e foram analisadas 10 fotomicrografias por grupo.

#### 1.3.3.7.8 *Western blot* para iNOS, Nrf2 e NF-κB

Com o objetivo de avaliar o efeito da bixina e do licopeno sobre a expressão da iNOS, do Nrf2 e do NF-κB, macrófagos ( $5.0 \times 10^5$  células/poço) foram semeados em placas de 6 poços e tratadas com bixina (0,03 µM) ou licopeno (0,003 µM) ou veículo por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com LDLox 100 µg/mL ou veículo por mais 24 h. Após esse período as células foram lavadas 1 × PBS e coletadas com 200 µl do tampão de lise, específico para cada determinação. Para a análise da expressão da iNOS o tampão de lise consistia em 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 40 mM β-glicerofosfato, 50 mM NaF, 200 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5% glicerol e coquetel inibidor de proteases. Após a coleta as amostras foram centrifugadas a 13.000 g a 4°C por 45 min e o sobrenadante foi coletado. Para a determinação da expressão do Nrf2 e NF-κB, primeiramente as células foram lisadas com o tampão A (10 mM Hepes com pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100 e coquetel inibidor de proteases),

centrifugadas a 15.000 g a 4°C por 30 min e o sobrenadante foi coletado (fração citoplasmática). Posteriormente, os pellets foram homogeneizados com o tampão B (20 mM Hepes com pH 7.9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 25% glicerol e coquetel inibidor de proteases), centrifugados a 15.000 g a 4°C por 30 min e o sobrenadante foi coletado (fração nuclear).

Após a determinação de proteínas em todos os sobrenadantes, 50 µg de proteína foram aplicados em gel de poliacrilamida e posteriormente transferido para membrana de nitrocelulose. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-iNOS policlonal de coelho (1:1000; sc-8310, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-Nrf2 policlonal de coelho (1:250; sc-722, Santa Cruz Biotechnology), anti-NF-κB monoclonal de rato (1:100; sc-166588, Santa Cruz Biotechnology), β-actina policlonal de rato (1:2500; sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, USA) e anti-PCNA monoclonal de rato (1:200; sc-56, Santa Cruz Biotechnology, USA). Posteriormente as membranas foram reveladas utilizando ECL (GE Healthcare) e fotodocumentadas no equipamento ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A intensidade das bandas foi quantificada através do software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e normalizadas em relação à banda da β-actina (Nrf2 e NF-κB citoplasmático e iNOS) ou PCNA (Nrf2 e NF-κB nuclear).

#### **1.3.4 Determinação dos níveis de proteínas**

O conteúdo de proteínas no homogeneizado e sobrendante de aortas, nas LDL isoladas e na cultura celular de macrófagos foi determinado conforme metodologia descrita por Lowry et al (1951), usando albumina de soro bovino como padrão (LOWRY et al., 1951).

## **2. DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 ARTIGO 1**

**THE ANTIATHEROGENIC EFFECT OF BIXIN IN HYPERCHOLESTEROLEMIC RABBITS IS ASSOCIATED TO THE IMPROVEMENT OF LIPID PROFILE AND TO ITS ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS**

Sabrina Somacal, Cassieli G. Figueiredo, Amanda R. Ruviaro, Andréia Quatrin, Lisiane Conte, Miguel Rohers, Ione T. Denardin, Jocieli Kasten, Marcelo L. da Veiga, Marta M. F. Duarte, Tatiana Emanuelli

Artigo publicado no periódico:  
Molecular and Cellular Biochemistry

## The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects

Sabrina Somacal · Cassieli G. Figueiredo · Andréia Quatrin · Amanda R. Ruviano · Lisiane Conte · Paula R. Augusti · Miguel Roehrs · Ione T. Denardin · Jocieli Kasten · Marcelo L. da Veiga · Marta M. F. Duarte · Tatiana Emanuelli

Received: 23 September 2014 / Accepted: 14 February 2015 / Published online: 22 February 2015  
 © Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Hypercholesterolemia and oxidative stress have been implicated in the pathophysiology of atherosclerosis and coronary artery disease. We investigated whether the carotenoid bixin (BIX) may reduce oxidative damage, inflammatory response, and the atherosclerotic lesion induced by hypercholesterolemia in rabbits. Rabbits received regular chow (control) or a hypercholesterolemic diet (0.5 % cholesterol) alone or supplemented with BIX (10, 30 or 100 mg/kg body weight, b.w.) or simvastatin (15 mg/kg b.w.) for 60 days. Treatment with BIX or simvastatin reduced the atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits (up to 55 and 96 % reduction, respectively).

This protective effect of BIX was accompanied by decrease in the levels of tumor necrosis factor alpha by 15 %, interleukin 6 by 19 %, lipid peroxidation by 60 %, non-high-density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C) by 37 %, and triglycerides by 41 %. BIX increased by 160 % the HDL-C levels and decreased by 67 % the atherogenic index of hypercholesterolemic rabbits. In atherosclerotic rabbits, the non-protein thiol groups content and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, and thioredoxin reductase were increased in the aortic tissue, whereas paraoxonase activity was reduced in the serum. All these changes were completely prevented by BIX or simvastatin treatment. These results demonstrate that BIX reduces the extent of atherosclerotic lesions and this effect was associated with the decrease in oxidative stress, inflammatory response, and improvement of dyslipidemia, which were most effectively controlled after treatment with 10–30 mg BIX/kg b.w. BIX consumption may, therefore, be an adjuvant to prevent atherosclerosis reducing risk factors for coronary diseases.

S. Somacal · A. Quatrin · M. Roehrs  
 Graduate Program on Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-9003, Brazil

C. G. Figueiredo · A. R. Ruviano · L. Conte · T. Emanuelli (✉)  
 Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil  
 e-mail: tatiemanuelli@gmail.com

P. R. Augusti  
 Department of Food Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

I. T. Denardin  
 Polytechnical High School, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

J. Kasten · M. L. da Veiga  
 Department of Morphology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

M. M. F. Duarte  
 Department of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS 97020-001, Brazil

**Keywords** Inflammation · High-density lipoprotein cholesterol · Carotenoids · Lipid peroxidation · Atheroma plaques · Annatto

### Introduction

Atherosclerosis is a pathological condition that underlies several important adverse vascular events including stroke and coronary artery disease [1], and is characterized by increased plasma cholesterol levels, damage to endothelial cells, recruitment of inflammatory cells, oxidative stress, and lipid accumulation [1–3].

Hypercholesterolemia, especially high levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), is the critical step in the initial stage of atherosclerosis [2]. Statins, which inhibit the key enzyme in the cholesterol synthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), have been used as anti-hyperlipidemic drugs to reduce cardiac events and mortality [1]. However, some studies suggest that statin withdrawal results in significant adverse effects, mainly in patients with acute vascular events [4]. Statin withdrawal could induce a proatherothrombotic state even in patients treated with other antiatherothrombotic agents and cause a related increase in LDL-C [5]. Recent studies have focused on certain natural products that can produce the same lipid changes and positive effects of statins with no side effects [6–9].

In addition to hypercholesterolemia, oxidative stress is closely linked to the progress of atherosclerosis as the excessive formation of reactive species in the arterial endothelial cells may damage vascular smooth muscle cells [10]. The oxidative stress also modifies LDL-C and generates oxidized LDL-C (ox-LDL-C) that is recognized by macrophage scavenger receptors and generate macrophage foam cells, a major cell type found within the fatty streaks [11]. Macrophages activated by ox-LDL-C induce further oxidative stress and contribute to the chronic inflammatory response by secreting pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and interleukins (IL). These cytokines promote the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in endothelial cells and the interaction between monocytes and endothelial cells, resulting in an increase in transmigration of circulating monocytes to the intima [3]. The components associated with native HDL-C such as paraoxonase 1 (PON1) are supposed to reduce peroxides and protect plasma lipoproteins from oxidative modifications, and low PON1 activity has been associated with increased risk of coronary artery disease [12]. Therefore, modulation of the lipoproteins oxidation and inflammation is important targets in the protection against atherosclerosis.

The association between atherosclerosis with oxidative events has led to the hypothesis that dietary antioxidants may inhibit the development of atherosclerosis, by modulating LDL-C oxidation or inflammatory factors

[10, 13, 14]. BIX (Fig. 1) is the main carotenoid responsible for the orange-red color of annatto (*Bixa orellana*) seeds and extracts. This pigment has been used worldwide as a coloring agent in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries [15], being the second most used natural colorant, especially after the use of specific synthetic color additives has been prohibited in several countries [15]. Maximum BIX plasma level in humans is reached 2 h after intake and the complete plasma clearance generally occurs within 8 h [16]. BIX is a very efficient quencher of singlet oxygen; it deactivates the excited triplet state of sensitizers and scavenges reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) such as superoxide radical, peroxy radicals, hypochlorous acid, nitric oxide, and peroxytrite at the  $\mu\text{g/mL}$  level [17, 18]. This ability is most likely linked to its peculiar structure containing 25 carbon atoms, 9 conjugated double bonds, and 2 carboxylic groups, one of which is a methyl ester.

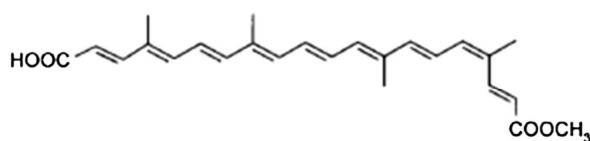
In recent years, several beneficial biological activities of BIX have been reported including the protection against the chromosomal aberrations and glutathione depletion induced by cisplatin [19], the decrease of lipid peroxidation [19, 20], and a hypoglycemic effect [6, 21]. Additionally, toxicological studies corroborate the safety of BIX [22–24].

The BIX effects on cholesterolemia and atherosclerosis have been scarcely evaluated. It has been demonstrated to improve the lipid profile of diabetic rats [6] and hyperlipidemic rabbits [8] but its capacity to prevent the in vivo lipid oxidation associated to atheroma plaques and the anti-atherosclerotic potential of BIX have been not evaluated. The aim of this study was to clarify whether the dietary supplementation with BIX protects against the atherosclerotic lesion in hypercholesterolemic rabbits and to investigate the involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in this effect.

## Materials and methods

### Animals and diets

The experimental procedures in the study were in accordance with guidelines of the Brazilian College of Experimental Animals (COBEA), and the experimental protocol was approved by the Ethics in Animal Use Committee of the Federal University of Santa Maria (protocol number 28/2010). Eight-week-old male New Zealand white rabbits were obtained from the central animal colony of the Federal University of Santa Maria and were housed in individual cages, under a 12:12 h light:dark cycle with access to 50 g chow per kg of body weight per day and water ad libitum.



**Fig. 1** Chemical structure of BIX



After 1 week of adaptation, the rabbits ( $1.89 \pm 0.05$  kg body weight) were randomly divided into seven experimental groups (6 rabbits per group). The control group was fed a standard chow diet (Supra, São Leopoldo, Brazil); the hypercholesterolemic group (vehicle) was fed the standard chow diet enriched with 0.5 % cholesterol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA); BIX 10, BIX 30, and BIX 100 groups were fed the same cholesterol-rich diet concomitantly supplemented with natural BIX (Christian Hansen, Hørsholm, Denmark) at 10, 30, and 100 mg/kg of body weight, respectively; simvastatin group was fed the cholesterol-rich diet concomitantly supplemented with simvastatin 15 mg/kg of body weight. Additionally, the highest dose of BIX (100 mg/kg b.w.) was given to normocholesterolemic rabbits in order to check for any per se effect of BIX. Simvastatin was used as a positive control as it is a standard drug used to control the hypercholesterolemia. The composition of diet is shown in Table 1. Cholesterol, simvastatin, and BIX were dissolved in diethyl ether and sprayed on the standard chow to yield the cholesterol-enriched and BIX-supplemented diets. The standard chow of the control group was sprayed with diethyl ether. The diethyl ether was allowed to evaporate from the chows before being stored under refrigeration and protected from light. Chows were prepared once a week. To ensure that rabbits would intake the amounts of cholesterol and carotenoids defined for each group, feed amount was restricted to 50 g/kg of body weight daily for all groups. This amount of feed has been described as adequate for rabbits [25, 26] and was completely eaten by all animals. Water was supplied ad libitum.

The level of cholesterol treatment was chosen based on a previous study [27] and on a pilot study, which

demonstrated that dietary supplementation with 0.5 % cholesterol for 60 days induced atherosclerotic lesions in rabbits. The BIX concentrations in the diets were based on a previous study [6].

The rabbits were weighed weekly and after 60 days of dietary treatment blood samples were collected from the marginal ear artery of 12-h-fasted rabbits and centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min. Serum was stored at  $-20$  °C until the analysis of lipid profile, PON1 activity, IL-6, and TNF- $\alpha$  level. Aortic tissue between the origin and bifurcation of the iliac arteries was removed, cleaned of gross adventitial tissue, and washed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. Immediately, approximately 0.5 cm of the ascending aorta was removed for histopathological examination. We limited our analyses only to the aortic roots and the arch segment of the aortas, which are known to be the first and the main areas affected by the atherosclerotic lesion [28]. The remaining tissue, which included the aortic root, the distal ascending aorta, and the descending thoracic aorta, was mixed and homogenized with 5 volumes of PBS. One part of the homogenate was used to assess the levels of non-protein thiol groups (NPSH) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Another part of the homogenate was centrifuged at  $3000 \times g$  at 4 °C for 10 min to yield a low-speed supernatant that was used to determine antioxidant enzyme activities.

#### Determination of serum lipid profile and inflammatory markers

Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and HDL-C levels were determined by enzymatic methods using commercial kits (Doles, Goiania-GO, Brazil). Non-HDL-C

**Table 1** Energy and composition of the experimental diets (mean  $\pm$  SE)

	Groups					
	Control	Vehicle	BIX 10	BIX 30	BIX 100	Simvastatin
Energy (Kcal %)	261.0 $\pm$ 3.0	266.5 $\pm$ 3.4	266.4 $\pm$ 2.4	273.9 $\pm$ 1.9	264.7 $\pm$ 4.2	267.4 $\pm$ 2.6
Moisture (%)	9.4 $\pm$ 0.1	8.6 $\pm$ 0.1*	8.7 $\pm$ 0.9*	8.6 $\pm$ 0.1*	8.3 $\pm$ 0.1*	8.6 $\pm$ 0.1*
Protein <sup>a</sup> (%)	13.0 $\pm$ 0.1	13.2 $\pm$ 0.1	13.1 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 0.2	13.8 $\pm$ 0.4	13.3 $\pm$ 0.1
Lipids (%)	7.0 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 0.2	7.5 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 0.7
Ash (%)	15.21 $\pm$ 2.2	13.9 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.6	13.5 $\pm$ 0.1	15.7 $\pm$ 1.0	13.8 $\pm$ 0.2
Crude fiber (%)	18.9 $\pm$ 0.0	18.8 $\pm$ 0.1	18.7 $\pm$ 0.2	18.8 $\pm$ 0.1	18.7 $\pm$ 0.2	18.5 $\pm$ 0.1
Non-fibrous carbohydrates <sup>b</sup> (%)	36.5 $\pm$ 0.5	38.8 $\pm$ 0.4	38.2 $\pm$ 0.7	38.2 $\pm$ 0.2	36.4 $\pm$ 1.1	39.6 $\pm$ 0.5
Cholesterol (%)	–	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Bixin (%)	–	–	0.02	0.06	0.20	0.00

Analyses of the moisture, protein, lipids, crude fiber, and ash were performed in triplicate

<sup>a</sup> Conversion factor used to calculate protein:  $N = 6.25$

<sup>b</sup> Non-fibrous carbohydrates =  $100 - (\text{moisture} + \text{protein} + \text{lipids} + \text{ash} + \text{crude fiber})$

\* Different from control group ( $P < 0.05$ )



was calculated by differences between TC and HDL-C. The atherogenic index was calculated as  $(TC-HDL-C)/IIDL-C$ . Serum TNF- $\alpha$  and IL-6 were measured by ELISA (eBIOSCIENCE<sup>®</sup>, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions.

#### Determination of lipid peroxidation (LPO) levels in aortic tissue

After the addition of 7.2 mM butylated hydroxytoluene to prevent further oxidation, LPO was estimated by the measurement of TBARS using a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane [29].

#### Determination of NPSH levels in aortic tissue

The homogenate fraction was deproteinized with 10 % trichloroacetic acid (1:1 v/v), and NPSH levels were determined as described by Ellman using a standard curve of cysteine [30].

#### Serum PON1 activity

PON1 (EC 3.1.8.1) activity was assessed by measuring the rate of paraoxon hydrolysis to yield p-nitrophenol at 412 nm and 25 °C [27].

#### Antioxidant enzymes in aortic tissue

Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) activity was determined based on its ability to inhibit the auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome at an alkaline pH [31].

Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) activity was determined at 240 nm using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as substrate [32]. The pseudo-first-order reaction constant (*k*) of the decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorption at 25 °C was determined, and the activity was expressed as *k*/mg protein.

Glutathione reductase (GR) (EC 1.8.1.10) activity was determined using oxidized glutathione and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) [33]. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm.

Thioredoxin reductase-1 (TrxR-1) (EC 1.8.1.9) activity was determined using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and NADPH. The method is based on the reduction of DTNB, which is indicated by an increase in absorbance at 412 nm [34].

#### Protein quantification

Protein was measured using bovine serum albumin as the standard [35].

#### Histopathological analysis

Aortic tissue sections were examined by light microscopy as described in a previous study [7]. Briefly, 10 % formalin-fixed aortic segment was embedded in paraffin. Sections (5  $\mu$ m) were obtained with a standard microtome and stained with hematoxylin and eosin. A pathologist blinded to the experimental groups measured the intima layer/media layer ratio, which was used as an index of atherosclerosis [36]. Because the lesions were not uniform, the results of each sample were expressed as the mean of five different measurements along the aortic section.

#### Statistical analysis

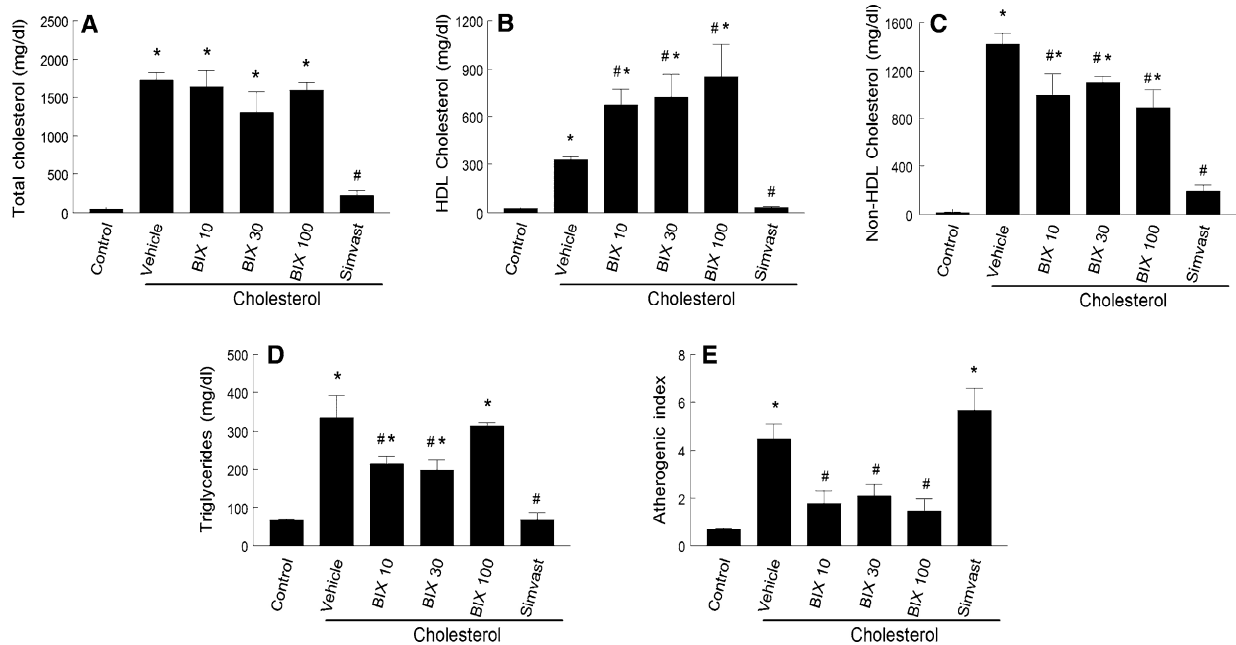
Statistical analyses were performed using the Statistica<sup>®</sup> 9.1 software system (Statsoft Inc., 2004). Data were expressed as mean  $\pm$  standard error (SE). Histopathological analysis did not meet the parametric ANOVA assumptions and were analyzed by nonparametric Kruskal–Wallis ANOVA followed by a multiple comparison test. The remaining data were analyzed using one-way ANOVA followed by post hoc Duncan's test. Results were considered significantly different when  $P < 0.05$ .

## Results

#### Body weight and lipid profile of rabbits

No differences were found among the experimental groups with respect to baseline body weight or lipid profile parameters before the experimental period (data not shown). In addition, no differences were found among the experimental groups with respect to body weight gain during the experimental period (control  $0.85 \pm 0.20$  kg; vehicle  $0.99 \pm 0.15$  kg; BIX10  $1.02 \pm 0.11$  kg; BIX30  $0.97 \pm 0.15$  kg; BIX100  $1.10 \pm 0.17$  kg; simvastatin  $0.94 \pm 0.27$  kg).

The consumption of the cholesterol-enriched diet altered the serum lipid profiles, as shown by the increased TC, HDL-C, non-HDL-C, and TG levels, and atherogenic index in comparison to the control group (Fig. 2,  $P < 0.05$ ). Dietary supplementation with BIX did not change TC levels (Fig. 2a,  $P > 0.05$ ) but all doses of BIX accentuated the increase in HDL-C levels caused by the cholesterol-enriched diet (Fig. 2b,  $P < 0.05$ ). All doses of BIX partially decreased the non-HDL-C levels, whereas BIX 10 and 30 mg/kg partially decreased the TG levels of cholesterol-fed rabbits (Fig. 2c, d,  $P < 0.05$ ). Moreover, all doses of BIX reduced the atherogenic index to the level of the control group (Fig. 2e,  $P < 0.05$ ). Simvastatin treatment completely recovered all lipid changes observed in



**Fig. 2** Total cholesterol (a), HDL-C (b), non-HDL-C (c), triglycerides (d) levels, and atherogenic index (e) in serum from rabbits fed with cholesterol and/or bixin (BIX) enriched diet. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \*Different from control group ( $P < 0.05$ ). #Different from vehicle-cholesterol group ( $P < 0.05$ ). BIX 10

cholesterol-enriched diet plus 10 mg bixin/kg b.w., BIX 30 cholesterol-enriched diet plus 30 mg bixin/kg b.w., BIX100 cholesterol-enriched diet plus 100 mg bixin/kg b.w., SIMVAST cholesterol-enriched diet plus 15 mg simvastatin/kg b.w.

rabbits fed the cholesterol-enriched diet (Fig. 2a–d,  $P < 0.05$ ) but did not reduce the atherogenic index (Fig. 2e). The highest dose of BIX (100 mg/kg b.w.) did not change serum lipid profile in a normocholesterolemic rabbit group (data not shown).

#### Effect of BIX or simvastatin supplementation on atherosclerotic plaque

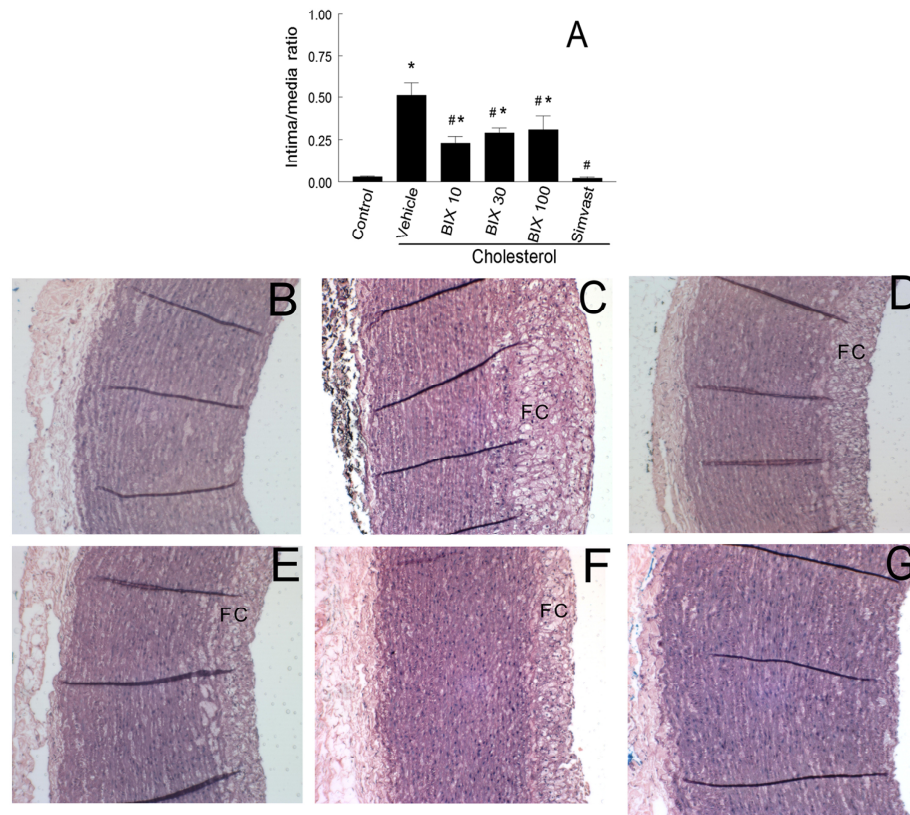
Aortic tissue stained with hematoxylin and eosin was examined by microscopy. In the control group, there was no impairment of the aorta integrity and all layers remained intact (Fig. 3b), whereas all cholesterol-fed groups exhibited atherosclerotic lesions characterized by a significant thickening of the intima layer compared to the control group (Fig. 3a,  $P < 0.05$ ). We also observed clusters of foam cell formation (Fig. 3c–f) due to lipid accumulation and lipid droplets between smooth muscle cells and in the cytoplasm of the intimal cells, confirming that hypercholesterolemia induces atherosclerotic lesions. Dietary supplementation with BIX partially prevented these effects (Fig. 3a, d–f,  $P < 0.05$ ), whereas simvastatin completely restored these changes (Fig. 3g,  $P < 0.05$ ). The highest dose of bixin (100 mg/kg b.w.) caused no histological

changes in the aortic tissue of a normocholesterolemic rabbit group (data not shown).

#### Effect of BIX or simvastatin supplementation on oxidative and inflammatory status and antioxidant enzymes

The hypercholesterolemic diet induced oxidative stress as assessed by the increased levels of TBARS in the aortic tissue compared to the control rabbits (Fig. 4a,  $P < 0.05$ ). NPSH levels were also increased in the aortic tissue of rabbits fed the hypercholesterolemic diet (Fig. 4b,  $P < 0.05$ ). BIX and simvastatin treatment completely prevented the changes in TBARS and NPSH of hypercholesterolemic rabbits (Fig. 4a, b).

The hypercholesterolemic diet increased TNF- $\alpha$  and IL-6 serum levels in comparison to the control group (Fig. 4c, d,  $P < 0.05$ ). This increase in TNF- $\alpha$  level was partially prevented by 10 and 30 mg/kg of BIX and by simvastatin treatment. In addition, 10 mg/kg of BIX and simvastatin treatment partially prevented the changes in IL-6 levels. The highest dose of bixin (100 mg/kg b.w.) had no effect on TBARS, NPSH, TNF- $\alpha$ , or IL-6 in a normocholesterolemic rabbit group (data not shown).



**Fig. 3** Intima layer/media layer ratio (mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ) (a) and representative histology (b–g, magnification of  $\times 100$ ) of aortic arch of rabbits fed cholesterol and/or bixin-enriched diet. In the control group, the architecture of the intima layer is preserved, showing regular endothelial cells and the absence of foam cells (b). In the vehicle-cholesterol group (c), there are high subintimal deposits of foam cells (FC) and evidence of thickening of the aortic arch. In the rabbits that received the cholesterol-enriched diet plus 10 mg BIX/kg b.w. (d), 30 mg BIX/kg b.w. (e) and 100 mg BIX/kg b.w. (f) there is

reduction in the intima layer/media layer ratio indicating the antiatherogenic effect of bixin. The group that received the cholesterol-enriched diet and was treated with simvastatin (g) also had decrease in the intima/media layer ratio. \*Different from control group ( $P < 0.05$ ). #Different from vehicle-cholesterol group ( $P < 0.05$ ). BIX 10 cholesterol-enriched diet plus 10 mg bixin/kg b.w., BIX 30 cholesterol-enriched diet plus 30 mg bixin/kg b.w., BIX 100 cholesterol-enriched diet plus 100 mg bixin/kg b.w., SIMVAST cholesterol-enriched diet plus 15 mg simvastatin/kg b.w.

Compared to the control group, SOD, CAT, GR, and TrxR-1 activities were increased, whereas PON1 activity was decreased in rabbits fed the cholesterol-enriched diet (Fig. 5a–e,  $P < 0.05$ ). Simvastatin treatment restored the changes in SOD, CAT, GR, TrxR-1, and PON-1 activities, whereas all BIX doses completely prevented the changes in SOD, CAT, and TrxR-1 activities caused by the hypercholesterolemic diet (Fig. 5,  $P < 0.05$ ). In addition, 30 and 100 mg/kg of BIX completely prevented the changes in GR activity (Fig. 5c,  $P < 0.05$ ) and 100 mg/kg of BIX partially prevented the changes in PON1 activity in cholesterol-fed rabbits (Fig. 5e,  $P < 0.05$ ). The highest dose of bixin (100 mg/kg b.w.) had no effect on the activity of antioxidant enzymes in a normocholesterolemic rabbit group (data not shown).

## Discussion

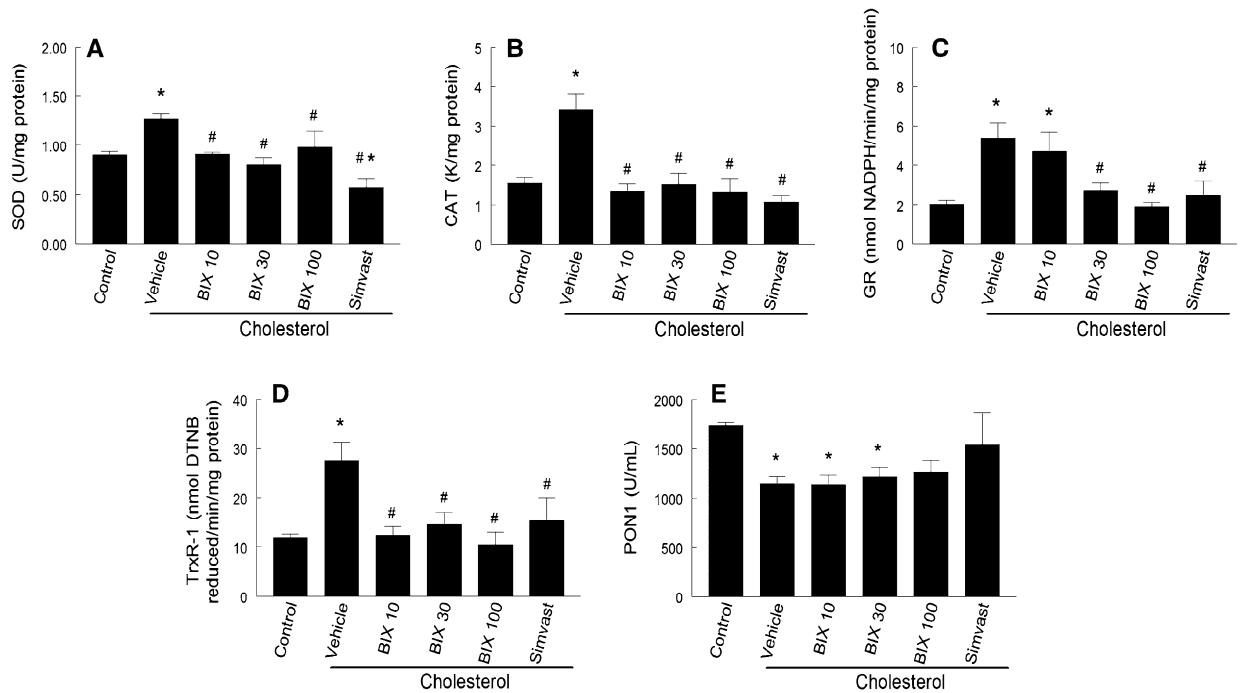
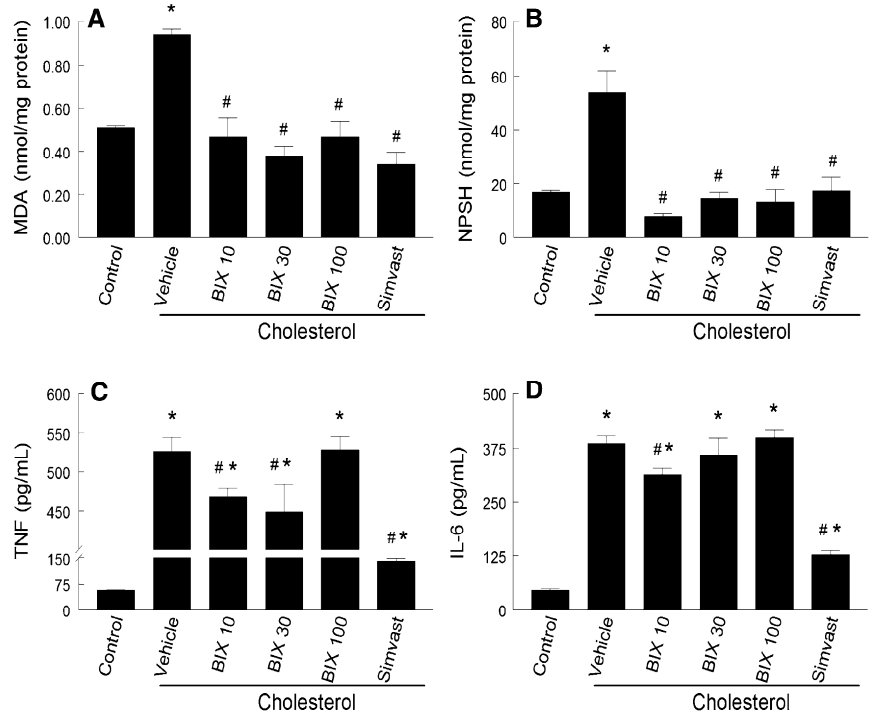
The present study confirmed our initial hypothesis that dietary supplementation with BIX can attenuate atherosclerosis by reducing the oxidative damage and the inflammatory response induced by hypercholesterolemia. Plasma cholesterol levels are strongly associated to the degree of aortic lesion in rabbits and the distribution of atherosclerotic lesion in the rabbit model resembles atherosclerosis in human in certain degree [37]. Accordingly, rabbits receiving a cholesterol-enriched diet for 60 days had hypercholesterolemia that was accompanied by severe atherosclerotic damage characterized by endothelial layer disruption, thickening of the intimal layer, lipid accumulation, and marked foam cell formation.



**Fig. 4** TBARS (a), NPSH (b) levels in the aortic tissue and serum TNF- $\alpha$  (c) and IL-6 (d) levels from rabbits fed a cholesterol and/or BIX enriched diet. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ).

\*Different from control group ( $P < 0.05$ ). #Different from vehicle-cholesterol group ( $P < 0.05$ ).

MDA malondialdehyde, NPSH non-protein thiol groups, TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor, IL-6 interleukin 6, BIX 10 cholesterol-enriched diet plus 10 mg bixin/kg b.w., BIX 30 cholesterol-enriched diet plus 30 mg bixin/kg b.w., BIX 100 cholesterol-enriched diet plus 100 mg bixin/kg b.w., SIMVAST cholesterol-enriched diet plus 15 mg simvastatin/kg b.w.



**Fig. 5** Superoxide dismutase (a), catalase (b), glutathione reductase (c), thioredoxin reductase-1 (d) and paraoxonase-1 (e) activities from aortic tissue of rabbits fed a cholesterol and/or bixin-enriched diet. Data are shown as the means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \*Different from control group ( $P < 0.05$ ). #Different from vehicle-cholesterol group ( $P < 0.05$ ). SOD superoxide dismutase, CAT catalase, GR glutathione

reductase, TrxR thioredoxin reductase-1, PON1 paraoxonase 1, BIX 10 cholesterol-enriched diet plus 10 mg bixin/kg b.w., BIX 30 cholesterol-enriched diet plus 30 mg bixin/kg b.w., BIX 100 cholesterol-enriched diet plus 100 mg bixin/kg b.w., SIMVAST cholesterol-enriched diet plus 15 mg simvastatin/kg b.w.

We showed for the first time that the supplementation of hypercholesterolemic diet with BIX attenuated atherosclerotic lesions. BIX also prevented the increase in non-HDL-C and TG levels of rabbits, which reinforces its ability to reduce the cardiovascular risk. Non-HDL-C, which consists on the major blood carriers of cholesterol, namely VLDL-C and LDL-C, has been shown to translate better the risk of cardiovascular mortality than LDL-C [38]. TG-rich lipoproteins also have a direct atherogenic effect [39]. Although some previous studies have already shown a hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effect of BIX in rabbits [8, 40], none of these studies evaluated the capacity of BIX to prevent the formation of atherosclerotic plaques.

Interestingly, the supplementation with BIX increased serum HDL-C levels of hypercholesterolemic rabbits. A study in Swiss mice on a high-fat diet showed that norbixin, a hydrosoluble analog of BIX that is found in small amounts in annatto seeds, redistributes the cholesterol among lipoprotein particles, resulting in an increase in HDL-C levels and decrease in VLDL/LDL levels [41], which is similar to our findings for BIX. In fact, BIX is possibly metabolized into norbixin as norbixin plasma levels were shown to increase after BIX intake by humans [16] and the expression of cytochrome P450 in HepG cells has been increased by BIX but not by norbixin [42]. The recently demonstrated agonist effect of BIX or norbixin on the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) [43] may increase the expression of lipoprotein lipase and hepatic apolipoprotein A-I and -II, which decrease serum TG in chylomicrons and VLDL-C particles [2], raise HDL-C levels, and promote HDL-C-mediated cholesterol efflux from macrophages by inducing ATP-binding cassette A1 transporter [2]. Thus, it remains to be determined whether this mechanism contributes to the anti-atherosclerotic effects of BIX *in vivo*.

The atherogenic index reflects the relationship between the non-HDL-C and HDL-C fractions and has been shown to be better indicator of the risk of coronary artery disease than the absolute levels of lipids or lipoproteins [44]. In this study, BIX lowered the atherogenic index, which indicates a cardioprotective effect. In fact, it is noteworthy that simvastatin did not decrease the atherogenic index because it did not change HDL-C levels although it caused a great decrease in the non-HDL-C levels.

Accumulating evidence suggests that risk factors for atherosclerosis such as hypercholesterolemia can increase the production of ROS and RNS, that are persistently secreted from activated macrophages or endothelial cells at the artery region [13]. In this study, hypercholesterolemic rabbits had increased LPO in the aortic tissue, which indicates that the free radicals generated by hypercholesterolemia exceeded the endogenous antioxidant defenses.

The lipid and protein oxidation of LDL-C inside the arterial wall is a starting point for the atherogenic process, as the ox-LDL-C can be captured by macrophage scavenger receptors and macrophages are subsequently converted into foam cells, thereby contributing to the formation of atherosclerotic plaques [11]. All BIX doses prevented the increase in LPO in the present study and this antioxidant activity may contribute to the protective effect of BIX against the atherosclerotic lesion as it would avoid endothelial cell injury. The antioxidant activity of BIX has been mainly attributed to its long polyene chain [17] that confers singlet oxygen quenching [45] and free radicals scavenging [14, 17] activities.

The oxidatively modified lipids and their degradation products are believed to have pro-inflammatory, immunogenic, and cytotoxic properties which contribute to the initiation and progression of atherosclerotic lesions [1, 46] as they mediate the recruitment of monocytes and T cells, directly or indirectly, via induction of chemokines and endothelial cell adhesion molecules [3]. In accordance, the increased oxidative stress was accompanied by increased serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in this study and BIX supplementation reduced the changes in inflammatory markers. This anti-inflammatory effect of BIX may also contribute to its antiatherogenic effect as TNF- $\alpha$ , IL-6, and vascular inflammation play an important role in the atherogenesis [46]. The anti-inflammatory response triggered by BIX may be secondary to its antioxidant effect, which would explain the lower efficacy of BIX against the inflammatory response. The anti-inflammatory effect of BIX may also be related to the activation of PPARs as BIX was demonstrated to have agonist actions on PPAR $\alpha$  [43] and PPAR $\gamma$  [47], whose activations are associated with the lowering of inflammatory cytokines and inhibition of macrophage activation [48]. As already described for various other drugs [49], BIX had a hormetic-biphasic dose-response because the highest dose of BIX (100 mg/kg) did not have such anti-inflammatory effect nor did it reduce plasma TG levels. These hormetic responses may be associated to each other as the hepatic NF- $\kappa$ B pathway has been implicated in the production of VLDL-TG in the liver [50].

Hypercholesterolemia induces the overproduction of free radicals, increases mitochondrial respiration, and modifies the antioxidant status [51]. Rabbits fed the high-cholesterol diet had increased enzymatic (SOD, CAT and TrxR-1 activities) and non-enzymatic (NPSH levels) antioxidant defenses, which probably occurred as a defense response to counteract the oxidative stress that was evidenced by the increased LPO in this study. The end product of LPO, 4-hydroxynonenal, activates the nuclear transcription factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) [52] that targets the antioxidant response elements (ARE) in the

nucleus and results in increased expression of phase 2 and antioxidant enzymes, which are crucial for the detoxification of ROS and electrophilic species [14]. Despite this increase in the activity of the endogenous antioxidant system, free radicals generated by hypercholesterolemia probably exceeded the endogenous antioxidant capacity as cholesterol-fed rabbits had atherosclerotic lesions. The changes in the activity of antioxidant enzymes and in the NPSH content observed in the cholesterol-fed rabbits were prevented by BIX treatment. This protective effect is likely related to the antioxidant potential of BIX that would improve the intracellular redox balance resulting in the spare of antioxidant defenses or decrease in the endogenous adaptive response to oxidative stress. This is the first report regarding the protective effects of BIX against changes in the antioxidant defense and inflammatory system in an atherosclerotic model.

In addition to the antioxidant enzymes in the vessel wall, the PON1 that is located on HDL-C is primarily responsible for breaking down lipid peroxides before they can accumulate in LDL-C [53]. The activity of serum PON1 is inversely associated with the risk for atherosclerosis development [12]. Despite its important effects, PON1 is sensitive to oxidative stress and is readily inactivated by oxidants [53]. Accordingly, hypercholesterolemic rabbits showed reduced PON1 activity along with increased LPO and atherosclerotic plaque formation in the present study. BIX protected against the decreased PON1 activity in hypercholesterolemic rabbits, and this is the first report involving this carotenoid and PON1 activity. Because the PON1/HDL-C ratio was not significantly increased by supplementation with 100 mg/kg of BIX ( $2.1 \pm 0.7$ ) in comparison to the non-supplemented hypercholesterolemic rabbits ( $3.5 \pm 0.2$ ), we propose that the effect of BIX on PON1 is confounded by the increase in the number of functional HDL-C particles caused by treatment with 100 mg/kg of BIX. Thus, BIX protection seems to be related to the increase in HDL-C levels, rather than to an antioxidant effect against oxidative stress-induced loss of PON1 activity.

In the present study, simvastatin completely prevented the atherosclerotic damage and this effect was associated to a reduction in the blood lipid levels. This statin inhibits HMG-Coa reductase and results in increased LDL cholesterol uptake by liver cells [2]. BIX and statins seem not share the same mechanism of action as BIX caused a smaller reduction in non-HDL-C levels than simvastatin and it did increase HDL-C levels. This finding may be particularly interesting as withdrawal of statin therapy besides leading to a rapid loss of its protective properties, also [4, 54] induces a pro-oxidant, pro-inflammatory and pro-thrombotic state that is followed by a rebound deterioration in the vasculature and increased risk of acute vascular events [4, 54]. Moreover, in this study, the supplementation of normocholesterolemic rabbits with BIX showed no per-

se effect for this carotenoid, which contrasts with other drugs as an agonist of angiotensin II receptors that has been shown to increase oxidative stress and pro-inflammatory markers in healthy animals, a response that was opposite to that observed in obese animals [55].

The protective effects of BIX against the increased non-HDL-C and triglycerides levels, the atherosclerotic damage and the inflammatory response were lower than those of simvastatin. However, BIX protection against the oxidative stress was similar to that of simvastatin. Furthermore, BIX treatment caused a remarkable increase in the HDL-C levels (about threefold higher) and reduced the atherogenic index of hypercholesterolemic rabbits, whereas simvastatin had no such effects. These results indicate that BIX, which is a natural nontoxic compound that is found in many foods, may contribute to reduce risk factors for coronary artery diseases.

## Conclusion

In conclusion, the results of the present study have demonstrated for the first time that administration of BIX is able to protect against the atherosclerotic lesion induced by a hypercholesterolemic diet. This beneficial effect of BIX is likely due to its anti-inflammatory and antioxidant capacity in addition to the improvement of dyslipidemia. Our findings support a potential role for BIX as a therapeutic agent for the prevention of atherosclerosis and related cardiovascular diseases. In addition, the regular consumption of BIX as food condiment and natural colorant deserves investigation since it could be a promising adjuvant to reduce the risk of coronary artery diseases.

**Acknowledgments** This work was supported by fellowships from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Co-ordination for the Improvement of Higher Education Staff (CAPES) and had financial support from CNPq (475597/2010-9 and 552440/2011-6) and Edital Capes 11/2009 and 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional. The authors thank Christian Hansen Co., Ltd., Denmark, for the kind donation of the BIX product and Doles, Brazil, for the kind donation of biochemical kits.

**Conflict of interest** All authors declare that there are no funding sources, employment, or personal financial competing interests that could influence the position presented in this manuscript. In addition, authors are not aware of any institutional competing interest of any nature or kind.

## References

1. Douglas G, Channon KM (2014) The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine (Baltimore)*. doi:10.1016/j.mpmed.2014.06.011
2. Jamkhande PG, Chandak PG, Dhawale SC et al (2014) Therapeutic approaches to drug targets in atherosclerosis. *Saudi*



- Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc 22:179–190. doi:10.1016/j.jsps.2013.04.005
3. Chávez-Sánchez L, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K et al (2014) Innate immune system cells in atherosclerosis. Arch Med Res 45:1–14. doi:10.1016/j.arcmed.2013.11.007
  4. Pineda A, Cubeddu LX (2011) Statin rebound or withdrawal syndrome: does it exist? Curr Atheroscler Rep 13:23–30. doi:10.1007/s11883-010-0148-x
  5. Puccetti L, Pasqui AL, Scarpini F et al (2011) Statins discontinuation in compliant chronic users induces atherothrombotic profile despite baseline clinical setting and treatments. Int J Cardiol 153:328–329. doi:10.1016/j.ijcard.2011.09.042
  6. Roehrs M, Figueiredo CG, Zanchi MM et al (2014) Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Int J Endocrinol. doi:10.1155/2014/839095
  7. Anandhi R, Thomas PA, Geraldine P (2014) Evaluation of the anti-atherogenic potential of chrysin in Wistar rats. Mol Cell Biochem 385:103–113. doi:10.1007/s11010-013-1819-z
  8. Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ, Pacheco S (2010) Flavonoids and natural urucum dyes on induced hyperlipidemic rabbits. Rev Bras Análises Clínicas 42:69–74
  9. Xu X, Pan J, Zhou X (2014) Amelioration of lipid profile and level of antioxidant activities by epigallocatechin-gallate in a rat model of atherosclerosis. Heart Lung Circ 23:1194–1201. doi:10.1016/j.hlc.2014.05.013
  10. Lönn ME, Dennis JM, Stocker R (2012) Actions of “antioxidants” in the protection against atherosclerosis. Free Radic Biol Med 53:863–884. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.027
  11. Yu X-H, Fu Y-C, Zhang D-W et al (2013) Foam cells in atherosclerosis. Clin Chim Acta 424:245–252. doi:10.1016/j.cca.2013.06.006
  12. Vaisi-Raygani A, Ghaneialvar H, Rahimi Z et al (2011) Paraoxonase Arg 192 allele is an independent risk factor for three-vessel stenosis of coronary artery disease. Mol Biol Rep 38:5421–5428. doi:10.1007/s11033-011-0696-3
  13. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T et al (2014) Antioxidants and human diseases. Clin Chim Acta 436C:332–347. doi:10.1016/j.cca.2014.06.004
  14. Kaulmann A, Bohn T (2014) Carotenoids, inflammation and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. Nutr Res. doi:10.1016/j.nutres.2014.07.010
  15. Giuliano G, Rosati C, Bramley PM (2003) To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. Trends Biotechnol 21:513–516. doi:10.1016/j.tibtech.2003.10.001
  16. Levy LW, Regalado E, Navarrete S, Watkins RH (1997) Bixin and norbixin in human plasma: determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color. Analyst 122:977–980. doi:10.1039/a701304c
  17. Chisté RC, Mercadante AZ, Gomes A et al (2011) In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. Food Chem 127:419–426. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.139
  18. Montenegro MA, de Rios AO, Mercadante AZ et al (2004) Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. J Agric Food Chem 52:367–373. doi:10.1021/jf0349026
  19. Silva CR, Antunes LM, Bianchi ML (2001) Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. Pharmacol Res 43:561–566. doi:10.1006/phrs.2001.0822
  20. Rao MP, Manjunath K, Bhagawati ST, Thippeswamy BS (2014) Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection—preparation, characterisation and in vivo evaluation. Int J Pharm 473:485–492. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.027
  21. Russell KRM, Omoruyi FO, Pascoe KO, Morrison EYSA (2008) Hypoglycaemic activity of *Bixa orellana* extract in the dog. Methods Find Exp Clin Pharmacol 30:301–305. doi:10.1358/mf.2008.30.4.1186073
  22. Barcelos GRM, Angeli JPF, Serpeloni JM et al (2009) Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. Environ Mol Mutagen 50:808–814. doi:10.1002/em.20494
  23. Agner AR, Barbisan LF, Scolastici C, Salvadori DMF (2004) Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. Food Chem Toxicol 42:1687–1693. doi:10.1016/j.fct.2004.06.005
  24. Paumgarten FJR, De-Carvalho RR, Araujo IB et al (2002) Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. Food Chem Toxicol 40:1595–1601. doi:10.1016/S0278-6915(02)00133-3
  25. Tully TN Jr, Tully TN, Mitchell MA (2012) A veterinary Technician’s guide to exotic animal care, 2nd ed. Can Vet J 43:257
  26. Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE (1994) The biology of the laboratory rabbit, 2nd edn. Academic Press, Waltham, p 483
  27. Bolayirli IM, Aslan M, Balci H et al (2007) Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. Life Sci 81:121–127. doi:10.1016/j.lfs.2007.04.027
  28. Haidari M, Ali M, Gangehei L et al (2010) Increased oxidative stress in atherosclerosis predisposed regions of the mouse aorta. Life Sci 87:100–110. doi:10.1016/j.lfs.2010.05.016
  29. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95:351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3
  30. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 82:70–77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6
  31. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 247:3170–3175
  32. Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105:121–126
  33. Carlberg I, Mannervik B (1979) Inhibition of glutathione reductase by interaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate with the active-site dithiol. FEBS Lett 98:263–266. doi:10.1016/0014-5793(79)80196-9
  34. Holmgren A, Björnstedt M (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods Enzymol 252:199–208. doi:10.1016/0076-6879(95)52023-6
  35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275
  36. Augusti PR, Conterato GMM, Somacal S et al (2009) Astaxanthin reduces oxidative stress, but not aortic damage in atherosclerotic rabbits. J Cardiovasc Pharmacol Ther 14:314–322. doi:10.1177/1074248409350136
  37. Buja LM (2014) Nikolai N. Anitschkow and the lipid hypothesis of atherosclerosis. Cardiovasc Pathol 23:183–184. doi:10.1016/j.carpath.2013.12.004
  38. Pereira T (2012) Dyslipidemia and cardiovascular risk: lipid ratios as risk factors for cardiovascular disease. In: Kelishadi R (ed) Dyslipidemia—from prev. to treat. InTech, Rijeka, pp 279–302
  39. Song S, Ovbiagele B (2009) Management of risk factors for accelerated atherosclerosis. Curr Treat Options Neurol 11:460–472. doi:10.1007/s11940-009-0050-4
  40. Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ et al (2008) Therapeutic action and innocuity on the metabolism of quercetin, bixin and norbixin in rabbits hyperlipidemics. Tecnol Ciência Agropecuária 2:51–56
  41. Santos AA, Silva MV, Guerreiro LT et al (2002) Influence of norbixin on plasma cholesterol-associated lipoproteins, plasma arylesterase/paraoxonase activity and hepatic lipid peroxidation

- of Swiss mice on a high fat diet. *Food Chem* 77:393–399. doi:10.1016/S0308-8146(01)00363-6
42. Matuo MC, Takamoto RTO, Kikuchi IS, Pinto TJA (2013) Effect of bixin and norbixin on the expression of cytochrome P450 in HepG2 cell line. *Cell Biol Int* 37:843–848. doi:10.1002/cbin.10108
  43. Goto T, Takahashi N, Kato S et al (2012) Bixin activates PPAR $\alpha$  and improves obesity-induced abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in mice. *J Agric Food Chem* 60:11952–11958. doi:10.1021/jf303639f
  44. Eliasson B, Cederholm J, Eeg-Olofsson K et al (2011) Clinical usefulness of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in type 2 diabetes: a report from the Swedish National Diabetes Register. *Diabetes Care* 34:2095–2100. doi:10.2337/dc11-0209
  45. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 274:532–538. doi:10.1016/0003-9861(89)90467-0
  46. Van Diepen JA, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN (2013) Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 228:306–315. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.028
  47. Takahashi N, Goto T, Taimatsu A et al (2009) Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR $\gamma$  activation. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1372–1376. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.162
  48. Choi J-M, Bothwell ALM (2012) The nuclear receptor PPARs are important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Mol Cells* 33:217–222. doi:10.1007/s10059-012-2297-y
  49. Calabrese EJ (2008) Hormesis and medicine. *Br J Clin Pharmacol* 66:594–617. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03243.x
  50. Van Diepen JA, Wong MC, Guigas B et al (2011) Hepatocyte-specific IKK- $\beta$  activation enhances VLDL-triglyceride production in APOE\*3-Leiden mice. *J Lipid Res* 52:942–950. doi:10.1194/jlr.M010405
  51. Thiruchenduran M, Vijayan NA, Sawaminathan JK, Devaraj SN (2011) Protective effect of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Cardiovasc Pathol* 20:361–368. doi:10.1016/j.carpath.2010.09.002
  52. Ishii T, Itoh K, Ruiz E et al (2004) Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res* 94:609–616. doi:10.1161/01.RES.0000119171.44657.45
  53. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S et al (1999) Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 26:892–904. doi:10.1016/S0891-5849(98)00272-X
  54. Sposito AC, Carvalho LSF, Cintra RMR et al (2009) Rebound inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction after simvastatin withdrawal. *Atherosclerosis* 207:191–194. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.008
  55. Sabuhi R, Ali Q, Asghar M et al (2011) Role of the angiotensin II AT2 receptor in inflammation and oxidative stress: opposing effects in lean and obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F700–F706. doi:10.1152/ajprenal.00616.2010



2.2 MANUSCRITO 1

**BIXIN PROTECTS MACROPHAGE CELLS AGAINST oxLDL-INDUCED  
CYTOTOXICITY AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION: INVOLVEMENT OF Nrf2  
AND NF- $\kappa$ B PATHWAYS**

Sabrina Somacal, Luana CS da Silva, Jade de Oliveira, Marcos R Stralotto, Andreza F  
de Bem, Tatiana Emanuelli

Manuscrito submetido ao periódico:  
Journal of Functional Foods

Bixin protects macrophage cells against oxLDL-induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction: Involvement of Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways

Running head: Anti-atherogenic mechanisms of bixin

Sabrina Somacal<sup>1</sup>, Luana Caroline Schüler da Silva<sup>2</sup>, Jade de Oliveira<sup>2</sup>, Marcos Raniel Stralio<sup>2</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>2</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program on Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-9003, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

\*Corresponding author. Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil; Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353.

E-mail address: [tatiana.emanuelli@ufsm.com](mailto:tatiana.emanuelli@ufsm.com) (Tatiana Emanuelli).

## Abstract

The accumulation of oxidized LDL (oxLDL) and its toxicity in the arterial wall have been implicated in atherosclerosis. This study was aimed to investigate the mechanisms underlying the protective effect of bixin on Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation and oxLDL-mediated effects in J774A.1 macrophage cells. Bixin effects were compared to the cardioprotective carotenoid lycopene. Bixin was more potent (5-6-fold) than lycopene to inhibit the oxidation of LDL isolated from humans. Bixin pretreatment reduced atherogenic signaling triggered by oxLDL in macrophages, namely the generation of reactive oxygen and nitrogen species, disturbance of nitric oxide homeostasis, mitochondrial dysfunction and foam cell formation. The redox signaling effects of bixin were accompanied by upregulation of Nrf2 and downregulation of NF-κB pathways. Lycopene was as protective as bixin except that it did not prevent mitochondrial dysfunction. The relatively strong performance of bixin makes it an ideal candidate for further trials as a new nutraceutical compound for preventing atherosclerotic lesion.

**Keywords:** Atherosclerosis, Inflammation; oxLDL; Carotenoids; Lycopene, High-resolution respirometry.

## 1. Introduction

Atherosclerosis is a leading cause of cardiovascular disease (CVD) (Grundy et al., 2014). It is a progressive disorder characterized by the proliferation of smooth muscle cells (SMCs) and accumulation of lipids in the arterial wall, leading to macrophage foam cell formation (Tabas, García-Cardena, & Owens, 2015). Oxidative modifications of low-density lipoprotein (LDL) play a pivotal role in the development of atherosclerosis (Steinberg & Witztum, 2010). Vascular oxidative stress enhances the generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) by endothelial cells, SMCs, and macrophages, leading to LDL oxidation and its subsequent uptake by macrophages (Salvayre, Negre-Salvayre, & Camaré, 2016). Macrophages taking up oxidized LDL (oxLDL) increase the production of inflammatory mediators, such as cytokines, proteases, ROS and RNS, metalloproteinases (MMPs) and other factors through oxidative sensitive signaling pathways (Tabas et al., 2015). The balance between the generation of pro-oxidants and the levels of antioxidants in the vessel wall plays a significant role in the pathogenesis of atherosclerosis (Lönn, Dennis, & Stocker, 2012). In this context, lipid soluble dietary antioxidants have been shown to be incorporated into LDL structure reducing its susceptibility to be oxidized (Fernández-García et al., 2012).

Diets rich in carotenoid-containing fruits and vegetables have been associated with reduced risk of chronic diseases (Kaulmann & Bohn, 2014). Among lipid soluble pigments, lycopene is one of the major carotenoids found in Western diets (Fernández-García et al., 2012). Epidemiological studies have associated high lycopene intake with reduced incidence of CVD (Mordente et al., 2011), whereas serum lycopene levels are inversely related to intimal wall thickness or lesions in the carotid artery, suggesting that lycopene may protect against atherosclerosis (Rissanen et al., 2003). Lycopene protective effects have been attributed to its

antioxidant properties (Erdman, Ford, & Lindshield, 2009). Lycopene has been demonstrated to protect LDL from oxidation *in vitro*, whereas the intake of lycopene-containing foods increased the resistance of LDL to oxidation *in vivo* (Abete et al., 2013).

Bixin is a lipophilic carotenoid obtained from the seeds of tropical annatto plant *Bixa orellana*. Bixin has an excellent safety record (Ulbricht et al., 2012), it is approved by FDA as a natural food colorant (Code of Federal Regulations Title 21, Section 73.30), and has established systemic bioavailability and pharmacokinetic profile upon oral administration (Levy, Regalado, Navarrete, & Watkins, 1997; Tao, Park, de la Vega, Zhang, & Wondrak, 2015). Bixin is among the most effective carotenoids to remove singlet molecular-oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), superoxide anion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), nitric oxide ( $^{\bullet}\text{NO}$ ), and other reactive species (Chisté et al., 2011; Di Mascio, Devasagayam, Kaiser, & Sies, 1990; Rios, Antunes, & Bianchi, 2009) and could potentially protect cells and tissues against oxidative damage. Moreover, bixin protection against glutathione (GSH) depletion and lipid peroxidation as well as its anti-carcinogenic effects (Anantharaman et al., 2016; Rao, Manjunath, Bhagawati, & Thippeswamy, 2014; Tao et al., 2015) were recently associated to the nuclear translocation of Nrf2 (nuclear factor-E2-related factor 2) triggering Nrf2-dependent signaling (Tao et al., 2015). This redox-sensitive transcription factor orchestrates major cellular defense mechanisms including phase-II detoxification, inflammatory signaling, DNA repair, and antioxidant response and is a promising molecular target for pharmacological prevention of several human pathologies (Mimura & Itoh, 2015).

We have recently demonstrated that bixin supplementation attenuates atherosclerotic lesions in rabbits through anti-inflammatory and antioxidant mechanisms (Somacal et al., 2015). Bixin also improved lipid profile in animal models of atherosclerosis (Somacal et al., 2015) and diabetes (Roehrs et al., 2014). Such effects may be related to its agonist action on PPAR- $\gamma$

and PPAR- $\alpha$  receptors that regulate adipogenesis and fatty acid oxidation (Goto et al., 2012; Takahashi et al., 2009).

The present study was carried out to further elucidate cellular and molecular mechanisms implicated in bixin protection against atherosclerotic damage and compare bixin effects to lycopene, which has already emerged as a cardioprotective carotenoid. We have investigated whether bixin protects against the oxidation of isolated human LDL and foam cell formation *in vitro*, which are early events that play a major role in atherogenesis. In addition, we evaluated the molecular pathways implicated in the antiatherogenic effects of bixin in J774A.1 macrophage cells exposed to oxLDL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Bixin was obtained from Christian-Hansen (Hørsholm, Denmark) and lycopene from Galena (São Paulo, Brazil). Bixin and lycopene were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), which was used as control/vehicle and whose concentration in cell culture assays did not exceed 0.05%. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### 2.2. Human LDL isolation

The study was approved by the Ethic Committee of Federal University of Santa Catarina (n° 943/10, FR 363814). LDL was isolated from fresh human plasma by discontinuous density-

gradient ultracentrifugation as previously described (Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, & Demacker PN, 1992). Protein concentration was determined (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) and LDL were stored at -20°C no longer than 2 weeks.

### 2.3. LDL oxidation assay

Lipid and protein oxidation of LDL were assessed by conjugated diene formation and LDL-tryptophan (TrP) fluorescence, respectively. LDL samples (50 µg protein/mL) were pre-incubated for 10 min at 37°C in a medium containing 10 mM phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and different concentrations of bixin (0 – 7.5 µM) or lycopene (0 – 40 µM).

#### 2.3.1. Measurement of conjugated diene formation

After pre-incubation with carotenoids, CuSO<sub>4</sub> (10 µM) was added to the reaction medium and absorbance was monitored at 234 nm during 390 min to assess conjugated diene production (Esterbauer, Striegl, Puhl, & Rotheneder, 1989). The duration of the lag phase (min) was determined as the intercept between the time axis and the tangent of the slope of the absorbance curve in propagation phase. The oxidation rate (V<sub>max</sub>) was obtained from the slope of the absorbance curve during the propagation phase (Giese & Esterbauer, 1994).

#### 2.3.2. Measurement of LDL-tryptophan (TrP) fluorescence

After pre-incubation with carotenoids, CuSO<sub>4</sub> (3.3 µM) was added to the reaction medium and Trp fluorescence was measured at different time points (0–390 min) using a fluorimetric microplate reader (excitation at 282 nm and emission at 331 nm). The time (min) required for

half maximal reduction in Trp fluorescence ( $T_{max}/2$ ) was calculated and used to monitor  $Cu^{2+}$ -induced apolipoprotein LDL oxidation (Giessauf A, Steiner E, & Esterbauer H, 1995). The characteristic fluorescence spectra of native LDL displays a single band centered at approximately 332 nm, which has been assigned to the Trp residues in apolipoprotein B-100 (ApoB-100) and is lost upon apolipoprotein oxidation (Giessauf A et al., 1995; Reyftmann et al., 1990).

## 2.4. Cell culture assays

### 2.4.1. Cell culture and oxLDL preparation

Murine J774A.1 macrophage cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and maintained at subconfluence in a 5%  $CO_2$  humidified atmosphere at 37°C. The medium used for routine subculture was DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 10% FBS. Cells were subcultured at confluence (70–80%) and used between the 5<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> passages. Cell exposure to bixin, lycopene and/or oxLDL was carried out in the same medium except that FBS was omitted.

LDL isolated samples (1 mg of protein/mL) were incubated with 10  $\mu$ M  $CuSO_4$  for 16 h at 37°C, to produce oxLDL. Then, 10  $\mu$ M EDTA was added and samples were dialyzed against PBS (148 mM, pH 7.4) for 24 h at 4°C. LDL oxidation was checked by assessing conjugated diene levels and oxLDL preparation was stored at -20°C not longer than 2 weeks.



#### 2.4.2. Cell viability assay

Macrophages were seeded in 96-well plates ( $1.2 \times 10^4$  cells/well) and pretreated with bixin, lycopene or vehicle for 24 h. Then, cell viability was measured at 550 nm by the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, which assesses the activity of labile mitochondrial dehydrogenases (Mosmann, 1983). Results were expressed as a percentage of control (non-treated cells) absorbance.

#### 2.4.3. Measurement of reactive oxygen species (ROS) production

Intracellular ROS production was detected using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) that permeates the cell, where it is hydrolyzed by cellular esterases and reacts with intracellular ROS to form the fluorescent product 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (Wang & Joseph, 1999). To evaluate the antioxidant protective effect of bixin and lycopene against ROS production induced by oxLDL, macrophage cells were plated into 24-well plates at equal density ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) and were pretreated for 1 h or 24 h with vehicle, bixin (0.03-0.3  $\mu$ M) or lycopene (0.001-0.1  $\mu$ M) at 37°C. Thereafter, the carotenoid-containing medium was removed and cells were washed and replaced with Hank's balanced salt solution (HBSS) consisting of 136 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.4 mM KCl, 10 mM HEPES and 9 mM glucose (pH 7.4), containing 10  $\mu$ M DCFH-DA. Cells were then exposed to oxLDL (100  $\mu$ g/mL) and the time course of ROS production was immediately evaluated at 37°C for 60 min with 485 nm excitation and 520 nm emission, using a fluorescence plate reader. Results were expressed as the intensity of fluorescence (arbitrary units) and the oxidation rate was calculated.

#### 2.4.4. Dihydrorhodamine (DHR) oxidation

DHR oxidation is widely used to measure peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) production *in vitro* as this fluorescent probe reacts with peroxynitrite-derived free radicals but not with O<sub>2</sub><sup>-</sup> or <sup>•</sup>NO directly (Radi, Peluffo, Alvarez, Naviliat, & Cayota, 2001; Wrona, Patel, & Wardman, 2005). Macrophage cells were grown in 24-well culture plates at equal density ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) and pretreated with vehicle, bixin (0.03-0.3  $\mu$ M) or lycopene (0.001-01  $\mu$ M) for 1 h or 24 h. Carotenoid-containing medium was removed and cells were washed and replaced with Dulbecco's phosphate-buffered solution (dPBS) consisting of 137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.7 mM KCl, and 1.45 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), supplemented with 5.6 mM glucose and 1 mM L-arginine, containing 10  $\mu$ M DHR. Cells were then exposed to oxLDL (100  $\mu$ g/mL) and the detection of rhodamine 123, an oxidation product of DHR, was immediately followed at 37°C for 60 min at 485 nm excitation and 525 nm and 590 nm emission in a fluorescence plate reader. Results were expressed as the intensity of fluorescence (arbitrary units) and the DHR oxidation rate was calculated.

#### 2.4.5. High-resolution respirometry of intact cells

Mitochondrial function was assessed using an Oroboros Oxygraph-O<sub>2</sub>K respirometer according to a standard protocol provided by the manufacturer. Macrophage cells were pretreated with vehicle, bixin (0.03  $\mu$ M) or lycopene (0.003  $\mu$ M) for 24 h followed by exposure to oxLDL (100  $\mu$ g/mL) for 24 h. After the exposure period, cells were harvested and spun at 1200  $x g$  for 3 min and resuspended in DMEM without FBS ( $5.0 \times 10^5$  cells/mL) for measurement of O<sub>2</sub> consumption of intact cells in the closed (2 mL) respirometer chamber.

The experimental regime started with routine respiration, which is defined as respiration in cell-culture medium without additional substrates or effectors. After measuring routine

respiratory flux, ATP synthase was inhibited with oligomycin (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in order to estimate the amount of the oxygen consumption coupled to ATP synthesis. Next, 100 nM carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, a mitochondrial uncoupler) was added to determine the maximal oxygen consumption that cells can sustain. After FCCP titration, the electron transport chain of oxidative phosphorylation was stopped/blocked by antimycin A (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and the oxygen flow rate detected in this condition was defined as extra-mitochondrial oxygen consumption. DatLab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) was used for data acquisition and analysis. Respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio between the maximal oxygen consumption (FCCP) and leak respiration (oxygen consumption after adding oligomycin). The ATP-linked  $\text{O}_2$  consumption, i.e. coupled respiration was calculated as the routine respiratory flux minus leak respiration. Reserve capacity was calculated as the maximal oxygen consumption rate minus routine respiratory rate. Cellular respiration was quantified in terms of oxygen flux ( $JO_2$ ) based on the rate of change of the  $\text{O}_2$  concentration in the chambers. ATP-linked  $\text{O}_2$  consumption and reserve capacity were expressed as a percentage of control (vehicle-treated cells).

#### 2.4.6. Cellular reduced glutathione (GSH) levels

Macrophage cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) were cultured in 24-well plates and pre-incubated with vehicle, bixin (0.03  $\mu\text{M}$ ) or lycopene (0.003  $\mu\text{M}$ ) for 24 h and then stimulated with oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for additional 24 h. Intracellular levels of GSH were determined using the fluorescent probe o-phthalaldehyde at 350nm excitation and 420 nm (Hissin & Hilf, 1976). The amount of GSH was calculated from a standard curve of reduced glutathione and adjusted with cellular protein content measured by the Lowry assay (Lowry et al., 1951).

#### 2.4.7. Nitrite assay

Macrophages were cultured in 24-well plates ( $2.5 \times 10^5$  cells/well), pre-incubated with vehicle, bixin ( $0.03 \mu\text{M}$ ) or lycopene ( $0.003 \mu\text{M}$ ) for 24 h and then oxLDL ( $100 \mu\text{g}$  protein/mL) was added and cells were incubated for additional 24 h. The supernatants were collected to quantify nitrite levels at 540 nm after Griess reaction (Schulz, Kerber, & Kelm, 1999). The amount of nitrite ( $\mu\text{M}$ ) was calculated from a standard curve using freshly prepared sodium nitrite in culture medium. Nitrite was used as an estimate of  $\cdot\text{NO}$  level as it is produced during the oxidative metabolism of  $\cdot\text{NO}$ .

#### 2.4.8. iNOS protein expression

The expression of iNOS was evaluated by western blot analysis. Macrophages ( $5.0 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 6-well plates and then pre-incubated with vehicle, bixin ( $0.03 \mu\text{M}$ ) or lycopene ( $0.003 \mu\text{M}$ ) for 24 h, followed by stimulation with oxLDL ( $100 \text{ mg}$  protein/mL) for additional 24 h. Cells were washed twice with  $1 \times \text{PBS}$  and harvested in  $200 \mu\text{l}$  of ice-cold lysis buffer ( $50 \text{ mM}$  Tris-HCl pH 7.5,  $1\%$  Triton X-100,  $100 \text{ mM}$  NaCl,  $5 \text{ mM}$  EDTA pH 8.0,  $40 \text{ mM}$   $\beta$ -glycerophosphate,  $50 \text{ mM}$  NaF,  $200 \mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $5\%$  glycerol and protease inhibitors) followed by sonication for 45 s. The samples were centrifuged at  $13,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 45 min, and the supernatant was collected for protein measurement (Lowry et al., 1951). Fifty micrograms of protein extract were subjected to  $7.5\%$  SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes. After membrane blocking ( $5\%$  low-fat dried milk in TBS for 1 h) membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (1:1000; sc-8310, Santa Cruz Biotechnology, USA) or mouse polyclonal anti- $\beta$ -actin (1:2500; sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, USA). Membranes were probed with HRP-conjugated secondary antibodies and revealed using the

ECL system (GE Healthcare). Membranes were scanned using ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Band intensity was quantified with Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and normalized with respect to  $\beta$ -actin bands.

#### 2.4.9. Nrf2 and NF- $\kappa$ B protein expression

Macrophages ( $5.0 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 6-well plates and then pre-incubated with vehicle, bixin (0.03  $\mu$ M) or lycopene (0.003  $\mu$ M) for 24 h, followed by stimulation with oxLDL (100 mg protein/mL) for additional 24 h. Cells were washed twice with  $1 \times$  PBS and harvested in 200  $\mu$ L of cold buffer A, consisting of 10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100 and protease inhibitor and left on ice for 15 min. Then, cell lysates were centrifuged at 15,000  $\times$  g at 4°C for 30 min and supernatants was collected (cytoplasmic fraction). The pellets were homogenized in cold buffer B, consisting of 20 mM Hepes (pH 7.9), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 25% glycerol and protease inhibitor. Then, samples were sonicated, centrifuged at 15,000  $\times$  g at 4°C for 30 min and the supernatant (nuclear fraction) was collected for protein measurement (Lowry et al., 1951). Electrophoresis and western blot were performed as in section 2.5.8, except that 12% SDS/PAGE was used and membranes were incubated with polyclonal rabbit anti-Nrf2 antibody (1:250; sc-722, Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-NF- $\kappa$ B antibody (1:100; sc-166588, Santa Cruz Biotechnology), mouse polyclonal anti- $\beta$ -actin (1:2500; sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, USA) or mouse monoclonal anti-PCNA (1:200; sc-56, Santa Cruz Biotechnology, USA). Band intensity was normalized with respect to  $\beta$ -actin (cytoplasmic fraction) or PCNA (nuclear fraction) bands.

#### 2.4.10. Foam cell formation assay

Macrophages ( $3.0 \times 10^5$  cells/well) plated in coverslip in 12-well plates were pretreated with vehicle, bixin ( $0.03 \mu\text{M}$ ) or lycopene ( $0.003 \mu\text{M}$ ) for 24 h, and thereafter stimulated with oxLDL ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) for additional 3 h. After oxLDL incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.3% Oil Red O for 10 min (Koopman, Schaart, & Hesselink, 2001). Hematoxylin was used as counterstaining. Cell images were acquired using a light microscopy (Olympus) with oil immersion objective (1000 x). Ten images were captured from each group, the total pixels intensity was determined using NIH Image J 1.36b imaging software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and lipid content was expressed as optical density (OD).

#### 2.5. Statistical analysis

Results are presented as means  $\pm$  SEM. GSH, nitrite, respirometry and western blot data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test when appropriate. The remaining data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test (only for MTT data) or Tukey's test (other data). Linear regression was performed to identify concentration-dependent effects. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the Statistica® 9.1 software system (Statsoft Inc., 2004).

### 3. Results

#### 3.1. Bixin is more potent than lycopene to inhibit LDL oxidation

Incubating native human LDL with  $\text{Cu}^{2+}$  resulted in the oxidation of LDL polyunsaturated fatty acids as indicated by the formation of conjugated diene (Fig. 1). The kinetic profile of the oxidation was characterized by an initial lag phase followed by a propagation phase, where the rate of conjugated diene formation was maximal, and then by a decomposition phase. Bixin and lycopene inhibited  $\text{Cu}^{2+}$ -induced lipid oxidation of isolated LDL (Fig. 1A and B). Bixin in the range of 2.5-7.5  $\mu\text{M}$  (Fig 1C) and lycopene in the range 10-40  $\mu\text{M}$  (Fig 1D) increased the lag phase of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation ( $p < 0.05$ ) and the effect was concentration-dependent for both compounds (bixin:  $r^2 = 0.979$ ,  $p < 0.005$ ; lycopene:  $r^2 = 0.985$ ,  $p < 0.005$ ; Fig 1A and 1B Supplementary). Additionally, bixin 0.5-5  $\mu\text{M}$  (Fig 1E) and lycopene 10-30  $\mu\text{M}$  (Fig 1F) decreased the oxidation rate –  $V_{\text{max}}$  ( $p < 0.05$ ) and this effect was also concentration-dependent for both compounds (bixin:  $r^2 = -0.96$ ,  $p < 0.05$ ; lycopene:  $r^2 = -0.96$ ,  $p < 0.05$ ; Fig 1C and 1D Supplementary).  $\text{Cu}^{2+}$ -induced lipid LDL oxidation was almost completely abolished in the presence of 7.5  $\mu\text{M}$  bixin and 40  $\mu\text{M}$  lycopene during an assay time of 390 min (Fig 1A and 1B, respectively).

In addition to lipid oxidation, the exposure of LDL to  $\text{Cu}^{2+}$  also triggered protein oxidation, which was assessed as the loss of tryptophan fluorescence (Fig. 2). Bixin and lycopene inhibited the loss of tryptophan fluorescence (Fig. 2A and D). The time required to decline 50% of tryptophan fluorescence ( $T_{\text{max}}/2$ ) was increased in the presence of 0.1-2.5  $\mu\text{M}$  bixin (Fig. 2C) and 10-20  $\mu\text{M}$  lycopene (Fig. 2F) and completely inhibited in the presence of 5-7.5  $\mu\text{M}$  bixin (Fig. 2C) and 30-40  $\mu\text{M}$  lycopene (Fig. 2F) within 390 min ( $p < 0.05$ ). This effect was

concentration-dependent for both carotenoids (bixin:  $r^2=0.974$ ,  $p<0.001$ ; lycopene:  $r^2=0.989$ ,  $p<0.001$ ; Fig 2B and 2E, respectively). It is noteworthy, that bixin was 5-times more potent than lycopene to completely inhibit LDL-lipid oxidation and 6-times more potent than lycopene to completely inhibit LDL-protein oxidation.

### 3.2. Bixin is less toxic to macrophage cells than lycopene

To evaluate the beneficial effects of bixin or lycopene on oxLDL-mediated toxicity in macrophage cells, we first determined the appropriate non-toxic concentration of bixin or lycopene to be used in the study. Thus, a 24- h concentration-response study was conducted by exposing cells to bixin (0.03–30  $\mu\text{M}$ ) or lycopene (0.001–3  $\mu\text{M}$ ). Both carotenoids caused a concentration-dependent decline in the metabolic ability to reduce MTT, with significant effects being detected at concentrations equal to or higher than 1  $\mu\text{M}$  bixin (Fig 3A) and 0.03  $\mu\text{M}$  lycopene (Fig 3B), respectively ( $p<0.05$ ). Thus, lycopene was ~30-fold more toxic to macrophage cells than bixin.

Based on these results, subsequent cell culture studies were conducted at maximal concentrations of 0.3  $\mu\text{M}$  for bixin and 0.01  $\mu\text{M}$  for lycopene, which did not induce loss of cell viability within 24 h.



### 3.3. Bixin and lycopene prevent the generation of oxidative species triggered by oxLDL in macrophage cells

Besides being involved in the formation of oxLDL, intracellular RS generation plays a key role in the cytotoxic effects of oxLDL (Salvayre et al., 2016). The intracellular fluorescent probes DCF-DA and DHR were used to assess the time course of ROS and RNS production in macrophage cells exposed to oxLDL. Exposure of macrophage cells to oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) induced linear ROS generation up to 60 min (data not shown), and the pretreatment of cells with bixin (0.03-0.1  $\mu\text{M}$ ) or lycopene (0.001-0.01  $\mu\text{M}$ ) for 24 h efficiently reduced intracellular ROS production ( $p < 0.05$ ; Fig 4A). However, pretreatment of cells with carotenoids for 1 h had no effect (data not show).

RNS such as  $\text{ONOO}^-$ , have a significant role in the nitroxidation of biomolecules, acting especially in mitochondria (Bem et al., 2013; Pacher, Beckman, & Liaudet, 2007). Exposure of macrophage cells to oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) also triggered the production of  $\text{ONOO}^-$ -derived radicals assessed by DHR oxidation (Fig 4B). Rhodamine formation after oxLDL-exposure was not prevented by pretreatment of cells with bixin and lycopene concentrations for 1 h (data not show). However, pretreatment of cells with carotenoids for 24 h had effect ( $p < 0.05$ , Fig. 4B), demonstrating that these compounds can prevent DHR oxidation by secondary radicals derived from  $\text{ONOO}^-$  at very low concentrations.

Based on these results, the pretreatment for 24 h with 0.03  $\mu\text{M}$  bixin or 0.003  $\mu\text{M}$  lycopene was chosen to investigate their protective mechanisms against the cytotoxic effects of oxLDL in macrophages, as described below.

### 3.4. Bixin prevents oxLDL-induced mitochondrial dysfunction

OxLDL impairs various aspects of cellular function, including mitochondrial respiratory activity and ROS generation (Hill et al., 2012). High-resolution respirometry (Oroboros) allowed the detection of small changes in O<sub>2</sub> flux in the electron transport system coupled or not to ATP synthesis. Initially, O<sub>2</sub> consumption rates were measured in intact macrophage cells treated or not with oxLDL (100 µg/mL) (Fig. 4C). A decrease in baseline and maximum respiration was observed after 24 h incubation with oxLDL (Fig 4C). Oligomycin-inhibited respiration represents O<sub>2</sub> consumption uncoupled to ATP synthesis, leak respiration, and incubation with oxLDL increase this parameter, only bixin prevent it (data not show). ATP-coupled respiration was significantly reduced by oxLDL (Fig. 4D and F), indicating a possible inefficiency in ATP synthesis; only BIX prevented this effect. RCR, which reflects the efficiency of mitochondrial respiration, coupled or not to ATP synthesis was not changed by carotenoids or oxLDL exposure (data not show). When the proton ionophore FCCP is added to cells, it dissipates the proton gradient and mitochondrial oxygen flow is maintained at a maximum rate; this maximum respiratory capacity minus the routine respiration is the potential cellular reserve capacity. OxLDL exposure promoted a significant decrease in reserve capacity of macrophages, and bixin or lycopene pre-treatment did not modify this parameter (Fig 4E and 4G, P <0.05). Bixin or lycopene *per se* did not change any mitochondrial parameters evaluated in this study.

### 3.5. Bixin increase GSH levels and activate Nrf2 in macrophage cells

To elucidate the mechanisms underlining the protective effects of bixin and lycopene, we investigated carotenoids' effect on macrophage GSH levels and the activation of the Nrf2 pathway. Pre-treatment with bixin (0.03  $\mu\text{M}$ ) and lycopene (0.003  $\mu\text{M}$ ) for 24 h increased GSH content of macrophage cells ( $P < 0.05$ , Fig 5A and 5B). Exposure to oxLDL significantly decreased intracellular GSH content and only pre-incubation of macrophages with bixin partially prevent such effect ( $p < 0.05$ ).

Nuclear levels of Nrf2 protein, which is a key transcription factor that regulates the expression of antioxidant/phase II detoxifying enzymes, were strongly increased in macrophage cells treated only with bixin or lycopene for 24 h (Fig. 5C-F). Exposure to oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h also activated Nrf2 in macrophage cells, as observed by increased nuclear expression of Nrf2 protein ( $p < 0.05$ ) and this effect was partially prevented by pre-treatment with bixin or lycopene ( $p < 0.05$ ; Fig 5C-F).

### 3.6. Bixin and lycopene block NO production and NF- $\kappa\text{B}$ activation triggered by oxLDL

iNOS mediates the excessive  $\cdot\text{NO}$  synthesis under inflammatory conditions (Radi et al., 2001). Exposure to oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) increased protein expression of iNOS with consequent increase in  $\cdot\text{NO}$  levels in macrophages ( $p < 0.05$ ) and such effects were prevented by pretreatment with bixin or lycopene ( $p < 0.05$ , Fig. 6). Macrophage exposure to oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h also activated NF- $\kappa\text{B}$ , as observed by the increased expression of

nuclear NF- $\kappa$ B protein ( $p < 0.05$ ) and pre-treatment with bixin or lycopene partially prevented nuclear translocation of NF- $\kappa$ B protein (Fig 7A-D).

### 3.7. Bixin and lycopene reduced oxLDL-induced foam cells formation

Exposure of macrophages to oxLDL (100  $\mu\text{g/mL}$ ) resulted in oxLDL uptake and consequent foam cell formation assessed by the increased intracellular lipid content ( $p < 0.05$ ) and this event was blocked by pretreatment with bixin (0.03  $\mu\text{M}$ ) or lycopene (0.003  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0.05$ ; Fig.8).

## 4. Discussion

We have demonstrated that bixin, like lycopene, modulate intracellular antioxidant and anti-inflammatory signalling pathways, which are capable of preventing oxLDL-induced cytotoxicity in macrophages. Our data unveil mechanisms that may be involved in the anti-atherogenic properties of these carotenoids.

Oxidation of LDL lipids is initiated by the removal of a hydrogen atom from a methylene group of LDL polyunsaturated fatty acids (PUFAs) yielding a carbon centered radical that is unstable and undergoes molecular rearrangement to form more stable configuration, a CD (Young & McEneny, 2001). Thereafter, CD reacts with molecular oxygen to form peroxy radical that further abstracts hydrogen atom from an adjacent PUFAs propagating the lipid oxidation chain reaction (Salvayre et al., 2016). In the present study, bixin prevented  $\text{Cu}^{2+}$ -induced lipid peroxidation of human LDL in a concentration-dependent manner by decreasing

the formation of CD, thus extending the lag phase and lowering the oxidation rate. The lag phase indicates the intrinsic resistance of LDL to oxidation and is widely used to evaluate putative antiatherogenic compounds (Giese & Esterbauer, 1994; Steinberg & Witztum, 2010).

In addition to preventing lipid peroxidation of LDL, bixin also prevented protein oxidation of LDL. Oxidation of ApoB-100, which can be monitored by the loss of Trp fluorescence, alters its conformation and facilitates the recognition of oxLDL by scavenger receptors, that uptake oxLDL into macrophage, fundamental step in the pathogenesis of atherosclerosis (Steinberg & Witztum, 2010). The protective effect on LDL oxidation triggered by bixin can be related to its ability to remove peroxy radicals (Rodrigues et al., 2012). The long polyene chain is responsible for the direct free radical scavenging properties of bixin (Chisté et al., 2011; Di Mascio et al., 1990). The direct antioxidant effect of bixin against lipid and protein LDL oxidation occurred at concentrations 5- to 6-fold lower than those required for lycopene.

Accumulation of oxLDL in the arterial wall, and the recruitment of monocytes to the subendothelial space are known to be the main early events in the development of atherosclerosis (Steinberg & Witztum, 2010). oxLDL increases the production of intracellular  $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and  $\text{ONOO}^-$  in monocyte U937-derived macrophages (Deng, Xu, Zhang, & Zheng, 2008). These reactive species, which can be generated by multiple pathways, including NADPH-oxidase activation, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and mitochondrial uncoupling and dysfunction (Siti et al., 2015), can in turn stimulate pro-inflammatory pathways and apoptotic events (Libby, Ridker, & Hansson, 2011). In the present study, bixin efficiently decreased oxLDL-induced intracellular ROS/RNS generation in macrophages, which is in agreement with our recent evidence that bixin prevents oxidative stress in the aortic tissue (Somacal et al., 2015).

The decrease in the oxLDL-induced ROS/RNS production promoted by bixin and lycopene cannot be attributed to direct removal of ROS/RNS as the pretreatment of macrophages with carotenoids for 1 h (data not shown) was unable to prevent such effects. Thus, the intracellular antioxidant effect of bixin and lycopene as well as the inhibition of foam cell formation triggered by these carotenoids could be due to their ability to activate the transcription factor Nrf2, and consequently increase GSH content observed in this study. This transcription factor binds to the antioxidant responsive elements (ARE) and accelerates the transcription of genes that are involved in glutathione synthesis, detoxification enzymes and those directly involved with the amelioration of oxidative stress (Mimura & Itoh, 2015). Bixin promotes an effective Nrf2 nuclear translocation in the skin through interaction with critical Cys-151 sensor residue in Keap 1, a protein that anchors Nrf2 in the cytoplasm. The nuclear translocation of Nrf2 induced by bixin in the skin resulted gene expression of gamma-glutamylcysteine synthetase (GGCS), the enzyme responsible by GSH synthesis (Tao et al., 2015), and this effect could explain the increase in the GSH intracellular content here observed.

ROS and RNS may lead to mitochondrial dysfunction characterized by inhibition of mitochondrial respiration and strong decrease in cellular adenosine-5'-triphosphate (ATP) levels (Hill et al., 2012). Damaged mitochondria, in turn enhance the production of  $O_2^{\bullet-}$ , which rapidly reacts with  $\cdot NO$  and increases the formation of ONOO- (Szabó, Ischiropoulos, & Radi, 2007). Cell survival can be compromised by opening the mitochondrial permeability transition pore or activating the mitochondrial pathways of apoptosis (Szabó et al., 2007). High-resolution real-time respirometry assay in intact cells allows detailed investigation of mitochondrial bioenergetics (Hill et al., 2012). Exposure to oxLDL reduced macrophage consumption of  $O_2$  coupled to ATP synthesis and respiratory capacity, leading a strong impact on cellular bioenergetics. Reduced ATP-linked  $O_2$  consumption indicates a low ATP demand, a lack of substrate availability, or severe damage to the electron transport chain, which

impede the flow of electrons and result in lower O<sub>2</sub> consumption (Hill et al., 2012). Moreover, there is increased leak respiration, which was observed in our study and can be attributed in part, to intramitochondrial ROS generation, which amplifies the phenomenon of mitochondrial dysfunction.

The reduced mitochondrial reserve capacity of macrophages exposed to oxLDL, indicates impairment in cell ability to increase energy demand required to counteract oxidative stress or other cell insult. Cell can therefore enter in apoptosis through mitochondrial signaling (Asmis & Begley, 2003), collaborating with foam cell formation. Exposure of bovine aortic endothelial cells (BAEC) to oxLDL has been recently demonstrated to causes mitochondrial dysfunction, characterized by reduced reserve capacity and decreased O<sub>2</sub> consumption associated with ATP synthesis (Hort et al., 2014), but this is the first study demonstrating that oxLDL also causes mitochondrial dysfunction in macrophages.

Bixin but not lycopene prevented oxLDL-mediated mitochondrial dysfunction, by oxygen consumption coupled to ATP synthesis. Bixin ability to modulate the antioxidant response and improve redox balance through the activation of the Nrf2 pathway and subsequent increase in GSH synthesis may protect mitochondrial proteins and other biomolecules from oxidative damage.

$\cdot\text{NO}$  is known to counteract the atherogenic process by mediating vasorelaxation, reducing vascular smooth muscle cell proliferation, and decreasing platelet aggregation (Pacher et al., 2007). However, excess  $\cdot\text{NO}$  may react with O<sub>2</sub> $\cdot^-$  to form ONOO<sup>-</sup>, a biologically relevant oxidizing and nitrating agent (Radi et al., 2001; Szabó et al., 2007). oxLDL has been recently demonstrated to cause disturbances of  $\cdot\text{NO}$  homeostasis in macrophages (Stralio et al., 2013). Bixin and lycopene prevented the increase in iNOS protein expression,  $\cdot\text{NO}$  and ONOO<sup>-</sup> levels caused by macrophage exposure to oxLDL. Other carotenoids,  $\beta$ -carotene and

astaxanthin, have been also shown to inhibit  $\cdot\text{NO}$  production and decrease iNOS expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) (Bai et al., 2005; Lee et al., 2003). Moreover, such effect probably occurs *in vivo* as Roehrs and colleagues (2014) showed that bixin reduced  $\cdot\text{NO}$  serum levels in diabetic rats and this effect was correlated with a decrease in protein oxidation mediated by ONOO<sup>-</sup> (Roehrs et al., 2014).

NF- $\kappa$ B is a redox-sensitive transcription factor that triggers the expression of proinflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, and CD36 receptor (Siti et al., 2015). The interaction between NF- $\kappa$ B and the inhibitory protein I $\kappa$ B is regulated by redox-sensitive protein kinases that contain several cysteine residues (Karin et al., 2001). Data from macrophages exposed to minimally oxidized LDL (mmLDL) and LPS revealed that the cooperative engagement of NF- $\kappa$ B results in additive/synergistic increased transcription of inflammatory cytokines within atherosclerotic lesions (Wiesner et al., 2010). Here, we showed that the exposure of macrophages to oxLDL increased ROS/RNS and consequently lead to the activation of NF- $\kappa$ B, promoting its translocation to the nucleus, whereas bixin and lycopene blocked nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. In agreement, bixin and lycopene also prevented oxLDL-induced increase in iNOS expression and  $\cdot\text{NO}$  levels, inflammatory mediators that are upregulated by NF- $\kappa$ B activation. Additionally, we recently demonstrated bixin treatment also prevents the increase in TNF- $\alpha$  and IL-6, other inflammatory mediators triggered by the activation of NF- $\kappa$ B, in hypercholesterolemic rabbits (Somacal et al., 2015). Other carotenoids have also been demonstrated to inhibit the production of inflammatory mediators by blocking nuclear translocation of NF- $\kappa$ B through its inhibitory effect on IKK activity and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation/phosphorylation, probably due to its antioxidant activity (Bai et al., 2005; Lee et al., 2003). We propose that this anti-inflammatory effect of bixin is secondary to the activation of the Nrf2 pathway as Nrf2 upregulation has been demonstrated



to attenuate NF- $\kappa$ B-controlled signaling by increasing cell redox balance and decreasing ROS generation (Li et al., 2008).

Macrophage uptake of oxLDL occurs through different cell surface receptors, particularly CD36, which results in cytotoxicity, stimulation of cholesterol accumulation and, hence, in foam cell formation, which is the hallmark of early atherosclerotic lesions (Hansson & Libby, 2006). The expression of CD36 receptor is not down-regulated by intracellular cholesterol levels, and it is increased in atherosclerotic lesions because of autoregulation by components of the oxLDL particles, particularly lipoperoxides (Libby et al., 2011; Tabas et al., 2015). Moreover, it is well established that ROS-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B upregulates CD36 receptor expression (Rios et al., 2012). In this study, we demonstrated that bixin efficiently decreased oxLDL uptake and consequent foam cell formation. We propose that this effect is related with bixin ability to decrease LDL oxidation and NF- $\kappa$ B activation, with consequent decrease in the expression of CD36, resulting in less uptake of oxLDL by macrophages. Decreased foam cell formation is expected to prevent or delay the atherogenic process. Accordingly, we have recently demonstrated that bixin reduces the extent of atherosclerotic plaques in hypercholesterolemic rabbits (Somacal et al., 2015).

Recent studies have shown an inverse relationship between the intake of tomatoes and/or lycopene and the incidence of atherosclerosis and CVD (Abete et al., 2013; Mordente et al., 2011). Because lycopene is an efficient antioxidant (Di Mascio et al., 1990; Erdman et al., 2009), it has been proposed that this property may be responsible for its cardiovascular beneficial effects. Our results show that bixin was more potent than lycopene to increase LDL resistance to oxidation and both carotenoids inhibited intracellular ROS and RNS production triggered by oxLDL in macrophage cells.

We revealed novel molecular targets for the anti-atherogenic effects of bixin and lycopene. Both bixin and lycopene prevented foam cell formation and modulated macrophage antioxidant response through increased in Nrf2 nuclear expression, although only bixin increase GSH levels. Also, these carotenoids reduced, the inflammatory response through changes in nuclear expression of NF- $\kappa$ B, iNOS expression and  $\cdot$ NO levels. It is noteworthy however, that only bixin prevented mitochondrial dysfunction and this result suggest that bixin ability to protect the mitochondria is dependent of GSH levels. It should be noted that this was the first study evaluating the effect of carotenoids on mitochondrial dysfunction in macrophages exposed to oxLDL. Modulation of antioxidant and anti-inflammatory events contributed to the reduction of the formation of foam cells *in vitro*.

## 6. Conclusion

Taken together, the effects of bixin and lycopene presented here are possibly related to their antioxidant properties. Bixin was more potent than lycopene to directly inhibit lipid and protein oxidation of human LDL. In addition, both carotenoids reduced oxLDL-induced cytotoxicity, macrophage uptake of oxLDL and foam cell formation. We propose that the down-regulation of oxLDL-mediated free radical generation that was triggered in part by the activation of Nrf2 signaling pathway is responsible for blocking NF- $\kappa$ B activation and foam cell formation. These new insights on the direct antioxidant effect of bixin and lycopene in LDL and on the mechanisms involved in macrophage protection against the toxicity of oxLDL are relevant to develop new therapeutic or nutritional approaches to prevent and treat atherosclerosis.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by fellowships from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Co-ordination for the Improvement of Higher Education Staff (CAPES) and had financial support from CNPq (552440/2011-6) and Edital Capes 11/2009 and 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional. The authors thank Christian Hansen Co., Ltd., Denmark, for the kind donation of bixin.

## References

- Abete, I., Perez-Cornago, A., Navas-Carretero, S., Bondia-Pons, I., Zulet, M. A., & Martinez, J. A. (2013). A regular lycopene enriched tomato sauce consumption influences antioxidant status of healthy young-subjects: A crossover study. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 28–35.
- Anantharaman, A., Hemachandran, H., Mohan, S., Ayyathan, D. M., D, T. K., C, G. P. D., & Siva, R. (2016). Induction of apoptosis by apocarotenoids in B16 melanoma cells through ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway. *Journal of Functional Foods*, 20, 346–357.
- Asmis, R., & Begley, J. G. (2003). Oxidized LDL promotes peroxide-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: A caspase-3-independent pathway. *Circulation Research*, 92(1), 20e–29.

- Bai, S.-K., Lee, S.-J., Na, H.-J., Ha, K.-S., Han, J.-A., Lee, H., ... Kim, Y.-M. (2005).  $\beta$ -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- $\kappa$ B activation. *Experimental & Molecular Medicine*, 37(4), 323–334.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483–495.
- Bem, A. F. de, Fiuza, B., Calcerrada, P., Brito, P. M., Peluffo, G., Dinis, T. C. P., ... Almeida, L. M. (2013). Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A comparison with ebselen. *Nitric Oxide*, 31, 20–30.
- Chisté, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., & Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127(2), 419–26.
- Deng, T., Xu, K., Zhang, L., & Zheng, X. (2008). Dynamic determination of Ox-LDL-induced oxidative/nitrosative stress in single macrophage by using fluorescent probes. *Cell Biology International*, 32(11), 1425–1432.
- Di Mascio, P., Devasagayam, T. P., Kaiser, S., & Sies, H. (1990). Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Society Transactions*, 18(6), 1054–6.
- Erdman, J. W., Ford, N. A., & Lindshield, B. L. (2009). Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 229–235.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., & Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research*

Communications, 6(1), 67–75.

- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2), 438–450.
- Giese, S. P., & Esterbauer, H. (1994). Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Letters*, 343(3), 188–194.
- Giessauf A, Steiner E, & Esterbauer H. (1995). Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1256(2), 221–32.
- Goto, T., Takahashi, N., Kato, S., Kim, Y.-I., Kusudo, T., Taimatsu, A., ... Kawada, T. (2012). Bixin activates PPAR $\alpha$  and improves obesity-induced abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 11952–8.
- Grundey, S. M., Arai, H., Barter, P., Bersot, T. P., Betteridge, D. J., Carmena, R., ... Zhao, D. (2014). An international atherosclerosis society position paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia - Full report. *Journal of Clinical Lipidology*, 8(1), 29–60.
- Hansson, G. K.; Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 6(7), 508–519.
- Hill, B. G., Benavides, G. A., Lancaster, J. R., Ballinger, S., Dell'Italia, L., Zhang, J., & Darley-Usmar, V. M. (2012). Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological Chemistry*, 393(12), 1485–1512.

- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226.
- Hort, M. A., Straliootto, M. R., de Oliveira, J., Amoêdo, N. D., da Rocha, J. B. T., Galina, A., ... de Bem, A. F. (2014). Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. *Biochimie*, 105, 172–181.
- Karin, M., Takahashi, T., Kapahi, P., Delhase, M., Chen, Y., Makris, C., ... Li, N. (2001). Oxidative stress and gene expression: The AP-1 and NF- $\kappa$ B connections. *BioFactors*, 15(2-4), 87–89.
- Kaulmann, A., & Bohn, T. (2014). Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, 34(11), 907–929.
- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, & Demacker PN. (1992). Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clinical Chemistry*, 10(38), 2066–2072.
- Koopman, R., Schaart, G., & Hesselink, M. K. (2001). Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochemistry and Cell Biology*, 116(1), 63–8.
- Lee, S.-J., Bai, S.-K., Lee, K.-S., Namkoong, S., Na, H.-J., Ha, K.-S., ... Kim, Y.-M. (2003). Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I $\kappa$ B Kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Molecules and Cells*, 16(1), 97–105.

- Levy, L. W., Regalado, E., Navarrete, S., & Watkins, R. H. (1997). Bixin and norbixin in human plasma: determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color. *The Analyst*, 122(9), 977–980.
- Li, W., Khor, T. O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W.-S., Yu, S., & Kong, A.-N. (2008). Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFκB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), 1485–1489.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317–25.
- Lönn, M. E., Dennis, J. M., & Stocker, R. (2012). Actions of “antioxidants” in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(4), 863–84.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–75.
- Mimura, J., & Itoh, K. (2015). Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 88, 221–232.
- Mordente, A., Guantario, B., Meucci, E., Silvestrini, A., Lombardi, E., Martorana, G. E., ... Böhm, V. (2011). Lycopene and cardiovascular diseases: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 18(8), 1146–63.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424.

- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333(1), 19–39.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., & Cayota, A. (2001). Unraveling peroxy-nitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(5), 463–488.
- Rao, M. P., Manjunath, K., Bhagawati, S. T., & Thippeswamy, B. S. (2014). Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection - Preparation, characterisation and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1-2), 485–92.
- Reyftmann, J.-P., Santus, R., Mazière, J.-C., Morlière, P., Salmon, S., Candide, C., ... Haigle, J. (1990). Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid auto-oxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1042(2), 159–167.
- Rios, A. de O., Antunes, L. M. G., & Bianchi, M. de L. P. (2009). Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. *Food Chemistry*, 113(4), 1113–1118.
- Rios, F. J. O., Koga, M. M., Ferracini, M., Jancar, S., Hansson, G., Robertson, A., ... Schmittgen, T. (2012). Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. *PLoS ONE*, 7(5), e36632.
- Rissanen, T. H., Voutilainen, S., Nyyssönen, K., Salonen, R., Kaplan, G. A., & Salonen, J. T. (2003). Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(1), 133–8.
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R., Chisté, R.C., Mercadante, A.Z. (2012). Development of a novel



- micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 135(3), 2103–2111.
- Roehrs, M., Figueiredo, C. G., Zanchi, M. M., Bochi, G. V., Moresco, R. N., Quatrin, A., ... Emanuelli, T. (2014). Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 1–10.
- Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., & Camaré, C. (2016). Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie*, 125, 281–296.
- Schulz, K., Kerber, S., & Kelm, M. (1999). Reevaluation of the griess method for determining no/no–2 in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide*, 3(3), 225–234.
- Seppo, L., Lähteenmäki, T., Tikkanen, M. J., Vanhanen, H., Korpela, R., & Vapaatalo, H. (2005). Effects of vitamin E on the toxicity of oxidized LDL on endothelial cells in vitro in smokers vs nonsmokers on diets rich in fish. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(11), 1282–1290.
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, 71(2015), 40–56.
- Somacal, S., Figueiredo, C. G., Quatrin, A., Ruviaro, A. R., Conte, L., Augusti, P. R., ... Emanuelli, T. (2015). The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 403(1-2), 243–253.
- Steinberg, D., & Witztum, J. L. (2010). Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2311–6.

- Straliootto, M. R., Hort, M. A., Fiuza, B., Rocha, J. B. T., Farina, M., Chiabrando, G., & de Bem, A. F. (2013). Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling. *Biochimie*, 95(8), 1544–1551.
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(8), 662–680.
- Tabas, I., García-Cardena, G., & Owens, G. K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *Journal of Cell Biology*, 209(1), 13–22.
- Takahashi, N., Goto, T., Taimatsu, A., Egawa, K., Katoh, S., Kusudo, T., ... Kawada, T. (2009). Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPARgamma activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(4), 1372–6.
- Tao, S., Park, S. L., de la Vega, M. R., Zhang, D. D., & Wondrak, G. T. (2015). Systemic administration of the apocarotenoid bixin protects skin against solar UV-induced damage through activation of NRF2. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 690–700.
- Ulbricht, C., Windsor, R. C., Brigham, A., Bryan, J. K., Conquer, J., Costa, D., ... Weissner, W. (2012). An evidence-based systematic review of annatto ( *Bixa orellana* L.) by the natural standard research collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, 9(1), 57–77.
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5), 612–616.
- Wiesner, P., Choi, S.-H., Almazan, F., Benner, C., Huang, W., Diehl, C. J., ... Miller, Y. I. (2010). Low doses of lipopolysaccharide and minimally oxidized low-density lipoprotein cooperatively activate macrophages via nuclear factor B and activator protein-1: Possible mechanism for acceleration of atherosclerosis by subclinical endotoxemia. *Circulation*

Research, 107(1), 56–65.

Wrona, M., Patel, K., & Wardman, P. (2005). Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(2), 262–270.

Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 358–62.

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=73.30>

### Figure captions

Fig. 1 – Bixin (A, C, E) is more potent than lycopene (B, D, F) to prevent  $\text{Cu}^{2+}$ -induced lipid peroxidation in isolated human LDL. Representative profile of conjugated dienes (CDs) formation (A-B), lag phase (C-D) and oxidation rate (E-F) of CD formation. In panels A-B, numbers over the lines indicate carotenoid concentration ( $\mu\text{M}$ ). Data from panels C-F are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Bars that have no common letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).  $> 390$  min indicate a lag phase higher than the duration of the assay. BIX: bixin; LYC: lycopene.

Fig. 2 – Bixin (A-C) is more potent than lycopene (D-F) to prevent  $\text{Cu}^{2+}$ -induced tryptophan oxidation in isolated human LDL. Representative profile of the loss of tryptophan fluorescence (A and D); average values (C and F) and linear regression (B and E) for the time required for half-maximal reduction in tryptophan fluorescence ( $T_{\text{max}/2}$ ). In panels A and D, data are percentage of emission intensity before  $\text{Cu}^{2+}$  addition and numbers under the lines indicate carotenoid concentration ( $\mu\text{M}$ ). Data from panels B-C and E-F are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Bars that have no common letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).  $> 390$  min indicate a lag phase higher than the duration of the assay. BIX: bixin; LYC: lycopene.

Fig. 3 – Effect of bixin (A) and lycopene (B) on viability of macrophage cells determined by MTT assay. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments.

\*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). BIX: bixin; LYC: lycopene.

Fig 4 – Bixin and lycopene decrease the intracellular production of ROS (A), RNS (B) but only bixin prevents mitochondrial dysfunction (C-G) induced by macrophage exposure to oxLDL. Representative record of oxygen flow in macrophage cells exposed or not to oxLDL for 24 h (C). Arrows in panel C show the steps in the titration regime, inducing the following respiratory states: Routine, routine state in cell culture medium; oligomycin (1 mg/mL), inhibition of ATP synthase; and FCCP (100 nM per injection), maximal stimulation by uncoupling of oxidative phosphorylation in subsequent titrations of FCCP. ATP-linked O<sub>2</sub> consumption (i.e., coupled respiration = routine respiration - leak respiration) (D and F). Reserve capacity (maximal respiratory consumption rate - routine respiratory rate) (E and G). Each bar represents the mean ± SEM of three independent experiments. Bars that have no common letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). BIX: bixin; LYC: lycopene.

Fig 5 – Effect of bixin (A) and lycopene (B) on cellular GSH content and protein expression of Nrf2 (C-F) in macrophages exposed to oxLDL. Representative Western blot analysis of cytoplasmic and nuclear expression of Nrf2 (C, bixin; D, lycopene) and quantification of bands for the nuclear fraction of Nrf2 (E, bixin; F, lycopene).  $\beta$ -Actin was used to normalize data from cytoplasmic fraction and PCNA for nuclear fraction. Data are mean ± SEM of least three independent experiments. Bars that have no common letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). BIX: bixin; LYC: lycopene.

Fig 6 – Bixin and lycopene prevent oxLDL-induced nitrite production (A and B) and protein expression of iNOS (C-F) in macrophages. Representative Western blot analysis of iNOS expression (C-D) and band quantification (E-F).  $\beta$ -Actin was used to normalize data. Results

are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Bars that have no common letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). BIX: bixin; LYC: lycopene.

Fig 7 – Bixin and lycopene prevent the activation of NF- $\kappa$ B in macrophages exposed to oxLDL. Representative Western blot analysis of NF- $\kappa$ B cytoplasmic and nuclear expression (A, bixin; B, lycopene) and band quantification (C and D).  $\beta$ -Actin was used to normalize data for cytoplasmic fraction and PCNA for nuclear fraction. Results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Bars that have no common letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). BIX: bixin; LYC: lycopene.

Fig 8 – Bixin and lycopene inhibit foam cell formation induced by exposure of macrophages to oxLDL. Representative images of Oil Red O staining in macrophage (magnification 100 x) [A, control macrophages; B, macrophages incubated with oxLDL (100  $\mu$ g/mL); C, macrophages pretreated with bixin (0.03  $\mu$ M) or D, lycopene (0.003  $\mu$ M) for 24 h and further incubated with oxLDL (100  $\mu$ g/mL)]. Quantification of intracellular lipid content (optical density) (E). In panel E results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Bars with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ). BIX: bixin; LYC: lycopene.

Supplementary material

Fig S1 – Linear regression of lag phase and  $V_{\max}$  was used in order to verify the concentration-dependent effects of bixin (A and C) and lycopene (B and D). BIX: bixin; LYC: lycopene.

## Figures

Fig 1

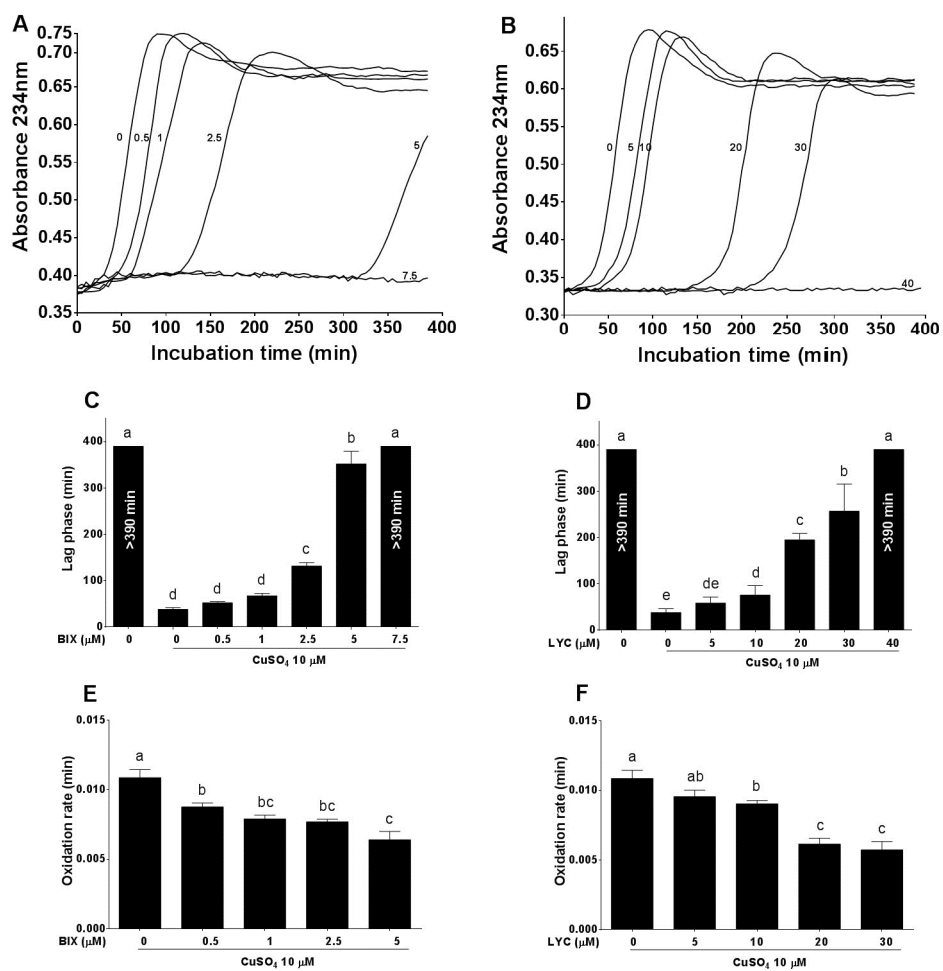


Fig 2

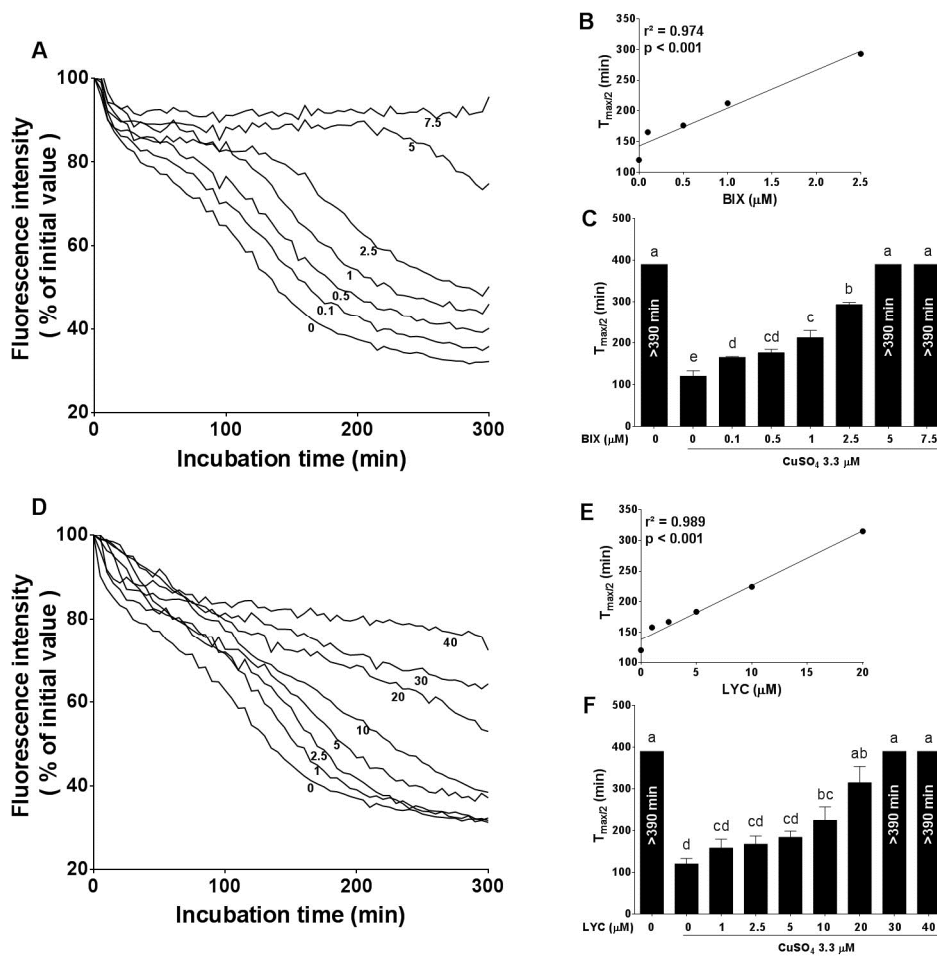


Fig. 3

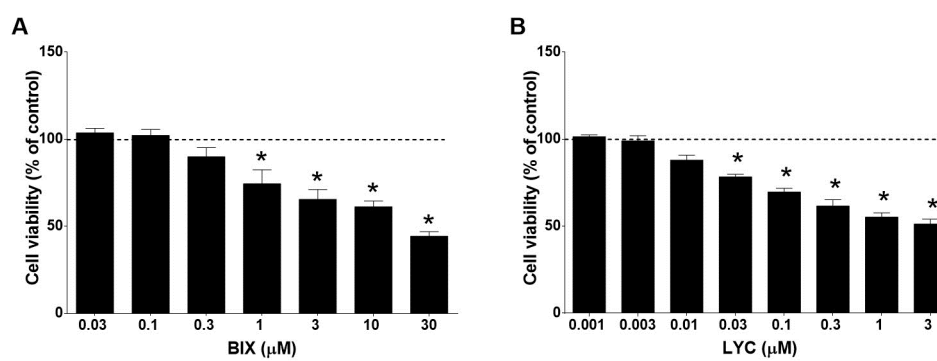




Fig 4

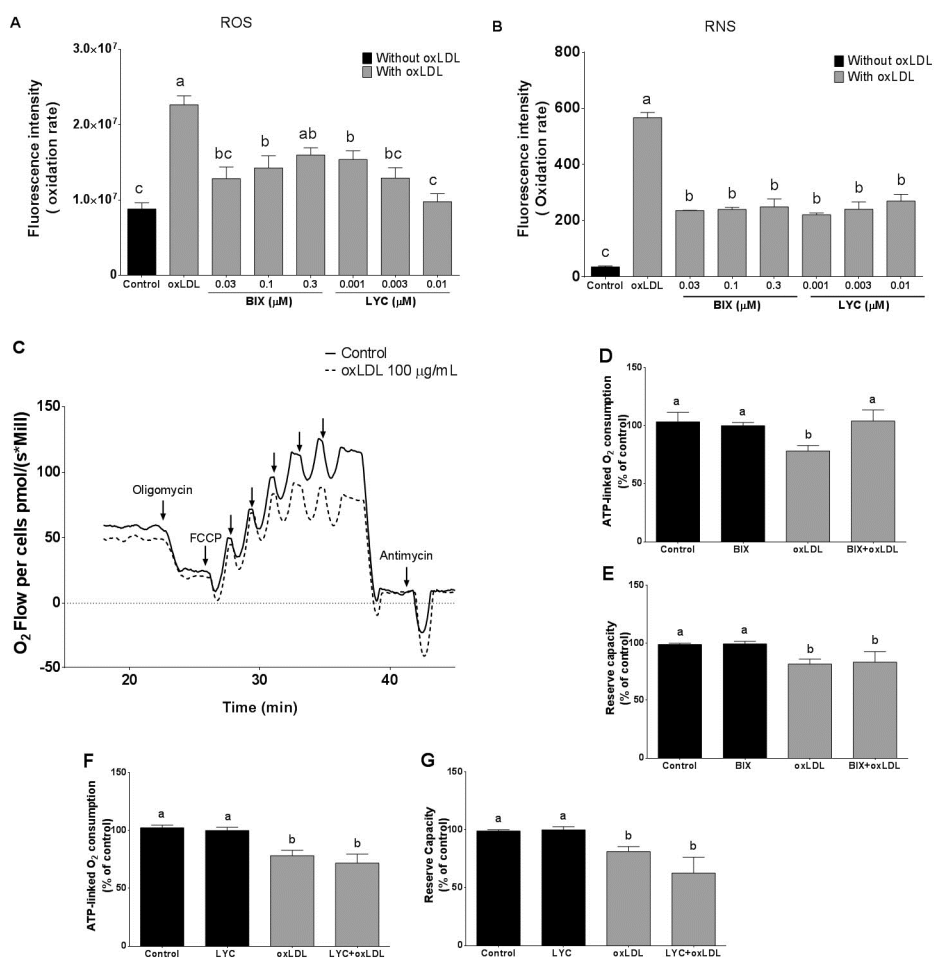


Fig 5.

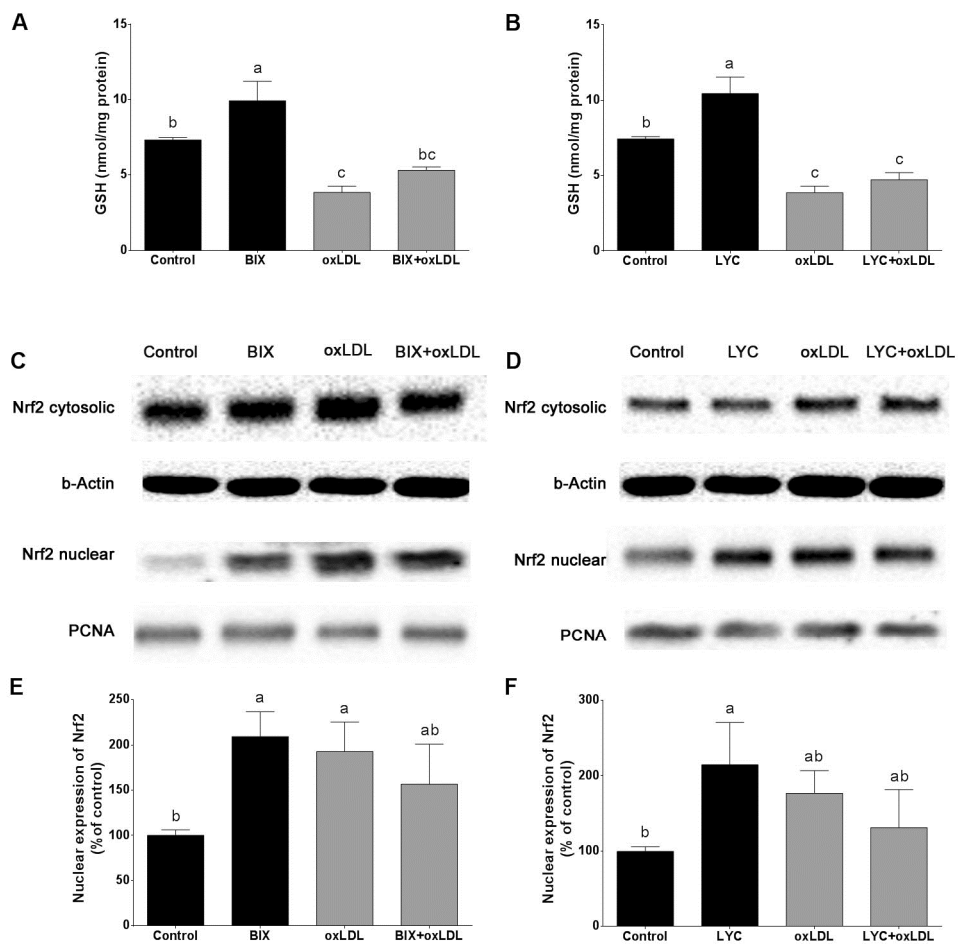


Fig 6.

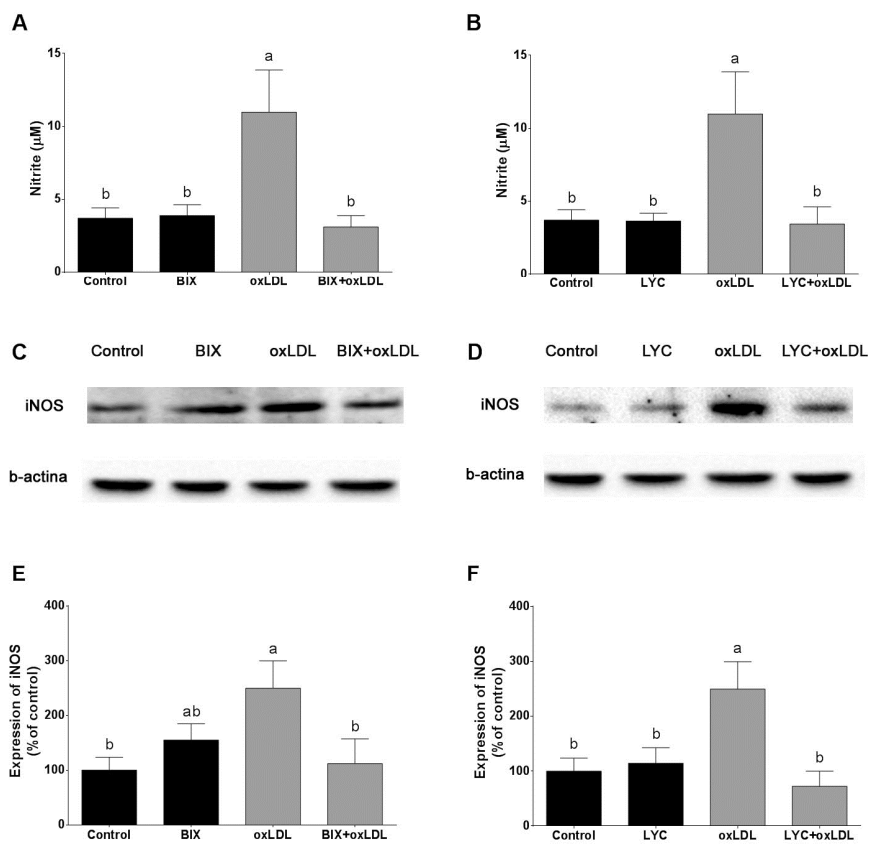


Fig 7.

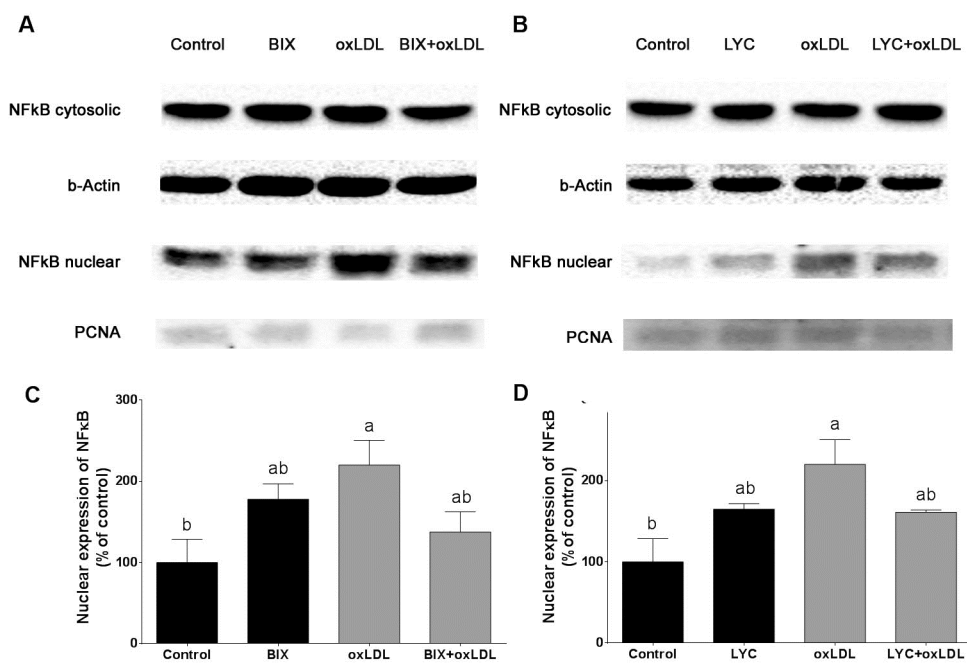
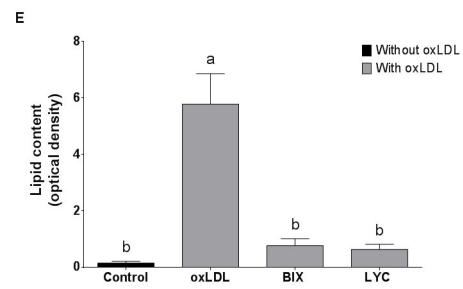
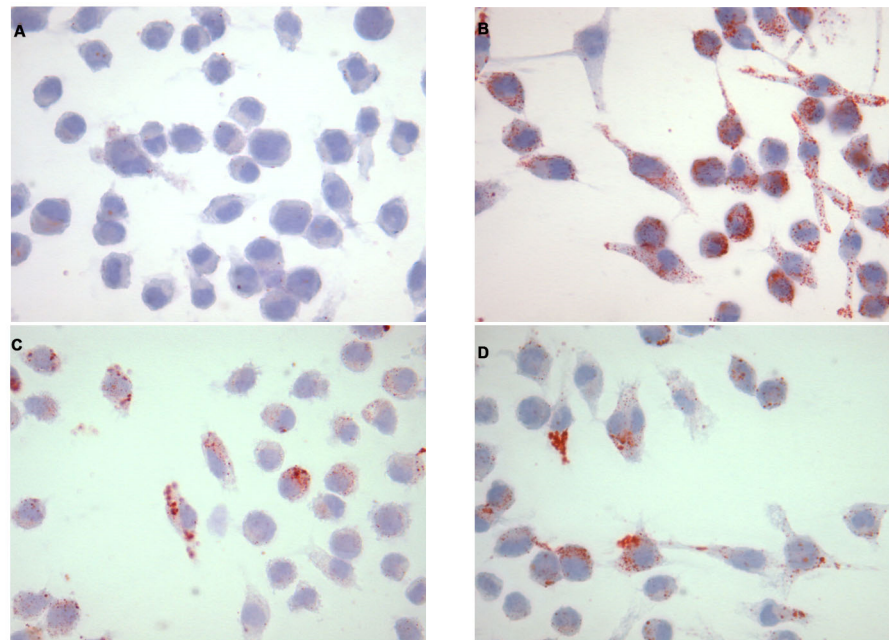
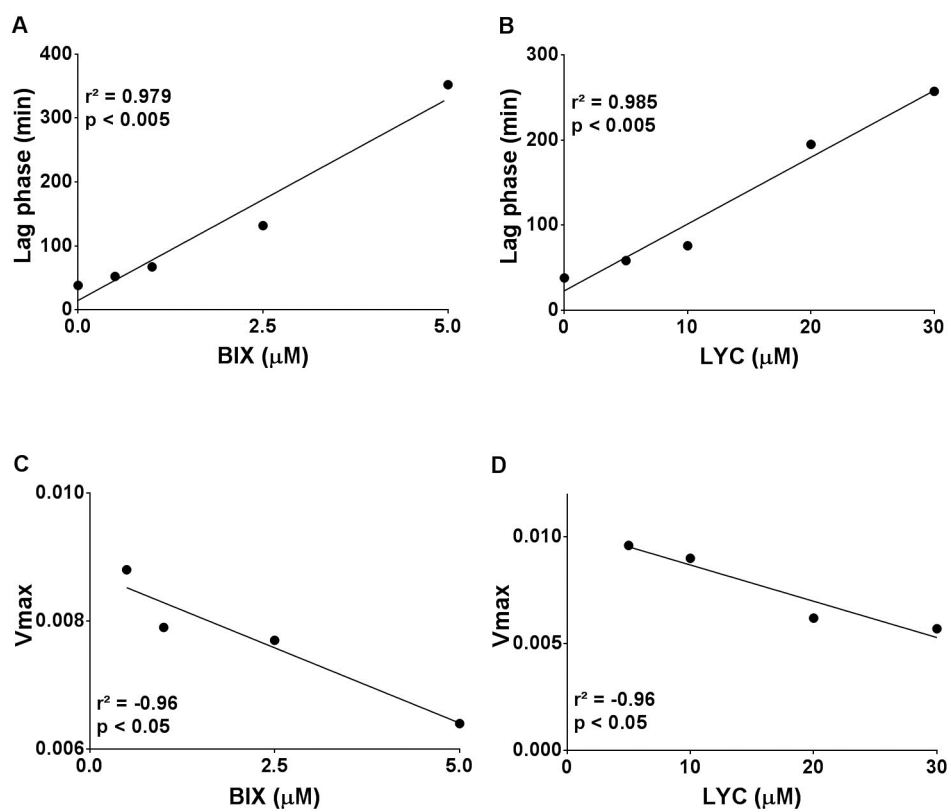


Fig 8



## Supplementary material

Fig S1



### 3 DISCUSSÃO

A aterosclerose é uma doença progressiva complexa que envolve a interação de diversos fatores, com destaque para a hipercolesterolemia, eventos oxidativos e a inflamação (LIBBY et al., 2010; SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016; STEINBERG et al., 1989). O tratamento atual da aterosclerose consiste na utilização de fármacos capazes de diminuir os níveis plasmáticos de colesterol (hipolipemiantes), diminuindo conseqüentemente os eventos clínicos e a mortalidade causada por essa patologia (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Adicionalmente, a busca por novas terapias e alvos farmacológicos que possam reduzir a progressão da aterosclerose vem crescendo nas últimas décadas (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015), pois há um grande interesse em compostos que sejam capazes de, não somente diminuir as concentrações plasmáticas de colesterol, mas de atuar em diferentes etapas do processo aterogênico, como na oxidação da LDL, na formação das células espumosas e na resposta inflamatória.

Considerando o envolvimento de eventos oxidativos na patogênese da aterosclerose e a excelente capacidade antioxidante da bixina, exemplificada pelo seu alto poder de sequestro de radicais livres (CHISTÉ et al., 2011; DI MASCIO et al., 1990; RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009), inclusive exibindo atividade desativadora do radical peroxil mais eficaz que o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) (RODRIGUES et al., 2012), e capacidade de inibir a peroxidação lipídica (RAO et al., 2014; SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001), nesse estudo investigamos o potencial antiaterogênico da bixina em coelhos hiperlipidêmicos. Posteriormente, com o intuito de compreender o mecanismo dos efeitos da bixina observados *in vivo*, avaliamos o efeito deste carotenoide sobre oxidação da LDL *in vitro* e sobre a toxicidade da LDLox em cultivo de macrófagos. A resposta inflamatória mediada por monócitos/macrófagos possui papel importante na formação das placas ateroscleróticas, desde a formação das estrias gordurosas, até o processo de ruptura da placa aterosclerótica (HANSSON; LIBBY, 2006). Sua ativação na íntima arterial, induzida pela LDLox, promove a liberação de moléculas vasoativas, produção de espécies reativas e secreção de enzimas proteolíticas que degradam componentes da matriz extracelular (HANSSON; LIBBY, 2006; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015).

Uma das formas comerciais do corante de urucum é uma dispersão oleosa cujo princípio ativo é a bixina. No presente estudo utilizamos, como fonte de bixina, um extrato comercial grau alimentício, que continha 10 g de bixina em 100 mL de óleo de girassol, no

qual a bixina representava 90% dos carotenoides do extrato (Anexo A). A partir deste extrato foram preparadas as soluções utilizadas para investigar o potencial antiaterogênico deste carotenoide nos ensaios de oxidação com LDL humana isolada, no ensaio com coelhos hipercolesterolêmicos, bem como nos ensaios com cultivos celulares de macrófagos expostos à LDL oxidada. Apesar do amplo uso dos pigmentos de urucum em alimentos industrializados, as informações sobre a sua cinética e metabolismo em animais e humanos, ainda são escassas, sendo que informações sobre a sua distribuição nas lipoproteínas plasmáticas e nos tecidos são inexistentes. No estudo *in vivo*, não se observou a presença da bixina e nem de seus possíveis metabólitos no soro dos coelhos antes do período experimental, demonstrando que esse carotenoide não faz parte da dieta normal desses animais. Após a suplementação da dieta hipercolesterolêmica com a bixina, observou-se a presença de diversos metabólitos no soro (Anexo B), sendo que os principais foram a di-cis-norbixina, a tri-cis-norbixina e a 9-cis-norbixina, e não se observou a presença da bixina (pico em  $\pm 35$  min de acordo com o padrão de bixina). A concentração sérica total desses metabólicos foi crescente de acordo com a dose de bixina fornecida na dieta ( $0,59 \pm 0,01$ ,  $1,78 \pm 0,02$  e  $5,70 \pm 2,02$   $\mu\text{g/mL}$  correspondente aos grupos experimentais que receberam bixina na concentração 10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente), demonstrando que houve absorção desse carotenoide e que esta foi dependente da quantidade fornecida na dieta. A ausência da bixina no soro desses animais pode ser devido ao tempo de coleta (12 h) após a última administração da dieta, pois sabe-se através de estudo realizado em humanos que o pico sérico da bixina ocorre 2 h após a administração oral deste carotenoide e que a depuração completa ocorre após 8 h (LEVY et al., 1997).

É importante observarmos que, o óleo de girassol (presente na preparação comercial de bixina) é composto em sua grande maioria pelos ácidos linoléico e oléico e apresenta, de forma minoritária, tocoferóis (principalmente o  $\alpha$ -tocoferóis) e fitoesteróis, como o  $\beta$ -sitoesterol, o estigmasterol e o campesterol (RAFALOWSKI et al, 2008; SCHWARTZ et al., 2008), que apresentam atividade biológica já descrita na literatura (JONES; RIDEOUT, 2011; AZZI, 2007). Nos experimentos que compõem esse estudo, a concentração de bixina utilizada é consideravelmente maior que a concentração de tocoferóis e fitoesteróis, fornecidos indiretamente através do óleo de girassol, e por isso acredita-se que os efeitos observados nesse estudo sejam realmente devido a esse carotenoide. No entanto não se pode descartar que esses compostos possam ter colaborado, de forma sinérgica, para os resultados obtidos, porém acreditamos que essa contribuição, se ela realmente existiu, tenha sido ínfima.

Adicionalmente aos dados de segurança da FAO/OMS, alguns estudos avaliaram o efeito de doses consideráveis de bixina e não observaram efeitos toxicológicos, reiterando a segurança toxicológica deste carotenoide. Entre esses estudos, destaca-se o de Bautista et al. (2004) que administraram doses diárias de 600 mg/kg de bixina a ratos Wistar por um período de 4 semanas e não observaram alterações em marcadores hematológicos ou bioquímicos, como  $\gamma$ -glutamil transpeptidase (GGT), creatinina, glicose ou perfil lipídico, além de não detectarem alterações histopatológicas nos rins, fígado, baço ou adrenais relacionadas a administração deste carotenoide (BAUTISTA et al., 2004). Com a intenção de avaliar um possível efeito teratogênico, Paumgarten et al (2002) administraram bixina na dose de 140 mg/kg a ratas prenhes e não observaram nenhuma alteração nos embriões nem nas mães (PAUMGARTTEN et al., 2002). Adicionalmente, Lima et al. (2008) avaliaram o efeito toxicológico de uma dose de 3940 mg/kg de bixina administrada oralmente durante 28 dias a coelhos hipercolesterolêmicos e verificaram redução nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), porém não observaram nenhuma alteração nos níveis de uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais ou cálcio nos coelhos que foram suplementados com este carotenoide (LIMA et al., 2008). Valendo-se destas informações e considerando a ausência de efeito *per se* da bixina nos coelhos normocolesterolêmicos observado em nosso estudo, acredita-se que as doses de bixina de 10, 30 e 100 mg/kg administradas aos coelhos neste estudo não apresentaram efeitos tóxicos.

A oxidação da LDL possui um papel de destaque no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, e várias evidências indicam que a LDLox tem participação tanto nos estágios iniciais quanto nos estágios mais avançados do processo aterogênico (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016). Existe correlação entre a resistência da LDL à oxidação e a severidade da aterosclerose, sendo que sua progressão diminuiu quando a oxidação da LDL é reduzida (SITI; KAMISAH; KAMISIAH, 2015). Os resultados desse estudo mostraram que a bixina preveniu a peroxidação lipídica da LDL humana isolada de maneira dependente da concentração, através da diminuição da formação dos dienos conjugados, verificado através do aumento da fase lag e a diminuição da taxa de oxidação ( $V_{max}$ ). Outro resultado significativo foi a capacidade da bixina em prevenir a perda da fluorescência do triptofano da LDL humana induzida por  $Cu^{2+}$ . Portanto, tanto o efeito protetor da bixina contra a oxidação proteica da LDL, quanto seu efeito benéfico contra a oxidação lipídica da LDL, indicam o potencial antiaterogênico da bixina, assim como já demonstrado para o licopeno (ABETE et al., 2013; MORDENTE et al., 2011) e outros compostos antioxidantes que tem sido estudados



para a promoção da saúde vascular (MCKECHNIE; RUBENFIRE; MOSCA, 2002; UPRITCHARD et al., 2003).

Sabe-se que os fatores de risco envolvidos no processo aterosclerótico (diabetes, hipertensão, tabagismo, níveis elevados e colesterol, obesidade, entre outros), assim como o processo aterosclerótico em sí, estão associados à produção vascular excessiva de ERO e ERN, que são continuamente secretadas a partir de macrófagos ou células endoteliais ativadas no tecido aórtico (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Essas espécies reativas desempenham um papel central na formação e no desenvolvimento das placas ateroscleróticas, pois estão envolvidas na modificação das lipoproteínas, na liberação de citocinas pró-inflamatórias, na regulação dos receptores *scavenger* e formação das células espumosas (STEINBERG; WITZTUM, 2010; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). Além disso, sabe-se que a formação vascular de espécies reativas promove a disfunção endotelial devido a diminuição da biodisponibilidade do NO, contribuindo para o desenvolvimento das lesões iniciais da aterosclerose (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003). No presente estudo, os macrófagos expostos à LDLox tiveram aumento nos níveis de ERO e ERN. Já os coelhos hipercolesterolêmicos apresentaram elevação nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no tecido aórtico, indicando que a hipercolesterolemia induziu um aumento nos radicais livres e consequente dano oxidativo aos lipídios do tecido aórtico. O tratamento com bixina preveniu a formação das espécies reativas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, indicando que esse carotenoide é capaz de prevenir os danos celular e tecidual induzidos pelo estresse oxidativo. Os efeitos antioxidantes demonstrados pela bixina na prevenção da oxidação da LDL isolada e na remoção do radical peroxil *in vitro* podem ser atribuídos à sua cadeia de duplas ligações conjugadas, que confere excelente capacidade removedora de oxigênio singlete e outras espécies reativas (CHISTÉ et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012). Por outro lado, o efeito antioxidante intracelular observado através da remoção de ERO e ERN em culturas de macrófagos expostos a LDLox não pode ser explicado pela remoção direta de espécies reativas, já que ele ocorreu apenas após a pré-incubação com bixina por 24 h, mas não após pré-incubação por 1 h. Este efeito antioxidante intracelular parece ser mediado pela ativação da via do Nrf2.

As mitocôndrias são responsáveis pelo fornecimento energético celular, e são ao mesmo tempo alvos e fontes importantes de ERO/ERN (ZMIJEWSKI et al., 2005). Por serem o principal sítio de formação e reação intracelular de ONOO<sup>-</sup>, a disfunção das mitocôndrias por oxidação e nitração de componentes cruciais, evolui para alterações homeostáticas e fisiológicas desta organela (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). Uma vez

danificada, a mitocôndria passa a produzir exacerbadamente  $O_2^{\cdot-}$ , que ao reagir rapidamente com  $\cdot NO$ , aumenta exponencialmente a formação de  $ONOO^-$ , amplificando os fenômenos de disfunção mitocondrial, inibição respiratória e superprodução de ERO por fuga de elétrons dos complexos I e III, comprometendo de maneira geral, o funcionamento energético celular (BALABAN et al., 2005; RADI et al., 2002).

Experimentos avaliando a disfunção bioenergética de células vêm sendo cada vez mais utilizados para a compreensão da fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Com os avanços tecnológicos, permite-se a pesquisa mais aprofundada da bioenergética mitocondrial, através de medições do consumo de  $O_2$  em tempo real em células intactas, com injeção de substratos e inibidores específicos (HILL et al., 2012). Em nosso estudo investigamos pela primeira vez o efeito da LDLox, assim como da bixina e licopeno, sobre a respiração mitocondrial de macrófagos usando a respirometria de alta resolução.

Observamos que a exposição dos macrófagos à LDLox e/ou a bixina neste protocolo experimental não alterou a capacidade máxima de respiração (RCR), ou seja, a eficiência respiratória mitocondrial. No entanto, a LDLox causou um grande declínio no consumo de  $O_2$  associado à síntese de ATP, sugerindo um comprometimento na geração de energia, além de aumentar o escape de elétrons aumentando os níveis intracelulares de ERO. Uma diminuição no consumo de  $O_2$  associado à síntese de ATP pode indicar uma demanda baixa de ATP, falta de substrato disponível, ou mesmo um dano severo à cadeia de transporte de elétrons, que poderia impedir o fluxo normal de elétrons e resultar em menor consumo de  $O_2$  (HILL et al., 2012). Adicionalmente, o comprometimento da produção energética mitocondrial induzida pela LDLox, pode estar associada à formação das células espumosas em nosso estudo, uma vez que, quando a respiração mitocondrial e sua produção de ATP estão prejudicadas a célula pode entrar em apoptose através de sinalização mitocondrial (PERFETTINI; ROUMIER; KROEMER, 2005).

Um terceiro parâmetro que pode ser avaliado através da respirometria é a capacidade de reserva mitocondrial. Estudos recentes demonstram que muitas células mantêm uma capacidade de reserva bioenergética bastante substancial, podendo ser feitas previsões a respeito da resposta celular frente ao estresse ou aumento de demanda energética (HILL et al., 2012; HORT et al., 2014). Nossos resultados demonstraram que a exposição à LDLox causou uma queda significativa na capacidade de reserva mitocondrial dos macrófagos, levando a um forte impacto na manutenção bioenergética celular. O aumento das ERO/ERN geradas pela LDLox ao causar danos aos componentes da cadeia transportadora de elétrons, pode afetar a capacidade de reserva e comprometer a resposta ao estresse oxidativo (BALABAN;

NEMOTO; FINKEL, 2005; DRANKA et al., 2011). O pré-tratamento com bixina preveniu a disfunção mitocondrial, evitando o dano a cadeia respiratória mediado pela LDLox e restaurando a taxa de consumo de oxigênio associado à síntese de ATP, ainda que não tenha restaurado a capacidade de reserva mitocondrial. Esse efeito protetor da bixina pode ser atribuído à sua capacidade de melhorar o ambiente redox pela promoção da síntese de GSH através da ativação da via do Nrf2, levando a uma diminuição nos níveis de espécies reativas, e por consequência, protegendo proteínas e outras macromoléculas mitocondriais do dano oxidativo.

A hipercolesterolemia induz superprodução de ERO/ERN, altera a respiração mitocondrial e modifica o estatus antioxidante celular (DRANKA et al., 2011; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015). Assim, a manutenção das defesas antioxidantes é de extrema importância para o estado redox celular e seu estatus pode estar alterado em situações de estresse oxidativo, como já observado na aterosclerose (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015). Relatos da literatura apontam que a LDLox, assim como frações lipídicas dessa lipoproteína, podem levar a rápida depleção de GSH em macrófagos, exercendo citotoxicidade e induzindo morte celular (SHEN; SEVANI, 2001; WANG et al., 2006). Além disso, um estudo recente demonstrou que a diminuição da produção de GSH induzida pelo inibidor da glutamato cisteína ligase (L-butionine-*S,R*-sulfoximina) em macrófagos resultou no aumento da produção de espécies reativas e da expressão dos receptores CD36, um dos responsáveis pela captação de LDLox (YANG et al., 2015), fato que levaria a um aumento na formação de células espumosas. Da forma semelhante, em nosso estudo observamos que o aumento da geração de ERO/ERN nos macrófagos expostos à LDLox foi acompanhada pela redução nos níveis intracelulares de GSH e aumento na formação das células espumosas.

Em contrapartida, no estudo em coelhos, observamos o estresse oxidativo induzido pela hipercolesterolemia levou a um aumento nos níveis de tióis não protéicos (SHNP) no tecido aórtico, resultado similar ao encontrado por Augusti et al. (2009), e que parece ser um mecanismo de compensação às espécies reativas geradas. A GSH é o principal tiol não protéico presente nas células e tecidos de mamíferos (PASTORE et al., 2003). Este aumento nos SHNP pode estar relacionado ao concomitante aumento da atividade das enzimas de síntese/reciclagem da GSH nos coelhos hipercolesterolêmicos, como a GR. O aumento da expressão da GR já foi demonstrado em macrófagos humanos expostos a LDLox *in vitro* (QIAO et al., 2007). Além da GR, observamos uma elevação na atividade de outras enzimas antioxidantes - SOD, CAT e TrxR, e essa elevação ocorreu provavelmente como uma resposta

de defesa na tentativa de conter o estresse oxidativo gerado pela hipercolesterolemia e evidenciado pelo aumento da lipoperoxidação no tecido aórtico. Confirmando nossas observações, Augusti et al (2009) também relataram um aumento na atividade dessas enzimas no tecido aórtico de coelhos ateroscleróticos. Um aumento na expressão dessas enzimas antioxidantes já foi descrito em macrófagos expostos à LDLox e em macrófagos de sujeitos com aterosclerose (HÄGG et al., 2006) e em ambos os casos, o aumento da expressão das enzimas ocorreu como resposta de defesa contra a LDLox.

O aumento na expressão das enzimas antioxidantes está ligado a ativação da sequência promotora ARE (Elementos de Resposta Antioxidante) por fatores de transcrição como o Nrf2 através de diversos tipos de estímulos, como a fosforilação de proteínas quinases (ERK e p38) e/ou oxidação de resíduos sulfidrílicos do Keap1, por compostos antioxidantes ou até pela LDLox ou produtos da peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonal (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012; TEBAY et al., 2015). A translocação do Nrf2 para o núcleo aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e de fase II, que são importantes para a remoção de espécies reativas e eletrofílicas (ISHII et al., 2004; TEBAY et al., 2015). Em nosso estudo *in vitro*, observamos um aumento da expressão do Nrf2 nuclear nos macrófagos expostos à LDLox, porém não observamos aumento nos níveis de GSH. Provavelmente o nível de ERO/ERN gerado pela exposição à LDLox excedeu a concentração desse antioxidante e induziu a formação das células espumosas. Tal processo também ocorreu *in vivo*, pois apesar dos esforços do sistema antioxidante, os radicais livres gerados pela hipercolesterolemia ultrapassaram a capacidade antioxidante endógena e induziram aterogênese.

As alterações induzidas pela hipercolesterolemia na atividade das enzimas antioxidantes e no conteúdo SHNP foram reduzidas pelo tratamento com bixina. Este é o primeiro relato sobre os efeitos protetores da bixina contra alterações no sistema de defesa antioxidante em modelo de aterosclerose. Estes efeitos protetores estão provavelmente relacionados ao potencial antioxidante da bixina. A longa cadeia de duplas conjugadas desse carotenoide poderia remover os radicais livres gerados pela hipercolesterolemia, poupando as defesas antioxidantes. Adicionalmente, a bixina poderia modular a resposta antioxidante endógena ao estresse oxidativo. Neste contexto, Tao et al (2015) verificaram que a bixina é capaz de aumentar significativamente a ligação do Nrf2 ao sítio promotor ARE, levando a um aumento da expressão gênica de subunidades da enzima de síntese da GSH, através da interação com o resíduo de cisteína 151 do Keap1. Em nosso estudo, observamos que a bixina *per se* foi capaz de promover a ativação do Nrf2 (aumento da expressão do Nrf2 nuclear) e isso pode ter contribuído para a melhora do ambiente celular, através do aumento dos níveis

intracelulares de GSH observado em nosso estudo. O pré-tratamento com bixina foi capaz de prevenir parcialmente as alterações induzidas pela LDLox no Nrf2 e nos níveis de GSH, reduzindo a produção de espécies reativas e a formação das células espumosas.

Além das enzimas antioxidantes na parede do vaso, os sistemas biológicos contam com a enzima PON1, localizada na HDL, que é a principal responsável pela quebra dos peróxidos lipídicos antes que eles se acumulem na LDL e provoquem a oxidação da mesma (MACKNESS; MACKNESS, 2015). A atividade sérica da PON1 está inversamente associada ao risco de desenvolvimento de DCV (MACKNESS; MACKNESS, 2004). Apesar dos efeitos importantes da PON1, sua atividade enzimática é sensível ao estresse oxidativo (AUGUSTI et al., 2012; MACKNESS; MACKNESS, 2015). No presente estudo, os coelhos hipercolesterolêmicos apresentaram uma redução na atividade da PON1 juntamente com o aumento de TBARS e a formação da placa aterosclerótica. Assim, nós sugerimos que a inibição da PON1 pode ter contribuído para a formação das estrias gordurosas no tecido aórtico de coelhos hipercolesterolêmicos. A redução na atividade da PON1 pode ocorrer por inibição da sua síntese hepática induzida pela hiperlipidemia (MACKNESS et al., 1999) ou essa enzima pode ser inativada através da interação de lipídios oxidados da LDLox com o seu grupo SH livre do resíduo de cisteína 283 (AVIRAM et al., 1999). A atividade da PON1 foi restaurada pela dose de 100 mg/kg. Esse é o primeiro relato na literatura relacionando a bixina e a atividade da PON1. No entanto, a proteção exercida pela bixina parece estar relacionada ao aumento nos níveis de HDL, ao invés de efeitos antioxidantes contra a perda de atividade da PON1 induzida pelo estresse oxidativo.

Os lípidos oxidados e seus produtos de degradação possuem propriedades pró-inflamatórias, imunogênicas e citotóxicas que contribuem para o início e a progressão das lesões ateroscleróticas, estando envolvidos, por exemplo, no recrutamento e adesão de monócitos ao endotélio vascular (LIBBY et al., 2010). Em nosso estudo, a exposição dos macrófagos a LDLox aumentou a expressão da iNOS e os níveis de  $\cdot\text{NO}$ . Altos níveis de  $\cdot\text{NO}$  podem levar a uma resposta pró-inflamatória, assim como à reação com  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , levando à formação de  $\text{ONOO}^-$  e consequente toxicidade celular (RADI et al., 2001). Já nos coelhos hipercolesterolêmicos o aumento do estresse oxidativo foi acompanhado por um aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6. O tratamento com bixina reduziu essas alterações nos marcadores inflamatórios. Este efeito anti-inflamatório da bixina certamente contribuiu para a redução da formação das células espumosas na cultura de macrófagos e da aterosclerose nos coelhos hipercolesterolêmicos, uma vez que esses mediadores pró-inflamatórios desempenham um papel importante na aterogênese (HANSSON; LIBBY, 2006; LIBBY;

RIDKER; HANSSON, 2011). A modulação da resposta anti-inflamatória pela bixina está relacionada à sua capacidade de inibir a via do NF- $\kappa$ B, sabidamente ativada pela LDLox (YURDAGUL et al., 2016). A inibição da ativação desse fator de transcrição nuclear pode estar relacionada a ação agonista da bixina sobre os receptores PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  (GOTO et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2009), uma vez que ligantes de PPAR inibem a via do NF- $\kappa$ B e regulam a transcrição de genes inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, metaloproteinases e receptores *scavenger*, como o CD36 e o SRA (KAULMANN; BOHN, 2014; NEVE; FRUCHART; STAELS, 2000). Também é importante mencionar que o NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição redox-sensível, podendo ser ativado por espécies reativas (ROBBESYN; SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE, 2004) e assim o efeito anti-inflamatório da bixina poderiam ser um evento secundário a sua propriedade antioxidante. A diminuição de ERO/ERN intracelulares, gerados pela LDLox, levaria a uma diminuição da ativação do NF- $\kappa$ B, e conseqüentemente da produção de mediadores inflamatórios e geração de  $\cdot$ NO, diminuindo o quadro inflamatório.

Coelhos da raça Nova Zelândia alimentados com altos níveis de colesterol tornam-se hipercolesterolêmicos e suscetíveis a aterosclerose e são usados classicamente como modelo experimental para esta doença. No nosso estudo, como anteriormente já relatado em estudos utilizando este modelo (AUGUSTI et al., 2009, 2012; LORENZ et al., 2012) observou-se um aumento no perfil lipídico acompanhado de severo dano aórtico nos coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol. A suplementação com bixina não modificou os níveis de colesterol total dos coelhos, mas preveniu o aumento dos níveis de colesterol não-HDL e triglicerídeos e aumentou os níveis de HDL, demonstrando a capacidade da bixina de reduzir o risco cardiovascular. O colesterol não-HDL, que consiste nas duas maiores frações carreadoras de colesterol na circulação (VLDL + LDL) traduz melhor o risco de mortalidade cardiovascular do que os níveis de LDL, pois expressa com mais precisão a aterogenicidade das lipoproteínas (PEREIRA, 2012). O efeito da bixina sobre a redução do triglicerídeos observado nesse estudo já havia sido anteriormente relato pelo nosso grupo de pesquisa (ROEHRS et al., 2014) e Goto et. al. (2012) demonstraram que a ação da bixina na redução dos triglicerídeos é maior que a do fenobibrato, fármaco usado no tratamento clínico da hipertrigliceridemia. Além disso, em nosso estudo observamos aumento dos níveis séricos de HDL, que juntamente com a redução dos triglicerídeos podem estar relacionado a ação agonista deste carotenoide sobre o receptor PPAR $\alpha$  (GOTO et al., 2012). Uma vez ativado, esse receptor aumenta a expressão da lipoproteína lipase e da apolipoproteína A-V e diminui a expressão da apolipoproteína C-III hepática. Essas ações diminuem os níveis de triglicerídeos

sérico nos quilomícrons e na VLDL, e aumenta os níveis de HDL e o efluxo de colesterol dos macrófagos mediado por essa lipoproteína (JAMKHANDÉ et al., 2014). Assim, agonistas de PPAR podem ser usados no tratamento das dislipidemias e a ativação desses receptores pela bixina pode ter contribuído para a diminuição das placas ateroscleróticas observada no presente estudo.

Adicionalmente, a suplementação com bixina reduziu o índice aterogênico, que é um parâmetro que reflete a relação entre a fração não-HDL e a fração HDL e é considerado um bom indicador do risco de doenças cardiovasculares em relação aos níveis absolutos de lipídios ou lipoproteínas (ELIASSON et al., 2011).

O processo aterogênico promovido pela LDLox, pode ser consequência da sua citotoxicidade, seus efeitos inibitórios na motilidade dos macrófagos e sua incorporação por receptores *scavenger*, particularmente o CD36 e os receptores *scavenger* de classe A (SRAI/II)(YU et al., 2013). A ativação desses receptores resulta em acúmulo intracelular de colesterol, levando à formação das células espumosas, que são os primeiros marcadores morfológicos das lesões ateroscleróticas (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; YU et al., 2013). Nesse estudo, a hipercolesterolemia estava associada a um aumento significativo do acúmulo de macrófagos nas lesões ateroscleróticas nos coelhos, e a bixina preveniu parcialmente a formação das lesões ateroscleróticas. Esses dados estão de acordo com os achados do estudo *in vitro*, onde o tratamento com bixina reduziu significativamente o conteúdo lipídico no interior dos macrófagos. A redução na captação de LDLox, e por consequência, a formação das células espumosas, promovida pela bixina pode estar ligada a sua capacidade de modular o estresse oxidativo e, principalmente, a resposta inflamatória através da redução da translocação do NF- $\kappa$ B. A ativação desse fator de transcrição nuclear aumenta a expressão de receptores CD36 com consequente aumento na captação de LDLox (RIOS et al., 2012).

Com o objetivo de avaliarmos a real magnitude dos efeitos antiateroscleróticos da bixina, nós incluímos em nossos estudos, a título de comparação, compostos que tem sido utilizados para a promoção da saúde cardiovascular, como o fármaco hipolipemiante sinvastatina e o carotenoide licopeno, utilizado como suplemento alimentar.

A bixina e a sinvastatina possuem mecanismos de ação distintos. A sinvastatina inibe a hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima chave na síntese do colesterol, resultando em menor síntese de colesterol e aumento na captação de LDL pelo fígado (JAMKHANDÉ et al., 2014). Já a bixina, além de seu potencial antioxidante, tem ação agonista nos receptores de PPAR (GOTO et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2009), que são receptores nucleares que regulam o metabolismo de lipídios e carboidratos. Nos coelhos

hiperlipidêmicos o tratamento com sinvastatina resultou em maior redução dos lipídios séricos do que a bixina. Devido a esse considerável efeito hipocolesterolêmico, nós não observamos a formação de placa aterosclerótica nos animais tratados com esse fármaco. Já o tratamento com a bixina foi mais efetivo em aumentar os níveis séricos de HDL e reduzir o índice aterogênico, apesar da sinvastatina ter diminuído consideravelmente os níveis de colesterol não-HDL. Ambos os compostos apresentaram resultados semelhantes em relação aos marcadores de estresse oxidativo, TNF- $\alpha$  e atividade das enzimas antioxidantes.

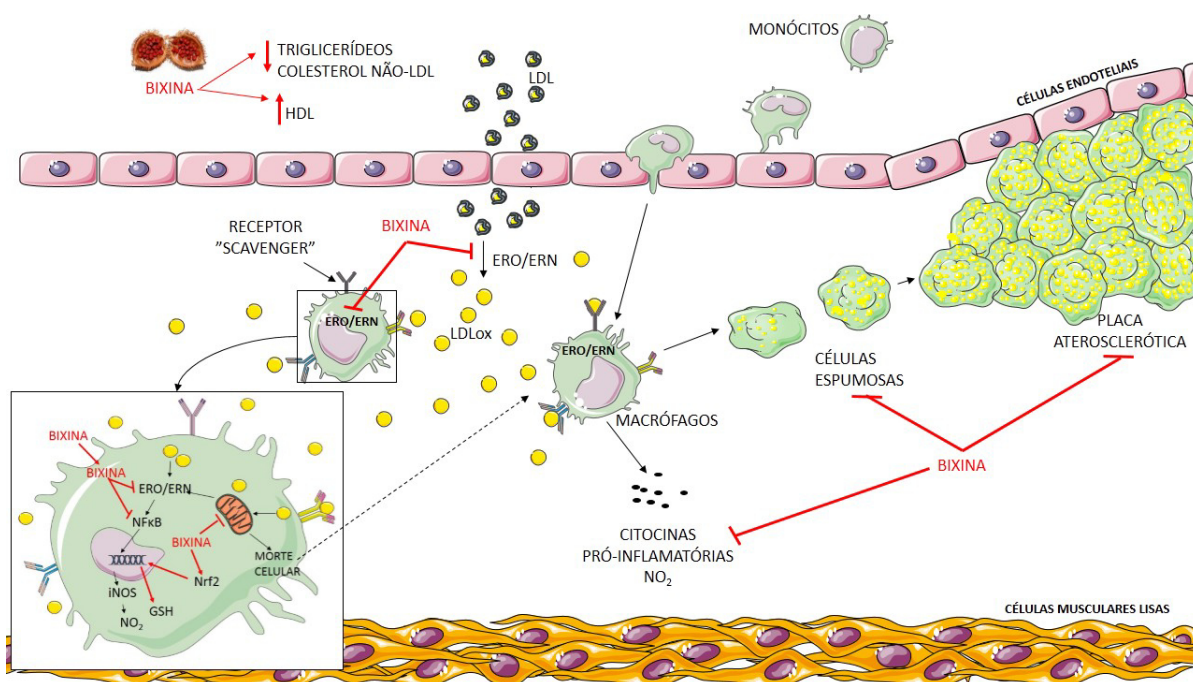
Em nossos estudos *in vitro* utilizamos o carotenoide licopeno como controle positivo. A bixina e o licopeno pertencem a mesma classe de compostos naturais e partilham da presença de um sistema de duplas ligações conjugadas semelhantes em sua estrutura. Devido a essa cadeia poliênica conjugada, ambos os carotenoides já demonstraram excelente capacidade antioxidante (DI MASCIO et al., 1990; RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009; RODRIGUES et al., 2012). O licopeno é o carotenoide mais abundante na dieta ocidental e por isso a relação entre o seu consumo e os efeitos sobre diversas desordens crônicas (DCV, diabetes, síndrome metabólica, variados tipos de câncer, entre outros) tem sido amplamente investigada (AGARWAL; RAO, 2000; CÁMARA et al., 2013; HAN et al., 2016; MORDENTE et al., 2011). No estudo com LDL humana isolada, a bixina foi aproximadamente 5 vezes mais potente que o licopeno em reduzir a oxidação da LDL. Essa diferença pode estar relacionada com as particularidades da estrutura química desses carotenoides, pois a bixina possui 2 grupamentos polares (xantofila), enquanto o licopeno apresenta apenas cadeia poliênica (caroteno). Carotenoides que possuem grupamentos polares em sua estrutura são melhores desativadores de ER em sistemas biológicos que aqueles que não os possuem (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2012). Baseado em estudos com lipossomas, pode-se afirmar que esses carotenóides assumem uma disposição espacial nas membranas celulares que permite que a cadeia poliênica desative as ER no interior hidrofóbico, enquanto os grupamentos polares desativam as ER nos núcleos hidrofílicos. Já os carotenóides que possuem apenas cadeia poliênica, como o licopeno, atuam somente no núcleo hidrofóbico (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2012; ZHANG; STANLEY; MELTON, 2006).

Nos ensaios com cultura celular, a bixina e o licopeno apresentaram eficácia semelhante em praticamente todos os parâmetros avaliados. O licopeno divergiu da bixina nos ensaios de citotoxicidade, onde se mostrou 30 vezes mais tóxico aos macrófagos que o carotenoide do urucum e nos ensaios de avaliação da função mitocondrial, onde o licopeno não foi capaz de prevenir o comprometimento mitocondrial induzido pela LDLox. Os nossos



resultados indicam que os efeitos antioxidantes intracelulares da bixina e do licopeno, prevenindo o dano oxidativo induzido pelo LDLox em macrófagos, estão relacionados a modulação de vias de sinalização intracelulares (Nrf2 e Nf-kB) ao invés de um efeito antioxidante direto. Vale destacar que esse é o primeiro estudo avaliando o efeito tanto da LDLox, quanto da bixina e do licopeno sobre a função mitocondrial. O conjunto de dados obtidos nesse estudo reforça o potencial da bixina como uma estratégia terapêutica ou nutricional para impedir o desenvolvimento da aterosclerose. Na Figura 9 estão representados esquematicamente os principais efeitos da bixina.

Figura 9 – Representação esquemática do potencial antiaterogênico da bixina.



Fonte: Autoria pessoal. Baseado nos resultados apresentados nesse estudo a bixina é capaz de reduzir os níveis séricos de triglicerídeos e colesterol não-HDL e elevar os níveis de HDL, além de reduzir a oxidação da LDL. No tecido aórtico, a bixina reduz o estresse oxidativo e restaura as defesas antioxidantes. Adicionalmente, a bixina previne a geração intracelular de ERO/ERN e a disfunção mitocondrial induzida pela LDLox em macrófagos, reduzindo a formação de células espumosas. Esse carotenoide também atua sobre a via do NF-kB, bloqueando a sua translocação para o núcleo e modificando a resposta inflamatória induzida pela LDLox. Além disso, a bixina modula a via do Nrf2 melhorando o ambiente celular e reduzindo a citotoxicidade da LDLox. Legenda: LDL – lipoproteína de baixa densidade; HDL – Lipoproteína de alta densidade; ERO – espécies reativas de oxigênio; ERN – espécies reativas de nitrogênio; NO<sub>2</sub> – nitrito; iNOS – óxido nítrico induzível; GSH – glutatona reduzida; Nrf2 – fator nuclear eritróide-2; NFκB – fator nuclear kappa B.

## 4 CONCLUSÕES

No presente estudo foram avaliados pela primeira vez os efeitos anti-aterogênicos do carotenoide bixina, incluindo os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos. Sendo assim, demonstrou-se que:

✓ O tratamento com bixina foi capaz de reduzir a aterosclerose observada através da redução da razão da espessura da camada íntima pela camada média da aorta dos coelhos hiperlipidêmicos, além de melhorar o perfil lipídico, evidenciado pelo efeito hipotrigliceridêmico, aumento considerável dos níveis de HDL e redução dos níveis de colesterol não-HDL.

✓ O tratamento com bixina preveniu o estresse oxidativo dos coelhos hiperlipidêmicos, demonstrado pela redução dos níveis de produtos da peroxidação lipídica, e restaurou a atividade das enzimas antioxidantes, além de reduzir a resposta inflamatória.

✓ O tratamento com bixina pode ser promissor, pois promoveu um aumento marcante dos níveis de HDL e melhorou o índice aterogênico, apesar de ter sido menos efetivo que a sinvastatina na redução do perfil lipídico, de IL-6 e da placa aterosclerótica. Em relação ao estresse oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes e níveis de TNF- $\alpha$ , ambos os compostos apresentaram efeito semelhante;

✓ A bixina apresentou efeito antioxidante direto sendo mais potente que o licopeno para prevenir a oxidação lipídica e proteica da LDL humana isolada, e remover o radical peroxil;

✓ A bixina reduziu a formação de células espumosas e a citotoxicidade induzida pela LDLox, através da redução da formação intracelular de espécies reativas, do dano mitocondrial, da depleção de GSH, e indução da iNOS em macrófagos;

✓ O efeito citoprotetor e antioxidante da bixina e do licopeno em macrófagos foram relacionados à modulação da expressão nuclear dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e Nrf2, e não pela remoção direta de espécies reativas.

✓ O bixina foi menos tóxica aos macrófagos e mais efetiva que o licopeno na prevenção do dano mitocondrial induzido pela LDLox, além de ter apresentado efeitos semelhantes ao licopeno na prevenção da citotoxicidade induzida pela LDLox.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABETE, I. et al. A regular lycopene enriched tomato sauce consumption influences antioxidant status of healthy young-subjects: A crossover study. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 28–35, 2013.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, 1984.

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne**, v. 163, n. 6, p. 739–44, 19 set. 2000.

ALBUQUERQUE, C. L. C. et al. Thin layer chromatographic analysis of annatto extracts obtained using supercritical fluid. **Food and Public Health**, v. 5, n. 4, p. 130–140, 2015.

ANANTHARAMAN, A. et al. Induction of apoptosis by apocarotenoids in B16 melanoma cells through ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 346–357, 2016.

ANDRIKOPOULOS, N. K. et al. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2002.

ANTUNES, L. M. G. et al. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1-2, p. 113–119, 2005.

ASHRAF, M. Z.; GUPTA, N. Scavenger receptors: Implications in atherothrombotic disorders. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 43, n. 5, p. 697–700, 2011.

AUGUSTI, P. R. et al. Astaxanthin reduces oxidative stress, but not aortic damage in atherosclerotic rabbits. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 14, n. 4, p. 314–22, 2009.

AUGUSTI, P. R. et al. Astaxanthin prevents changes in the activities of thioredoxin reductase and paraoxonase in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 51, n. 1, p. 42–9, 2012.

AVIRAM, M. et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 7, p. 892–904, 1999.

AZZI, A. Molecular mechanisms of alpha-tocopherol actions. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 16-21, 2007.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, 2005.

BAUTISTA, A. R. P. L. et al. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. **Food and**

**Chemical Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 625–629, 2004.

BHASKAR, S. et al. Quercetin alleviates hypercholesterolemic diet induced inflammation during progression and regression of atherosclerosis in rabbits. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 219–229, 2013.

BLANKENBERG, S. et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 17, p. 1605–13, 2003.

BOCAN, T. M. et al. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. **Atherosclerosis**, v. 102, n. 1, p. 9–22, 1993.

BOCZKOWSKI, J. et al. Peroxynitrite-mediated mitochondrial dysfunction. **Neurosignals**, v. 10, n. 1-2, p. 66–80, 2001.

BOHN, T. Bioavailability of non-provitamin a carotenoids. **Current Nutrition & Food Science**, v. 4, n. 4, p. 240–258, 2008.

BOLAYIRLI, I. M. et al. Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. **Life sciences**, v. 81, n. 2, p. 121–7, 2007.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 2, p. 168–75, 2003.

**BRASIL. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil 2011-2022.** Ministério da Saúde. 1ª edição. 160 p.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551–1558, 1995.

CÁMARA, M. et al. Chapter 11 – Lycopene: A review of chemical and biological activity related to beneficial health effects. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.: s.n.]. v. 40p. 383–426, 2013.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Inhibition of glutathione reductase by interaction of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonate with the active-site dithiol. **FEBS letters**, v. 98, n. 2, p. 263–6, 1979.

CASSINA, A. M. et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21409–15, 2000.

CHE IDRIS, C. A. et al. Oil palm phenolics and vitamin E reduce atherosclerosis in rabbits. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 541–550, 2014.

CHEN, Y. et al. Probucol and cilostazol exert a combinatorial anti-atherogenic effect in cholesterol-fed rabbits. **Thrombosis research**, v. 132, n. 5, p. 565–71, 2013.

CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–26, 2011.

CUBEDDU, L. X.; SEAMON, M. J. Statin withdrawal: clinical implications and molecular mechanisms. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 9, p. 1288–96, 2006.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 323, n. 1, p. 3–10, 2002.

DI MASCIO, P. et al. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochemical Society Transactions**, v. 18, n. 6, p. 1054–6,

DRANKA, B. P. et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 9, p. 1621–1635, 2011.

DRANKA, B. P.; HILL, B. G.; DARLEY-USMAR, V. M. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 7, p. 905–14, 2010.

DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 4, p. 473–80, 2001.

EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants - A review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 41, n. 3, p. 189–200, 1997.

ELIASSON, B. et al. Clinical usefulness of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in type 2 diabetes: a report from the Swedish National Diabetes Register. **Diabetes care**, v. 34, n. 9, p. 2095–100, 2011.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

ESSAWY, S. S. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Marrubium alysson extracts in high cholesterol-fed rabbits. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 5, p. 472–82, 2014.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 81–128, 1991.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. et al. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 438–450, 2012.

FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. **ACS chemical biology**, v. 4, n. 3, p. 161–77, 2009.

FINKING, G.; HANKE, H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. **Atherosclerosis**, v. 135, n. 1, p. 1–7, 1997.

FRANCIS, G. PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 186–191, 2003.

FREDERIKSEN, H. et al. Dietary supplementation with an extract of lycopene-rich tomatoes does not reduce atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits. **The British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 6–10, 2007.

GAJENDRAGADKAR, P. R. et al. Effects of oral lycopene supplementation on vascular function in patients with cardiovascular disease and healthy volunteers: A randomised controlled trial. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

GALLE, J. et al. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 219–26, 2006.

GARELNABI, M.; LITVINOV, D.; MAHINI, H. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: Implication in arteriosclerosis diseases. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 11, p. 523, 2012.

GERSZTEN, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. April, p. 718–723, 1999.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Animal models of atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 5, p. 1104–15, 2012.

GIESEG, S. P.; ESTERBAUER, H. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. **FEBS Letters**, v. 343, n. 3, p. 188–194, 1994.

GISSAUF, A.; STEINER, E.; ESTERBAUER, H. Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1256, n. 2, p. 221–32, 1995.

GOTO, T. et al. Bixin activates PPAR $\alpha$  and improves obesity-induced abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 48, p. 11952–8, 2012.

GRUNDY, S. M. et al. An international atherosclerosis society position paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia - Full report. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 8, n. 1, p. 29–60, 2014.

HABERLAND, M. E.; FONG, D.; CHENG, L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Science**, v. 241, n. 4862, p. 215–8, 1988.

HÄGG, D. et al. Oxidized LDL induces a coordinated up-regulation of the glutathione and thioredoxin systems in human macrophages. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 282–289, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, 5<sup>th</sup> ed., Clarendon Press: Oxford, 1999.

HAN, G.-M. et al. Higher levels of serum lycopene are associated with reduced mortality in individuals with metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 36, n. 5, p. 402–407, 2016.

HANSSON, G. K. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 91, n. 4, p. 281–291, 2002.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1685–1695, 2014.

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

HEESCHEN, C. et al. Withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 105, n. 12, p. 1446–1452, 2002.

HILL, B. G. et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. **Biological Chemistry**, v. 393, n. 12, p. 1485–1512, 2012.

HIRAYMA, S.; MIIDA, T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 414, p. 215–224.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, Methods in Enzymology. v. 252, p. 199–208, 1995.

HORT, M. A. et al. Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. **Biochimie**, v. 105, p. 172–181, 2014.

ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 2, p. 883–93, 1993.

ISHII, T. et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. **Circulation Research**, v. 94, n. 5, p. 609–16, 2004.

ISTVAN, E.S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, v. 292(5519), p. 1160–4, 2001.

JACKEVICIUS, C. A. Adherence with statin therapy in elderly patients with and without acute coronary syndromes. **JAMA**, v. 288, n. 4, p. 462, 2002.

JACOBSON, T. A.; ZIMMERMAN, F. H. Fibrates in combination with statins in the management of dyslipidemia. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 8, n. 1, p. 35–41; quiz

42–3, 2006.

JAMKHANDE, P. G. et al. Therapeutic approaches to drug targets in atherosclerosis. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 3, p. 179–90, 2014.

JECFA. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Meeting 67th: Rome, Italy, 2006.

JONES, P. J. H.; RIDEOUT, T. C. Plant sterols: nutritional aspects. **Comprehensive Biotechnology**, second edition, p. 535-542, 2011.

JÜRGENS, G. et al. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein(a). **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 13, n. 11, p. 1689–99, 1993.

KALIORA, A. C.; DEDOISSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 1, p. 1–17, 2006.

KANNEL, W. B. et al. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. **Annals of Internal Medicine**, v. 55, p. 33–50, 1961.

KARDEH, S.; ASHKANI-ESFAHANI, S.; ALIZADEH, A. M. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 735, p. 150–68, 2014.

KASHANI, A. et al. Risks associated with statin therapy: a systematic overview of randomized clinical trials. **Circulation**, v. 114, n. 25, p. 2788–97, 2006.

KASPRZAK, J. D.; KŁOSIŃSKA, M.; DROZDZ, J. Clinical aspects of assessment of endothelial function. **Pharmacological Reports**, v. 58 Suppl, p. 33–40, 2006.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition Research**, v. 34, n. 11, p. 907–929, 2014.

KLEINVELD HA et al. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. **Clinical Chemistry**, v. 10, n. 38, p. 2066–2072, 1992.

KOH, W.-P. et al. Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese Health Study. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 9, p. 685–90, 2011.

KOOPMAN, R.; SCHAART, G.; HESSELINK, M. K. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 1, p. 63–8, 2001.

KOWALA, M. C. et al. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice:



macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. **Atherosclerosis**, v. 149, n. 2, p. 323–330, abr. 2000.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, n. 1, p. 12–15, 2001.

KZHYSHKOWSKA, J.; NEYEN, C.; GORDON, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. **Immunobiology**, v. 217, n. 5, p. 492–502, 2012.

LEVY, L. W. et al. Bixin and norbixin in human plasma: determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color. **The Analyst**, v. 122, n. 9, p. 977–980, set. 1997.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 208–219, nov. 2014.

LIBBY, P. et al. Inflammation in Atherosclerosis: **Circulation Journal**, v. 74, n. 2, p. 213–220, 2010.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317–25, 2011.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135–43, 2002.

LIMA, L. R. P. et al. Therapeutic action and innocuity on the metabolism of quercetin, bixin and norbixin in rabbits hyperlipidaemics. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 1, p. 51–56, 2008.

LIMA, L. R. P. et al. Flavonoids and natural urucum dyes on induced hyperlipidemic rabbits. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 69–74, 2010.

LÖNN, M. E.; DENNIS, J. M.; STOCKER, R. Actions of “antioxidants” in the protection against atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 53, n. 4, p. 863–84, 2012.

LORENZ, M. et al. Effects of lycopene on the initial state of atherosclerosis in New Zealand White (NZW) rabbits. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e30808, 2012.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M. Paraoxonase 1: biochemistry and contribution to atherosclerosis. **International Congress Series**, v. 1262, p. 91–94, 2004.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M. The antioxidant properties of high-density lipoproteins in atherosclerosis. **Panminerva Medica**, v. 54, n. 2, p. 83–90, 2012.

MACKNESS, M. I. et al. Low serum paraoxonase: a risk factor for atherosclerotic disease? **Chemico-Biological Interactions**, v. 119, p. 389–397, 1999.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. **Gene**, v. 567, n. 1, p. 12–21, 2015.

MASSBERG, S. et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 7, p. 887–96, 2002.

MCENENY, J. et al. Lycopene intervention reduces inflammation and improves HDL functionality in moderately overweight middle-aged individuals. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 163–168, 2013.

MCKECHNIE, R.; RUBENFIRE, M.; MOSCA, L. Antioxidant nutrient supplementation and brachial reactivity in patients with coronary artery disease. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 3, p. 133–9, 2002.

MIMURA, J.; ITOH, K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 88, p. 221–232, 2015.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–5, 1972.

MITSUISHI, Y.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. **Frontiers in Oncology**, v.2, n. 200, pg. 1-13, 2012.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 176 Pt 1, p. 213–54, 2006.

MOORE, K. J.; FREEMAN, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 8, p. 1702–1711, 2006.

MORAES, M. N.; ZABOT, G. L.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin production. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 262–271, 2015.

MORDENTE, A. et al. Lycopene and cardiovascular diseases: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 1146–63, 2011.

MORROW, J. D. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 2, p. 279–286, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors.

**British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 6–20, 2008.

NEVE, B. P.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 8, p. 1245–1250, 2000.

OBOH, G. et al. Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 3, p. 257–62, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OLIVEIRA, P. F. et al. Bixin protects hepatocytes against 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity but does not suppress DNA damage and pre-neoplastic lesions in the colon of Wistar rats. **Mutation Research**, v. 759, p. 37–42, 2014.

PAFFEN, E.; DEMAAT, M. P. M. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 1, p. 30–9, 2006.

PARK, K.-H.; PARK, W. J. Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 9, p. 1213–25, 2015.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, n. 1, p. 19–39, 2003.

PAUMGARTTEN, F. J. R. et al. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1595–1601, 2002.

PEREIRA, T. Dyslipidemia and cardiovascular risk: lipid ratios as risk factors for cardiovascular disease. In: KELISHADI, R. (Ed.). **Dyslipidemia - From Prevention to Treatment**. [s.l.] InTech, 2012. p. 279–302.

PERFETTINI, J.-L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 179–183, 2005.

POLI, G. et al. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 3, p. 180–9, 2009.

PRASAD, K. Regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 34–42, 2008.

QIAO, M. et al. Increased expression of glutathione reductase in macrophages decreases atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 6, p. 1375–1382, 2007.

RADI, R. et al. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 5, p. 463–488, 2001.

RADOMSKA-LEŚNIEWSKA, D. M. et al. Reactive oxygen species and synthetic antioxidants as angiogenesis modulators: Clinical implications. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 2, p. 462–471, 2016.

RAFALOWSKI, R. et al. Fatty acid composition, tocopherol and b-carotene content in polish in commercial vegetable oils. *Pakistan Journal of Nutritional*, v. 7, n. 2, p. 278-282, 2008.

RAO, M. P. et al. Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection - Preparation, characterisation and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1-2, p. 485–92, 2014.

REDDY, M. K.; ALEXANDER-LINDO, R. L.; NAIR, M. G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9268–9273, 2005.

REYFTMANN, J.-P. et al. Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autoperoxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1042, n. 2, p. 159–167, 1990.

REZZANI, R. et al. Atherosclerosis and oxidative stress. **Histology and Histopathology**, v. 23, n. 3, p. 381–390, 2008.

RIOS, A. D. O.; MERCADANTE, A. Z. Optimization of the conditions to obtain bixin crystals and for extraction and saponification to quantify bixin in extruded snacks by HPLC. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 203–213, 2004.

RIOS, A. DE O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. DE L. P. Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1113–1118, 2009.

RIOS, F. J. O. et al. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e36632, 2012.

RISSANEN, T. H. et al. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 1, p. 133–8, 2003.

ROBBESYN, F.; SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A. Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. **Free Radical Research**, v. 38, n. 6, p. 541–51, 2004.

RODRIGUES, E. et al. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure–activity relationship. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2103–2111, 2012.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 1784–1798, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 7, p. 726–740, 2010.

ROEHRS, M. et al. Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

RUBINS, H. B. et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans affairs high-density lipoprotein cholesterol intervention trial study group. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 6, p. 410–8, 1999.

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

SANTOS, G. C. et al. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 335–340, 2012.

SBC. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz brasileiras de dislipidemia e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101 (4), p.1-36, 2013(a).

SBC. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz brasileiras de prevenção cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101 (6), p.1-78, 2013(b).

SCHULZ, K.; KERBER, S.; KELM, M. Reevaluation of the griess method for determining NO/NO<sub>2</sub> in Aqueous and Protein-Containing Samples. **Nitric Oxide**, v. 3, n. 3, p. 225–234, 1999.

SCHWARTZ, H. et al. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2, p. 152-161, 2008.

SCOTTER, M. J. et al. Analysis of annatto ( *Bixa orellana* ) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 1031–1038, 1998.

SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, L. J.; MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016.

SHEN, L.; SEVANIAN, A. OxLDL induces macrophage gamma-GCS-HS protein expression: a role for oxLDL-associated lipid hydroperoxide in GSH synthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 5, p. 813–23, 2001.

SILASTE, M.-L. et al. Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. **The British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1251–8, 2007.

SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 6, p. 561–6, jun. 2001.

SILVA, L. C. S. **Avaliação das propriedades antioxidantes e antiaterogênicas da fucoxantina**. 2016. 73 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

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

SKALÉN, K. et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**, v. 417, n. 6890, p. 750–4, 2002.

SOMACAL, S. **Efeito da norbixina sobre o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a aterosclerose em coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica**. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SOMACAL, S. et al. The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, n. 1-2, p. 243–253, 22 maio 2015.

SOUZA, L. F. et al. The effect of the carotenoid bixin and annatto seeds on hematological markers and nephrotoxicity in rats subjected to chronic treatment with cisplatin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, abr. 2016.

STAELS, B. et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v. 98, n. 19, p. 2088–2093, 1998.

STAHL, W.; SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 691, p. 10–9, 1993.

STEINBERG, D. et al. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation**, v. 80, n. 3, p. 719–23, 1989.

STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 12, p. 2311–6, 1 dez. 2010.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1381–1478, 2004.

STRATTON, S. P.; SCHAEFER, W. H.; LIEBLER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of .beta.-carotene. **Chemical Research in Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 542–547, 1993.

SUCU, N. et al. 3-Nitrotyrosine in atherosclerotic blood vessels. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 1, p. 23–5, 2003.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 662–680, 2007.

TABAS, I.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; OWENS, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 1, p. 13–22, 2015.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S. **Extração da bixina do urucum utilizando diferentes tecnologias**. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...**São Paulo: Editora Edgard Blücher, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/18677>>. Acesso em: 25 jul. 2016

TAKAHASHI, N. et al. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR $\gamma$  activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 4, p. 1372–6, 2009.

TAO, S. et al. Systemic administration of the apocarotenoid bixin protects skin against solar UV-induced damage through activation of NRF2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 690–700, 2015.

TEBAY, L. E. et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 108–146, 2015.

TEDGUI, A. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 515–581, 2006.

TEICH, V.; ARAUJO, D. V. Estimativa de custo da síndrome coronariana aguda no Brasil. *Revista Brasileira de Cardiologia*, v. 24, n. 2, p. 85-94, 2011.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extraction and determination of bixin and norbixin in annatto spice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, dez. 2001.

TOUSOULIS, D. et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 144, n. 3, p. 253–67, 2014.

UPRITCHARD, J. E. et al. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 5, p. 985–92, 2003.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5, p. 612–616, 1999.

WANG, Y. et al. Molecular mechanism of glutathione-mediated protection from oxidized low-density lipoprotein-induced cell injury in human macrophages: Role of glutathione reductase and glutaredoxin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 5, p. 775–785, 2006.

WANG, Z. et al. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels.

**International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, n. 4, p. 533–40, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. France, 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Noncommunicable diseases country profiles 2011**. France, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **10 facts on noncommunicable diseases**. France, 2013.

WINKLER, K. et al. Qualitative effect of fenofibrate and quantitative effect of atorvastatin on LDL profile in combined hyperlipidemia with dense LDL. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 112, n. 5, p. 241–7, 2004.

WINTHER, M. P. J. et al. Nuclear Factor B signaling in atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 5, p. 904–914, 2005.

WONG, B. W. et al. The biological role of inflammation in atherosclerosis. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 28, n. 6, p. 631–41, 2012.

WORLD, C. J.; YAMAWAKI, H.; BERK, B. C. Thioredoxin in the cardiovascular system. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 12, p. 997–1003, 2006.

WRONA, M.; PATEL, K.; WARDMAN, P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 2, p. 262–270, 2005.

XAPLANTERIS, P. et al. Tomato paste supplementation improves endothelial dynamics and reduces plasma total oxidative status in healthy subjects. **Nutrition Research**, v. 32, n. 5, p. 390–394, 2012.

YAMAGUCHI, Y.; KUNITOMO, M.; HAGINAKA, J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 781, n. 1-2, p. 313–30, 2002.

YANG, H. et al. Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses Benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 1, p. 51–58, 2009.

YANG, X. et al. Inhibition of glutathione production induces macrophage CD36 expression and enhances cellular-oxidized low density lipoprotein (oxLDL) uptake. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 36, p. 21788–99, 2015.

YOSHIDA, H.; KISUGI, R. Mechanisms of LDL oxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23, p. 1875–1882, 2010.

YU, X.-H. et al. Foam cells in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p. 245–252, 2013.

YURDAGUL, A. et al. Oxidized LDL induces FAK-dependent RSK signaling to drive NF-



κB activation and VCAM-1 expression. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 8, p. 1580–91, 2016.

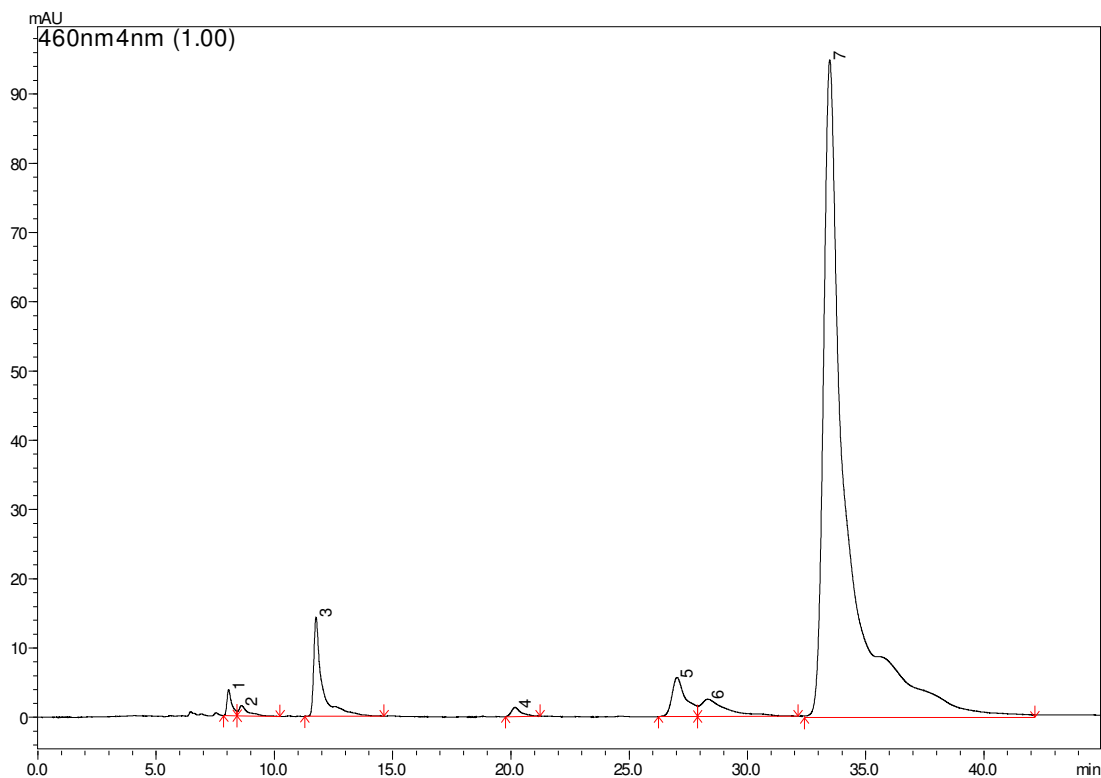
ZADELAAR, S. et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 8, p. 1706–21, 2007.

ZANG, J.; STANLEY, R. A.; MELTON, L. D. Lipid peroxidation inhibition capacity assay for antioxidants based on liposomal membrane. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 50, p. 714-724, 2006.

ZMIJEWSKI, J. W. et al. Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 2, p. H852–61, ago. 2005.

ZRELLI, H. et al. Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK-FOXO3a pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, n. 2-3, p. 275–282, 2011.

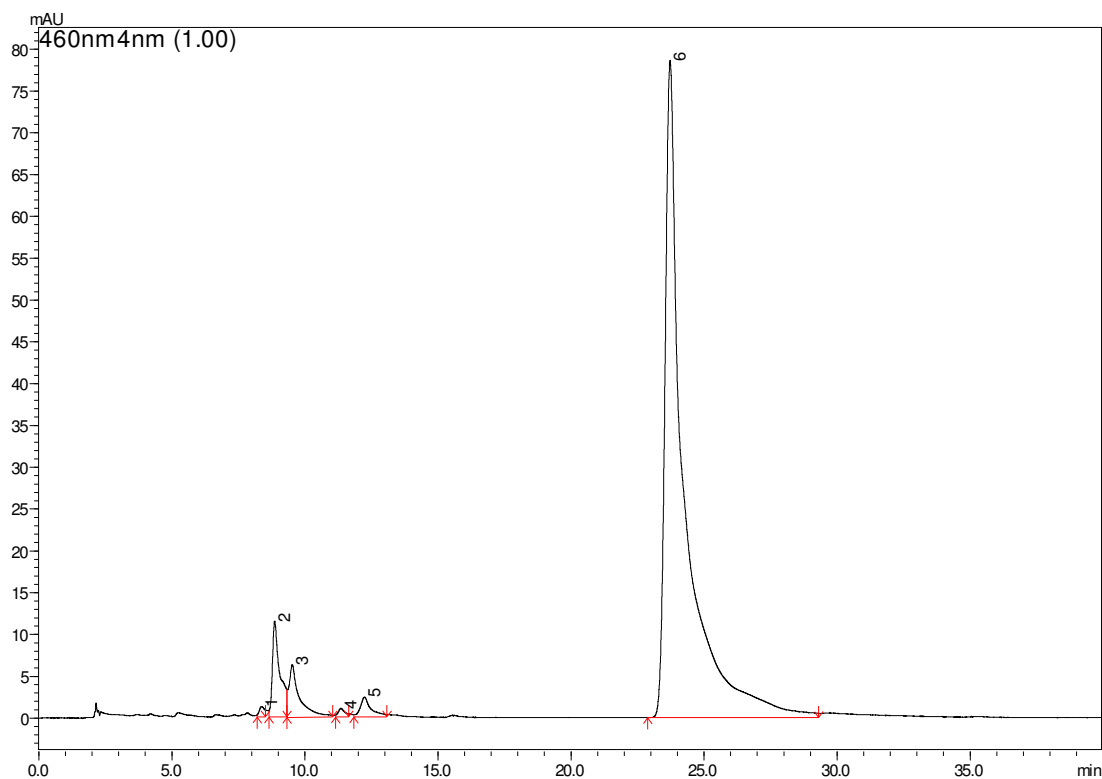
## ANEXO A – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE BIXINA



Pico	$\lambda_{\text{máx}}$	Área <sub>(460nm)</sub>	% Área	Identificação*
1	394	53578	0,74	trans-C17
2	457	41659	0,57	di-cis-norbixina
3	460	281630	3,89	9-cis-norbixina
4	447	37694	0,52	di-cis-norbixina
5	467	210400	2,91	N.I.
6	457	151312	2,09	di-cis-norbixina
7	460	6309767	89,3	bixina

\* A identificação dos compostos presentes no extrato foi baseada nas informações contida na literatura (LEVY et al., 1997; SCOTTER et al., 1998), considerando os tempos de retenção e os espectros de DAD em condições experimentais semelhantes. Legenda: N.I. – não identificado. Nota: conforme o laudo fornecido pela Christian-Hansen o extrato é composto por bixina e óleo de girassol 20%.

## ANEXO B – CROMATOGRAMA EXPERIMENTO *IN VIVO*



Nota: Cromatograma representativo do soro dos animais experimentais suplementados com bixina por 60 dias.

Pico	$\lambda_{\text{máx}}$	Área <sub>(460nm)</sub>	Identificação*
1	394	16722	trans-C17
2	454	226756	di-cis-norbixina
3	445	176203	tri-cis-norbixina
4	407	18325	N.I.
5	460	67922	9-cis-norbixina
6	480	3940857	Sudan (P.I.)

\*A identificação dos compostos presentes no extrato foi baseada nas informações contida na literatura (LEVY et al., 1997; SCOTTER et al., 1998), considerando os tempos de retenção e os espectros de DAD em condições experimentais semelhantes. Legenda: N.I. – não identificado; P.I. – padrão interno.

## ANEXO C – AUTORIZAÇÃO PARA USO DAS FIGURAS

### FIGURA 1

27/07/2016

RightsLink Printable License

#### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 27, 2016

This Agreement between Sabrina Somacal ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3917091128076
License date	Jul 27, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Clinica Chimica Acta
Licensed Content Title	Mechanisms of LDL oxidation
Licensed Content Author	Hiroshi Yoshida,Reiko Kisugi
Licensed Content Date	14 December 2010
Licensed Content Volume Number	411
Licensed Content Issue Number	23-24
Licensed Content Pages	8
Start Page	1875
End Page	1882
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 3
Title of your thesis/dissertation	POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA IN VIVO E IN VITRO
Expected completion date	Sep 2016
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Sabrina Somacal Br 158 Km 265
	Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul 98130000 Brazil Attn: Sabrina Somacal
Total	0.00 USD

## FIGURA 2

14/07/2016

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 14, 2016

This Agreement between Sabrina Somacal ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3907850546740
License date	Jul 14, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Chromatography B
Licensed Content Title	Assay methods of modified lipoproteins in plasma
Licensed Content Author	Yu Yamaguchi,Masaru Kunitomo,Jun Haginaka
Licensed Content Date	5 December 2002
Licensed Content Volume Number	781
Licensed Content Issue Number	1-2
Licensed Content Pages	18
Start Page	313
End Page	330
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Efeito antiaterogenico da bixina in vivo e in vitro
Expected completion date	Aug 2016
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Sabrina Somacal Br 158 Km 265  Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul 98130000 Brazil Attn: Sabrina Somacal
Total	0.00 USD

## FIGURA 3

14/07/2016

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 14, 2016

---

This Agreement between Sabrina Somacal ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3907850574394
License date	Jul 14, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Free Radical Biology and Medicine
Licensed Content Title	Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis
Licensed Content Author	Junsei Mimura, Ken Itoh
Licensed Content Date	November 2015
Licensed Content Volume Number	88
Licensed Content Issue Number	n/a
Licensed Content Pages	12
Start Page	221
End Page	232
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA IN VIVO E IN VITRO
Expected completion date	Sep 2016
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Sabrina Somacal Br 158 Km 265  Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul 98130000 Brazil Attn: Sabrina Somacal
Total	0.00 USD

## FIGURA 4

14/07/2016

RightsLink Printable License

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 14, 2016

---

This Agreement between Sabrina Somacal ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number	3907880816179
License date	Jul 14, 2016
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature
Licensed Content Title	Inflammation in atherosclerosis
Licensed Content Author	Peter Libby
Licensed Content Date	Dec 19, 2002
Licensed Content Volume Number	420
Licensed Content Issue Number	6917
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 4
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA IN VIVO E IN VITRO
Expected completion date	Sep 2016
Estimated size (number of pages)	150
Requestor Location	Sabrina Somacal Br 158 Km 265  Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul 98130000 Brazil Attn: Sabrina Somacal
Billing Type	Invoice
Billing Address	Sabrina Somacal Br 158 Km 265  Julio de Castilhos, Brazil 98130000 Attn: Sabrina Somacal
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

## FIGURA 6

25/07/2016

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 25, 2016

---

This Agreement between Sabrina Somacal ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.


License Number	3916061166188
License date	Jul 25, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Food Research International
Licensed Content Title	Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities
Licensed Content Author	Elisabet Fernández-García,Irene Carvajal-Lérida,Manuel Jarén-Galán,Juan Garrido-Fernández,Antonio Pérez-Gálvez,Dámaso Hornero-Méndez
Licensed Content Date	May 2012
Licensed Content Volume Number	46
Licensed Content Issue Number	2
Licensed Content Pages	13
Start Page	438
End Page	450
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	figure 1
Title of your thesis/dissertation	POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA IN VIVO E IN VITRO
Expected completion date	Sep 2016
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Sabrina Somacal Br 158 Km 265



FIGURA 7

Origem: EMEPA - Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A - <http://www.emepa.org.br>

---

 **Dr. Camilo Flamarion de Oliveira Franco**, é Diretor Técnico da EMEPA.  
Doutorado em Fitotecnia pela Universidad Politécnica de Madrid, U.P.MADRID, Espanha.  
Mestrado em Agronomia (Fitotecnia) pela Universidade Federal do Ceará, UFC, Brasil.  
Graduado em Agronomia pela Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil.  
Está cursando Pós-Doutorado na Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais  
**Contato:** [camilo@emepa.org.br](mailto:camilo@emepa.org.br)

---

Reprodução autorizada desde que citadas a autoria e a fonte

---

Dados para citação bibliográfica (ABNT):  
FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P. da; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. Etnobotânica e Taxonomia do UrucumTaxon. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em:  
<[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/UrucumTaxon/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm)>. Acesso em: 13/10/2014

---

[www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/UrucumTaxon/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm) Publicado em: 13/10/2008

## ANEXO D – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DO ARTIGO

14/07/2016

RightsLink Printable License

### SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 14, 2016

This Agreement between Sabrina Somacal ("You") and Springer ("Springer") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer and Copyright Clearance Center.

License Number	3907890212077
License date	Jul 14, 2016
Licensed Content Publisher	Springer
Licensed Content Publication	Molecular and Cellular Biochemistry
Licensed Content Title	The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects
Licensed Content Author	Sabrina Somacal
Licensed Content Date	Jan 1, 2015
Licensed Content Volume Number	403
Licensed Content Issue Number	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Full text
Number of figures/tables/illustrations	1
Number of copies	3
Author of this Springer article	Yes and you are the sole author of the new work
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	POTENCIAL ANTIATEROGÊNICO DA BIXINA IN VIVO E IN VITRO
Expected completion date	Sep 2016
Estimated size(pages)	150
Requestor Location	Sabrina Somacal Br 158 Km 265  Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul 98130000 Brazil Attn: Sabrina Somacal
Billing Type	Invoice
Billing Address	Sabrina Somacal Br 158 Km 265  Julio de Castilhos, Brazil 98130000 Attn: Sabrina Somacal
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

#### Introduction

The publisher for this copyrighted material is Springer. By clicking "accept" in connection