

Luana Caroline Schüler da Silva

**FUCOXANTINA INIBE A OXIDAÇÃO DA LDL E
ATIVACÃO DE MACRÓFAGOS IN VITRO**

Dissertação submetida ao
Programa de Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Andreza
Fabro de Bem

Florianópolis
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Luana Caroline Schüler da Silva

**FUCOXANTINA INIBE A OXIDAÇÃO DE LDL E
ATIVÇÃO DE MACRÓFAGOS IN VITRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andreza Fabro de Bem.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Luana Caroline Schüller da
Fucoxantina inibe a oxidação da LDL e ativação de
macrófagos in vitro / Luana Caroline Schüller da Silva ;
orientadora, Andreza Fabro de Bem - Florianópolis, SC, 2016.
93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências

1. Saúde. 2. Fucoxantina. 3. LDL. 4. Macrófagos. 5.
Estresse Oxidativo. I. Bem, Andreza Fabro de. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação Multidisciplinar em Saúde. III. Título.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória nem derrota.”

Theodore

Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, mulher guerreira, por todo amor incondicional e por toda a força que pode me ajudar nesse caminho.

Agradeço à minha orientadora Andreza Fabro de Bem, grande exemplo de profissionalismo, por todos os ensinamentos, paciência e incentivo a mim. Obrigada por me mostrar como é ser apaixonada pela pesquisa.

Aos amigos do laboratório e da pós-graduação, tanto pelos ensinamentos que levarei comigo quanto pelas risadas que jamais esquecerei.

Aos professores da PPG-BQA pelos conhecimentos e exemplos passados durante o mestrado.

Aos amigos que direta ou indiretamente participaram desta fase da minha vida, obrigada pela paciência e apoio.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Atualmente, as doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo. Por sua vez, a aterosclerose, principal causa das doenças cardiovasculares, é uma doença inflamatória crônica e progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos celulares na túnica íntima das artérias de médio e grande calibre. A produção anormal de espécies reativas relacionada a diversos fatores de risco para essa patologia, e a consequente modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) desempenham papéis importantes na patogênese dessa condição. Um possível método para prevenir a aterosclerose seria a administração de substâncias antioxidantes de maneira a deixar a LDL menos sensível ao processo oxidativo, impedindo ou retardando a progressão da doença. Por esse motivo, a inclusão de antioxidantes dietéticos representa uma alternativa concreta no controle da progressão da aterogênese. A fucoxantina, um carotenóide extraído de algas marrons comestíveis, possui excelentes atividades anti-inflamatórias e antioxidantes já demonstradas em diversos modelos experimentais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar os potenciais efeitos antioxidante e antiaterogênico do composto fucoxantina sobre a inibição da oxidação da LDL humana isolada, assim como em macrófagos J774 expostos à LDL oxidada (LDLox). Inicialmente, avaliamos os efeitos protetores da fucoxantina frente à oxidação de LDL humana induzida por Cu^{2+} . O composto inibiu de maneira dependente de concentração a lipoperoxidação da LDL. Além disso, a oxidação proteica da LDL humana isolada foi igualmente inibida de forma dependente da concentração. Considerando os efeitos protetores antioxidantes da fucoxantina, e considerando o envolvimento da LDLox na patogênese da aterosclerose, investigamos os efeitos protetores da fucoxantina sobre danos citotóxicos induzidos pela exposição de macrófagos murinos J774 à LDLox. O pré-tratamento por 24 horas com fucoxantina reduziu efeitos citotóxicos causados pela LDLox, i.e., a produção elevada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs), distúrbio na homeostase do NO, redução dos níveis intracelulares de glutathione reduzida (GSH), comprometimento na bioenergética mitocondrial e formação de células espumosas. O potencial efeito antiaterogênico da fucoxantina foi relacionado à sua capacidade de sequestrar radicais livres, assim como de ativar fatores de transcrição como Nrf-2, e inibir a atividade do NF- κ B, já relatadas na literatura. Os resultados indicam um

papel benéfico da fucoxantina na aterogênese, impedindo eventos oxidativos que possam contribuir para a progressão da doença.

Palavras-chave: Aterosclerose. Lipoproteína de baixa densidade. Macrófagos. Carotenóides.

ABSTRACT

Nowadays, cardiovascular diseases are the leading cause of mortality and morbidity worldwide. In turn, atherosclerosis, mainly cause of cardiovascular diseases, it's a inflammatory and chronic pathology characterized by the accumulation of lipids and cellular elements in the intima layer of arteries of medium and large caliber. Abnormal production of reactive species related to several risk factors for this pathology, and consequently the oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) play an important role in the pathogenesis of this condition. One possible method to prevent atherosclerotic diseases would be the administration of antioxidant substances thereby making LDL less sensitive to this oxidative process, preventing or delaying the disease progression. For this reason, the inclusion of dietary antioxidants represents a concrete alternative in controlling the progression of atherogenesis. Fucoxanthin, a carotenoid extracted from edible brown seaweed, has excellent anti-inflammatory and antioxidative activities already demonstrated in several experimental models. In this context, the objective of this study was to investigate the potential antioxidant and antiatherogenic effects of the compound fucoxanthin on the inhibition of human isolated LDL oxidation, as well on macrophages J774 expose to oxidized LDL (oxLDL). Initially, we evaluated the protective effects of fucoxanthin on human Cu^{2+} -induced human LDL oxidation. The compound caused a concentration-dependent inhibition on the LDL lipoperoxidation. Furthermore, the protein moieties oxidation from human isolated LDL was also inhibited in a concentration-dependent manner. Considering the antioxidative protective effects of fucoxanthin, and considering the involvement of oxLDL in the pathogenesis of atherosclerosis, we investigated the protective effects of fucoxanthin on oxLDL-mediated cytotoxic effects in murine macrophage cells. The 24 hours pre-treatment with fucoxanthin reduced the cytotoxic effects caused by oxLDL, including elevated production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), disturbance of .NO homeostasis, reduction of intracellular levels of reduced glutathione (GSH), foam cell formation and impairment in mitochondrial bioenergetics. The potential antiatherogenic effect of fucoxanthin was related to its ability of scavenging free radicals, as well as activating transcription factors as Nrf-2, and inhibit the activity of NF- κ B, as reported in the literature. The results indicate a beneficial role of fucoxanthin in atherogenesis by preventing oxidative events that may contribute to disease progression.

Keywords: Atherosclerosis. Low density lipoprotein. Macrophages. Carotenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recrutamento e ativação de macrófagos na lesão aterosclerótica.	19
Figura 2. Progressão do ateroma.	20
Figura 3. Representação esquemática de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL).	22
Figura 4. Modificação oxidativa da LDL.	23
Figura 5. Estrutura química da fucoxantina.	28
Figura 6. Efeito da fucoxantina (2 – 40 μM) na peroxidação lipídica induzida por Cu^{2+} em LDL humana isolada.	48
Figura 7. Efeito da fucoxantina (0,4 – 20 μM) na oxidação de resíduos de triptofano induzido por Cu^{2+} em LDL humana isolada.	49
Figura 8. Efeito da fucoxantina (0,4 – 40 μM) sobre a viabilidade celular em macrófagos J774 de murinos.	50
Figura 9. Efeito da fucoxantina sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por LDLox em macrófagos.	51
Figura 10. Efeito da fucoxantina sobre a produção de ERNs em macrófagos murinos J774 estimulados com LDLox.	53
Figura 11. Efeito da fucoxantina sobre os níveis de .NO em macrófagos estimulados com LDLox.	55
Figura 12. Efeito da fucoxantina sobre o conteúdo intracelular de GSH em macrófagos estimulados com LDLox.	55
Figura 13. Efeito da fucoxantina sobre o consumo de O_2 em macrófagos expostos à LDLox.	58
Figura 14. Efeito da fucoxantina sobre a formação de células espumosas em macrófagos expostos à LDLox.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\cdot^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
AST	Alanina aminotransferase
Apo B-100	Apolipoproteína B-100
AST	Aspartato aminotransferase
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BSO	L-Butionina-sulfoximina
CD36	Receptor scavenger CD36
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DCFH-DA	2',7'- Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCV	Doença cardiovascular
DHA	Ácido docosahexanóico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Proteínas quinases reguladas por sinais
extracelulares	
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GCL	Glutamato cisteína ligase
GCLC	Glutamato cisteína ligase subunidade catalítica
GCLM	Glutamato cisteína ligase subunidade
modificadora	
GGT	Gama-GT
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HMG CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A
HO-1	Heme oxigenase-1
HOCl	Ácido hipocloroso
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LOX-1	Receptor de LDL oxidada

LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos - 1
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo
de tetrazolina	
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina
reduzida	
NF-κB	Fator nuclear κB
NOS	Óxido nítrico sintase
NQO1	NAD(P)H quinona desidrogenase 1
Nrf-2	Fator nuclear eritróide-2
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
p38	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
PBS	Salina tamponada com fosfato
PGC-1α	Receptor proliferador ativado de peroxissoma gama
coativador 1-alfa	
PGE ₂	Prostaglandina E2
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
RCR	Capacidade máxima de respiração
SFB	Soro fetal bovino
SHRSP	Ratos espontaneamente hipertensos propensos
ao AVC	
SOD	Superóxido dismutase
SR-A	Receptor <i>scavenger</i> A
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adesão vascular - 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	ATEROSCLEROSE	17
1.1.1	Aspectos gerais	17
1.1.2	Aspectos morfológicos da aterosclerose	18
1.2	LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) E A ATEROSCLEROSE	21
1.3	HIPÓTESE OXIDATIVA DA LDL NA ATEROSCLEROSE	22
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E A ATEROSCLEROSE	24
1.5	CAROTENÓIDES	27
1.5.1	Fucoxantina	28
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	JUSTIFICATIVA	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Fucoxantina	37
4.1.1	Extração da fucoxantina	37
4.1.2	Purificação da fucoxantina	37
4.1.3	Identificação e quantificação da fucoxantina	38
4.1.4	Preparo da fucoxantina para protocolos experimentais	38
4.2	Isolamento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana	38
4.3	Oxidação da LDL	39
4.4	Ensaio <i>in vitro</i> de oxidação de LDL	39
4.4.1	Dienos conjugados	39
4.4.2	Fluorescência do triptofano	40

4.5	Ensaio <i>in vitro</i> com cultura de macrófagos _____	40
4.5.1	Ensaio de citotoxicidade celular _____	41
4.5.2	Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) _____	41
4.5.3	Medida da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) _____	42
4.5.4	Determinação da concentração intracelular de glutatona (GSH) _____	42
4.5.5	Determinação dos níveis de nitrito (NO ₂) _____	43
4.5.6	Respirometria de alta resolução em células intactas 43	
4.5.7	Ensaio de formação de células espumosas _____	44
4.6	Determinação dos níveis de proteínas _____	45
4.7	Análise estatística _____	45
5	RESULTADOS _____	47
5.1	A fucoxantina impediu a oxidação de LDL induzida por Cu ²⁺ 47	
5.2	A fucoxantina inibiu a oxidação de resíduos de triptofano na LDL induzida por Cu ²⁺ _____	48
5.3	Análise da viabilidade celular de macrófagos expostos a diferentes concentrações de fucoxantina _____	49
5.4	A fucoxantina foi capaz de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) em macrófagos expostos à LDLox _____	50
5.5	Fucoxantina diminuiu a produção de NO em macrófagos expostos a LDLox _____	54
5.6	Efeito da fucoxantina sobre o conteúdo de glutatona (GSH) em macrófagos expostos a LDLox _____	55
5.7	Fucoxantina preserva a capacidade respiratória mitocondrial e o consumo de oxigênio acoplado a síntese de ATP em macrófagos expostos à LDLox _____	56
5.8	Fucoxantina reduziu a formação de células espumosas induzida pela LDLox em macrófagos _____	58

6	DISCUSSÃO _____	62
7	CONCLUSÕES _____	71
8	PERSPECTIVAS _____	73
	REFERÊNCIAS _____	75

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo em países desenvolvidos industrializados ou em desenvolvimento. As DCVs representam cerca de 17,5 milhões de mortes ao ano no mundo (MOZZAFARIAN, D. et al, 2015; WHO, 2015). Desse representativo mundial, estima-se que 7,4 milhões dos casos sejam devido a doença arterial coronariana e 6,7 milhões ao infarto de miocárdio (WHO, 2015).

Apesar de nos últimos 30 anos ocorrer um declínio de mortalidade associada às doenças cardiovasculares nos países desenvolvidos, houve uma rápida elevação em países em desenvolvimento como o Brasil, sendo que a Organização Mundial de Saúde afirma que tal tendência deve persistir (SPOSITO et. al, 2007). No Brasil, segundo dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde, cerca de 30% das mortes são decorrentes das doenças cardiovasculares, registrando 339 mil óbitos em 2013.

Etiologicamente, a aterosclerose é o processo patológico que antecede a maior parte dos episódios de doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC), no qual ocorre obstrução aguda de artérias em seu espaço interno, perdendo elasticidade, resultante de eventos vasculares iniciados pela ruptura da placa aterosclerótica (LIBBY, 2002a).

1.1 ATEROSCLEROSE

1.1.1 Aspectos gerais

A aterosclerose é uma doença inflamatória complexa de caráter crônico e progressivo, cujo desenvolvimento é caracterizado por diversos eventos celulares e moleculares, dentre os quais o acúmulo de lipídios, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), e de elementos celulares, como macrófagos e células musculares lisas, que vão se depositar na túnica íntima de artérias de médio e grande calibre, ocasionando a formação de placas ateroscleróticas (HANSSON et al., 2015; ROSS, 1999).

O desenvolvimento da doença está relacionado com os hábitos de vida das pessoas, como sedentarismo, tabagismo, diabetes, altos níveis plasmáticos de colesterol, hipertensão e obesidade. Até meados da década de 70, vários estudos eram focados na associação entre lipídios e a aterosclerose, onde diversas evidências clínicas e experimentais

levavam a uma relação entre a hipercolesterolemia e a formação do ateroma (LIBBY, 2002a). Já a partir da década de 90, a aterosclerose foi reconhecida como uma doença de caráter inflamatório crônico, apresentando componentes infecciosos e autoimunes para a evolução do processo (ROCHA e LIBBY, 2009; ROSS, 1999), sendo que experimentos realizados em modelos animais e em humanos demonstraram que a inflamação mostra-se presente em todas as fases da aterosclerose, incluindo fase de início, progressão e nas complicações trombóticas da lesão (LIBBY et al., 2010).

O caráter crônico deve-se a característica insidiosa de formação da lesão aterosclerótica, podendo se estender em décadas para formação da mesma, a qual pode se romper devido à força física do fluxo sanguíneo, expondo os componentes da parede arterial, levando assim, à formação de trombos, os quais podem interromper o fornecimento de oxigênio para órgãos vitais como pulmões, coração e cérebro (SHAH, 2009; STOCKER e KEANEY, 2004).

1.1.2 Aspectos morfológicos da aterosclerose

A aterosclerose manifesta-se tipicamente em três estágios, sendo eles a fase inicial (com lesões precoces), fase de progressão (com o desenvolvimento das lesões), e a fase de lesões maduras, podendo ocorrer o desencadeamento de complicações trombóticas (KEANEY, 2000).

Os processos iniciais da aterosclerose ocorrem geralmente em locais onde o fluxo sanguíneo é turbulento e desorientado, como na curvatura ou em bifurcações arteriais (LIBBY et al., 2016; LUSIS, 2000). O endotélio, com suas junções intercelulares complexas, funciona como uma barreira permeável entre o sangue e os tecidos, regulando a passagem de células da circulação, assim como promovendo de maneira molecular a regulação de processos como inflamação e remodelação vascular (LUSIS, 2000). A disfunção endotelial não somente é um iniciador, mas pode ser um fator importante na progressão da aterosclerose (PARK e PARK, 2015). A perda da integridade do endotélio favorece uma resposta inflamatória, acarretando em aumento da permeabilidade vascular para elementos circulantes como leucócitos, plaquetas e lipídios (KADAR e GLASZ, 2001). Essa disfunção endotelial pode ser causada por diversos fatores, incluindo elevados níveis de LDL, geração de estresse oxidativo por tabagismo, obesidade e diabetes, alterações genéticas, concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína, e a presença de alguns

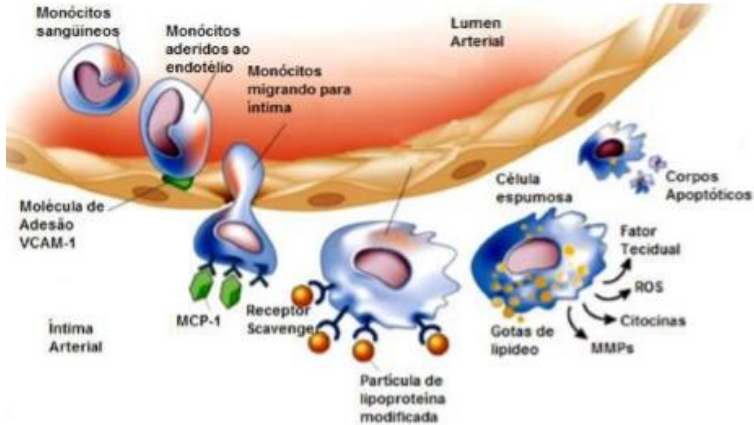
microorganismos, como o vírus da herpes e *Chlamydia pneumoniae* (ROSS, 1999).

As lesões iniciais, que originam ao ateroma, são caracterizadas por áreas de deposição de lipídios nomeadas como estrias gordurosas, que representam macrófagos cheios de lipídios e células musculares lisas em áreas focais da camada íntima das artérias (LIBBY et al., 2016; STARY, 1990). A formação dessas lesões inicia-se pela passagem da LDL pela camada endotelial até a camada íntima, onde esta lipoproteína sofrerá modificações oxidativas por ação enzimática ou não enzimática, levando à liberação de fosfolipídeos bioativos que podem ativar as células endoteliais. Uma vez ativadas, podem expressar diversas moléculas de adesão para leucócitos, em especial a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), que vão promover o rolamento e adesão dessas células sanguíneas na superfície vascular. Após a adesão, os leucócitos vão migrar para a camada íntima em resposta a estímulos quimioatrativos, como por exemplo, pelas quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo a MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos-1), a qual recruta monócitos circulantes para local da lesão (HANSSON et al., 2006).

Uma vez na camada íntima arterial, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, que expressam os receptores “*scavenger*”, como o SR-A e CD-36, que permitem a captação de partículas de lipoproteínas modificadas, levando então à formação de células espumosas, que são o resultado do acúmulo de lipídio em seu citoplasma (LIBBY et al., 2010; ROSS, 1999). Tais células espumosas vão produzir fatores de crescimento, induzindo a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima. Com a proliferação dessas células, a estria gordurosa é convertida em ateroma. Além disso, as células espumosas secretam citocinas pró-inflamatórias, que vão amplificar a resposta inflamatória do local, intensificando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Já as células musculares lisas podem produzir matriz extracelular, levando à formação de uma capa fibrosa, a qual vai cercar o centro do ateroma, este rico em lipídios, contendo células mortas ou em apoptose (GLASS e WITZTUM, 2001; LIBBY, 1996;2002a) (Figura 1).

Figura 1. Recrutamento e ativação de macrófagos na lesão aterosclerótica. Monócitos sanguíneos se aderem às células endoteliais através de moléculas de adesão vascular (VCAM-1), atravessam a camada endotelial e adquirem características de macrófagos teciduais na camada íntima da artéria. Os macrófagos expressam receptores scavengers que incorporam partículas de LDL

modificadas e formam as células espumosas, elementos importantes para o estabelecimento da lesão aterosclerótica. Estes macrófagos ativados secretam componentes inflamatórios (citocinas, MMPs, EROs, etc) que intensificam e perpetuam o processo aterosclerótico (Adaptado de Libby, 2002).

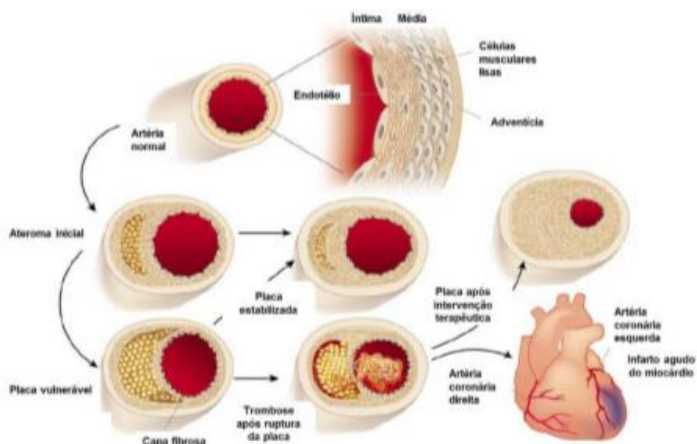


Ao mesmo tempo, macrófagos e células espumosas podem participar das complicações trombóticas da aterosclerose pela produção e secreção de enzimas proteolíticas que podem degradar a matriz extracelular, rompendo a placa aterosclerótica. A ruptura dessa capa fibrosa pode levar a um processo denominado aterotrombose, onde o sangue entra em contato com o fator tecidual pró-coagulante, formando assim um trombo sobrejacente (LIBBY, 2002a), sendo um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose.

A formação de trombos vai depender da vulnerabilidade da placa aterosclerótica, que podem ser classificadas em estáveis ou vulneráveis à ruptura. As placas estáveis possuem um pequeno núcleo lipídico com uma densa camada fibrosa; já as placas vulneráveis apresentam uma fina camada fibrosa e um número elevado de células inflamatórias (LUSIS, 2000; STOCKER e KEANEY, 2004) (Figura 2).

Figura 2. Progressão do ateroma. No ateroma inicial, o recrutamento de células inflamatórias e o acúmulo de lipídios 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 infarto agudo do miocárdio (Adaptado de Libby, 2002).



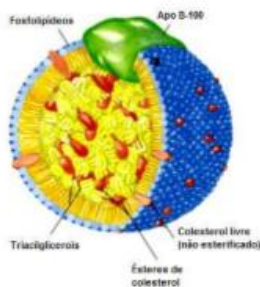
Com o rompimento da placa aterosclerótica, o material lipídico altamente trombogênico entra em contato com o sangue e seus elementos circulantes, como as plaquetas ativadas pela trombina gerada a partir da cascata de coagulação, favorecendo a formação dos trombos. Se o mesmo for para a circulação e causar obstrução de algum vaso, pode desencadear eventos tais como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Além disso, a resposta de cicatrização pode estimular a proliferação de células musculares lisas, levando ao estabelecimento de placas estáveis e aumento da cápsula fibrosa. Isso pode acarretar em uma constrição do lúmen vascular, e por consequência uma restrição do fluxo sanguíneo, especialmente em situações de maior demanda cardíaca (LIBBY, 2002a; LIBBY et al., 1996; STOCKER e KEANEY, 2004).

1.2 LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) E A ATEROSCLEROSE

A LDL é a principal lipoproteína transportadora de lipídeos, responsável pelo fornecimento de colesterol para tecidos periféricos, e é um dos agentes causadores da aterosclerose (LUSIS, 2000). Apresentam massa molecular relativa média de 3000kDa, com diâmetro entre 22 e 28 nm, e densidade entre 1.019 e 1.063 g/mL. A estrutura geral é uma emulsão esferoidal constituída por uma porção lipídica, basicamente

composta por colesterol, fosfolipídeos e triacilgliceróis, e uma porção proteica, constituída por uma única proteína, a apolipoproteína B-100 (apo B-100) (Figura 3). As células capturam as partículas de LDL através de receptores B/E (receptores para Apo B e E), que vão reconhecer a parte proteica da lipoproteína (LEHNINGER et. al, 2006). A expressão desses receptores no fígado, portanto, é responsável pelo controle de níveis de colesterol no sangue, e vai depender da atividade da enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima chave para síntese de colesterol hepático (SPOSITO et al., 2007).

Figura 3. Representação esquemática de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL). A partícula de LDL é formada de uma monocamada de fosfolipídeos e colesterol livre na camada externa onde também se encontra a maior proteína, a Apo B-100. Triacilgliceróis e ésteres de colesterol encontram-se na sua parte interna (Adaptado de Lehninger et al., 2006).



Estudos sobre a hipercolesterolemia estabeleceram relações entre a LDL e a aterosclerose. Em 1985, os pesquisadores americanos Michael Brown e Joseph Goldstein ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por caracterizarem os receptores da LDL, associando a deficiência genética desses receptores ao desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar. Heterozigotos para essa patologia manifestariam elevação de duas a cinco vezes nos níveis plasmáticos de LDL resultado de uma deficiência da depuração dessa lipoproteína devido ao prejuízo funcional dos seus receptores. Já os indivíduos homozigotos apresentariam aumento de quatro a seis vezes no colesterol plasmático, desenvolvendo precocemente o processo de aterosclerose (GOTTO e GRUNDY, 1999; STEINBERG, 2002).

1.3 HIPÓTESE OXIDATIVA DA LDL NA ATEROSCLEROSE

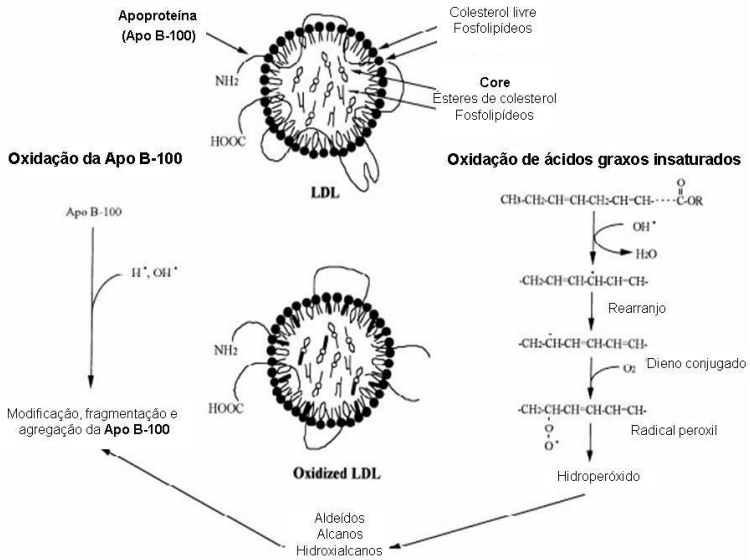
A partícula de LDL difunde passivamente entre as junções celulares do endotélio; no entanto, a LDL nativa não é captada por macrófagos de maneira suficientemente rápida para formar células espumosas. Portanto, é proposto que a LDL sofre modificações na parede arterial para ser captada pelos receptores “*scavengers*” expressos pelos macrófagos (ITABE, 2003; LUSIS, 2000).

Há mais de 25 anos, Steinberg e colaboradores (1989), propuseram a hipótese da modificação oxidativa da LDL, sugerindo que processos oxidativo levariam a modificações nas lipoproteínas de baixa densidade, processo este fundamental na aterogênese. Os mecanismos das modificações das lipoproteínas *in vivo* ainda não estão completamente esclarecidos; no entanto, sabe-se que um dos eventos iniciais da oxidação da LDL é a peroxidação de seu conteúdo lipídico, como os fosfolípidos e ésteres de colesterol (GLAVIND et al., 1952). Interessantemente, em 1990, Hermann Esterbauer observou que a LDL poderia ser facilmente oxidada em presença de íons metálicos de transição (como ferro e cobre), ocorrendo a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) por radicais livres e formação de aldeídos (ESTERBAUER et al., 1990). Esse resultado ocorre devido a geração de um dos produtos final da oxidação dos ácidos graxos, os dienos conjugados, que reagem rapidamente com oxigênio molecular, iniciando uma reação auto-catalítica que resulta na formação de hidroperóxidos. Os hidroperóxidos lipídicos podem ainda originar fragmentos de cadeia curta (com 3 a 9 carbonos), incluindo aldeídos (como malondialdeído e 4-hidronenonal) e cetonas, que podem inclusive conjugar-se com outros lípidos ou proteínas (PORTER, 1984; YAMAGUCHI et al., 2002).

Ainda, os produtos da lipoperoxidação, como os aldeídos, vão formar bases de Schiff com o grupo amino do resíduo de aminácido da apo B-100 (STEINBRECHER, 1987; YAMAGUCHI et al., 2002). Modificações estruturais devido a perda da estrutura secundária ou alterações de carga elétrica resultam em uma proteína com carga negativa aumentada. Conseqüentemente, o aumento da carga negativa da apo-100 resulta em alteração no seu reconhecimento pelo receptor de LDL, e passa a ter uma maior afinidade pelo receptor “*scavenger*” dos macrófagos, ocasionando à captação e acúmulo de LDL nestas células e formação das células espumosas, essenciais para a formação da lesão primária da aterosclerose (MIMURA e ITOH, 2015; YAMAGUCHI et al., 2002) (Figura 4).

Figura 4. Modificação oxidativa da LDL. O dano oxidativo a LDL afeta ambos componentes lipídicos e proteicos da molécula. A oxidação da LDL leva à modificação, fragmentação e agregação da apo B-100. Por outro lado, a oxidação da

LDL inicia-se através da peroxidação lipídica, principalmente de fosfolípidos e ésteres de colesterol, resultando na formação de dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos (Adaptado de Yamaguchi et al., 2002).



A LDL oxidada é nociva às células, e seus produtos de oxidação causam diversos efeitos pró-aterogênicos, como a atração de indução de adesão monocitária no endotélio, formação de células espumosas, capacidade de danificar células por vias necróticas e apoptóticas, indução e proliferação de células musculares lisas, interferência no processo de homeostase da musculatura vascular mediada pelo endotélio por indução de perda da bioatividade do óxido nítrico (.NO), indução de secreção de citocinas pelos macrófagos e aumento da expressão de receptores “scavengers” pelos macrófagos (BRUCKDORFER, 2008; CHISOLM e STEINBERG, 2000; FOGELMAN et al., 1980; STEINBERG, 1997).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E A ATEROSCLEROSE

O estresse oxidativo pode ser definido pelo desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, onde ocorrem danos oxidativo que comprometem a resposta redox celular devido a diminuição de sistemas

antioxidantes ou mesmo uma elevação na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), as quais são espécies químicas altamente reativas, geralmente com propriedades oxidantes (HALLIWELL, 1999).

Em condições fisiológicas normais, as EROs/ERNs são produzidas em níveis baixos, sendo necessárias para manutenção de funções celulares como produção de energia, regulação de crescimento celular, fagocitose, síntese de substâncias biológicas e sinalização celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

No entanto, a utilização modificada do oxigênio e/ou formação aumentada de EROs e/ou de ERNs contribuem para a progressão da aterosclerose e das doenças cardiovasculares. Nestas doenças, há intensa geração de espécies reativas. Dentre elas, podemos citar como mais relevantes o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$), óxido nítrico ($\cdot NO$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e ácido hipocloroso ($HOCl$) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Um conjunto de sistemas enzimáticos participam da geração destas espécies reativas, tais como a xantina oxidase, NAD(P)H oxidases (NOX), citocromo P450, fontes mitocondriais (cadeia transportadora de elétrons) e as óxido nítrico sintases (NOS) (HARRISON et al., 2003). Em nível mitocondrial, os complexos I e III da cadeia respiratória são as principais fontes produtoras de $O_2^{\cdot-}$ (TURRENS, 2003).

O ânion superóxido, o qual pode ser produzido a partir de NAD(P)H oxidases, xantina oxidase, na mitocôndria ou mesmo pelo desacoplamento da NOS, é um produto da redução univalente do O_2 (PELUFFO e RADI, 2007). A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por catalisar a transformação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Todavia, quando as concentrações de $O_2^{\cdot-}$ ou $\cdot NO$ estão elevadas, o $O_2^{\cdot-}$ reage dez vezes mais rápido com o $\cdot NO$ do que com a SOD (FERRER-SUETA e RADI, 2009), originando o peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante e nitrante. Com a formação de $ONOO^-$, não apenas os benefícios das ações protetoras mediadas pelo $\cdot NO$ 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 (SZABO et al., 2007). Estas modificações nitrooxidativas são processos biologicamente relevantes que podem induzir ativação, inativação ou ganho de nova função em proteínas (CALCERRADA et al., 2011).

É importante mencionar que as mitocôndrias representam o sítio primário de formação, reação e efeitos nocivos do $ONOO^-$ (RADI et al., 2002), uma vez que essas organelas são as principais fontes celulares de

O_2^- (PODEROSO et al., 1996). 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; SZABO et al., 2007). Uma alteração na bioenergética mitocondrial e homeostase do cálcio induz ainda uma geração adicional de O_2^- , resultando numa amplificação do processo nitrooxidativo (CASSINA et al., 2000).

A elevação da produção de EROs em situações de estresse oxidativo pode induzir eventos celulares tóxicos, tais como a inativação do NO , ativação de monócitos, modificações oxidativas do DNA e proteínas, oxidação de lipídeos, aumento da mitogenicidade e apoptose de células vasculares, e aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, tais como receptores para LDLox, moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, citocinas pró-inflamatórias, reguladores do ciclo celular e metaloproteinases de matriz (KALIORA et al., 2006; WASSMANN et al., 2004).

As EROs ainda são responsáveis pelas modificações oxidativas da LDL em ambiente vascular, convertendo esta lipoproteína em partículas mais aterogênicas (RIZZO et al., 2009). A oxidação da LDL, mediada por EROs, envolve a peroxidação de ácidos graxos e modificação covalente da apo B-100 por produtos da peroxidação lipídica. Assim, a LDLox é rapidamente captada pelos macrófagos através dos receptores “*scavenger*” que, ao contrário do receptor que reconhece a LDL nativa, não apresenta hiporregulação em resposta ao excesso de colesterol celular, dando origem às células espumosas (STEINBERG e WITZTUM, 2010). A LDLox também pode induzir estresse oxidativo, levando a geração de O_2^- pelas células endoteliais e musculares lisas, intensificando o processo de disfunção endotelial e vascular (GALLE et al., 2006; WILLIAMS e FISHER, 2005).

Além da participação das EROs na oxidação da partícula de LDL, elas ainda podem desempenhar um papel importante na disfunção endotelial durante a aterogênese (CAI e HARRISON, 2000). Nas células endoteliais, o NO protege a vasculatura do desenvolvimento da aterosclerose através de suas propriedades vasodilatadoras, da inibição da expressão de moléculas de adesão, agregação plaquetária, proliferação de células musculares lisas e oxidação da LDL (GAUT e HEINECKE, 2001).

A detoxificação de agentes oxidativos e nitrosativos é, portanto, fundamental para proteção contra os efeitos citotóxicos, podendo ocorrer através de mecanismos antioxidantes intracelulares ou por agentes farmacológicos (SMITH et al., 2012). Intracelularmente a detoxificação é mediada por enzimas antioxidantes, tais como a glutationa peroxidase (GPx) e a peroxiredoxina (PRx), sendo a PRx o principal mecanismo antioxidante endógeno na detoxificação do ONOO⁻ (FERRER-SUETA e RADI, 2009). Por outro lado, a ação farmacológica tipicamente envolve a capacidade de manipular vias endógenas de respostas antioxidantes (SMITH et al., 2012). Um dos principais mecanismos de regulação antioxidante é a via do fator de transcrição nuclear eritróide-2 (Nrf-2), que regula a expressão de centenas de genes que aumentam a capacidade antioxidante celular (HYBERTSON et al., 2011; ZHENG et al., 2014). Em condições basais, o Nrf-2 citosólico está fortemente ligado à proteína Keap1, sendo que a oxidação ou fosforilação da Keap1 acarreta na dissociação do Nrf-2, que transloca para o núcleo. No núcleo, o Nrf-2 liga-se ao sítio promotor ARE (elementos de resposta antioxidante) e regula a expressão de diversas enzimas antioxidantes (ITOH et al., 2003).

Além das enzimas, as células podem ter auxílio de antioxidantes não enzimáticos, como compostos endógenos como a glutationa (GSH), ácido úrico, ubiquinona e bilirrubina, e compostos exógenos como as vitaminas E, C e A (HALLIWELL, 1999; STOCKER e KEANEY, 2004). Antioxidantes hidrofílicos, como GSH, são encontrados no citosol, mitocôndrias e compartimento nuclear. Já os hidrofóbicos, como a vitamina E e carotenóides, são encontrados em lipoproteínas e membranas, atuando na limitação da extensão da peroxidação lipídica (CHAUDIERE e FERRARI-ILIOU, 1999). Dessa maneira, o uso de antioxidantes dietéticos como agentes preventivos e terapêuticos tem sido amplamente discutidos, como em estudos em modelos animais que demonstraram que o consumo de alguns alimentos ou extratos contendo vitamina C, E, β -caroteno e polifenóis resultam em redução de estresse oxidativo e de biomarcadores de DCVs, devido à prevenção da oxidação da LDL e da disfunção endotelial (KALIORA et al., 2006), sugerindo que a prevenção do estresse oxidativo estaria envolvido em uma melhora no quadro das DCVs.

1.5 CAROTENÓIDES

Os carotenóides, sintetizados por plantas e microorganismos, são pigmentos naturais que humanos e outros animais não podem produzir,

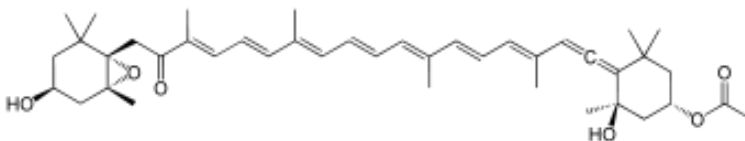
portanto são necessários na dieta, e podem ser provenientes de diversos alimentos, particularmente frutas, vegetais e peixes. Estão distribuídos em larga escala na natureza e possuem diversas funções. Podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em carotenos (não possuem oxigênio em sua estrutura) e xantofilas (possuem oxigênio em sua estrutura). Carotenos incluem o beta-caroteno e licopeno, e xantofilas incluem luteína fucoxantina, cantaxantina, astaxantina, entre outros (GAMMONE et al., 2015; VOUTILAINEN et al., 2006).

Tais compostos possuem propriedades antioxidantes ligadas a sua alta capacidade de remover espécies reativas (EDGE et al., 1997). Radicais de oxigênio, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pode ser reduzido pelo β -caroteno devido à capacidade desse carotenóide de doar elétrons para as EROs (CONN et al., 1992). Além disso, a maioria dos carotenóides tem propriedades lipofílicas; por isto, podem ser transportados pelas lipoproteínas na corrente sanguínea, tornando-os substâncias alvo na prevenção de doenças cardiovasculares (AGARWAL e RAO, 2000; HOZAWA et al., 2007; KOH et al., 2011; UPRITCHARD et al., 2003).

1.5.1 Fucoxantina

A fucoxantina é um carotenóide de pigmentação alaranjada, sendo um dos principais e mais abundantes carotenóides encontrados na natureza, classificados como uma xantofila, e está presente em algumas algas marinhas pardas comestíveis fotossintéticas como *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Hijikia fusiformis* (Hijiki), *Laminaria japonica* (MaKombu), e *Sargassum fulvellum* (PENG et al., 2011) (Figura 5). Fucoxantina proveniente de dieta é hidrolisada em fucoxantínois no trato gastrointestinal pelas enzimas digestivas como a lipase e a colesterol esterase, e então convertida em amarouciaxantina A no fígado (ASAI et al., 2004). Dessa maneira, esses metabolitos são considerados a forma ativa que exercem as funções biológicas da fucoxantina no corpo, sendo que a amarouciaxantina A é armazenada em tecido adiposo branco abdominal, e o fucoxantínois em outros tecidos (ASAI et al., 2008).

Figura 5. Estrutura química da fucoxantina.



Atualmente, há poucos dados sobre a farmacocinética da fucoxantina e seus metabolitos em humanos. Estudos recentes mostraram que fucoxantanol foi detectado em plasma humano após dias de ingestão de Wakame. Dados sobre a farmacocinética da fucoxantina demonstraram que a biodisponibilidade e o metabolismo do fucoxantanol é maior em humanos que em camundongos (MATSUMOTO et al., 2010; MORDENTI, 1986). No entanto, a absorção da fucoxantina geralmente é afetada pela composição do alimento: por exemplo, ela é mais solúvel em meio contendo óleo de peixe (MAEDA et al., 2007).

Diversos estudos apontam as funções da fucoxantina na redução de fatores de risco relacionados às DCVs, como obesidade, diabetes, pressão sanguínea alta, inflamação crônica, níveis aumentados de triglicerídeos hepáticos e plasmáticos, e concentrações de colesterol (D'ORAZIO et al., 2012a; GAMMONE et al., 2014; GAMMONE et al., 2015).

A identificação de substâncias que podem diminuir ou prevenir a obesidade mantem-se como o principal foco na pesquisa médica. Termogênese adaptativa realizada pela proteína desacopladora-1 (UCP-1) pode ser uma defesa fisiológica contra a obesidade (GAMMONE et al., 2014). A expressão da UCP-1 é conhecida por ser um componente significativo no gasto energético corporal, e sua disfunção contribui ao desenvolvimento da obesidade (LABRUNA et al., 2011). De fato, durante o metabolismo normal, o corpo produz calor em um processo chamado termogênese, e estudos há estudos que sugerem que a fucoxantina aumentaria a quantidade de energia liberada em forma de calor no tecido adiposo pela indução da expressão da UCP-1. A indução da proteína UCP-1 por metabólitos da fucoxantina acumulados em tecido adiposo branco é de grande interesse, pois normalmente, UCP-1 é expressa somente em tecido adiposo marrom, e não em branco. Essa proteína, situada na membrana interna da mitocôndria, dissipa o gradiente de H⁺ gerado pela fosforilação oxidativa, liberando energia química em forma de calor. Um estudo de Okada e colaboradores (2011), por exemplo, sugere que um aumento na expressão da UCP-1 em tecido adiposo branco, ocasionado pela ingestão de fucoxantina, levou a uma maior oxidação de ácidos graxos e produção de calor nesses tecidos. Demonstrou-se igualmente em outro estudo que a fucoxantina induz tanto a expressão de RNAm quando proteica de UCP-1 em tecidos adiposos brancos (D'ORAZIO et al., 2012b). Esse achados

podem levar a novos desenvolvimentos de terapias contra a obesidade, um fator tão importante para o desenvolvimento da aterosclerose.

Todos esses achados promissores foram obtidos de estudos em modelos animais, e, portanto, para que a fucoxantina continue sendo uma promessa nutricional contra a obesidade, precisa ser extensivamente avaliada em humanos. Somente um estudo foi conduzido em humanos, o qual avaliou a efetividade da suplementação da fucoxantina na perda de peso. Nesse estudo, Abidov e colaboradores (2010) testaram a fucoxantina em 151 mulheres não diabéticas, obesas e na pré-menopausa. Três quartos das participantes sofriam de esteatose hepática, sendo que as restantes possuíam a função hepática normal. As mulheres foram divididas em dois grupos: um ingeriu 600mg de Xanthigen contendo cerca de 300mg de óleo de semente de romã e 300mg de extrato de alga marrom contendo 2,4 mg de fucoxantina, e o outro grupo ingeriu placebo, com duração de tratamento de 16 semanas. A dieta das mulheres foi reduzida a 1.800 kcal por dia e era composta de 50% de carboidratos, 30% de proteína e 20% de gordura. Os resultados demonstraram uma significativa redução do peso corporal, gordura, e pressão sanguínea; níveis diminuídos de triglicérides e algumas enzimas (AST, ALT, GGT), e um significativo aumento no gasto energético verificado indiretamente por calorimetria. Pacientes obesos com esteatose hepática comumente apresentam marcadores de dano ou inflamação hepática elevados, incluindo ALT, AST, GGT e Proteína C-Reativa (HEILBRONN et al., 2001). Uma redução significativa no peso corporal e gordura em indivíduos obesos podem então resultar na diminuição da expressão de marcadores inflamatórios e previnem a síndrome metabólica.

Foi demonstrado que um aumento nos níveis plasmáticos de ALT e Proteína C-Reativa é associado com uma diminuição na sensibilidade hepática à insulina, resistência insulínica, e um risco aumentado de síndrome metabólica e diabetes do tipo 2 (SHOELSON et al., 2006). Os potenciais efeitos antidiabéticos da fucoxantina são atribuídos à habilidade desse composto de induzir a perda de peso e a redução de tecido adiposo. Um recente estudo de Maeda e colaboradores (2015) verificou que uma dieta contendo fucoxantíol foi capaz de diminuir os níveis de glicose sanguínea de camundongos KK-Ay (diabéticos/obesos), melhorando a tolerância a glicose, quando comparado ao grupo controle. Além disso, eles verificaram que o tratamento com fucoxantíol em uma co-cultura de adipócitos e macrófagos causou uma downregulation de TNF- α e MCP-1, assim como uma diminuição da produção de IL-6 e NO. Em um outro estudo,

foi verificado também que fucoxantol foi capaz de diminuir a expressão de RNAm de TNF- α , iNOS e ciclooxigenase-2 (COX-2) em macrófagos RAW264.7, sugerindo que o composto previne a inflamação e a resistência insulínica pela inibição da produção de .NO e PGE2 pela downregulation de iNOS e COX-2 (HOSOKAWA et al., 2010). iNOS é uma enzima que produz 'NO, um radical livre muito relacionada à inflamação. A superexpressão gênica de iNOS foi observado em tecido adiposo branco em camundongos obesos e adipócitos (NOZAKI et al., 2007). Além disso, um benefício metabólico extra da administração de fucoxantina em roedores seria a promoção da síntese de ácido docosahexaenóico (DHA) no fígado, resultando em melhores resultados do perfil lipídico (PARK et al., 2011; TSUKUI et al., 2007).

Experimentos em ratos espontaneamente hipertensos propensos ao AVC (SHRSP) demonstram um possível papel protetor da fucoxantina em DCVs. Trinta e três ratos SHRSP, com 5 semanas de vida, foram divididos em três grupos: 1) grupo de dieta normal; 2) grupo com dieta contendo Wakame (alga comestível contendo fucoxantina); e 3) grupo de dieta com celulose. Nesse estudo, Wakame atrasou a incidência de sinais de acidente vascular cerebral e aumentou a vida útil dos ratos SHRSP (IKEDA et al., 2003).

Sendo um carotenóide, fucoxantina é um poderoso antioxidante que protege células de danos causados por radicais livres. Inúmeros estudos vêm demonstrando essa atividade biológica importante para o organismo (HEO e JEON, 2009; SANGEETHA et al., 2009), De modo notório, alguns destes estudos sugerem que a fucoxantina possui capacidade de aumentar as defesas antioxidantes celulares por meio do aumento da expressão de genes regulados pelo fator de transcrição Nrf-2 (LIU et al., 2011a; ZHENG et al., 2014).

Uma dieta rica em fucoxantina poderia, então, ajudar a reduzir a acumulação lipídica corporal e modular os níveis sanguíneos de glicose e insulina, através da regulação da secreção de citocinas pelo tecido adiposo branco. Fucoxantina tem-se provado seguro, sem efeitos colaterais, e ainda provem outros benefícios para a saúde, incluindo a melhoria da saúde cardiovascular, redução da inflamação (uma grande causa das doenças cardíacas), níveis saudáveis de colesterol e triglicérides, melhora nos níveis de pressão sanguínea, e funcionamento saudável do fígado (GAMMONE et al., 2015).

Pesquisas experimentais também indicam que o aumento metabólico pela ingestão de fucoxantina não estimula o sistema nervoso central, significando que não causa nervosismo ou perda de sono, ao

contrário de substâncias como cafeína e nicotina, ou hormônios da tireoide. Dessa maneira, a fucoxantina pode ter um potencial papel na modulação e prevenção de doenças, particularmente na redução de incidência de DCVs (RICCIONI et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os potenciais efeitos antioxidante e antiaterogênico do composto fucoxantina *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

Investigar o possível efeito protetor da fucoxantina na proteção contra oxidação da LDL humana isolada.

Investigar o possível efeito protetor da fucoxantina sobre a toxicidade induzida pela exposição à LDL oxidada (LDLox) em cultura de macrófagos murinos J774.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, as doenças cardiovasculares constituem as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, afetando mais de 17 milhões de pessoas. A busca por terapias que possam contribuir para prevenção dessa patologia torna-se imperativo. A aterosclerose, causa primária das DCVs, tem como principal hipótese para sua patogênese a “hipótese oxidativa da LDL”. Neste sentido, os antioxidantes dietéticos têm atraído considerável atenção da comunidade científica e indústria farmacêutica como agentes preventivos e terapêuticos das doenças cardiovasculares. Portanto, o interesse por estudos químicos e bioquímicos utilizando carotenóides continuam com muita relevância devido suas já comprovadas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. A fucoxantina é um composto carotenoide proveniente de algas comestíveis, para o qual várias propriedades farmacológicas já foram descritas, destacando-se as atividades antioxidante, antiinflamatória, antiproliferativa. De particular interesse, este composto vem demonstrando efeitos protetores em modelos de obesidade, um fator de risco conhecido para a aterosclerose. Tendo em mente o acima descrito, acreditamos na possibilidade do emprego de carotenóides dietéticos, particularmente a fucoxantina, como eficientes agentes preventivos e terapêuticos em patologias relacionadas ao estresse oxidativo, como a aterosclerose e suas condições cardiovasculares associadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fucoxantina

O composto fucoxantina foi extraído e caracterizado no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) de acordo com os protocolos descritos a seguir, e gentilmente cedido pelo Professor Dr. Marcelo Maraschin e Mestranda Claudia Marlene Bauer (Departamento de Biotecnologia e Biociências).

4.1.1 Extração da fucoxantina

A extração da fucoxantina foi realizada de acordo com o protocolo de Hosokawa e colaboradores (1999), com algumas modificações. Uma biomassa seca (liofilizada) da microalga *Phaeodactylum tricorutum* (1g), cultivada em ambiente controlado - tanques cilindro cônicos com volume de 500L com o meio de cultura F/2, o qual recebe radiação solar durante o dia e iluminação artificial durante a noite, com temperatura oscilando entre 25 a 30°C, obtendo um tempo de cultivo total de 60 dias -, foi colocada sob agitação com 100 ml de etanol P.A. por cerca de 24 horas a temperatura ambiente. O sobrenadante (extrato) foi recuperado, centrifugado (10 min, 4000 rpm, temperatura ambiente), e em seguida armazenado (-80°C). A biomassa residual da primeira extração foi novamente adicionada de etanol (100 ml) e o procedimento de extração foi repetido de 3 a 5 vezes com intenção de recuperar a maior quantidade de pigmento possível, sem interferir qualitativamente no extrato final. Do extrato total obtido, fez-se a extração da fucoxantina por cromatografia em coluna aberta de sílica.

4.1.2 Purificação da fucoxantina

Previamente às análises cromatográficas, todos os extratos em estudo foram concentrados em rotaevaporador (55°C, 45 rpm), seguido da adição de volume mínimo de acetato de etila (10 ml) até a completa ressolubilização dos compostos. O volume amostral, foi reduzido a 1 ml, sob fluxo de nitrogênio gasoso.

Para a obtenção da fração laranja por cromatografia, seguiu-se o protocolo de Hosokawa e colaboradores (1999), com algumas modificações. Os extratos (1 ml) foram submetidos à cromatografia em

coluna de sílica-gel previamente equilibrada com 3 volumes de *n*-hexano e eluídos com solução de clorofórmio: metanol: água (65: 25: 4, v/v/v), recuperando-se a fração alaranjada. Sequencialmente, uma segunda separação cromatográfica da fração de interesse foi realizada em fase estacionária de sílica gel e eluída com solução de *n*-hexano: acetona (6: 4, v/v), recuperando-se novamente a fração alaranjada.

4.1.3 Identificação e quantificação da fucoxantina

Para a identificação e quantificação da fucoxantina, alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm □ interno), pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 µm) e detector espectrofotométrico UV-Vis operando em 450 nm. Para a eluição, foi utilizado metanol: acetonitrila (90: 10, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL.min⁻¹. A identificação foi realizada através da comparação com os tempos de retenção do composto padrão (fucoxantina), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação da fucoxantina foi feita utilizando-se curva padrão externa de fucoxantina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), considerando a área do pico de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções sequenciais/amostra.

4.1.4 Preparo da fucoxantina para protocolos experimentais

Para a realização dos experimentos *in vitro*, a fucoxantina foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO). Nos protocolos utilizando cultura de células, o composto foi dissolvido em solução contendo no máximo 0,1% de DMSO.

4.2 Isolamento da lipoproteína de baixa densidade (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 desta Universidade (parecer 943/10, FR 363814).

O isolamento da LDL foi realizado por ultracentrifugação de gradiente de densidade descontínua, conforme descrito por Silva e colaboradores (1998), com pequenas modificações. Ao plasma, foram

adicionados EDTA (1 mg/mL) e sacarose (concentração final de 0,5%) para evitar a agregação de LDL. A densidade foi ajustada a 1,22 g/mL adicionando KBr (0,326 g/mL) à 5mL de plasma-EDTA e em seguida foi adicionado cuidadosamente NaCl 0,85% (1,006 g/mL). A ultracentrifugação foi executada a 65.000 rpm por 2 horas a 4 °C em ultracentrifuga Hitachi Himac CP80WX, rotor P80AT 0147. Após este processo, a camada contendo LDL (porção mediana) foi coletada e dialisada durante 16 horas a 4°C em tampão fosfato 148 mM (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4). O teor de proteína da LDL isolada foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

4.3 Oxidação da LDL

Amostras de LDL isolada (1 mg/mL) foram oxidadas na presença de sulfato de cobre (CuSO₄) 10 µM por 16 horas 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 horas a 4°C. Após a diálise, as alíquotas de LDL oxidada (LDL_{ox}) foram estocadas a -20°C até a utilização.

4.4 Ensaios *in vitro* de oxidação de LDL

4.4.1 Dienos conjugados

A oxidação da parte lipídica da LDL nativa isolada foi analisada pela formação de dienos conjugados. Amostras de LDL (50 µg/mL) foram pré-incubadas a 37°C em um tampão de fosfato de potássio 10 mM (pH 7,4) e diferentes concentrações de fucoxantina (0,1 – 40 µM). Após incubação de 60 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado 10 µM de CuSO₄ (Cu²⁺) para iniciar a oxidação. A oxidação foi monitorada medindo o aumento da absorbância em 234 nm devido à formação dos dienos conjugados, conforme previamente descrito (DE BEM et al., 2008; ESTERBAUER et al., 1989).

É importante destacar que no ensaio de formação de dienos conjugados, diversos parâmetros podem ser obtidos através de análises de formação de dienos *versus* tempo. O valor da fase *lag* é comumente determinado graficamente pela intercepção das tangentes ao aumento da absorbância dos dienos. Outro parâmetro analisado é a máxima taxa de oxidação, analisada através da derivada da curva de absorbância durante

a fase de propagação em função do tempo (GIESEG e ESTERBAUER, 1994).

4.4.2 Fluorescência do triptofano

A oxidação por CuSO_4 da apolipoproteína LDL pode ser monitorada através da intensidade de emissão de fluorescência do triptofano em um decurso de tempo. O espectro fluorescente da LDL nativa apresenta uma única banda centrada em aproximadamente 332 nm, o qual é atribuído aos resíduos de triptofano (Trp) na apolipoproteína B-100 (apoB-100) (GIESSAUF et al., 1995). A perda de fluorescência do triptofano é então um marcador de oxidação da fração proteica da LDL (GIESSAUF et al., 1995; REYFTMANN et al., 1990).

A cinética da oxidação da LDL foi medida através da diminuição da fluorescência do triptofano, após a adição de CuSO_4 3,3 mM, na presença ou ausência de fucoxantina em diferentes concentrações (0,4 – 40 μM) em uma solução contendo LDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em PBS (10 mM). A fluorescência foi analisada em diferentes tempos (0 – 360 minutos) com o uso de um espectrofluorímetro (Spectramax Paradigm) com excitação em 282nm e emissão em 332 nm. O resultado foi calculado em relação ao percentual de diminuição de fluorescência do Trp em cada amostra. O parâmetro “meia-vida” ($t_{\text{max}/2}$) foi também calculado, o qual é definido como o tempo necessário para observar a redução de fluorescência em 50% em relação à fluorescência inicial (JERLICH et al., 2000).

4.5 Ensaios *in vitro* 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, mantidas em atmosfera umidificada (estufa) a 37°C e 5% de CO_2 .

Para os procedimentos experimentais, as células inicialmente foram plaqueadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas para adesão. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por DMEM contendo 0,5% de

SFB, mantido durante os tratamentos com fucoxantina ou LDLox, conforme descrito nos protocolos experimentais a seguir.

4.5.1 Ensaio de citotoxicidade celular

Para a determinação da citotoxicidade da fucoxantina sobre os macrófagos, foi realizado o teste 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). Células foram cultivadas em placas de 96 poços (12.500 células/poço) e colocadas em estufa incubadora (37°C, 5% CO₂) por 24 horas para adesão. Após este período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de fucoxantina (0,4 – 40 µM) ou veículo (DMEM 0,5% + concentração máxima de DMSO 0,1%), nos grupos controles, e incubadas por 24 horas. Ao final deste período, o meio foi removido e 100 µL de MTT 0,5 mg/mL foram adicionados a cada poço, seguido de uma nova incubação de 1 hora e meia a 37°C. Terminada esta etapa, o MTT foi removido e adicionados 100 µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan em uma incubação sob agitação por meia hora. 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). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2 Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A geração intracelular de EROs foi medida utilizando a sonda 2',7'- diclorodidrofluoresceína 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, a DCFH. Na presença de EROs, a DCFH é oxidada gerando o composto altamente fluorescente DCF, cuja fluorescência pode ser quantificada por citometria de fluxo ou fluorimetricamente (WANG e JOSEPH, 1999). Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 24 poços (3x10⁵ células/poço) e mantidas em estufa incubadora (37 °C, 5% CO₂) por 24 horas.

Para verificar os efeitos da fucoxantina sobre a produção de EROs induzida por LDL oxidada, células foram pré-tratadas com o

referido composto (0,4 ou 2 μM) ou veículo por 24 horas. A fim de avaliar a cinética de formação de EROs induzida pela exposição à LDLox, as células foram tratadas com DCFH-DA (10 μM), e logo em seguida com LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo que a intensidade de fluorescência foi medida em um espectrofluorímetro (Spectramax Paradigm) durante 1 hora (480 nm de excitação e 525 nm de emissão) em intervalos de 1 minuto. Os resultados deste experimento foram expressos em delta de fluorescência em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.3 Medida da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

Para verificar a produção de 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 et al., 2005). As células foram cultivadas em placas de 24 poços (3×10^5 células/poços) e mantidas em estufa incubadora (37 °C, 5% CO_2) por 24 horas.

Para examinar a cinética de formação de ERNs induzida pela exposição à LDLox, assim como o possível efeito protetor da fucoxantina frente a exposição à LDLox, as células foram pré-tratadas com o referido composto (0,4 ou 2 μM) ou veículo por 24 horas. Após esse período, foram tratadas com LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e DHR (10 μM) simultaneamente e a intensidade de fluorescência foi medida em um espectrofluorímetro (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. Os resultados deste experimento foram expressos em delta de fluorescência em relação ao controle (células não tratadas). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4 Determinação da concentração intracelular de glutathiona (GSH)

Os níveis intracelulares de GSH foram determinados por ensaio fluorimétrico conforme previamente descrito por Hissin e Hilf (1976) com algumas modificações. Esse ensaio baseia-se no princípio de que os grupos tiois (-SH) da GSH reagem especificamente com orto-ftalaldeído (OPT) em pH 8,0, resultando um produto fluorescente excitado a 350 nm e com emissão a 420 nm. As células foram semeadas em placas de 6 poços (5×10^5 células/poço), mantidas em estufa incubadora (37 °C, 5%

CO₂) por 24 horas. Para analisar os efeitos da fucoxantina, as células foram pré-tratadas com o composto (0,4 ou 2 µM) ou veículo por 24 horas, e posteriormente expostas à LDLox (100 µg/mL) ou veículo por 1 hora adicional. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS, coletadas com ácido perclórico 0,6 M e tampão fosfato de sódio 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 µL do sobrenadante foi incubado com 100 µL de orto-ftalaldeído (0,1% p/v em metanol) e 1,8 mL de Na₂HPO₄ 100 mM, por 15 min a temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (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 micromoles de GSH por miligrama de proteína e os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.5 Determinação dos níveis de nitrito (NO₂)

A produção de nitrito, um indicador de produção de óxido nítrico (NO), foi mensurada pela reação de Griess (SCHULZ et al., 1999). As células foram semeadas em placas de 6 poços (5x10⁵ células/poço), mantidas em estufa incubadora (37°C, 5% CO₂) por 24 horas. Para analisar os efeitos da FCX, as células foram pré-tratadas com o composto (0,4 ou 2 µM) ou veículo por 24 horas, e posteriormente expostas à LDLox (100 µg/mL) ou veículo por 1 hora adicional. Após o tratamento, o sobrenadante das células foi coletado para a quantificação de nitrito e centrifugado a 6.000rpm por 3 minutos. De maneira resumida, 100 µL de sobrenadante foi adicionado a 100 µL 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 absorbância foi medida em 540nm no leitor de placas (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria). A quantificação do nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão preparada com nitrito de sódio (NaNO₂) em meio de cultura e os resultados foram realizados em triplicata.

4.5.6 Respirometria de alta resolução em células intactas

As taxas de consumo de oxigênio foram medidas polarograficamente utilizando respirometria de alta resolução (Oroboros Oxygraph-O2K). A fim de avaliar a função mitocondrial frente à exposição à LDLox, as células foram pré-tratadas com fucoxantina 2

μM ou veículo por 24 horas seguido por exposição à LDLox 100 $\mu\text{g/mL}$ por adicionais 24 horas. Após o período de exposição, as células foram coletadas com um raspador de células (*scraper*). As células foram então centrifugadas a 1200g por 3 minutos e ressuspensas em DMEM isento de SFB. Foram utilizadas 1×10^6 células/mL para a realização de medições de 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 ionoforo de prótons Carbonil Cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), desacoplador da fosforilação oxidativa, foi titulado como previamente descrito (50 nM por injeção) (HORT et al., 2014; HUTTER et al., 2004). Após a titulação com FCCP, a cadeia transportadora de elétrons foi bloqueada por antimicina (1 $\mu\text{g/mL}$) e o fluxo de oxigênio detectado nesta condição foi definido como consumo de oxigênio extra mitocondrial. O DatLab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) foi utilizado para aquisição de dados e análise. Entre as taxas de controle respiratório que podem ser calculadas está o RCR (taxa de respiração para oligomicina na presença ou ausência de FCCP) que reflete o grau de acoplamento entre respiração e fosforilação oxidativa. 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. Por último, a determinação da capacidade de reserva (respiração máxima – respiração basal) indica o quanto a célula está preparada para lidar com o estresse oxidativo.

4.5.7 Ensaio de formação de células espumosas

Para verificar a formação de células espumosas através da exposição dos macrófagos à LDLox, previamente tratadas com fucoxantina ou veículo, realizou-se o método de coloração com Red Oil O, conforme descrito anteriormente (KOOPMAN et al., 2001). Inicialmente, as células J774 foram semeadas em placas de 12 poços (3×10^5 células/poço), sobre lamínulas de vidro estéreis. Após 24 horas de adesão em incubadora (37°C, 5% CO_2), foram adicionados

fucoxantina 2 μM ou veículo por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com LDLox 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou veículo por mais 3 horas.

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, QimagingTM) e software para capturação de imagens (Qcapture Pro 5.1, QImagingTM). A intensidade total de pixels (densidade optica) 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 de 10 a 15 fotomicrografias por grupo.

4.6 Determinação dos níveis de proteínas

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

4.7 Análise estatística

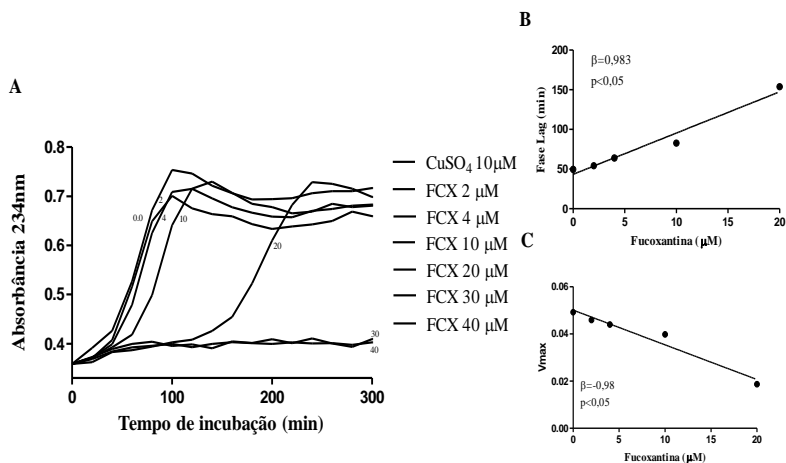
Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância de uma e duas vias (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Análise de regressão linear foi utilizada para verificar efeitos dependentes da concentração. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software Statistic (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 A fucoxantina impediu a oxidação de LDL induzida por Cu^{2+}

A LDL foi submetida à oxidação com 10 μM de Cu^{2+} . Os íons Cu^{2+} exerceram modificação oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados da LDL e conseqüentemente conduziram um rearranjo molecular, como indicado pela formação de dienos conjugados (Figura 6). O perfil cinético da oxidação foi caracterizado por uma fase *lag* inicial, seguido da fase de propagação, onde o índice de formação de dienos conjugados atingiu seu máximo, e então por uma fase de decomposição. De modo notório, a fucoxantina inibiu a produção de dienos conjugados induzida pelo Cu^{2+} de maneira concentração-dependente. Especificamente, a fucoxantina prolongou de maneira concentração-dependente a fase *lag* ($\beta = 0,983$; $p < 0,05$), e diminuiu a taxa de oxidação (V_{max}) ($\beta = -0,98$; $p < 0,05$). É importante destacar que a fucoxantina apresentou efeito máximo na concentração de 30 μM , na qual a oxidação lipídica da LDL induzida por Cu^{2+} foi completamente abolida.

Figura 6. Efeito da fucoxantina (2 – 40 μM) na peroxidação lipídica induzida por Cu^{2+} em LDL humana isolada. Os dienos conjugados formados foram analisados em função do tempo. Amostras de LDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram incubadas na presença de 10 μM de CuSO_4 , e na presença ou ausência de fucoxantina (2 - 40Mm). Dienos conjugados são expressos em absorbância em 234nm. A) Representativo da oxidação da LDL e formação de dienos conjugados em função do tempo. B) e C)Efeitos da fucoxantina na fase lag e na taxa de oxidação (V_{max}) da formação de dienos conjugados, respectivamente. Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, mostrando resultados similares. Regressão linear da fase lag e V_{max} foi calculada para verificar o efeito concentração-dependente. (FCX: fucoxantina)

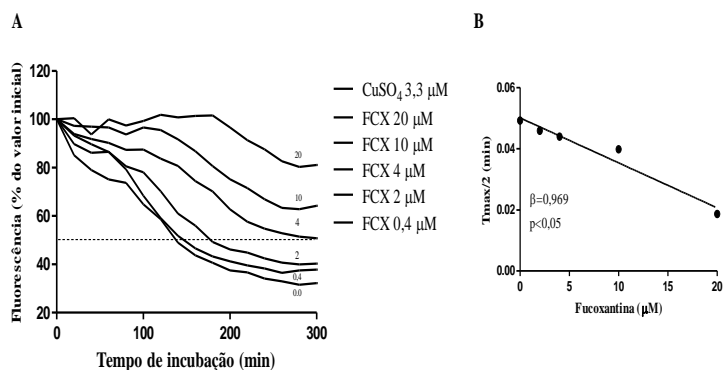


5.2 A fucoxantina inibiu a oxidação de resíduos de triptofano na LDL induzida por Cu^{2+}

A modificação oxidativa da parte lipídica da partícula de LDL geralmente é seguida pela modificação da apoB100 (ESTERBAUER et al., 1989). Nesse sentido, nós também investigamos se a fucoxantina seria capaz de prevenir a oxidação da parte proteica da LDL nativa humana induzida pela exposição ao Cu^{2+} . Como demonstrado na Figura 2, a incubação da LDL com Cu^{2+} (3,3 μM) resultou na oxidação proteica da LDL em função do tempo, resultando na diminuição da fluorescência de triptofano (Figura 7A). Na presença de fucoxantina, a oxidação da fração proteica da LDL foi prevenida de modo concentração-dependente ($\beta = 0,969$; $p < 0,05$), o que pode ser evidenciado pela inibição de 50% da intensidade da fluorescência dos resíduos de triptofano ($t_{\text{max}/2}$) presentes na fração proteica da lipoproteína (Figura 7B). Podemos

destacar que a fucoxantina apresentou efeito inibitório superior a 50% a partir da concentração de 4 μM .

Figura 7. Efeito da fucoxantina (0,4 – 20 μM) na oxidação de resíduos de triptofano induzido por Cu^{2+} em LDL humana isolada. Amostras de LDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram incubadas a 37°C na presença de 3,3 μM de CuSO_4 e de fucoxantina (0,4 - 20 μM). A) Fluorescência do triptofano (excitação a 282 nm e emissão a 332 nm) foi analisado em função do tempo (0 – 300 min). B) Gráfico representa a inibição de 50% ($t_{\text{max}}/2$) da perda da fluorescência do triptofano. Dados são expressos como percentual do valor inicial de intensidade de emissão medido antes da adição de Cu^{2+} . Experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes, demonstrando resultados similares. Regressão linear da perda de fluorescência do triptofano foi calculada para verificar o efeito concentração-dependente. (FCX: fucoxantina)



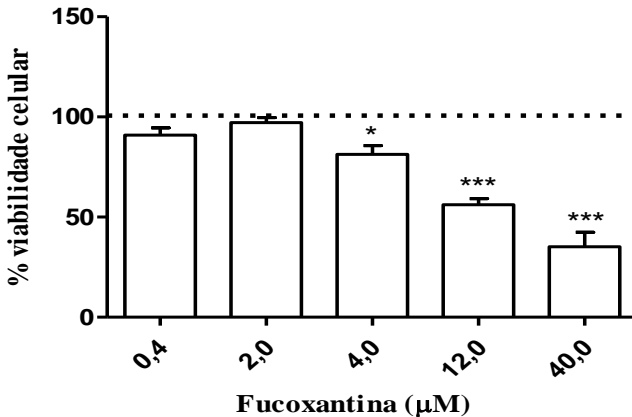
5.3 Análise da viabilidade celular de macrófagos expostos a diferentes concentrações de fucoxantina

Com o objetivo de estabelecer um intervalo de concentração seguro para investigar os efeitos antioxidantes e antiaterogênicos *in vitro* da fucoxantina em macrófagos, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT. A Figura 8 apresenta a porcentagem de células viáveis na presença de concentrações crescentes de fucoxantina.

O tratamento com fucoxantina por 24 horas em concentrações iguais ou menores que 2 μM não afetou a viabilidade celular. Todavia, é possível observar uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle a partir de 4 μM (células viáveis: 81,3%, $p < 0,05$), chegando a uma redução máxima da viabilidade na concentração

de 40 μM (células viáveis: 35,2%, $p < 0,001$). Tendo isso em mente, somente concentrações abaixo do limite de toxicidade (até 2 μM) foram utilizados nos experimentos posteriores, sendo que nesses casos, não observamos efeito tóxico da fucoxantina.

Figura 8. Efeito da fucoxantina (0,4 – 40 μM) sobre a viabilidade celular em macrófagos J774 de murinos. As células foram incubadas com concentrações crescentes de fucoxantina por 24 horas (37°C, 5% CO_2) e em seguida avaliadas pelo ensaio do MTT. Cada barra representa a média \pm EPM da porcentagem de células viáveis em relação ao controle (ausência de fucoxantina), de 3 experimentos independentes em triplicata. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo (ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc de Tukey).



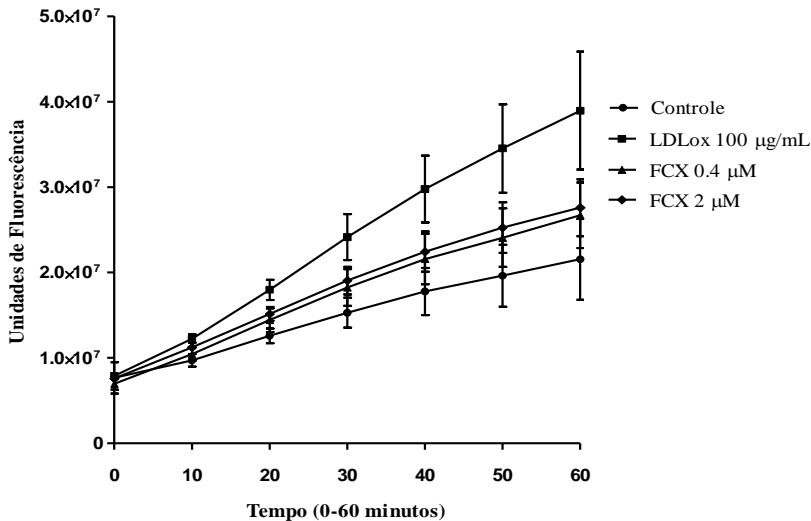
5.4 A fucoxantina foi capaz de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) em macrófagos expostos à LDLox

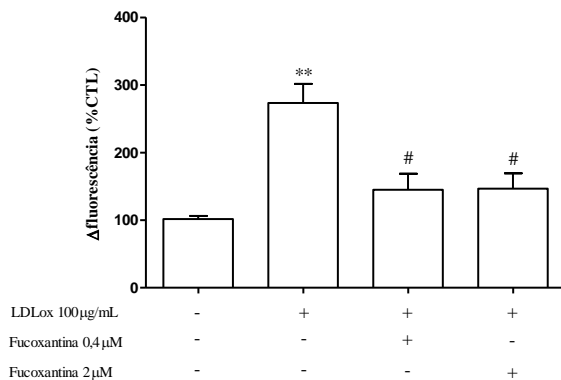
Além de as espécies reativas de oxigênio (EROs) estarem envolvidas na formação de LDLox, a geração intracelular de ROS pode representar um evento chave nas ações citotóxicas da LDLox (LEVITAN et al., 2010). As Figuras 9A e B representam os efeitos da LDLox, assim como do pré-tratamento com fucoxantina, sobre a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, analisada cineticamente pela oxidação da sonda fluorescente 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Os macrófagos expostos à 100 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox por 1 hora apresentaram um aumento na produção de EROs quando comparados ao controle. De maneira

interessante, o pré-tratamento por 24 horas com fucoxantina (0,4 e 2 μ M) foi capaz de reduzir significativamente, e de forma dependente da concentração, a geração de EROs induzida pela exposição à LDLox.

Figura 9. Efeito da fucoxantina sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por LDLox em macrófagos. (A) Curva temporal representativa da geração de EROs em macrófagos estimuladas com LDLox (100 μ g/mL) e incubadas com DCFH-DA (10 μ M). Células foram pré-incubadas com fucoxantina (0,4 ou 2 μ M) por 24 horas e posteriormente estimuladas com LDLox (100 μ g/mL) ou veículo por 1 hora após incubação com DCFH-DA (10 μ M). As amostras foram avaliadas cineticamente por fluorescência por 1 hora. (B) Células foram pré-incubadas com fucoxantina (0,4 ou 2 μ M) por 24 horas e posteriormente estimuladas com LDLox (100 μ g/mL) ou veículo por 1 hora após incubação com DCFH-DA (10 μ M). Gráfico representando o delta de fluorescência em relação ao percentual do controle. Cada barra representa a média \pm EPM da porcentagem de aumento de EROs em relação ao controle (células não tratadas) de 3 experimentos independentes em triplicata. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LDLox 100 μ g/mL (ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc de Tukey).

A

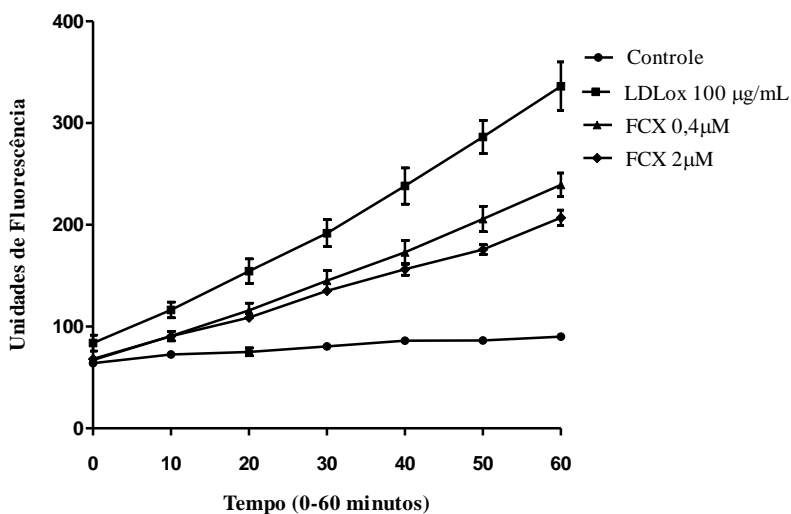


B

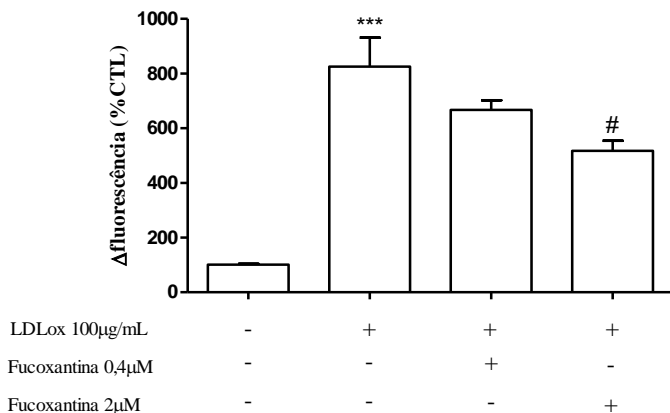
Sabe-se também que as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como, por exemplo, o peroxinitrito (ONOO⁻), possuem papel significativo na nitroxidação de biomoléculas celulares, agindo especialmente na mitocôndria (DE BEM et al., 2013; PACHER et al., 2007). Após verificada a diminuição na produção de EROs nos macrófagos tratados com fucoxantina e estimulados com LDLox, fomos averiguar se o composto também seria capaz de prevenir a produção de ERNs induzida pela LDLox nessas células. As Figuras 10 A e B representam o efeito da LDLox e do pré-tratamento com fucoxantina sobre a produção intracelular de ERNs, avaliada pela oxidação da sonda Dihidrorodamina 123 (DHR). Os macrófagos expostos à 100 µg/mL de LDLox por 1 hora apresentaram um aumento na produção de ERNs quando comparados ao controle. De maneira interessante, o pré-tratamento por 24 horas com fucoxantina 2 µM foi capaz de reduzir significativamente a geração de ERNs induzida pela exposição à LDLox. No entanto, a concentração de 0,4 µM não causou uma redução significativa em relação a produção de ERNs em comparação às células expostas a LDLox sem pré-tratamento com fucoxantina.

Figura 10. Efeito da fucoxantina sobre a produção de ERNs em macrófagos murinos J774 estimulados com LDLox. (A) Curva temporal representativa da geração de ERNs em macrófagos estimuladas com LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas com DHR (10 μM). Células foram pré-incubadas com fucoxantina (0,4 ou 2 μM) por 24 horas e posteriormente estimuladas com LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou veículo por 1 hora após incubação com DHR (10 μM). As amostras foram avaliadas cineticamente por fluorescência por 1 hora. (B) Quantificação da produção de ERNs. A intensidade de fluorescência foi medida em espectrofluorímetro e expressa como porcentagem de aumento em relação ao controle (100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos independentes em triplicata. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LDLox 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc de Tukey).

A



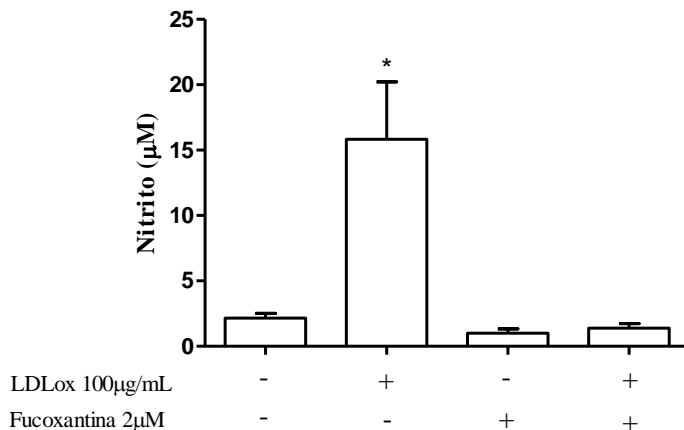
B



5.5 Fucoxantina diminuiu a produção de $\cdot\text{NO}$ em macrófagos expostos a LDLox

O nitrito (NO_2) é um indicador de produção de $\cdot\text{NO}$, o qual, em condições inflamatórias, pode estar em níveis elevados, reagindo com a superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), levando a produção aumentada da ERN peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) (CALCERRADA et al., 2011). Dessa forma, a produção cumulativa de $\cdot\text{NO}$ pelos macrófagos expostos à LDLox foi avaliada medindo os níveis de nitrito no meio condicionado. A Figura 11 mostra que a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox causou um aumento significativo da produção de $\cdot\text{NO}$, enquanto o pré-tratamento com fucoxantina 2 μM foi capaz de prevenir tal aumento. Cabe destacar que a fucoxantina *per se* não causou aumento de produção de $\cdot\text{NO}$.

Figura 11. Efeito da fucoxantina sobre os níveis de .NO em macrófagos estimulados com LDLox. Células foram pré-incubadas com fucoxantina (2 μ M) ou veículo por 24 horas e em seguida estimuladas com LDLox (100 μ g/mL) ou veículo por 1 hora. Ao final do tratamento as células foram coletadas e os níveis de .NO determinados por absorvância. Cada barra representa a média \pm EPM da concentração de nitrito (μ mol) de 3 experimentos independentes em triplicata. * $p < 0,05$; comparado ao grupo controle (células não tratadas) (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

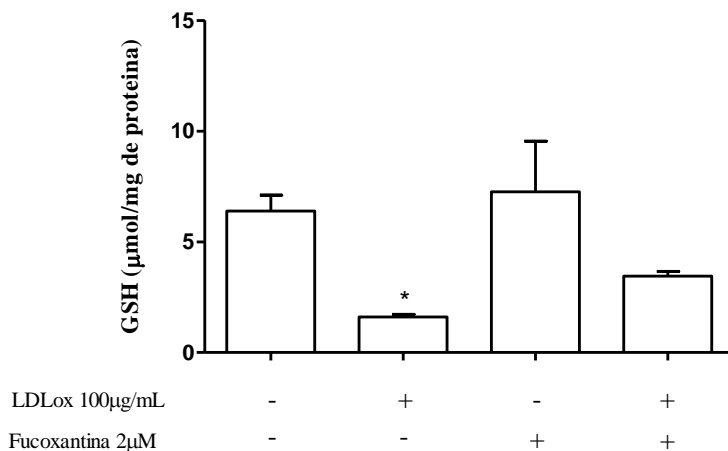


5.6 Efeito da fucoxantina sobre o conteúdo de glutatona (GSH) em macrófagos expostos a LDLox

A GSH está presente na maioria das células e sua capacidade redutora a faz ser considerada um dos agentes mais importantes de defesa antioxidante, protegendo-a contra exposições a agentes como a LDLox (ROSENBLAT e AVIRAM, 1998). A exposição dos macrófagos à LDLox (100 μ g/mL) por 1 hora induziu uma depleção significativa do conteúdo de GSH, conforme mostra a Figura 12. O pré-tratamento com FCX 2 μ M por 24 horas não foi capaz de prevenir a redução dos níveis de GSH induzida pela incubação com LDLox. Contudo, quando as células foram tratadas somente com o composto fucoxantina não houve redução do conteúdo de GSH intracelular.

Figura 12. Efeito da fucoxantina sobre o conteúdo intracelular de GSH em macrófagos estimulados com LDLox. Células foram pré-incubadas com fucoxantina (2 μ M) ou veículo por 24

horas e em seguida estimuladas com LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou veículo por 1 hora. Ao final do tratamento as células foram coletadas e o conteúdo de GSH determinados por ensaio fluorimétrico. Cada barra representa a média \pm EPM da concentração de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína) de 3 experimentos independentes em triplicata. * $p < 0,05$; comparado ao grupo controle (células não tratadas) (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).



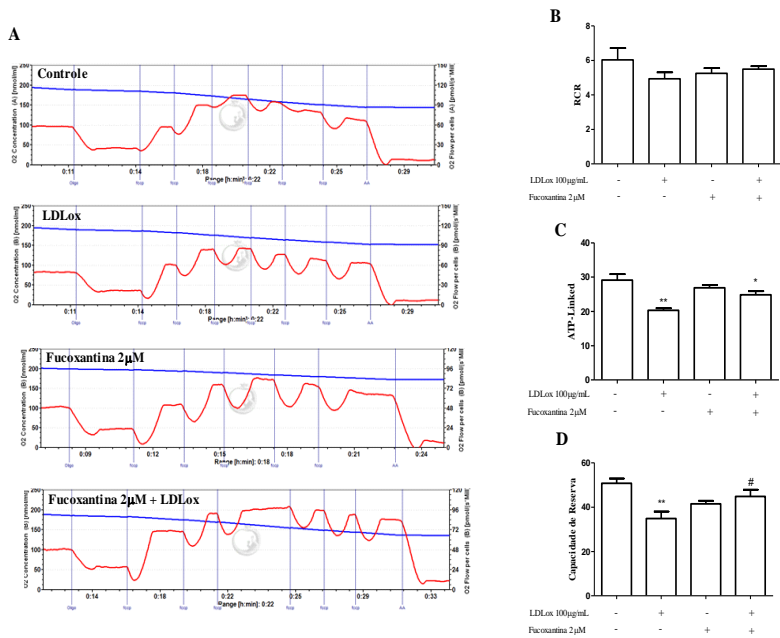
5.7 Fucoxantina preserva a capacidade respiratória mitocondrial e o consumo de oxigênio acoplado a síntese de ATP em macrófagos expostos à LDLox

Sabe-se que a produção de EROs/ERNs está intimamente relacionada com a atividade mitocondrial. A produção exagerada destas espécies reativas pela mitocôndria pode induzir disfunção mitocondrial pela oxidação e/ou nitração de biomoléculas mitocondriais; e, por conseguinte a mitocôndria danificada é uma importante fonte de espécies reativas perpetuando o processo oxidativo (FIGUEIRA et al., 2013). Portanto, buscamos estudar o efeito da fucoxantina sobre a função mitocondrial, analisando a capacidade do composto em modular diversos parâmetros relacionados ao consumo de oxigênio em macrófagos, conforme exposto na Figura 13.

Através do RCR (taxa de controle respiratório), podemos avaliar a eficiência respiratória da mitocôndria ao utilizar o oxigênio, acoplada ou não a síntese de ATP. De acordo com a Figura 13B, o controle respiratório dos macrófagos expostos à LDLox ou ao composto não sofreram alterações. Já em relação ao consumo de oxigênio acoplado a síntese de ATP (Figura 13C), podemos verificar que as células expostas à LDLox, pré-tratadas ou não, obtiveram alteração no consumo de O₂ mitocondrial relacionado a síntese de ATP, indicando uma possível ineficiência na síntese de ATP. O tratamento dos macrófagos com a fucoxantina foi capaz de restaurar as alterações induzida pela LDLox no consumo de O₂ mitocondrial relacionado a síntese de ATP.

Para verificar a capacidade de reserva mitocondrial, analisamos o fluxo de O₂ relacionado à capacidade respiratória máxima da mitocôndria através da dissipação de prótons induzida pelo ionóforo FCCP, um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons. A taxa respiratória máxima das células, diminuída da respiração basal é considerada a capacidade de reserva mitocondrial. As células expostas à LDLox apresentaram uma capacidade de reserva significativamente menor quando comparados às células controle. Isso está relacionado à diminuição de sua eficiência respiratória. O pré-tratamento com a fucoxantina foi capaz de prevenir a diminuição da capacidade respiratória induzida pela LDLox nas células. É importante mencionar que a fucoxantina *per se* não alterou a capacidade de reserva mitocondrial dos macrófagos.

Figura 13. Efeito da fucoxantina sobre o consumo de O₂ em macrófagos expostos à LDLox. (A) Perfil representativo do consumo de oxigênio em macrófagos controle, macrófagos expostos a LDLox, macrófagos tratados com fucoxantina, e macrófagos pré-tratados com fucoxantina expostos a LDLox, (B) RCR (Máxima capacidade respiratória/oligomícina) ($RCR = (FCCP-AA)/(Oligo-AA)$). (C) Consumo de O₂ acoplado a síntese de ATP (ATP Linked=(Basal-AA) – (Oligo-AA)) (D) Capacidade de reserva respiratória (Capacidade de reserva= (FCCP-AA)/(Basal-AA) (Máxima capacidade respiratória/ respiração basal). Os resultados representam médias \pm erro padrão de pelo menos três determinações independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (células não tratadas); # $p < 0,05$ comparado ao grupo LDL 100 μ g/mL. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).



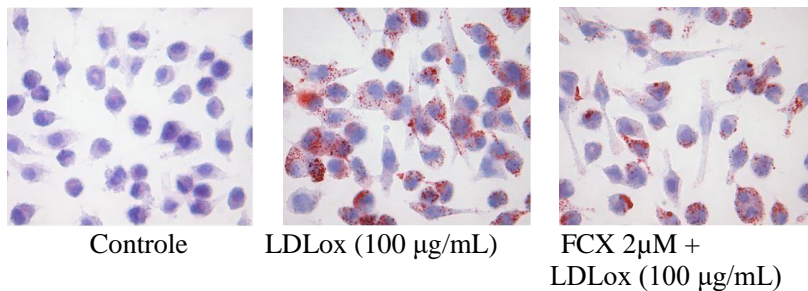
5.8 Fucoxantina reduziu a formação de células espumosas induzida pela LDLox em macrófagos

A formação de células espumosas, as quais são importantes marcadores do processo inicial da formação das placas aterogênicas, pode ser avaliada *in vitro* através da incubação de macrófagos em cultura com LDLox e coloração com Oil Red O (STRALIOTTO et al.,

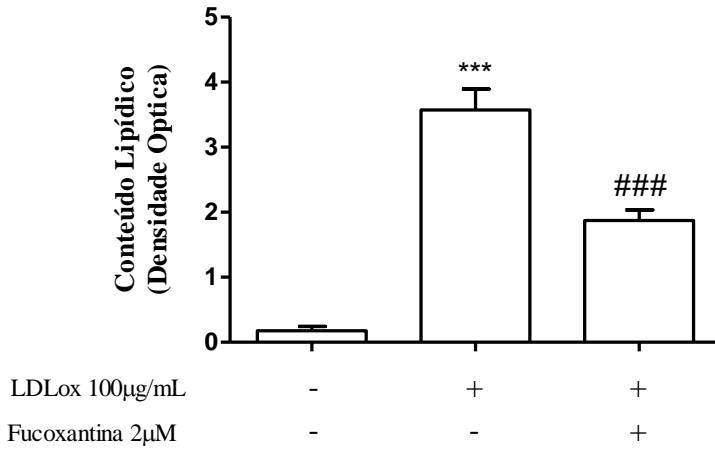
2013). A formação de células espumosas foi induzida nos macrófagos expostos à LDLox (100 µg/mL), por 3 horas (Figura 14). O pré-tratamento durante 24 horas com fucoxantina, na concentração de 2 µM, reduziu significativamente o conteúdo lipídico no interior dos macrófagos, i.e., este composto foi capaz de diminuir a captação de LDLox e consequentemente a formação de células espumosas *in vitro* (Figura 14A e B).

Figura 14. Efeito da fucoxantina sobre a formação de células espumosas em macrófagos expostos à LDLox. (A) Fotomicrografias representativas da formação de células espumosas. Macrófagos da linhagem J774 foram pré-incubados com fucoxantina (2 µM) ou veículo por 24 horas e em seguida estimulados com LDLox (100 µg/mL) por 3 horas. Posteriormente, as células foram fixadas e coradas com Oil Red O e hematoxilina de Harris. Aumento 1.000x. (B) Conteúdo lipídico das células espumosas (densidade óptica). Cada barra representa a média ± EPM de 3 experimentos independentes em triplicata. *** $p < 0,001$ indica a diferença comparado ao grupo controle (células não tratadas); ### $p < 0,001$; indica a diferença comparado ao grupo LDLox 100 µg/mL (ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc de Tukey).

A



B



6 DISCUSSÃO

A aterosclerose é uma doença progressiva complexa que envolve a interação de diversos fatores, sejam eles genéticos ou ambientais. Hoje em dia, o tratamento da aterosclerose consiste na utilização de fármacos que sejam capazes de diminuir os níveis plasmáticos de colesterol (fármacos hipolipemiantes), diminuindo conseqüentemente os eventos clínicos e a mortalidade causados por essa patologia (INSULL, 2009; LUSIS, 2000). Entretanto, a terapia medicamentosa existente ainda não é completamente eficaz, por isto, a pesquisa por novas terapias e alvos farmacológicos que possam auxiliar a reduzir a progressão da aterosclerose vem crescendo nos últimos anos (RADER e DAUGHERTY, 2008). Neste sentido, há grande interesse no estudo e desenvolvimento de compostos que tenham a capacidade de, não somente diminuir as concentrações plasmáticas de colesterol, como também que possam atuar em diferentes estágios do processo aterogênico, como na oxidação da LDL e nos processos de inflamação. Diversos estudos reportam os benefícios dos carotenóides contra condições patológicas associadas ao estresse oxidativo (inflamação, diabetes, neurotoxicidade e hepatotoxicidade). Por exemplo, o carotenóide bixina, um colorante utilizado na indústria alimentícia, tem sido alvo de estudos envolvendo condições associadas à aterosclerose (SOMACAL et al., 2015). Nesse sentido, o objetivo desta dissertação de mestrado foi avaliar os potenciais efeitos antioxidantes e antiaterogênicos da fucoxantina *in vitro*, utilizando ensaios de oxidação com LDL humana isolada, bem como ensaios com cultivos celulares de macrófagos expostos à LDL oxidada.

A oxidação da LDL é um evento chave no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (BATLOUNI, 1997). Nesse contexto, destacam-se os compostos antioxidantes, estimando-se que a suplementação da dieta com tais compostos, como os carotenóides, aumente a resistência da LDL a ser oxidada, retardando desta forma a ativação de um dos eventos chaves do processo aterosclerótico. Alguns antioxidantes provenientes de dieta já tem atraído grande interesse devido a alta capacidade de remoção de EROs, como as vitaminas C e E, polifenóis e carotenóides como licopeno, luteína e zeaxantina (WILLCOX et al., 2008).

A oxidação da LDL possui um importante papel 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 (HANSSON et al.,

2006). Inclusive, há uma correlação entre a capacidade da LDL em resistência à oxidação e a severidade da aterosclerose, sendo que sua progressão está diminuída quando a oxidação da LDL está inibida (HEINECKE, 1998). Atualmente, a resistência da LDL à sua oxidação é maior em dietas com alto consumo de antioxidantes; portanto o consumo de carotenóides, padrão de dietas como a dieta Mediterrânea, podem ter efeitos benéficos na saúde cardiovascular (GAMMONE et al., 2015).

Além disso, há evidências sugerindo que uma elevada concentração de cobre plasmático está associado a aceleração do processo aterogênico e representa um fator de risco para o progresso da patologia (FERNS et al., 1997). Íons de cobre cataliticamente ativos foram achados em amostras retiradas de ateromas humanos, indicando que o interior das lesões ateroscleróticas avançadas é um ambiente altamente pro-oxidante. Conseqüentemente, o uso de íons de cobre para promover a peroxidação da LDL em condições *in vitro* pode ser considerado um modelo válido para estudar eventos que ocorrem nas paredes arteriais durante os processos de aterosclerose (SMITH et al., 1992).

Os resultados desse estudo mostram que a fucoxantina preveniu a peroxidação lipídica da LDL humana isolada induzida por Cu^{2+} de uma maneira dependente da concentração, através da diminuição da formação de dienos conjugados, demonstrado com a extensão da fase lag e a diminuição da taxa de oxidação (V_{max}). Outro resultado significativo foi a capacidade da fucoxantina em prevenir a perda de fluorescência do triptofano da LDL humana induzida pelo Cu^{2+} . Sabe-se que o espectro de fluorescência da LDL nativa mostra uma banda única centrada em aproximadamente 332 nm, a qual é associada aos resíduos de triptofano na Apo B-100, e a perda da fluorescência do triptofano representa então um marcador de oxidação da parte proteica da LDL (REYFTMANN et al., 1990). Portanto, tanto o efeito protetor da fucoxantina contra a oxidação proteica da LDL, quanto seu efeito benéfico contra a oxidação lipídica da LDL, indicam este composto como uma possível estratégia não farmacológica na inibição do processo aterogênico.

Para melhor compreender o mecanismo de ação da fucoxantina na prevenção de eventos relacionados ao processo aterosclerótico, avaliamos também o efeito deste composto sobre a toxicidade da LDLox em cultivo de macrófagos murinos (J774). Sabe-se que o processo inflamatório e a participação de monócitos/macrófagos possuem papel importante na formação das placas ateroscleróticas

(HANSSON et al., 2006). Macrófagos têm funções essenciais durante a progressão da aterosclerose, desde a formação das estrias gordurosas, até o processo de ruptura da placa aterosclerótica (LI e GLASS, 2002). Sua ativação na íntima arterial induzida pela LDL oxidada leva a liberação de biomoléculas vasoativas, produção de EROs e secreção de enzimas proteolíticas que degradam componentes da matriz extracelular (HANSSON et al., 2006). Portanto, lesões com numerosas células inflamatórias são mais susceptíveis à ruptura, e uma redução do conteúdo destas células contribuiria para aumentar a estabilidade desta lesão (LIBBY, 2002b).

A captação e o acúmulo de LDLox nos macrófagos, com a consequente formação das células espumosas, constituem processos iniciais do processo aterosclerótico e marcam o início da ativação inflamatória decorrente deste processo (STEINBERG, 1997). Diversos processos patofisiológicos atuam na intensificação e perpetuação do processo inflamatório na aterogênese. Dentre estes destacam-se a indução de moléculas de adesão na superfície endotelial, alterações na matriz extracelular e em vias de regulação do tônus arterial. Ademais, a citotoxicidade induzida pela LDLox em macrófagos é, em parte, relacionada a intensa geração de espécies reativas (EROs/ERNs) pelas células espumosas, o qual pode desencadear eventos celulares como distúrbios na homeostase do $\cdot\text{NO}$ e nos níveis antioxidantes intracelulares como a GSH e alteração do consumo de oxigênio mitocondrial (CHEN et al., 2007; SONOKI et al., 2002). Nosso grupo já havia verificado que a LDLox, causa uma superprodução de espécies reativas, associando à distúrbios da $\cdot\text{NO}$, ativação de MMP, acúmulo de colesterol intracelular, disfunção mitocondrial, ativação do fator de transcrição NF- κ B e consequente apoptose celular (STRALIOTTO et al., 2013).

Conforme descrito anteriormente, tanto os fatores de risco envolvidos no processo aterosclerótico (diabetes, hipertensão, tabagismo, níveis elevados e colesterol, obesidade, entre outros), assim como o próprio processo aterosclerótico, estão associados à produção excessiva de EROs e ERNs. O dano mediado por esses radicais livres aos lipídeos e proteínas e às demais biomoléculas estão presentes em todo o decorrer da progressão da aterosclerose, desde a oxidação da LDL ou pela nitração de proteínas, por exemplo, a qual já foi detectada em lesões ateroscleróticas humanas (GRAHAM et al., 1993; PELUFFO e RADI, 2007). Além disso, sabe-se que a formação vascular de EROs promove a disfunção endotelial devido a diminuição de biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$, contribuindo para o desenvolvimento de lesões iniciais da

aterosclerose (BONETTI et al., 2003; HARRISON, 1997). Portanto, uma estratégia capaz de diminuir esses danos causados não somente pelas EROs, também pelas ERNs, como o peroxinitrito, seria interceptar essas espécies reativas.

Sabe-se que os carotenóides tem uma alta capacidade antioxidante, a qual está fortemente associada com sua capacidade de sequestrar radicais livres e promover a inativação dos mesmos (PALOZZA e KRINSKY, 1992). A fucoxantina tem sido associada a sua capacidade antioxidante, onde estudos já indicaram que esse composto é efetivo no sequestro de radicais livres (NOMURA et al., 1997; YAN et al., 1999). Além disso, Sachindra e colaboradores (2007) analisaram as atividades antioxidantes *in vitro* da fucoxantina e seus metabólitos, e sugeriu que a fucoxantina e seu metabólito fucoxantíol exibem atividade antioxidante mais eficaz ou similar ao α -tocoferol (vitamina E).

Nossos resultados demonstram que a exposição de macrófagos à LDLox, induziu um aumento significativo na geração de EROs. Este aumento na produção de ROS pode ser responsável pela ativação de diferentes vias relacionadas ao processo inflamatório e morte celular (OU et al., 2010). Por outro lado, quando os macrófagos foram pré-tratados com fucoxantina a geração de ROS induzida pela LDLox foi significativamente reduzida, indicando que o efeito citoprotetor deste composto pode estar relacionado à sua atividade antioxidante de sequestro de radicais (YAN et al., 1999).

Além disso, quando os macrófagos foram expostos à LDLox, houve um aumento significativo na geração de ERNs. O peroxinitrito, espécie reativa de nitrogênio com alta capacidade de nitração e oxidação de biomoléculas, é formado a partir de uma reação entre $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot NO$, o que leva a uma diminuição da biodisponibilidade de $\cdot NO$, desequilibrando as condições fisiológicas do endotélio (RADI et al., 2002). Além disso, o ONOO $^-$ pode agir como uma molécula vasoconstritora e citotóxica, causando danos a proteínas, lipídeos e DNA (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). Ainda, o envolvimento do ONOO $^-$ em lesões ateroscleróticas humanas tem sido sugerido devido sua capacidade em oxidar a LDL ou por nitrar resíduos de tirosina em proteínas (GRAHAM et al., 1993; PELUFFO e RADI, 2007). Verificou-se, no entanto, que o pré-tratamento com fucoxantina (2 μM) reduziu significativamente a geração de ERNs induzida pela LDLox. Esses estudos corroboram com diversas pesquisas que apontam a ação antioxidante da fucoxantina. O composto demonstrou ser capaz de sequestrar o radical DPPH (YAN et al., 1999), e conferiu proteção

celular contra danos induzidos por H_2O_2 e ultravioleta B em fibroblastos (HEO e JEON, 2009). Além disso, a fucoxantina foi capaz de prevenir estresse oxidativo induzido por íons de ferro em uma linhagem celular de células hepáticas, através da diminuição da produção de EROs intracelular, levando a proteção contra dano ao DNA, modificações proteicas por lipoperoxidação e ainda induziu um aumento de níveis de GSH nestas células (LIU et al., 2011b). Um estudo em um sistema sem células revelou que na estrutura da fucoxantina, o anel alênico e grupo funcional acetil seriam os responsáveis pelas suas atividades antioxidantes, como indicado pelo sequestro de radicais como hidroxil ($\cdot OH$), superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e oxigênio singlet (1O_2) (SACHINDRA et al., 2007).

Um estudo realizado por Persson e colaboradores (2009) demonstrou que a LDLox aumenta a expressão da iNOS e consequentemente a produção de $\cdot NO$ em macrófagos. Altos níveis de $\cdot NO$ levam ao desencadeamento de situações pró-inflamatórias, assim como à reação com $O_2^{\cdot -}$, levando a formação de $ONOO^{\cdot -}$ e consequente toxicidade celular, conforme já mencionado (RADI et al., 2002). Através da análise de nossos resultados, podemos observar que a exposição de macrófagos J774 a LDLox causou um aumento significativo na produção de $\cdot NO$. Estudos ainda indicam que o aumento na produção de $\cdot NO$ pela iNOS pode levar a ativação de NF- κB (LI et al., 2001). A ativação do NF- κB , indutor de vários mediadores pró-inflamatórios, pode ainda ser um evento posterior da superprodução de EROs pela LDLox (OU et al., 2007; TERKELTAUB et al., 1994). Trabalhos do nosso laboratório já haviam corroborado com essas pesquisas, demonstrando que a exposição à LDLox aumenta a produção de $\cdot NO$, assim como induz a ativação do NF- κB , que poderia ser consequência da produção de EROs induzida pela LDLox (STRALIOTTO et al., 2013).

Nesta pesquisa, observamos ainda que o pré-tratamento com fucoxantina demonstrou capacidade em inibir uma superprodução de $\cdot NO$. Neste contexto, vários estudos indicam propriedades anti-inflamatórias que podem estar correlacionado a esse resultado. Em estudos de Kim e colaboradores (2010), a fucoxantina demonstrou capacidade de regular negativamente (inibir) a ativação do fator NF- κB , levando a diminuição de fatores pró-inflamatórios incluindo $\cdot NO$, PGE_2 , IL- 1β , TNF- α e IL-6 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, Shiratori e colaboradores (2005) já haviam também descrito que a fucoxantina teria a capacidade anti-inflamatória devido a supressão de geração de $\cdot NO$ e outras moléculas

pró-inflamatórias pela inibição da atividade do NF- κ B. Considerando que o NF- κ B é um fator de transcrição redox-sensível, podendo ser ativado por EROs (ROBBESYN et al., 2004), a redução da produção de 'NO pela fucoxantina poderia ser resultado de suas propriedades antioxidantes. A diminuição de EROs/ERNs intracelulares, gerados pela LDLox, levaria a uma diminuição da ativação do NF- κ B, e conseqüentemente da ativação de iNOS e geração de 'NO, diminuindo um possível quadro inflamatório.

A glutatona reduzida (GSH) é de extrema importância no estado redox celular, e seus níveis intracelulares são diminuídos devido situações de estresse oxidativo (PASTORE et al., 2003). Um desequilíbrio na biossíntese de GSH, assim como de seu metabolismo e função, pode implicar no desenvolvimento de aterosclerose (CALLEGARI et al., 2011; QIAO et al., 2007). A diminuição dos níveis de GSH celular pode resultar em uma produção elevada de EROs, particularmente em macrófagos, o que pode causar diversas alterações biológicas, como o aumento de produção de moléculas inflamatórias e produtos modificados oxidativamente, como a LDLox (SILVERSTEIN et al., 2010). Além disso, um recente estudo de YAN e colaboradores (2015) relata que a diminuição da produção de GSH induzida por BSO em macrófagos resultou no aumento da produção de espécies reativas e da expressão dos receptores CD36, um dos responsáveis pela captação de LDLox, fato que levaria a um aumento de formação de células espumosas.

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 e SEVANIAN, 2001; WANG et al., 2006). Em contrapartida, Bea e colaboradores (2003) verificou que o estresse oxidativo induzido pela LDLox leva à uma compensação protetora aumentando a síntese de GSH em macrófagos, verificado pelo aumento da expressão das subunidades GCLC e GCLM que compõem a enzima sintetizante de GSH, a glutamato cisteína ligase (GCL). Este dado estaria ligado a ativação da seqüência promotora ARE (Elementos de Resposta Antioxidante) por fatores de transcrição como o NRF-2 através do estímulo por LDLox. Neste contexto, LIU e colaboradores (2011a) verificaram que a fucoxantina também é capaz de aumentar significativamente a ligação do Nrf-2 ao sítio promotor ARE, levando a um aumento da expressão genica e proteica de HO-1 e NQO1, através de fosforilação de proteínas quinases como ERK e p38, bem como de sua atividade pro-oxidante pela oxidação de resíduos sulfidrilicos de

keap1. Em nosso estudo, vimos que a exposição dos macrófagos à LDLox promoveu uma redução nos níveis intracelulares de GSH, a qual foi acompanhada pela geração de EROs/ERNs. O pré-tratamento com fucoxantina não foi capaz de prevenir a depleção desse antioxidante essencial, apesar de ter sido capaz de diminuir a produção de espécies reativas.

Uma vez na camada íntima, a LDLox pode ser rapidamente capturada pelos receptores que são expressos nos macrófagos, particularmente os receptores “*scavenger*” de classe A (SRAI/II), o receptor de LDL oxidada (LOX-1) e CD36, resultando em um acúmulo intracelular de colesterol e, conseqüentemente, levando à formação das células espumosas (CHISTIAKOV et al., 2016; COLLOT-TEIXEIRA et al., 2007; STEINBERG, 2002). Ainda, sabe-se que a translocação no fator nuclear NF- κ B induzida por EROs leva à um aumento na expressão de receptores CD36 (RIOS et al., 2012). Nossos dados mostram que a fucoxantina reduziu significativamente o conteúdo lipídico no interior dos macrófagos, demonstrando que o composto foi eficaz em diminuir a captação de LDLox, e por conseqüência, a formação de células espumosas. Tal resultado pode ser em decorrência à diminuição da ativação dos macrófagos e conseqüentemente a expressão dos receptores “*scavengers*”. Um recente estudo de Relevy e colaboradores (2015) demonstrou que um isômero do β -caroteno foi capaz de diminuir a captação de LDLox e a formação de células espumosas, corroborando com a ideia de que os carotenóides seriam uma boa opção terapêutica para impedir o desenvolvimento da aterosclerose.

As mitocôndrias são organelas importantes para o fornecimento energético celular, e são ao mesmo tempo alvos e fontes importantes de EROs/ERNs. Por serem o principal sítio de formação e reação intracelular de ONOO⁻, a disfunção das mitocôndrias por oxidação e nitração de componentes cruciais, evolui para alterações homeostáticas e fisiológicas desta organela (KOWALTOWSKI et al., 2001). Uma vez danificada, a mitocôndria passa a produzir exacerbadamente O₂⁻, que ao reagir rapidamente com NO, aumenta exponencialmente a formação de ONOO⁻, amplificando os fenômenos de disfunção mitocondrial, inibição respiratória e ainda superprodução de EROs por escape de elétrons dos complexos I e III, comprometendo então, de maneira geral, o funcionamento energético celular (BALABAN et al., 2005; RADY 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, avaliando medições em tempo real do consumo de O₂ em células intactas, através da injeção de substratos e inibidores específicos (HILL et al., 2012). Portanto, em nosso estudo investigamos o efeito da LDLox, assim como da fucoxantina, sobre a respiração mitocondrial usando a respirometria de alta resolução.

Observamos que a exposição dos macrófagos à LDLox neste protocolo experimental não alterou a capacidade máxima de respiração (RCR), ou seja, a eficiência respiratória mitocondrial. No entanto, observamos que a LDLox causou um grande declínio do consumo de oxigênio associado à síntese de ATP, sugerindo um comprometimento na geração de energia. Uma diminuição no consumo de oxigênio 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 um menor consumo de oxigênio (HILL et al., 2012). Sabe-se que EROs/ERNs geradas por LDLox podem causar danos aos componentes da cadeia transportadora de elétrons, afetando a capacidade de reserva e prejudicando a resposta ao estresse oxidativo (DRANKA et al., 2010). Hort e colaboradores (2014) já haviam demonstrado que exposição de células endoteliais da artéria bovina (BAEC) à LDLox causa disfunção mitocondrial, demonstrando um declínio na RCR, assim como diminuição do consumo de oxigênio associado à síntese de ATP e capacidade de reserva mitocondrial.

Recentes avanços demonstram que muitas células mantêm uma capacidade de reserva bioenergética bastante substancial, definida como a quantidade de consumo de oxigênio que a célula teria disponível para uso quando a demanda de ATP fosse aumentava ou quando a célula estivesse recebendo algum estímulo estressante. Dessa forma, indicaria então que em condições basais, alguns tipos celulares não consumiriam a quantidade máxima de oxigênio (DRANKA et al., 2011). Além disso, a capacidade de reserva pode ser considerada um índice indicativo de população de mitocôndrias saudáveis, podendo ser feitas previsões a respeito da resposta celular frente ao estresse ou aumento de demanda energética (HILL et al., 2012). 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, indicando que as células apresentariam uma habilidade debilitada em lidar com o estresse oxidativo ou aumento da demanda energética devido ao insulto. Com a

capacidade de reserva decaída, a respiração celular e produção energética ficam comprometidas, e a célula pode entrar em morte celular programada através de sinalização mitocondrial.

Nossos resultados mostraram que a fucoxantina não foi capaz de reverter os danos à cadeia respiratória causada pela LDLox, resultando em declínio da taxa de consumo de oxigênio associado à síntese de ATP. No entanto, o pré-tratamento com a fucoxantina foi capaz de reverter a perda da capacidade de reserva causada pela LDLox, demonstrando uma possível melhora na eficiência da célula frente à insultos, tais como a LDLox. O aumento do metabolismo mitocondrial geralmente está correlacionado com um aumento do número de mitocôndrias. Ainda, Nrf-2 já foi identificado como um fator envolvendo a expressão de vários genes que são necessários para expressão e função da cadeia respiratória (SCARPULLA, 2011; VOMHOF-DEKREY e PICKLO, 2012). Neste sentido, a fucoxantina, como já mencionado, pode ativar o Nrf-2, e talvez possa ser capaz de induzir a expressão de alguns componentes mitocondriais, consequentemente aumentando a biogênese mitocondrial e a capacidade de reserva. Wu e colaboradores (WU et al., 2014) verificaram que a fucoxantina proveniente de dieta foi capaz de regular positivamente a expressão de genes como PGC-1 α , participante da biogênese mitocondrial. Além disso, a fucoxantina pode melhorar o ambiente redox pela promoção da síntese de GSH pela ativação do Nrf-2, levando a uma diminuição da geração de espécies reativas, e por consequência, protegendo proteínas e outras macromoléculas de danos oxidativo.

De maneira geral, verificamos que o pré-tratamento com fucoxantina causou uma diminuição na produção de EROs e ERNs, promovendo uma melhora em relação ao estresse oxidativo/nitrosativo, ocasionando uma melhora na biodisponibilidade de .NO. Também se verificou que a fucoxantina foi capaz de diminuir a formação de células espumosas e melhorar a capacidade de reserva mitocondrial, importante frente à insultos como a LDLox. Além disso, a fucoxantina foi capaz de prevenir a lipoperoxidação e a oxidação proteica da LDL humana isolada *in vitro*. De tal forma, podemos concluir que a fucoxantina pode ser uma interessante ferramenta terapêutica nos estudos relacionados à doenças cardiovasculares.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

- A LDLox aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, além de diminuir a biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$, os níveis de GSH intracelular e aumentar a formação de células espumosas. Além disso, os danos causados pela LDLox nos macrófagos J774 causam comprometimento mitocondrial, com diminuição da capacidade de reserva e consumo de oxigênio associado à síntese de ATP.
- O pré-tratamento com fucoxantina por 24 horas promoveu uma melhora em relação ao estresse oxidativo/nitrosativo promovido pelas EROs/ERNs, ocasionando uma melhora na biosponibilidade de $\cdot\text{NO}$, e causou uma diminuição da formação de células espumosas, além de uma melhora da capacidade de reserva mitocondrial frente à insultos como a LDLox.
- A fucoxantina também foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica e oxidação proteica da LDL humana *in vitro*.

8 PERSPECTIVAS

Alguns aspectos relacionados a este trabalho ainda precisam ser melhores elucidados; desta forma, nosso grupo propõe algumas perspectivas:

- Investigar mais a fundo o mecanismo protetor da fucoxantina, utilizando ferramentas de regulação gênica.
- Avaliar a fucoxantina sobre perspectiva de outros parâmetros da aterosclerose como expressão de moléculas pró-inflamatórias.
- Verificar o efeito aterosclerótico da fucoxantina em modelos animais.

REFERÊNCIAS

ABIDOV, M.; RAMAZANOV, Z.; SEIFULLA, R. and GRACHEV, S. The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. **Diabetes Obes Metab**, v. 12, n. 1, p. 72-81, 2010.

AGARWAL, S. and RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **CMAJ**, v. 163, n. 6, p. 739-44, 2000.

ASAI, A.; SUGAWARA, T.; ONO, H. and NAGAO, A. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 2, p. 205-11, 2004.

ASAI, A.; YONEKURA, L. and NAGAO, A. Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans. **Br J Nutr**, v. 100, n. 2, p. 273-7, 2008.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S. and FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483-95, 2005.

BATLOUNI, M. [The oxidative hypothesis of atherosclerosis and the use of antioxidants in coronary disease]. **Arq Bras Cardiol**, v. 68, n. 1, p. 55-63, 1997.

BEA, F.; HUDSON, F. N.; CHAIT, A.; KAVANAGH, T. J. and ROSENFELD, M. E. Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements. **Circ Res**, v. 92, n. 4, p. 386-93, 2003.

BECKMAN, J. S. and KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, 1996.

BOCZKOWSKI, J.; LISDERO, C. L.; LANONE, S.; CARRERAS, M. C.; AUBIER, M. and PODEROSO, J. J. Peroxynitrite-

mediated mitochondrial dysfunction. **Biol Signals Recept**, v. 10, n. 1-2, p. 66-80, 2001.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O. and LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 2, p. 168-75, 2003.

BRUCKDORFER, K. R. Antioxidants and CVD. **Proc Nutr Soc**, v. 67, n. 2, p. 214-22, 2008.

CAI, H. and HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, n. 10, p. 840-4, 2000.

CALCERRADA, P.; PELUFFO, G. and RADII, R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 35, p. 3905-32, 2011.

CALLEGARI, A.; LIU, Y.; WHITE, C. C.; CHAIT, A.; GOUGH, P.; RAINES, E. W.; COX, D.; KAVANAGH, T. J. and ROSENFELD, M. E. Gain and loss of function for glutathione synthesis: impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 11, p. 2473-82, 2011.

CASSINA, A. M.; HODARA, R.; SOUZA, J. M.; THOMSON, L.; CASTRO, L.; ISCHIROPOULOS, H.; FREEMAN, B. A. and RADII, R. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. **J Biol Chem**, v. 275, n. 28, p. 21409-15, 2000.

CHAUDIERE, J. and FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chem Toxicol**, v. 37, n. 9-10, p. 949-62, 1999.

CHEN, Y.; ROLLINS, J.; PAIGEN, B. and WANG, X. Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. **Cell Metab**, v. 6, n. 3, p. 164-79, 2007.

CHISOLM, G. M. and STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 12, p. 1815-26, 2000.

CHISTIakov, D. A.; OREKHOV, A. N. and BOBRYsheV, Y. V. LOX-1-Mediated Effects on Vascular Cells in Atherosclerosis. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 5, p. 1851-9, 2016.

COLLOT-TEIXEIRA, S.; DE LORENZO, F. and MCGREGOR, J. L. Scavenger receptor A and CD36 are implicated in mediating platelet activation induced by oxidized low- density lipoproteins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 12, p. 2491-2, 2007.

CONN, P. F.; LAMBERT, C.; LAND, E. J.; SCHALCH, W. and TRUSCOTT, T. G. Carotene-oxygen radical interactions. **Free Radic Res Commun**, v. 16, n. 6, p. 401-8, 1992.

D'ORAZIO, N.; GAMMONE, M. A.; GEMELLO, E.; DE GIROLAMO, M.; CUSENZA, S. and RICCIONI, G. Marine bioactives: pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. **Mar Drugs**, v. 10, n. 4, p. 812-33, 2012a.

D'ORAZIO, N.; GEMELLO, E.; GAMMONE, M. A.; DE GIROLAMO, M.; FICONERI, C. and RICCIONI, G. Fucoxantin: a treasure from the sea. **Mar Drugs**, v. 10, n. 3, p. 604-16, 2012b.

DE BEM, A. F.; FARINA, M.; PORTELLA RDE, L.; NOGUEIRA, C. W.; DINIS, T. C.; LARANJINHA, J. A.; ALMEIDA, L. M. and ROCHA, J. B. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, v. 201, n. 1, p. 92-100, 2008.

DE BEM, A. F.; FIUZA, B.; CALCERRADA, P.; BRITO, P. M.; PELUFFO, G.; DINIS, T. C.; TRUJILLO, M.; ROCHA, J. B.; RADI, R. and ALMEIDA, L. M. Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen. **Nitric Oxide**, v. 31, p. 20-30, 2013.

DRANKA, B. P.; BENAVIDES, G. A.; DIERS, A. R.; GIORDANO, S.; ZELICKSON, B. R.; REILY, C.; ZOU, L.; CHATHAM, J. C.; HILL, B. G.; ZHANG, J.; LANDAR, A. and

DARLEY-USMAR, V. M. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 9, p. 1621-35, 2011.

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

EDGE, R.; MCGARVEY, D. J. and TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants--a review. **J Photochem Photobiol B**, v. 41, n. 3, p. 189-200, 1997.

ESTERBAUER, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; WAEG, G.; STRIEGL, G. and JURGENS, G. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. **Chem Res Toxicol**, v. 3, n. 2, p. 77-92, 1990.

ESTERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H. and ROTHENEDER, M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. **Free Radic Res Commun**, v. 6, n. 1, p. 67-75, 1989.

FERNS, G. A.; LAMB, D. J. and TAYLOR, A. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. **Atherosclerosis**, v. 133, n. 2, p. 139-52, 1997.

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

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C. and VERCESI, A. E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2029-74, 2013.

FOGELMAN, A. M.; SHECHTER, I.; SEAGER, J.; HOKOM, M.; CHILD, J. S. and EDWARDS, P. A. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in

human monocyte-macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 4, p. 2214-8, 1980.

GALLE, J.; HANSEN-HAGGE, T.; WANNER, C. and SEIBOLD, S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 219-26, 2006.

GAMMONE, M. A.; GEMELLO, E.; RICCIONI, G. and D'ORAZIO, N. Marine bioactives and potential application in sports. **Mar Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2357-82, 2014.

GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G. and D'ORAZIO, N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? **Food Nutr Res**, v. 59, p. 26762, 2015.

GAUT, J. P. and HEINECKE, J. W. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med**, v. 11, n. 3-4, p. 103-12, 2001.

GIESEG, S. P. and ESTERBAUER, H. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. **FEBS Lett**, v. 343, n. 3, p. 188-94, 1994.

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

GLASS, C. K. and WITZTUM, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 503-16, 2001.

GLAVIND, J.; HARTMANN, S.; CLEMMESSEN, J.; JESSEN, K. E. and DAM, H. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 1952.

GOTTO, A. M., JR. and GRUNDY, S. M. Lowering LDL cholesterol: questions from recent meta-analyses and subset analyses of clinical trial DataIssues from the Interdisciplinary Council on Reducing

the Risk for Coronary Heart Disease, ninth Council meeting. **Circulation**, v. 99, n. 8, p. E1-7, 1999.

GRAHAM, A.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B.; O'LEARY, V.; DARLEY-USMAR, V. and MONCADA, S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. **FEBS Lett**, v. 330, n. 2, p. 181-5, 1993.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radic Res**, v. 31, n. 4, p. 261-72, 1999.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P. and TABAS, I. Inflammation and plaque vulnerability. **J Intern Med**, v. 278, n. 5, p. 483-93, 2015.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. K. and SODERBERG-NAUCLER, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu Rev Pathol**, v. 1, p. 297-329, 2006.

HARRISON, D.; GRIENDLING, K. K.; LANDMESSER, U.; HORNIG, B. and DREXLER, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v. 91, n. 3A, p. 7A-11A, 2003.

HARRISON, D. G. Endothelial function and oxidant stress. **Clin Cardiol**, v. 20, n. 11 Suppl 2, p. II-11-7, 1997.

HEILBRONN, L. K.; NOAKES, M. and CLIFTON, P. M. Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 6, p. 968-70, 2001.

HEINECKE, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. **Atherosclerosis**, v. 141, n. 1, p. 1-15, 1998.

HEO, S. J. and JEON, Y. J. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. **J Photochem Photobiol B**, v. 95, n. 2, p. 101-7, 2009.

HILL, B. G.; BENAVIDES, G. A.; LANCASTER, J. R., JR.; BALLINGER, S.; DELL'ITALIA, L.; JIANHUA, Z. and DARLEY-USMAR, V. M. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. **Biol Chem**, v. 393, n. 12, p. 1485-1512, 2012.

HISSIN, P. J. and HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-26, 1976.

HORT, M. A.; STRALIOTTO, M. R.; DE OLIVEIRA, J.; AMOEDO, N. D.; DA ROCHA, J. B.; GALINA, A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. and DE BEM, A. F. Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. **Biochimie**, v. 105, p. 172-81, 2014.

HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, T.; NISHIKAWA, S.; EMI, S.; TSUKUI, T.; BEPPU, F.; OKADA, T. and MIYASHITA, K. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-Ay mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 504, n. 1, p. 17-25, 2010.

HOZAWA, A.; JACOBS, D. R., JR.; STEFFES, M. W.; GROSS, M. D.; STEFFEN, L. M. and LEE, D. H. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) study. **Clin Chem**, v. 53, n. 3, p. 447-55, 2007.

HUTTER, E.; RENNER, K.; PFISTER, G.; STOCKL, P.; JANSEN-DURR, P. and GNAIGER, E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. **Biochem J**, v. 380, n. Pt 3, p. 919-28, 2004.

HYBERTSON, B. M.; GAO, B.; BOSE, S. K. and MCCORD, J. M. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Mol Aspects Med**, v. 32, n. 4-6, p. 234-46, 2011.

IKEDA, K.; KITAMURA, A.; MACHIDA, H.; WATANABE, M.; NEGISHI, H.; HIRAOKA, J. and NAKANO, T. Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 30, n. 1-2, p. 44-8, 2003.

INSULL, W., JR. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **Am J Med**, v. 122, n. 1 Suppl, p. S3-S14, 2009.

ITABE, H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. **Biol Pharm Bull**, v. 26, n. 1, p. 1-9, 2003.

ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T.; O'CONNOR, T. and YAMAMOTO, M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes Cells**, v. 8, n. 4, p. 379-91, 2003.

JERLICH, A.; FRITZ, G.; KHARRAZI, H.; HAMMEL, M.; TSCHABUSCHNIG, S.; GLATTER, O. and SCHAUR, R. J. Comparison of HOCl traps with myeloperoxidase inhibitors in prevention of low density lipoprotein oxidation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1481, n. 1, p. 109-18, 2000.

KADAR, A. and GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiovasc Surg**, v. 9, n. 2, p. 109-21, 2001.

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

KEANEY, J. F., JR. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. **Mol Aspects Med**, v. 21, n. 4-5, p. 99-166, 2000.

KIM, K. N.; HEO, S. J.; YOON, W. J.; KANG, S. M.; AHN, G.; YI, T. H. and JEON, Y. J. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-kappaB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. **Eur J Pharmacol**, v. 649, n. 1-3, p. 369-75, 2010.

KOH, W. P.; YUAN, J. M.; WANG, R.; LEE, Y. P.; LEE, B. L.; YU, M. C. and ONG, C. N. Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese Health Study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 21, n. 9, p. 685-90, 2011.

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

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F. and VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 495, n. 1-2, p. 12-5, 2001.

LABRUNA, G.; PASANISI, F.; FORTUNATO, G.; NARDELLI, C.; FINELLI, C.; FARINARO, E.; CONTALDO, F. and SACCHETTI, L. Sequence Analysis of the UCP1 Gene in a Severe Obese Population from Southern Italy. **J Obes**, v. 2011, p. 269043, 2011.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S. and SUBBAIAH, P. V. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 1, p. 39-75, 2010.

LI, A. C. and GLASS, C. K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1235-42, 2002.

LI, Y. H.; YAN, Z. Q.; BRAUNER, A. and TULLUS, K. Meconium induces expression of inducible NO synthase and activation of NF-kappaB in rat alveolar macrophages. **Pediatr Res**, v. 49, n. 6, p. 820-5, 2001.

LIBBY, P. Atheroma: more than mush. **Lancet**, v. 348 Suppl 1, p. s4-7, 1996.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-74, 2002a.

LIBBY, P. Lipid-lowering therapy stabilizes plaque, reduces events by limiting inflammation. **Am J Manag Care**, v. Suppl, p. 1, 4, 2002b.

LIBBY, P.; BORNFELDT, K. E. and TALL, A. R. Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. **Circ Res**, v. 118, n. 4, p. 531-4, 2016.

LIBBY, P.; GENG, Y. J.; AIKAWA, M.; SCHOENBECK, U.; MACH, F.; CLINTON, S. K.; SUKHOVA, G. K. and LEE, R. T. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. **Curr Opin Lipidol**, v. 7, n. 5, p. 330-5, 1996.

LIBBY, P.; OKAMOTO, Y.; ROCHA, V. Z. and FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circ J**, v. 74, n. 2, p. 213-20, 2010.

LIU, C. L.; CHIU, Y. T. and HU, M. L. Fucoxanthin enhances HO-1 and NQO1 expression in murine hepatic BNL CL.2 cells through activation of the Nrf2/ARE system partially by its pro-oxidant activity. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 20, p. 11344-51, 2011a.

LIU, C. L.; LIANG, A. L. and HU, M. L. Protective effects of fucoxanthin against ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress in murine hepatic BNL CL.2 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1314-9, 2011b.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUIZ DA SILVA, E.; TSUSHIDA, T. and TERAQ, J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. **Arch Biochem Biophys**, v. 349, n. 2, p. 313-20, 1998.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-41, 2000.

MAEDA, H.; HOSOKAWA, M.; SASHIMA, T. and MIYASHITA, K. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil

attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 19, p. 7701-6, 2007.

MAEDA, H.; KANNO, S.; KODATE, M.; HOSOKAWA, M. and MIYASHITA, K. Fucoxanthinol, Metabolite of Fucoxanthin, Improves Obesity-Induced Inflammation in Adipocyte Cells. **Mar Drugs**, v. 13, n. 8, p. 4799-813, 2015.

MATSUMOTO, M.; HOSOKAWA, M.; MATSUKAWA, N.; HAGIO, M.; SHINOKI, A.; NISHIMUKAI, M.; MIYASHITA, K.; YAJIMA, T. and HARA, H. Suppressive effects of the marine carotenoids, fucoxanthin and fucoxanthinol on triglyceride absorption in lymph duct-cannulated rats. **Eur J Nutr**, v. 49, n. 4, p. 243-9, 2010.

MIMURA, J. and ITOH, K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, v. 88, n. Pt B, p. 221-32, 2015.

MORDENTI, J. Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. **J Pharm Sci**, v. 75, n. 11, p. 1028-40, 1986.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NOMURA, T.; KIKUCHI, M.; KUBODERA, A. and KAWAKAMI, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). **Biochem Mol Biol Int**, v. 42, n. 2, p. 361-70, 1997.

NOZAKI, M.; FUKUHARA, A.; SEGAWA, K.; OKUNO, Y.; ABE, M.; HOSOGAI, N.; MATSUDA, M.; KOMURO, R. and SHIMOMURA, I. Nitric oxide dysregulates adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 364, n. 1, p. 33-9, 2007.

OKADA, T.; MIZUNO, Y.; SIBAYAMA, S.; HOSOKAWA, M. and MIYASHITA, K. Antiobesity effects of Undaria lipid capsules prepared with scallop phospholipids. **J Food Sci**, v. 76, n. 1, p. H2-6, 2011.

OU, H. C.; CHOU, F. P.; SHEU, W. H.; HSU, S. L. and LEE, W. J. Protective effects of magnolol against oxidized LDL-induced apoptosis in endothelial cells. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 6, p. 421-32, 2007.

OU, H. C.; LEE, W. J.; LEE, S. D.; HUANG, C. Y.; CHIU, T. H.; TSAI, K. L.; HSU, W. C. and SHEU, W. H. Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 248, n. 2, p. 134-43, 2010.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S. and LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PALOZZA, P. and KRINSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. **Methods Enzymol**, v. 213, p. 403-20, 1992.

PARK, H. J.; LEE, M. K.; PARK, Y. B.; SHIN, Y. C. and CHOI, M. S. Beneficial effects of *Undaria pinnatifida* ethanol extract on diet-induced-insulin resistance in C57BL/6J mice. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 4, p. 727-33, 2011.

PARK, K. H. and PARK, W. J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. **J Korean Med Sci**, v. 30, n. 9, p. 1213-25, 2015.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E. and PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chim Acta**, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.

PELUFFO, G. and RADI, R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 2, p. 291-302, 2007.

PENG, J.; YUAN, J. P.; WU, C. F. and WANG, J. H. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. **Mar Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1806-28, 2011.

PERSSON, K.; SAUMA, L.; SAFHOLM, A.; XU, L.; LI, W. and YUAN, X. M. LDL and UV-oxidized LDL induce upregulation of iNOS and NO in unstimulated J774 macrophages and HUVEC. **APMIS**, v. 117, n. 1, p. 1-9, 2009.

PODEROSO, J. J.; CARRERAS, M. C.; LISDERO, C.; RIOBO, N.; SCHOPFER, F. and BOVERIS, A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. **Arch Biochem Biophys**, v. 328, n. 1, p. 85-92, 1996.

PORTER, N. A. Chemistry of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 273-82, 1984.

QIAO, M.; KISGATI, M.; CHOLEWA, J. M.; ZHU, W.; SMART, E. J.; SULISTIO, M. S. and ASMIS, R. Increased expression of glutathione reductase in macrophages decreases atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 6, p. 1375-82, 2007.

RADER, D. J. and DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 904-13, 2008.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R.; QUIJANO, C. and CASTRO, L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 11, p. 1451-64, 2002.

RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; NAVILIAT, M. and CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 5, p. 463-88, 2001.

REYFTMANN, J. P.; SANTUS, R.; MAZIERE, J. C.; MORLIERE, P.; SALMON, S.; CANDIDE, C.; MAZIERE, C. and HAIGLE, J. Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1042, n. 2, p. 159-67, 1990.

RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N.; FRANCESCHELLI, S. and SPERANZA, L. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. **Mar Drugs**, v. 9, n. 7, p. 1166-75, 2011.

RIOS, F. J.; KOGA, M. M.; FERRACINI, M. and JANCAR, S. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36632, 2012.

RIZZO, M.; KOTUR-STEVLJEVIC, J.; BERNEIS, K.; SPINAS, G.; RINI, G. B.; JELIC-IVANOVIC, Z.; SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, V. and VEKIC, J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Transl Res**, v. 153, n. 5, p. 217-23, 2009.

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

ROCHA, V. Z. and LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, n. 6, p. 399-409, 2009.

ROSENBLAT, M. and AVIRAM, M. Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL: in vitro and in vivo studies. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 2, p. 305-17, 1998.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115-26, 1999.

SACHINDRA, N. M.; SATO, E.; MAEDA, H.; HOSOKAWA, M.; NIWANO, Y.; KOHNO, M. and MIYASHITA, K. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 21, p. 8516-22, 2007.

SANGEETHA, R. K.; BHASKAR, N. and BASKARAN, V. Comparative effects of beta-carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 331, n. 1-2, p. 59-67, 2009.

SCARPULLA, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 7, p. 1269-78, 2011.

SCHULZ, K.; KERBER, S. and KELM, M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂- in aqueous and protein-containing samples. **Nitric Oxide**, v. 3, n. 3, p. 225-34, 1999.

SHAH, P. K. Inflammation and plaque vulnerability. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 23, n. 1, p. 31-40, 2009.

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

SHIRATORI, K.; OHGAMI, K.; ILIEVA, I.; JIN, X. H.; KOYAMA, Y.; MIYASHITA, K.; YOSHIDA, K.; KASE, S. and OHNO, S. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. **Exp Eye Res**, v. 81, n. 4, p. 422-8, 2005.

SHOELSON, S. E.; LEE, J. and GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1793-801, 2006.

SILVERSTEIN, R. L.; LI, W.; PARK, Y. M. and RAHAMAN, S. O. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 121, p. 206-20, 2010.

SMITH, C.; MITCHINSON, M. J.; ARUOMA, O. I. and HALLIWELL, B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. **Biochem J**, v. 286 (Pt 3), p. 901-5, 1992.

SMITH, R. A.; HARTLEY, R. C.; COCHEME, H. M. and MURPHY, M. P. Mitochondrial pharmacology. **Trends Pharmacol Sci**, v. 33, n. 6, p. 341-52, 2012.

SOMACAL, S.; FIGUEIREDO, C. G.; QUATRIN, A.; RUVIARO, A. R.; CONTE, L.; AUGUSTI, P. R.; ROEHRS, M.;

DENARDIN, I. T.; KASTEN, J.; DA VEIGA, M. L.; DUARTE, M. M. and EMANUELLI, T. The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Mol Cell Biochem**, v. 403, n. 1-2, p. 243-53, 2015.

SONOKI, K.; YOSHINARI, M.; IWASE, M.; IINO, K.; ICHIKAWA, K.; OHDO, S.; HIGUCHI, S. and IIDA, M. Glycoxidized low-density lipoprotein enhances monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells: relation to lysophosphatidylcholine contents and inhibition by nitric oxide donor. **Metabolism**, v. 51, n. 9, p. 1135-42, 2002.

STARY, H. C. [Atherosclerotic lesions in the young]. **G Ital Cardiol**, v. 20, n. 11, p. 1056-8, 1990.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J Biol Chem**, v. 272, n. 34, p. 20963-6, 1997.

STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1211-7, 2002.

STEINBERG, D.; CAREW, T. E.; FIELDING, C.; FOGELMAN, A. M.; MAHLEY, R. W.; SNIDERMAN, A. D. and ZILVERSMIT, D. B. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation**, v. 80, n. 3, p. 719-23, 1989.

STEINBERG, D. and WITZTUM, J. L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 12, p. 2311-6, 2010.

STEINBRECHER, U. P. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. **J Biol Chem**, v. 262, n. 8, p. 3603-8, 1987.

STOCKER, R. and KEANEY, J. F., JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, 2004.

STRALIOTTO, M. R.; HORT, M. A.; FIUZA, B.; ROCHA, J. B.; FARINA, M.; CHIABRANDO, G. and DE BEM, A. F. Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling. **Biochimie**, v. 95, n. 8, p. 1544-51, 2013.

SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H. and RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 8, p. 662-80, 2007.

TERKELTAUB, R.; BANKA, C. L.; SOLAN, J.; SANTORO, D.; BRAND, K. and CURTISS, L. K. Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. **Arterioscler Thromb**, v. 14, n. 1, p. 47-53, 1994.

TSUKUI, T.; KONNO, K.; HOSOKAWA, M.; MAEDA, H.; SASHIMA, T. and MIYASHITA, K. Fucoxanthin and fucoxanthinol enhance the amount of docosahexaenoic acid in the liver of KKAY obese/diabetic mice. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 13, p. 5025-9, 2007.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, 2003.

UPRITCHARD, J. E.; SCHUURMAN, C. R.; WIERSMA, A.; TIJBURG, L. B.; COOLEN, S. A.; RIJKEN, P. J. and WISEMAN, S. A. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 5, p. 985-92, 2003.

VOMHOF-DEKREY, E. E. and PICKLO, M. J., SR. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 10, p. 1201-6, 2012.

VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J. and RISSANEN, T. H. Carotenoids and cardiovascular health. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 6, p. 1265-71, 2006.

WANG, H. and JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 5-6, p. 612-6, 1999.

WANG, Y.; QIAO, M.; MIEYAL, J. J.; ASMIS, L. M. and ASMIS, R. Molecular mechanism of glutathione-mediated protection from oxidized low-density lipoprotein-induced cell injury in human macrophages: role of glutathione reductase and glutaredoxin. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 5, p. 775-85, 2006.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K. and NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 381-6, 2004.

WILLCOX, B. J.; CURB, J. D. and RODRIGUEZ, B. L. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 10A, p. 75D-86D, 2008.

WILLIAMS, K. J. and FISHER, E. A. Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 8, n. 2, p. 139-46, 2005.

WRONA, M.; PATEL, K. and WARDMAN, P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. **Free Radic Biol Med**, v. 38, n. 2, p. 262-70, 2005.

WU, M. T.; CHOU, H. N. and HUANG, C. J. Dietary fucoxanthin increases metabolic rate and upregulated mRNA expressions of the PGC-1alpha network, mitochondrial biogenesis and fusion genes in white adipose tissues of mice. **Mar Drugs**, v. 12, n. 2, p. 964-82, 2014.

YAMAGUCHI, Y.; KUNITOMO, M. and HAGINAKA, J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 781, n. 1-2, p. 313-30, 2002.

YAN, X.; CHUDA, Y.; SUZUKI, M. and NAGATA, T. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 63, n. 3, p. 605-7, 1999.

YANG, X.; YAO, H.; CHEN, Y.; SUN, L.; LI, Y.; MA, X.; DUAN, S.; LI, X.; XIANG, R.; HAN, J. and DUAN, Y. Inhibition of Glutathione Production Induces Macrophage CD36 Expression and

Enhances Cellular-oxidized Low Density Lipoprotein (oxLDL) Uptake. **J Biol Chem**, v. 290, n. 36, p. 21788-99, 2015.

ZHENG, J.; PIAO, M. J.; KIM, K. C.; YAO, C. W.; CHA, J. W. and HYUN, J. W. Fucoxanthin enhances the level of reduced glutathione via the Nrf2-mediated pathway in human keratinocytes. **Mar Drugs**, v. 12, n. 7, p. 4214-30, 2014.

ZOLBERG RELEVY, N.; BECHOR, S.; HARARI, A.; BEN-AMOTZ, A.; KAMARI, Y.; HARATS, D. and SHAISH, A. The inhibition of macrophage foam cell formation by 9-cis beta-carotene is driven by BCMO1 activity. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0115272, 2015.