

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Efeitos do tratamento com torta de bixina nas defesas antioxidantes e
perfil lipídico em hamsteres submetidos às dietas padrão e
hipercolesterolemiantes**

AUTORA: Aleçandra Maria Maciel

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. Maria Lúcia Pedrosa

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. Marcelo Eustáquio Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto, março de 2008.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

Sou infinitamente grata,

Ao Pai Celestial, pelo encanto da vida;

Ao senhor Maciel e a dona Lilia, pela dedicação;

Aos meus familiares pela paciência;

A minha família maior pela constância;

Ao Heberth, pela amizade;

Especialmente, a professora Lucinha, modelo de competência e profissionalismo e ao professor Marcelo, verdadeiro educador, pelo exemplo, dedicação e amor ao trabalho que contribuíram para o meu crescimento interior.

E como toda e qualquer tarefa só se torna completa e instrutiva com cooperação, agradeço também, pelo aprendizado a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho se realizasse. Obrigada, Fabrício, Bruno, Larissa, Marquinhos, Máisa, Joamyr, Lorene, Ramom e tantos outros.

Ao André Luiz

RESUMO

A aterosclerose é a principal causa de mortalidade no Brasil. A relação entre estresse oxidativo e aterosclerose já foi estabelecida em resultados de numerosos estudos que apóiam o envolvimento da oxidação na patogênese da aterosclerose e também os efeitos benéficos de antioxidantes. Neste contexto, vem crescendo o interesse por substâncias com propriedades antioxidantes que possam atuar neste processo. Há evidências que bixina, o principal pigmento vermelho do urucum que representa cerca 80% dos seus carotenóides totais, seja capaz de interceptar e desativar moléculas reativas de oxigênio, atuando na defesa antioxidante. As propriedades e peculiaridades, aliadas ao seu potencial antioxidante, tornam esse carotenóide um bom alvo de pesquisa para os eventos associados à hiperlipidemia e ao processo aterosclerótico.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da torta de bixina sobre defesas antioxidantes, sobre perfil lipídico, sérico e tecidual em hamsteres. Para tal foram utilizados hamsteres *Golden Syrian (Mesocricetus auratus)* fêmeas, alimentadas com dietas padrão (C) e hipercolesterolemiantes (H) e tratadas com torta de bixina 0,08% adicionada à dieta durante 60 dias. Nossos resultados mostraram que a dieta hipercolesterolemiantes reduziu os níveis de SH livre (SH) nos grupos HB e H ($107,49 \pm 2,19$ e $110,18 \pm 5,69$, respectivamente) ($p < 0,05$) e não alterou SH totais e SH protéicas. O tratamento com bixina não afetou os níveis de sulfidrilas livres, totais e ligadas às proteínas. Os animais dos grupos H ($401,24 \pm 48,5$) e HB ($426,39 \pm 66,66$) apresentaram atividade igual para paraoxonase e inferior aos grupos C e CB ($806,07 \pm 101,48$ e $631,01 \pm 101,56$). A bixina não afetou a atividade da catalase, mas a dieta interferiu. Os animais dos grupos H ($171,67 \pm 53,3$) e HB ($206,85 \pm 61,85$) apresentaram maior atividade para catalase comparados aos grupos C e CB ($160,06 \pm 46,13$ e $121,89 \pm 92,24$, respectivamente). Por outro lado, o tratamento com bixina reduziu o colesterol total no grupo HB ($6,47 \pm 1,1$), e as frações não HDL (LDL e VLDL) nos grupos HB e CB ($4,94 \pm 0,87$; $1,58 \pm 0,1$, respectivamente) quando comparados aos grupos não tratados (C e H); além disto, a bixina reduziu os níveis séricos de glicose no grupo CB ($4,94 \pm 0,87$) quando comparado aos demais grupos e restabeleceu o peso dos rins dos animais tratados, CB e HB ($0,93 \pm 0,09$; $0,99 \pm 0,11$). Os níveis séricos de hemoglobina, fosfatase alcalina, uréia, creatinina e a atividade da ALT e AST não foram afetados pelo tratamento, embora tenha aumentado gordura no fígado dos animais dos grupos CB ($0,9 \pm 0,15$) e HB

($0,98 \pm 0,5$) e colesterol hepáticos nos mesmos grupos tratados (CB = $12,73 \pm 0,95$ e HB = $17,64 \pm 1,87$, respectivamente).

Nas condições e modelo propostos, concluímos que embora o tratamento não tenha resultado em alterações significativas nas defesas antioxidantes (exceto para a PON paraoxon), a bixina apresentou efeito hipoglicemiante, reduziu os níveis de colesterol total e frações não HDL.

ABSTRACT

The atherosclerosis is principal mortality cause in Brazil. The relationship between oxidative stress and atherosclerosis was already established in results of numerous studies that support the involvement of the oxidation in the pathogenesis of the atherosclerosis and also the beneficial effects of antioxidants. In this context, it is increasing the interest for substances with antioxidant properties that can act in this process. There are evidences that bixin, the principal red pigment of the *urucum* that represents fence 80% of your total carotenoids, be capable to intercept and to disable molecules reactivate oxygen, acting in the antioxidant defense. The properties and peculiarities, allied to your antioxidant potential, they turn that carotenoid a good research objective for the events associated to the hyperlipidemic and atheroeclerotic process.

The objective of the present work was to evaluate the effects of the bixin pie on antioxidant defenses, on serum profile of the lipids and tissue in hamsters. For such hamsters Golden Syrian were used (*Mesocricetus auratus*) females, fed with diets standard (C) and in cholesterol rich diet (H) and treated with pie of bixina 0,08% added to the diet for 60 days. Our results showed that the cholesterol rich diet (H) reduced the levels of free SH (SH) in the groups HB and H ($107,49 \pm 2,19$ and $110,18 \pm 5,69$, respectively) ($p < 0,05$) and it didn't alter total SH and SH linked the protein. The treatment with bixin didn't affect the sulfidrials levels free, total and linked to the proteins. The animals of the groups H ($401,24 \pm 48,5$) and HB ($426,39 \pm 66,66$) they presented same activity for paraoxonase and inferior to the groups C and CB ($806,07 \pm 101,48$ and $631,01 \pm 101,56$). The bixin didn't affect the activity of the catalase, but the diet interfered. The animals of the groups H ($171,67 \pm 53,3$) and HB ($206,85 \pm 61,85$) they presented larger activity for catalase compared to the groups C and CB ($160,06 \pm 46,13$ and $121,89 \pm 92,24$, respectively). On the other hand, the treatment with bixin reduced the total cholesterol in the group HB ($6,47 \pm 1,1$), and the fractions non HDL (LDL and VLDL) in the groups HB and CB ($4,94 \pm 0,87$; $1,58 \pm 0,1$, respectively) compared to the groups non agreements (C and H); besides, the bixin reduced the levels serum glucose in the group CB ($4,94 \pm 0,87$) when compared to the other groups and it reestablished the weight of the kidneys of the treated animals, CB and HB ($0,93 \pm 0,09$; $0,99 \pm 0,11$, respectively). The levels serum hemoglobin, alkaline phosphatase, urea, creatinine and the activity of ALT and AST were not affected for the treatment, although it has increased fat in the liver of the animals of the groups CB ($0,9 \pm 0,15$) and HB ($0,98 \pm 0,5$) and hepatic

cholesterol in the same treated groups (CB = $12,73 \pm 0,95$ and HB = $17,64 \pm 1,87$, respectively).

In the conditions and model proposed, we conclude that although the treatment doesn't have result in significant alterations in the antioxidant defenses (except for the PON paraoxon), the bixina presented hypoglycemiant effect, it reduced the levels of total cholesterol and fractions non HDL.

AGRADECIMENTOS.....	02
RESUMO.....	03
ABSTRACT.....	05
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2. 1. RADICAIS LIVRES.....	17
2. 1. 1. Definição.....	17
2. 1. 2. Terminologia, tipos e peculiaridades químicas	18
2. 1. 3. Papel biológico e fontes de espécies reativas	20
2. 2. ESTRESSE OXIDATIVO, COLESTEROL E ATEROSCLEROSE.....	22
2. 2. 1. Definição, causas endógenas e exógenas.....	22
2. 2. 2. Intensidade e conseqüências.....	24
2. 2. 3. A lipoperoxidação.....	25
2. 2. 4. Transporte do colesterol e oxidação da LDL.....	27
2. 3. ANTIOXIDANTES.....	29
2. 3. 1. O estresse oxidativo e o princípio da proteção.....	29
2. 3. 2. Definição.....	29
2. 3. 3. Mecanismo de ação.....	31
2. 3. 4. Complexidade de classificação.....	31
2. 4. CAROTENÓIDES.....	34
2. 4. 1. Caracterização e ocorrência.....	34
2. 4. 2. Carotenóide e estresse oxidativo: mecanismo de ação.....	35
2. 4. 3. Estudos que relacionam carotenóides e processos patológicos.....	36
2. 5. URUCUM.....	38
2. 5. 1. O pigmento ativo bixina.....	39
2. 5. 2. Toxicidade.....	41
2. 6. MODELO EXPERIMENTAL.....	42
2. 6. 1. Hamsteres.....	42
2. 6. 2. Diferenças nas respostas a dietas aterogênicas entre hamsteres machos e fêmeas.....	43
3. OBJETIVOS.....	46

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4. 1. Animais.....	47
4. 2. Dietas.....	47
4. 3. Delineamento experimental.....	48
4. 4. Parâmetros biológicos.....	49
4. 4. 1. Peso corporal.....	49
4. 4. 2. Peso do fígado, baço, coração e rins.....	49
4. 4. 3. Obtenção do soro.....	49
4. 5. Defesas antioxidantes.....	50
4. 5. 1. Paraoxonase - atividade arilesterase.....	50
4. 5. 2. Paraoxonase - atividade paraoxonase.....	50
4. 5. 3. Sulfidrilas totais e livres e ligadas à proteínas.....	51
4. 5. 4. Catalase.....	51
4. 6. Lipídeos no soro.....	52
4. 6. 1 Colesterol total.....	52
4. 6. 2. Colesterol HDL.....	52
4. 6. 3. Colesterol não HDL.....	53
4. 6. 4. Triglicérides.....	53
4. 7. Lipídeos no fígado.....	54
4. 7. 1. Gordura no fígado.....	54
4. 7. 2. Colesterol no fígado.....	54
4. 8. Metabólitos séricos.....	55
4. 9. Atividade da Aspartato aminotransferase.....	55
4. 10. Atividade Alanina aminotransferase.....	55
4. 11. Análise estatística.....	55
5. RESULTADOS.....	56
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÃO.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
9. ANEXOS.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução do oxigênio (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O).

Figura 2 - Reação de Fenton: formação de diferentes tipos de espécies reativas associadas a metais de transição.

Figura 3 - Etapas da lipoperoxidação.

Figura 4 - Receptores de LDL nativa (LDL_n) e de LDL oxidada (LDL_{ox}) em macrófagos.

Figura 5 - Efeito citotóxico da LDL oxidada no macrófago e formação de células em espuma.

Figura 6 – Dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio (O_2) e água (H_2O) por ação da enzima catalase.

Figura 7 - Dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (H_2O) através da glutathione na forma oxidada e reduzida.

Figura 8 – Reações de conversão de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) através da atividade da SOD.

Figura 9 – Frutos do urucunzeiro contendo as sementes.

Figura 10 – Fórmula estrutural da bixina ($C_{25}H_{30}O_4$).

Figura 11 - Mecanismo de síntese de receptores LDL no hepatócito a partir de fatores transcricionais (SREBP).

Figura 12 - Diferentes vias metabólicas do colesterol. Adaptado de Pikuleva, 2006.

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Nomes, símbolos, meia-vida em segundos e peculiaridades químicas de metabólitos radicais e não radicais do oxigênio.

Tabela II: - Composição das dietas padrão (C) e hipercolesterolemiantes (H) em gramas para cada 1000g da dieta.

Tabela III - Efeitos da dieta hipercolesterolemiantes (H) nas concentrações séricas de glicose, na atividade arilesterase da enzima paraoxonase (PON arilesterase), colesterol total e peso após 15 dias de adaptação às dietas.

Tabela IV: - Peso inicial, peso final e ganho de peso e percentual de ganho de peso de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão (C) acrescidas ou não com bixina (0,08%) (HB, CB).

Tabela V - Peso do coração, peso do baço e peso dos rins e peso relativo dos rins.

Tabela VI - Atividade da fosfatase alcalina, peso, peso relativo, gordura, percentual de gordura, e colesterol hepáticos.

Tabela VII - Atividade da Paraoxonase – paraoxon - (PON paraoxon) e da Paraoxonase – atividade arilesterase (PON arilesterase) e da Catalase.

Tabela VIII – Concentração de Sulfidrilas totais (SH Total), de Sulfidrilas livres (SH livre), Sulfidrilas ligadas à fração protéica (SH-LFP) ($\mu\text{mol/L}$)

Tabela IX – Concentrações de Colesterol Total sérico, Colesterol HDL, Colesterol Não HDL, Relação HDL/Colesterol Não HDL (HDL/CN-HDL) e Triglicérides (mmol/L) no soro.

Tabela X – Hemoglobina, Proteínas totais, Albumina, Uréia e Creatinina.

Tabela XI – Níveis séricos de glicose (mmol/L).

Tabela XII - Atividade da Aspartato Aminotransferase (AST) e Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT).

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT - Acil-CoA-colesterol-acil-transferase.

AcGx – Ácido graxo.

ALT – Alanina aminotransferase.

ApoA-II – Apolipoproteína A-II.

ApoB – Apolipoproteína B.

ApoC – Apolipoproteína C.

ApoE – Apolipoproteína E.

AST – Aspartato aminotransferase.

CB – Grupo que recebeu dieta padrão acrescida de bixina.

CETEP – Proteína de transferência do éster de colesterol.

CN-HDL – Colesterol não HDL.

C – Grupo que recebeu dieta padrão.

CYP7A1 – Enzima colesterol 7 α -hidroxilase.

FXR – Receptor X farnesóide.

GLUTs – Proteínas transportadoras de glicose

GSH – glutationa reduzida.

GSH peroxidase – glutationa peroxidase.

GSSG – Glutaciona oxidada.

H – Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemia acrescida de bixina

Hb – Hemoglobina.

HDL – Lipoproteína de alta densidade.

HDL/CN-HDL – Relação colesterol HDL/colesterol não HDL.

HMG-CoA - Hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A.

HMG-CoA redutase - Hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A redutase.

H – Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemizante.

IDL – Lipoproteína de densidade intermediária.

L – Radical lipídico.

LCAT - Lecitina-colesterol acil-transferase.

LDL – Lipoproteína de baixa densidade.

LDL_n – Lipoproteína de baixa densidade nativa.

LDLox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada.

LDLr – Receptor de Lipoproteína de baixa densidade (LDL).

LH – Ácido graxo poliinsaturado.

LOO – Radical peroxila.

LOOH – Hidroperóxidos lipídicos.

Lp (a) – Lipoproteína a.

LPN – Linhagem específica de hamsteres que exibem baixa responsividade ao colesterol dietético.

LXR – Proteínas nucleares receptoras do fígado (*Liver X Receptor*).

LXR α – Isoforma funcional α do LXR.

LXR β – Isoforma funcional β do LXR.

LXRE – Promotor do gene do receptor de LXR.

MDA – Malondialdeído.

MO – Macrófago.

PON – Paraoxonase.

PON (paraoxon) – Paraoxonase paraoxon.

RE –Retículo endoplasmático.

RNS – Espécie reativa de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species*).

ROS – Espécie reativa de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*).

RXR – Receptor retinóide.

S1P – Domínio amino terminal 1 do SREBP.

S2P – Domínio amino terminal 2 do SREBP.

Scap – Chaperona que possui domínio sensível a esteróis. (*SREBP Cleavage Activating Protein*).

Scap/SREBP – Forma inativa do SREBP.

SH-LFP – Sulfidrilas ligadas à fração protéica.

SH Livre – Sulfidrilas não protéicas.

SH Total – Sulfidrilas totais.

SOD - Superóxido dismutase.

SRE – Elemento responsivo a esteróis (*Sterol Responsive Element*)

SREBP – Fator de transcrição envolvido na síntese de proteínas ligadoras do SRE (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*).

1- INTRODUÇÃO

A aterosclerose é a principal causa de mortalidade no Brasil (Diretrizes, 2001) sendo uma importante fonte de morbidez e mortalidade no mundo moderno. Tal fato tem motivado o grande interesse da comunidade científica para o estudo dos mecanismos desencadeadores, da progressão e as possíveis medidas profiláticas, objetivando reverter este quadro.

Dentre as várias hipóteses que buscam uma explicação para os seus mecanismos, inclui-se a hipótese lipídica da aterosclerose, segundo a qual, um dos fatores mais reconhecido que influencia o desenvolvimento do processo aterosclerótico é a elevação dos lipídios. Esta hipótese inclui a atração, depósito e modificações de substâncias lipídicas dentro da parede arterial (World Health Org., 1981).

Em meados do século XX, Ross, Clomset criaram a hipótese da injúria - reação endotelial (Ross & Clomset, 1976) propondo como estágio precoce da aterogênese, a disfunção endotelial. Disfunção esta, induzida por fatores de risco, especialmente níveis séricos elevados de LDL que oxidadas causavam alterações no endotélio (Ross & Clomset, 1973).

Outra hipótese que emergiu como uma explicação promissora foi a hipótese oxidativa (Steinberg *et al.*, 1989). Nela, as modificações oxidativas nas LDL desempenham um importante papel porque participam efetivamente da etiologia do processo aterosclerótico (Witzum, 1994; Niki, 2004; Stocker & Keaney, 2003).

Tais modificações, originadas em função do estresse oxidativo, seriam resultado do desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, a favor do oxidante, e com conseqüente indução de danos através da produção excessiva de radicais livres (Sies, 1993). Por outro lado, há evidências de trabalhos *in vivo*, intervenções controladas e estudos em modelos animais indicando que o consumo de certos alimentos resulta em uma redução do estresse oxidativo (Kaliora *et al.*, 2005).

De fato, resultados de numerosos estudos apóiam o envolvimento da oxidação na patogênese de aterosclerose e também os efeitos benéficos de antioxidantes, embora os resultados ainda sejam controversos (Niki, 2004; Kaliora *et al.*, 2005).

A possível ação de substâncias com propriedades antioxidantes e hipocolesterolemiantes tem estimulado a busca de compostos que atuem neste processo. Neste contexto, os carotenóides têm atraído considerável atenção, em função de sua estrutura e de suas propriedades antioxidantes (Britton, 1995; Sies & Stahl, 1995). Entre estes, o *Annatto*, popularmente conhecido como urucum, que por ser um corante natural,

(Paumgartten *et al.*, 2002; Tennant & Callaghan, 2005) tem sido inclusive, alvo de interesse da indústria alimentícia e de produtos cosméticos e farmacêuticos, em face da crescente proibição da utilização de corantes sintéticos (Pedrosa *et al.*, 1999).

A bixina, um dos compostos do *Annatto*, representa cerca 80% dos carotenóides totais presentes neste corante (Pedrosa *et al.*, 1999; Kiokias & Gordon, 2003). Trabalhos com bixina em modelos animais são relativamente escassos na literatura.

Há trabalhos indicando que a bixina não apresenta toxicidade (Bautista *et al.*, 2004) e que possivelmente inibe a peroxidação lipídica em modelos de nefrotoxicidade (Silva & Antunes, 2001). Outros trabalhos relatam sua possível atuação no metabolismo lipídico, embora ainda não bem explicado.

As propriedades e peculiaridades aliadas ao seu potencial antioxidante, tornam o carotenóide bixina um bom alvo de pesquisa para os eventos associados à hiperlipidemia e aterosclerose.

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos da torta de bixina nas defesas antioxidantes, no perfil lipídico e sérico de hamsteres fêmeas submetidas às dietas padrão e hipercolesterolemiantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1. RADICAIS LIVRES

2. 1. 1. Definição

A idéia que o oxigênio pode causar danos ao organismo não é recente. Trabalhos pioneiros que atribuíram toxicidade ao oxigênio foram realizados por John Bean e Paul Bert há mais de meio século (Bean, 1945; Bert, 1943).

Em 1954, Gerschman *et al.* propuseram que efeitos deletérios causados por oxigênio poderiam ser atribuídos à formação de “radicais de oxigênio”. Essa proposição foi posteriormente convertida na teoria superóxido de toxicidade do oxigênio, a qual atribuída ao excesso de radical superóxido a responsabilidade pelos efeitos tóxicos causados por este gás. Teoria esta que, mais tarde, serviria de base para o isolamento e a caracterização da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) por McCord e Fridovich em 1969.

Em 1956, Harman sugeriu que radicais livres estariam envolvidos em eventos fisiológicos, particularmente, no processo de envelhecimento. Esta hipótese inspirou numerosos estudos que contribuíram para o conhecimento atual sobre radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio. Embora os radicais livres já sejam conhecidos há várias décadas, indiscutivelmente, nos últimos anos, eles têm ganhado notoriedade nas diversas áreas do conhecimento médico, em função de sua efetiva associação com diversos processos fisiopatológicos de grande importância.

Conceitualmente, a expressão “radical livre” é utilizada para designar átomos ou moléculas, com existência independente (livres, portanto), com um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada orbital mais externa, diferenciando-os dos demais átomos e moléculas, nos quais os elétrons, usualmente se associam aos pares (Halliwell & Gutteridge, 1991; Halliwell & Chrigo, 1993). Apresentar um elétron desemparelhado é uma peculiaridade química que resulta em instabilidade e torna os radicais livres altamente reativos, favorecendo, portanto, reações instantâneas com diversos compostos e ataque a vários alvos celulares.

Em outras palavras, radicais livres são moléculas carregadas eletricamente que procuram e capturam elétrons de outras substâncias para neutralizar a si mesmas (Kaliora *et al.*, 2005).

Devido à sua natureza, há uma tendência para reação em cadeia (Sies, 1993). Logo, uma vez formado, o radical pode reagir com moléculas radicais ou não-radicais, em larga

escala. Podendo, desta forma, doar ou remover elétrons, ou simplesmente adicionar-se a um não-radical, modificando-o quimicamente e caracterizando, em poucos segundos, uma reação em cadeia num efeito cascata. E até que os mesmos sejam desativados, milhares de reações podem acontecer dentro de apenas alguns segundos (Kaliora *et al.*, 2005; Kohen & Nyska, 2002; Fridovich, 1998; Halliwell & Chrigo, 1993).

2. 1. 2. Terminologia, tipos e peculiaridades químicas

A expressão “radical livre” não é a mais apropriada para designar agentes reativos patogênicos, pois alguns destes não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada orbital (Halliwell & Cross, 1994). Alguns agentes reativos derivados do metabolismo do oxigênio molecular, por exemplo, apesar de altamente reativos, não são radicais na acepção exata da palavra. Em função disto, tem-se utilizado com frequência na literatura as expressões coletivas: *Reactive Oxygen Species* (ROS), *Reactive Nitrogen Species* (RNS) ou genericamente, espécies reativas ou ainda oxidantes, para designar uma variedade de radicais livres e derivados não radicais de oxigênio e nitrogênio.

Há diversos tipos de espécies reativas (Tabela I) e estas apresentam peculiaridades que as diferencia em vários aspectos (Bagchi & Puri, 1998), tais como: origem ou fontes, meia-vida, reatividade e até mesmo prováveis alvos. Existem vários aspectos que explicam estas diferenças. Fatores relacionados ao ambiente fisiológico, como pH ou ainda a presença de outras espécies reativas, podem exercer grande influência determinando a meia-vida dos oxidantes (Kohen & Nyska, 2002). Assim, o ataque a alvos celulares, guarda estreita relação com a meia vida dos oxidantes. Radicais hidroxila, por exemplo, reagem praticamente no seu sítio de formação, em função de sua meia-vida muito curta. Outros, no entanto, como os radicais peroxila que são relativamente estáveis, com uma meia vida mais longa, podem atingir alvos mais distantes (Sies, 1993).

Tabela I - Nomes, símbolos, meia-vida em segundos e peculiaridades químicas de metabólitos radicais e não radicais do oxigênio.

Nomes, Símbolos	Meia-vida/seg.	Peculiaridades
RADICAIS OXIGÊNIO		
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	-	Gerado por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos no processo inflamatório; pode atuar como sinalizador molecular e na produção de radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), oxigênio singlete (1O_2) e peroxinitrito (ONOOH). Gerado também por NAD(P)H oxidase e irradiação.
Hidroxila ($OH^{\cdot}$)	(10^{-9})	Formado a partir da reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição e por hemólise da água exposta à radiação; é muito deletério ao organismo devido a sua alta reatividade em sistemas biológicos. Causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas do núcleo e mitocondrial.
Peroxila ($ROO^{\cdot}$)	(7)	Gerado na etapa de propagação da lipoperoxidação, quando pode atacar hidrogênio de cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, formando hidroperóxidos lipídicos. São susceptíveis à ação de antioxidantes exógenos.
Óxido nítrico ($NO^{\cdot}$)	(1-10)	Origina peroxinitrito (ONOOH) quando reage com superóxido ($O_2^{\cdot-}$). É produzido em vários tipos de células, especialmente fagócitos e células vasculares endoteliais e no metabolismo da arginina. Pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase.
Alcoxila ($RO^{\cdot}$)	(10^{-6})	Formado na peroxidação de lipídios. É susceptível a ação de antioxidantes exógenos, que podem interromper processos de lipoperoxidação.
DERIVADOS DE OXIGÊNIO NÃO RADICAIS		
Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	-	Gerado pela β -oxidação de ácidos graxos ou pela dismutação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por ação de enzimas oxidases. É capaz de transpor membranas celulares e originar radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$). Pode oxidar proteínas com resíduos de metionina ou grupos tióis muito reativos. Apresenta forte atividade antimicrobiana.
Ácido hipocloroso (HOCL)	(Estável)	Apresenta forte atividade antimicrobiana
Oxigênio singlete (1O_2)	(10^{-5})	É uma forma muito deletéria do oxigênio ao organismo, pois é um intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 . Pode reagir com ácidos graxos, aminoácidos e com carotenóides devido às múltiplas insaturações conjugadas.
Peroxinitrito (ONOOH)	(0,05 – 1)	É um poderoso agente oxidante que pode causar depleção de grupos sulfidríla (-SH) e oxidação de muitas moléculas. Está associado à patogênese de células e disfunção de órgãos relacionados a aterosclerose. Apresenta forte atividade antimicrobiana

Adaptado de: Kohen & Nyska, 2002; Sies, 1993; Barreiros & David, 2006; Stadtman, 2003; Halliwell & Chrigo, 1993; Turrens & Boveris, 1980 e Radomski & Salas, 1995.

Desta forma, radicais livres são capazes de danificar, virtualmente, toda biomolécula celular, até mesmo quando esta disponha de algum mecanismo de proteção. É o caso do DNA de células de mamíferos que apesar de ser compartimentado longe de mitocôndrias e peroxissomos, encontra-se ligado a histonas e poliaminas que protegem contra oxidantes. Além disto, o DNA dispõe de mecanismos de reparos e, ainda assim pode sofrer danos por ação de oxidantes (Ames, 1989).

Além do DNA, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, membranas biológicas e muitas outras estruturas estão sujeitos a esta ação oxidante deletéria (Bagchi & Puri, 1998).

2. 1. 3. Papel biológico e fontes de espécies reativas

É muito provável, que os radicais livres exerceram um importante papel na origem da vida e na evolução biológica, favorecendo o desenvolvimento dos organismos (Fang *et al.*, 2002).

Os primeiros seres vivos que surgiram na terra eram, possivelmente, anaeróbios em função dos baixos níveis de oxigênio atmosférico, determinados pelas próprias condições que vigoravam no planeta (Fridovich, 1998). Nestas condições, o oxigênio era um gás tóxico.

Com a evolução dos organismos fotossintetizantes e conseqüente aumento do oxigênio atmosférico, os seres anaeróbios desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante para se protegerem contra a toxicidade do oxigênio. Este aumento na tolerância ao oxigênio possibilitou, no processo evolutivo, sua utilização na mitocôndria para uma produção mais eficiente de energia (Halliwell & Cross, 1994; Fridovich, 1998). Em contrapartida, a mitocôndria passou a ser a principal fonte endógena de radicais livres ou oxidantes (Liu *et al.*, 2002).

Embora os oxidantes também possam ser gerados em outros compartimentos citoplasmáticos, as mitocôndrias figuram como principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio na maioria dos tecidos (Turrens, 2003), devido a vazamento de elétrons da cadeia respiratória (Wei & Lee, 2002), caracterizando, assim, de certa forma, uma “geração accidental” (Halliwell & Cross 1994).

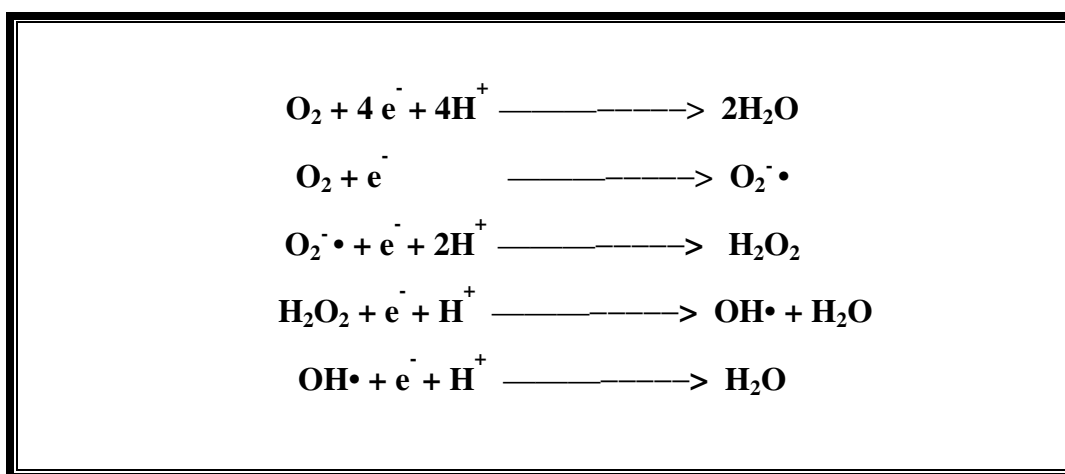
Hoje, é conhecido que para sua manutenção, as células utilizam ATP (Adenosina Trifosfato) para crescimento, diferenciação, resposta a estímulos fisiológicos e desafios ambientais.

No metabolismo aeróbio, as principais provedoras de ATP são as mitocôndrias através de fosforilação oxidativa (Wei & Lee, 2002).

A produção de ATP se processa através da transferência de elétrons de NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida) ou FADH₂ (gerados pelo ciclo de Krebs) para o oxigênio molecular. Isto acontece mediado por uma série de transportadores de elétrons como, complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase), complexo II (succinato-ubiquinona óxido redutase), complexo III (ubiquinol-citocromo c redutase) e complexo IV (citocromo c oxidase) localizados na membrana interna da mitocôndria (Turrens, 2003). Desta forma o oxigênio sofrerá uma redução tetravalente até H₂O (Figura 1).

Ao longo deste processo, entretanto há formação de espécies reativas por redução incompleta do oxigênio molecular, quando cerca de 2% do O₂ sofre redução univalente. Isto ocorre quando o oxigênio recebe menos de quatro elétrons nos passos intermediários desta redução (Fridovich, 1998), produzindo intermediários reativos como: radical superóxido (O₂^{-•}), hidroperoxila (HO₂•), hidroxila (OH•), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Turrens, 2003; Ames *et al.*, 1993) (Figura 1).

Figura 1: Redução tetravalente do oxigênio (O₂) na mitocôndria até formação de água (H₂O).



São consideradas ainda, três importantes fontes endógenas de oxidantes: a β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos, onde há liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como um subproduto, que é degradado por ação da enzima catalase. Evidências sugerem que, sob certas condições, peróxidos escapam dessa degradação, resultando em sua

liberação em outros compartimentos celulares (Beckman & Ames, 1998); uma segunda fonte seria a eliminação de subprodutos do metabolismo das enzimas do sistema citocromo P450. Estas enzimas previnem efeitos tóxicos agudos causados por substâncias exógenas, mas também resultam em subprodutos oxidantes (Ames *et al.*, 1993).

E uma terceira fonte seria a partir de atividade celular fagocítica, que produz uma mistura de oxidantes (óxido nítrico, radical superóxido e peróxido de hidrogênio) em resposta a estímulos, como em infecções crônicas causadas por vírus, bactéria e parasitas (Ames *et al.*, 1993).

Podem ser acrescentadas, ainda, às fontes endógenas: células (como neutrófilos), produção direta (NO sintase) ou indireta (xantina oxidase) de enzimas, exercícios, inflamação, algumas patologias, reações envolvendo ferro e outros metais de transição.

Cigarros, poluentes ambientais, radiação, luz ultravioleta, pesticidas, solventes industriais, xenobióticos, sais de ferro (Reação de Fenton), de cobre, vários tipos de drogas e ozônio também são considerados importantes fontes de oxidantes, porém de origem exógena. (Bagchi & Puri, 1998; Kohen & Nyska, 2002; Ames *et al.*, 1993).

Neste contexto, a associação direta ou indireta de diferentes tipos de oxidantes a uma série de processos fisiopatológicos importantes, tais como: envelhecimento, aterosclerose, câncer, diabetes, inflamação crônica, e outros (Droge, 2002), têm motivado inúmeras pesquisas para esclarecer sua efetiva atuação a fim de desenvolver tratamentos eficazes e medidas profiláticas efetivas.

2. 2. ESTRESSE OXIDATIVO, COLESTEROL E ATEROSCLEROSE

2. 2. 1. Definição, causas endógenas e exógenas.

Por definição, estresse oxidativo é “uma perturbação no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, a favor do oxidante, levando potencialmente a dano”. Esta é uma definição clássica, e é atribuída a Helmut Sies (Sies, 1985, 1986). Em outras palavras, é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante para neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios (Mayne, 2003). A geração de ROS e RNS é uma consequência inevitável da vida aeróbia (Valko *et al.*, 2006).

Então, para que prevaleça o equilíbrio homeostático e as funções biológicas sejam preservadas, é necessário que o organismo controle a presença de ambos, oxidante e

antioxidante, continuamente. Para isto, sistemas biológicos desenvolveram a capacidade de promover respostas adaptativas que podem compensar o estresse oxidativo (Sies, 1993).

No balanço entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante *in vivo*, parece prevalecer um equilíbrio relativo, onde há uma ligeira tendência para maior produção de oxidantes, de tal forma que níveis baixos de estresse oxidativos contínuos são controlados por sistemas de reparo. Entretanto, isso não ocorre se o estresse oxidativo for severo, o que poderá resultar em dano e morte celular (Halliwell & Cross, 1994). Sob tais circunstâncias, a taxa de geração de espécies reativas pode exceder a capacidade local de defesa antioxidante e contribuir para o dano. Logo, o resultado é o ataque a diferentes alvos no organismo (Mayne, 2003).

Estresse oxidativo pode ser gerado por várias vias (Halliwell & Cross, 1994) de tal forma que pode atingir todos os tipos de moléculas biológicas (Sies, 1993) causando, entre outras coisas, ativação de neutrófilos, modificação de proteínas, carboidratos (Halliwell & Cross, 1994) e DNA, comprometendo, desta forma, as respectivas funções destas biomoléculas (Stocker & Keaney, 2004; Halliwell & Cross, 1994; Sies, 1993). Ácidos graxos de cadeia longa, livres no compartimento citosólico e lipídeos ligados à membrana também podem ser alvos imediatos destas espécies reativas (Kalliora *et al.*, 2005).

Via de regra, o estresse oxidativo é gerado em função da produção excessiva de espécies reativas. Mas determinadas circunstâncias também podem contribuir, ainda que de forma indireta, para a produção do estresse oxidativo, tais como: infecções; atividade física intensa e resfriados (Singh & Kapur, 2004).

Desnutrição severa, devido à privação de minerais como: cobre (*Cu*), manganês (*Mn*), zinco (*Zn*), selênio (*Se*) e de vitaminas como riboflavina (cofator FAD da enzima glutatona redutase), além de α -tocoferol (necessário para manutenção de defesa antioxidante) também podem favorecer a produção de espécies reativas (Halliwell & Cross, 1994).

O aumento nos níveis celulares de estresse oxidativo pode, além disso, surgir em função de vários fatores de origem exógena, incluindo ingestão de álcool, traumas, radiação (Singh & Kapur, 2004), metabolismo de várias drogas e toxinas, como por exemplo fumaça de cigarro e herbicidas (Halliwell & Cross, 1994).

Diante disto, o estresse oxidativo está envolvido em processos como mutagênese, carcinogênese, danos em membranas e lipoperoxidação (Sies, 1993).

2. 2. 2. Intensidade e consequências

A oxidação de determinadas estruturas orgânicas, como mencionado, pode em tese, contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas (Mayne, 2003).

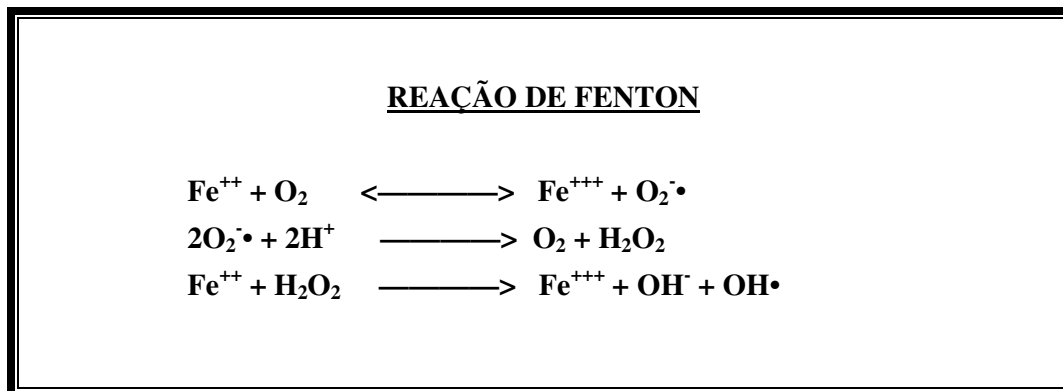
A intensidade e a importância do comprometimento dependerão do “grau” do estresse oxidativo, ou seja, dos mecanismos pelos quais ele é imposto, da natureza do sistema afetado e do tempo de exposição (Halliwell & Cross, 1994).

Atualmente, existem evidências que o excesso de liberação de espécies reativas de oxigênio faz parte do mecanismo intermediário de mais de 50 doenças como: aterosclerose (Stocker & Keaney, 2003; Bagchi & Puri, 1998), câncer (Valko *et al.*, 2006) diabetes, inflamação crônica, enfisema, displasia, retinopatia em bebês prematuros (Halliwell & Cross, 1994), artrite reumática, catarata, disfunção imunitária (Miquel & Ramírez-Boscá 2004), acidente cerebrovascular, doença inflamatória do intestino (Halliwell & Cross, 1994) desordens neurodegenerativas (Singh & Kapur, 2004) e danos teciduais por diferentes causas (Halliwell & Cross, 1994; Droge, 2002).

Em células de mamíferos, o estresse oxidativo severo pode aumentar os níveis intracelulares de Ca^{2+} (Droge, 2002) e ferro (Halliwell, 1987) livres, o que poderá ocasionar efeitos adversos, como: mediação de morte celular através do rompimento do citoesqueleto, fragmentação de DNA e dano extenso a componentes celulares (Orrenius, *et al.*, 1989) no caso do Ca^{2+} e promover reações de radicais no caso do ferro. O ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente capacitado para catalisar reações de oxidação de biomoléculas como na reação de Fenton (Figura 2) (Halliwell, 1987).

No endotélio, a produção excessiva de oxidantes ou uma diminuição das defesas antioxidantes leva à toxicidade celular, desequilibrando a sinalização das células vasculares, onde os oxidantes agem como segundo mensageiro intracelular ou ainda por toxicidade química direta de oxidantes, danificando o DNA e levando a apoptose (Bahia *et al.*, 2004).

Figura 2: Reações de Fenton: formação de diferentes tipos de espécies reativas associadas a metais de transição.



Adaptado de: Matsubara, 1997.

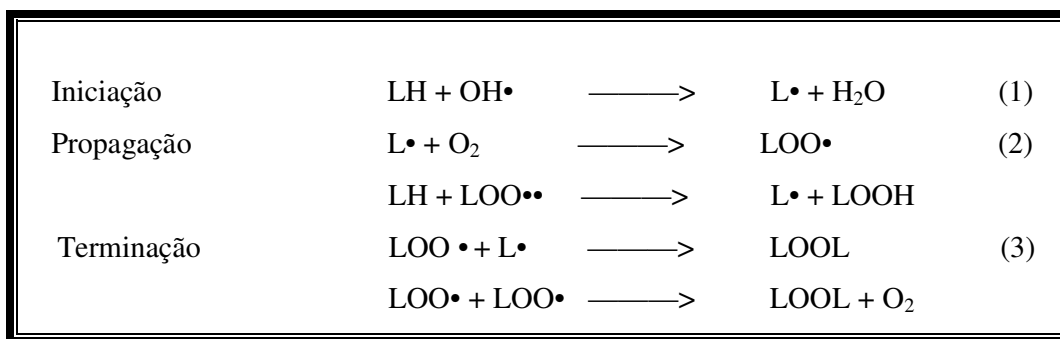
2. 2. 3 A lipoperoxidação

Dentre as conseqüências do estresse oxidativo, a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma das que mais se destaca, pois o aumento nas concentrações de seus produtos é um dos parâmetros que evidencia o envolvimento de espécies reativas em doenças humanas (Halliwell & Chirico, 1993).

Lipoperoxidação é uma modificação em ácidos graxos (AcGx) poliinsaturados constituintes de membranas biológicas por oxidação não-enzimática. Embora, praticamente todos os componentes celulares são susceptíveis à ação de espécies reativas, as membranas são especialmente vulneráveis a oxidação, em função de sua própria constituição (Kohen & Nyska, 2002). Membranas celulares e de organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Sua fluidez relaciona-se à presença de cadeias insaturadas de fosfolipídios e do colesterol.

AcGx poliinsaturados possuem alta susceptibilidade ao ataque de espécies reativas devido ao carbono metilênico *bis*-alílico (Barreiros & David, 2006). Este ataque à membrana é bastante lesivo e pode resultar em alterações em sua estrutura, permeabilidade e fluidez (Kohen & Nyska, 2002) com conseqüente comprometimento de funções biológicas.

A lipoperoxidação acontece em 3 fases: Iniciação, propagação e terminação (Figura 3) (Kohen & Nyska, 2002).

Figura 3: Etapas da lipoperoxidação.

(1) Iniciação, (2) propagação, (3) terminação. (L) lipídeo; (LH) ácido graxo poliinsaturado; (OH•) radical hidroxila; (L•) radical lipídico; (O₂) oxigênio; (LOO•) radical peroxil; (LOOH) hidroperóxidos lipídicos. Adaptado de Valko *et al.*, 2005.

O radical hidroxila apresenta uma grande habilidade para iniciar a peroxidação de lipídios (Valko *et al.*, 2005). Inicialmente, há uma interação entre o ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular e os radicais hidroxila. Esses radicais são capazes de subtrair hidrogênio de um grupo metileno do ácido graxo para formar espécies reativas lipídicas ou radical lipídico (L•) que são estabilizados depois de reestruturação molecular e, nessa forma, estes tendem a se combinar com oxigênio. O radical lipídico (L•) reage com o oxigênio produzindo radical peroxila (LOO•). O radical peroxil produzido tem potencial oxidativo suficiente para atacar o hidrogênio de cadeias adjacentes de AcGx poliinsaturados, formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e novos radicais lipídicos, além de perpetuar a reação oxidativa. As reações denominadas reações de propagação respondem pelas reações em cadeia. (Kohen & Nyska, 2002; Valko *et al.*, 2006; Halliwell & Gutteridge, 1991; Jialal & Devaraj, 1996).

Ferro e cobre são conhecidos como aceleradores da decomposição de peróxidos lipídicos. Como resultado da peroxidação de AcGx ocorre a produção de MDA (Vannucchi *et al.*, 1998). O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medido pela reação com o TBARS. A formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica de sistemas biológicos em células e tecidos (Bonnes & Guérin, 1992).

O sistema de defesa antioxidante do organismo tem como principal função inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas de oxigênio. Todas as células de organismos eucarióticos contêm poderosas enzimas antioxidantes entre as quais se destaca a catalase.

2. 2. 4. Transporte do colesterol e oxidação da LDL

O colesterol (sintetizado ou absorvido) por ser insolúvel em água é transportado por lipoproteínas plasmáticas. Diferentes combinações de lipídeos e proteínas produzem partículas com densidades diferentes, variando de lipoproteína com densidade muito baixa - VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), lipoproteína com baixa densidade, LDL (*Low Density Lipoprotein*), lipoproteína com alta densidade – HDL (*High Density Lipoprotein*) e quilomícrons.

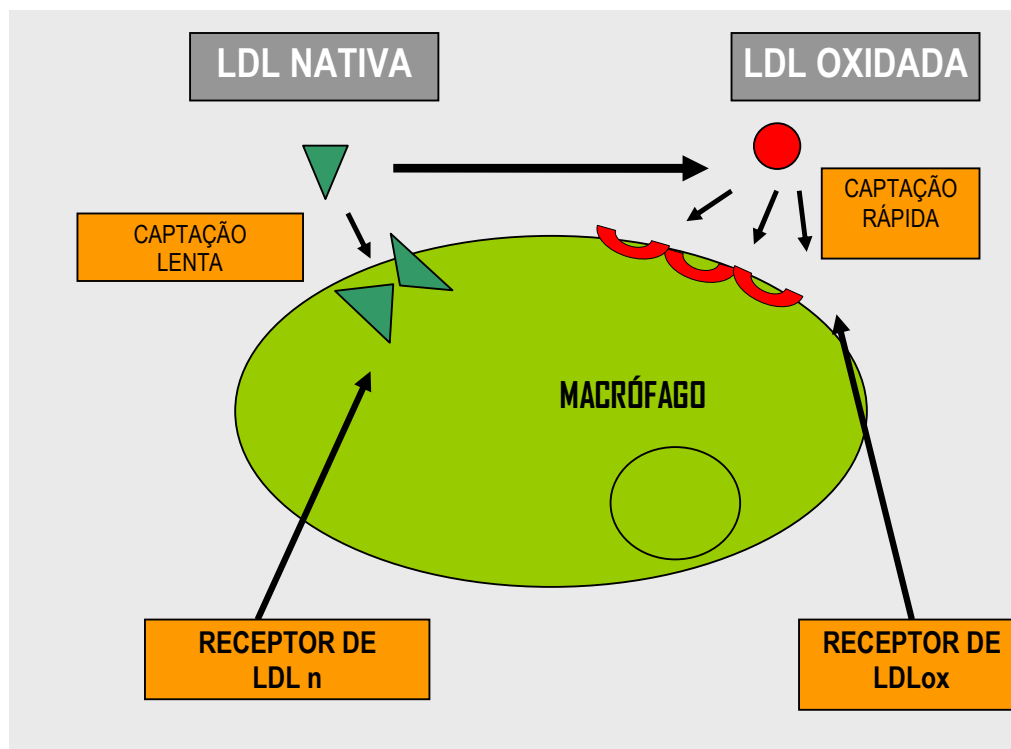
Uma vez que LDL nativa não é patogênica (Witztum & Steinberg, 1991; Stocker, 2004), a hipótese que considera a LDL oxidada como central na progressão da aterosclerose tem sido amplamente aceita (Simionescu *et al.*, 2002; Mayne, 2003).

Apesar de ser conhecido que LDL pode ser oxidada por muitos tipos de oxidantes através de diferentes vias e mecanismos (Niki, 2004), ainda não está bem compreendido como, onde e quando a LDL é oxidada *in vivo* (Niki, 2004); por isso várias teorias vêm tentando explicar os mecanismos através quais isto ocorre (Kalliora *et al.*, 2005).

Segundo a hipótese oxidativa, a LDL nativa é fisiologicamente, endocitada por macrófagos que têm receptores específicos, auto-reguláveis para fazer sua endocitose. Este tipo de receptor só permite a endocitose de LDL em quantidade suficiente de ser metabolizada e transportada pelo MO.

Estudos *in vitro* mostram que em meio rico de colesterol LDL, este receptor específico entra em “*downregulation*” e só fagocita a quantia adequada à sua capacidade de metabolização, não possibilitando a interiorização de excesso de LDL (Goldstein & Brown, 1977) (Figura 4).

Figura 4 – Receptores de LDL nativa (LDL_n) e de LDL oxidada (LDL_{ox}) em macrófagos



Adaptado de Steinberg, 2002.

Isto pode ser verificado em indivíduos com hipercolesterolemia familiar, nos quais falta receptor funcional para LDL, e que desenvolvem aterosclerose. Diante disto, foi possível verificar que a formação de célula em espuma não parece ser mediada pelos mesmos receptores de LDL nativa. Porém, o mesmo não ocorre com a LDL modificada. Oxidação torna a LDL completamente diferente quando comparada LDL_n quanto às propriedades físico-químicas e biológicas. A LDL_{ox} pode apresentar efeito citotóxico, e inibir a proliferação e mobilidade espontânea de células endoteliais de artérias coronárias humanas em cultura (Xavier *et al.*, 2004) (Figura 5).

As LDL nativas podem sofrer, ainda alterações químicas relacionadas com a peroxidação de AcGx constituintes da lipoproteína, resultando em um aumento na sua susceptibilidade à endocitose por MO (Morel, 1984; Jialal & Devaraj, 1996).

Dessa forma a LDL_{ox} se torna particularmente aterogênica e quimiotática para monócitos/macrófagos (Crowther, 2005).

Quando modificada quimicamente, a LDL é avidamente internalizada por MO, que expressam outro tipo de receptores denominados “*scavenger receptors*” (Goldstein *et al.*

1979), ultrapassando a capacidade fisiológica do MO, tornando-o menos móvel formando, então, as denominadas “células em espuma” (Figura 5).

2. 3. Antioxidante

2. 3. 1 Estresse oxidativo e o princípio da proteção

A associação entre estresse oxidativo e processos patológicos importantes e a multiplicidade das defesas que surgiram para contrapor a este mecanismo servem como um índice de sua gravidade.

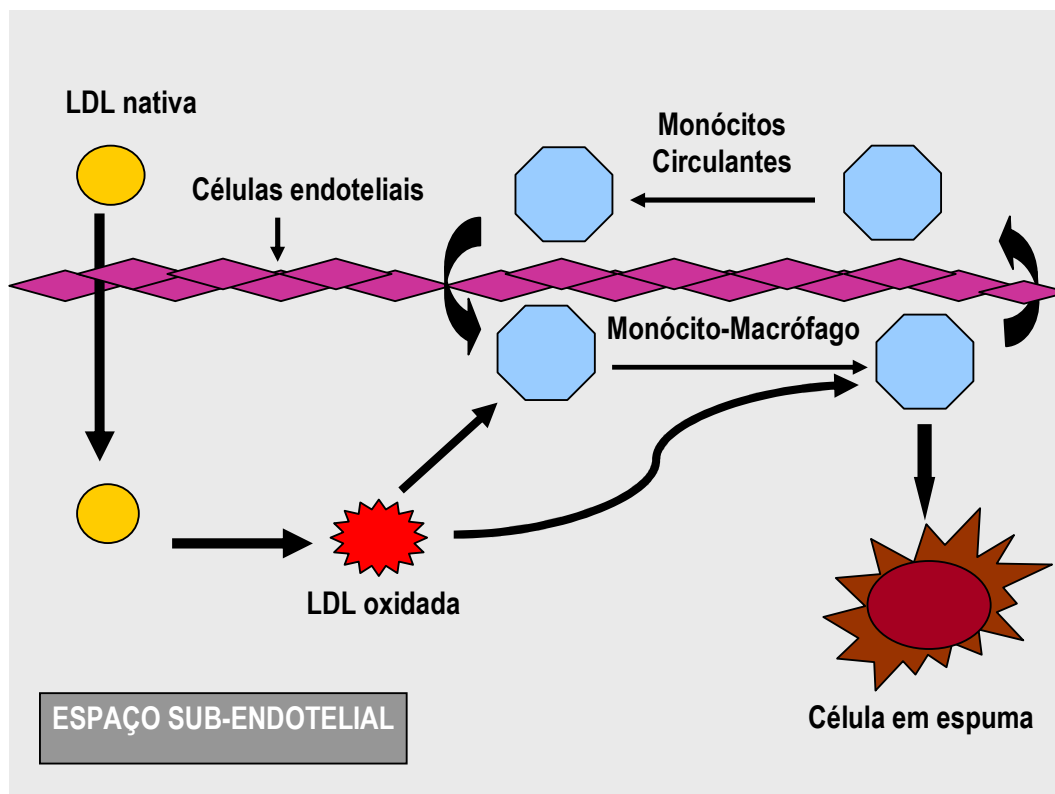
Ao longo da evolução, a produção contínua de espécies reativas durante os processos metabólicos aeróbios e a exposição constante a numerosas fontes resultou no desenvolvimento de tipos diferentes de mecanismos antioxidantes para limitar os altos níveis de oxidantes e impedir a indução de possíveis danos.

2. 3. 2 Definição

Tomada ao pé da letra, uma substância antioxidante seria aquela capaz de inibir a oxidação. Ou seja, é uma molécula estável o bastante para doar um elétron a uma espécie reativa, neutralizando-a e reduzindo sua capacidade de danificar biomoléculas (Bagchi & Puri, 1998).

Mas dada complexidade dos mecanismos antioxidantes desenvolvidos ao longo da evolução, utiliza-se com frequência a expressão “sistema antioxidante” já que há antioxidantes diferentes trabalhando em concerto para manutenção da homeostase do estado redox do corpo, através de mecanismos distintos (Berry & Kohen, 1999).

Figura 5: Efeito citotóxico da LDL oxidada no macrófago e formação de células em espuma.



Adaptado de Stoker, 2003.

Em função disto, desenvolveu-se nos organismos, um sistema de proteção antioxidante altamente complexo, que envolve uma variedade de componentes endógenos e exógenos, funcionando interativamente para neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Kaliara *et al.*, 2005; Sies, 1993; Bagchi & Puri, 1998).

A definição de antioxidantes tem sido baseada em parâmetros distintos na literatura, pois antioxidantes podem diferir quanto ao local de ação, ao mecanismo, a composição e as propriedades físico-químicas.

Do ponto de vista biológico, são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos danosos que levariam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares ou seja, refere-se a “qualquer molécula capaz de estabilizar ou desativar espécies reativas antes que estas ataquem células” (Kaliara *et al.*, 2005).

Numa abordagem química, antioxidantes seriam moléculas efetivamente capazes de remover radicais livres de um sistema, seja rompendo reações em cadeia ou reagindo com eles para formar produtos inócuos ou eletricamente estáveis (Britton, 1995).

Uma definição ampla e utilizada com frequência na literatura é a que considera antioxidante como: “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidável, diminui ou previne, significativamente a oxidação desse substrato” (Halliwell, B. & Gutteridge, 1991). Esta definição incluiria também, compostos de natureza enzimática e não enzimática (Sies, 1993).

2. 3. 3. Mecanismo de ação

Conforme mostrado na tabela I, são variados os tipos de espécies reativas e cada qual apresentado suas peculiaridades, o que leva a se considerar que há necessidade, também, de mecanismos de ação antioxidante diferenciados.

Em princípio, a ação dos antioxidantes ocorre de três formas distintas: antes da produção das espécies reativas (prevenção), após a produção (interceptação) ou ainda atenuando seus efeitos, fazendo reparos de danos (sistemas de reparo) (Berry & Kohen, 1999).

Prevenção é a primeira linha de defesa antioxidante que atua contra a formação de espécies reativas (Sies, 1993). Este mecanismo tem como principal função inibir ou reduzir os efeitos deletérios causados às células pelos oxidantes.

A interceptação implica como o próprio nome indica, em interceptar espécies prejudiciais já formadas, resultando em produtos finais inócuos.

Quando os processos de prevenção e interceptação não são completamente efetivos, entra em ação o terceiro mecanismo: reparo. Neste caso, o antioxidante tem que atuar após ocorrer o dano. Isto ocorre, por exemplo com o sistema de reparo no DNA e membranas biológicas (Sies, 1993).

2. 3. 4. Complexidade de classificação

Em função dos aspectos expostos, a classificação dos antioxidantes, também é diversificada, atendendo a critérios variados. Logo, os antioxidantes podem ser classificados como:

- i. Primários: quando rompem cadeias de radicais livres e podem doar átomos de hidrogênio rapidamente a um radical (Halliwell and Gutteridge, 1991).
- ii. Secundários: quando apresentam caráter preventivo. O mecanismo envolve remoção de iniciadores de ROS/RNS (Halliwell and Gutteridge, 1991).

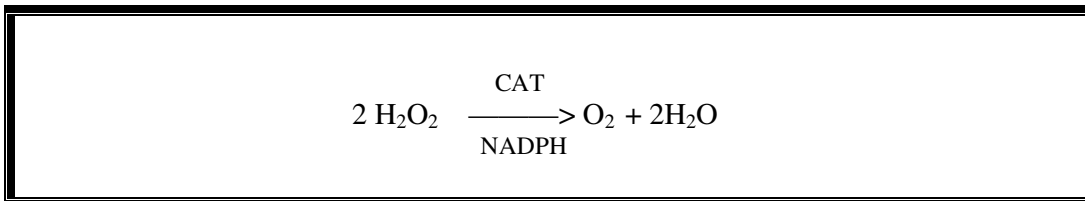
- iii. Funcionais: previnem os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (Rodrigues *et al.*, 2003).
- iv. Endógenos: produzidos pelo organismo, são essenciais para manter ótima saúde celular e sistêmica, embora não sejam suficientes para neutralizar todo o estresse oxidativo, especialmente o induzido por fatores externos como: exposição ao álcool, medicamentos, trauma, resfriados, infecções, dieta pobre, toxinas, radiação e atividade física extenuante (Kaliora *et al.*, 2005).
- v. Exógenos: Podem ser adquiridos através da dieta ou suplementação alimentar. Há evidências de sua eficiência neutralizando estresse oxidativo, particularmente, o provocado por causas exógenas (Kaliora *et al.*, 2005). Carotenóides, α -tocoferol, ácido ascórbico e flavonóides são exemplos deste tipo de antioxidante.
- vi. Sistema enzimático: É uma forma de interceptação que atua como detoxificadora de agentes oxidantes antes que estes causem lesões. A interceptação enzimática é realizada por um sofisticado conjunto de enzimas antioxidantes altamente eficientes, como: catalase (Figura 6), glutathione peroxidase e redutase (Figura 7 a, b) e superóxido desmutase (Figura 8), (Sies, 1993).

Incluem-se também, vários minerais essenciais como selênio, cobre, manganês e zinco necessários para a formação ou atividade destas enzimas pois, em caso de provisão nutricional inadequada, há comprometimento da função enzimática (Bagchi & Puri, 1998).
- vii. Sistema não-enzimático: composto por moléculas estáveis, o bastante para doar um elétron a um radical livre e neutralizá-lo, reduzindo sua capacidade de dano (Bagchi & Puri, 1998). Estas moléculas estão envolvidas na proteção contra propagação de reações oxidativas em cadeia, por mecanismo de interceptação.

Há, no mínimo, dois pré-requisitos básicos para uma boa interceptação não-enzimática: em primeiro lugar, apresentar capacidade efetiva de neutralizar espécies reativas iniciais e em segundo, reagir com compostos solúveis em água, possibilitando, dessa forma, sua própria regeneração. Estão incluídos neste grupo: α -tocoferol, β -caroteno, ubiquinol-10, bilirrubina, licopeno, flavonóides, urato, ascorbato entre outros (Sies, 1993).
- viii. Como alguns nutrientes hidrossolúveis e lipossolúveis representam um aspecto importante do sistema de defesa antioxidante (Mayne, 2003), compostos dietéticos que

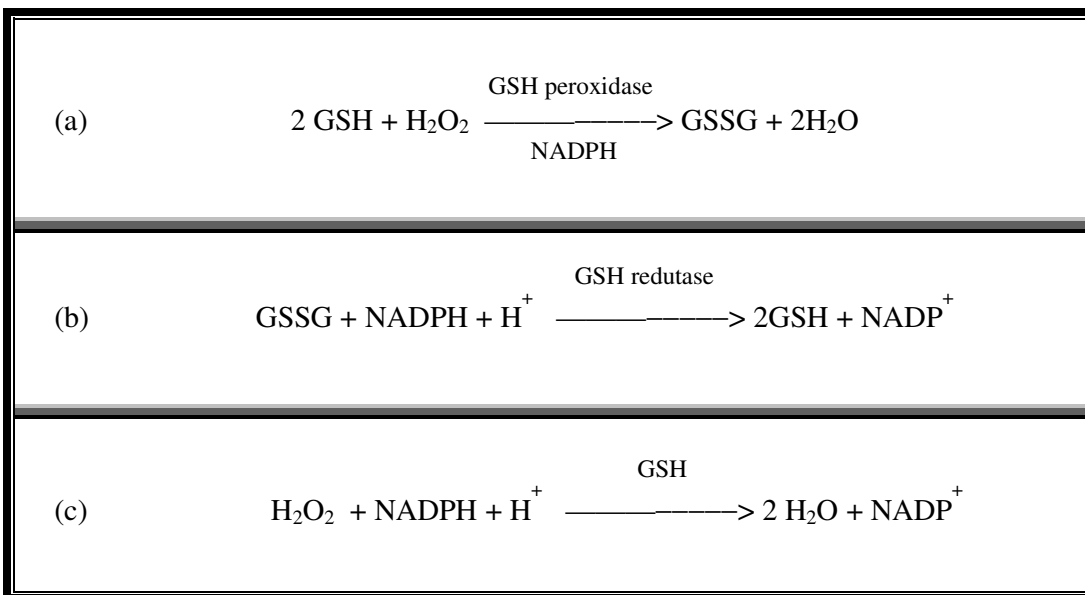
aumentam a atividade de antioxidantes endógenos, embora não neutralizem espécies reativas, também são classificados como antioxidantes (Kaliora *et al.*, 2005).

Figura 6 - Catalase e a dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.



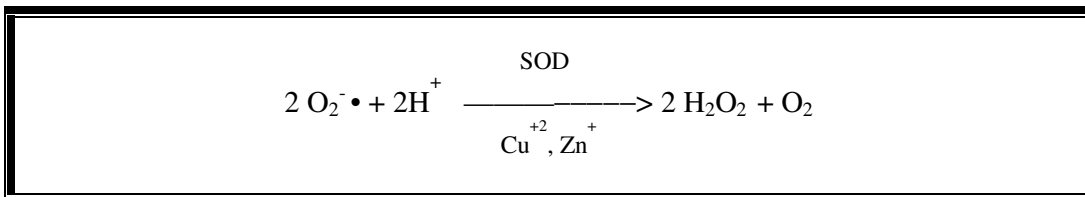
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio.

Figura 7 - Glutathione e a dismutação do peróxido de hidrogênio em água, porém, opera em ciclo na forma oxidada e reduzida.



GSH = Glutathione reduzida; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio GSSG = Glutathione oxidada; NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada; NADP = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida; GSSG = Glutathione oxidada.

Figura 8 - Superóxido dismutase e a conversão superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Pode ser encontrada na forma citoplasmática (CuZnSOD) ou mitocondrial (MnSOD).



SOD = Superóxido dismutase; $\text{O}_2^{\cdot -}$ = superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; Cu = cobre; Zn = zinco.

Em suma, para ser considerada um bom antioxidante, uma substância deve apresentar algumas características essenciais, como: especificamente extinguir espécies reativas ou contribuir para que tal ocorra; interagir com outros antioxidantes dentro da “rede de antioxidante”; apresentar efeito positivo na expressão de genes; ser absorvido prontamente, no caso dos exógenos; ter uma concentração em tecidos e biofluidos a um nível fisiologicamente pertinente; trabalhar em ambos os domínios de membrana e efetivamente evitar danos por ação de espécies reativas.

2. 4. CAROTENÓIDES

2. 4. 1. Caracterização e ocorrência

Estima-se que já foram identificadas na natureza, aproximadamente 4000 substâncias com propriedades antioxidantes (Bagchi & Puri, 1998). Destas, mais de 600 tipos são classificados como carotenóides, incluindo isômeros (El-Agamey *et al.*, 2004; Britton, 1995).

Carotenóides agrupam uma extensa classe de compostos isoprenóides pertencentes à família de pigmentos lipossolúveis encontrados no reino metáfita e metazoa (Jewell & O'Brien, 1999; Britton, 1995).

Estes pigmentos, presentes nos cromoplastos das flores, frutos e folhas, bem como em bactérias, fungos, algas, insetos, pássaros, peixes e crustáceos são responsáveis pelo espectro de cores que vão desde a faixa do amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho intenso (Stahl & Sies, 2003).

Em metáfitas, os carotenóides estão envolvidos na proteção contra danos oxidativos. Como somente plantas, bactérias, algas e fungos são capazes de sintetizá-los (Stahl & Sies, 2003), nos animais estes pigmentos são normalmente encontrados como resultado da dieta, já que carotenóides são nutricionalmente importantes para muitas espécies.

Em vários mamíferos eles participam de processos bioquímicos, a exemplo da conversão do β -caroteno em retinol ou na integração da complexa rede de sinais de comunicação envolvidos na atração, advertência e camuflagem (Sies & Stah, 1995; Britton, 1995).

Carotenóides são moléculas extremamente hidrofóbicas com pequena ou nenhuma solubilidade em água, compostas por um extenso sistema de duplas ligações conjugadas em sua porção central (Britton, 1995).

Tudo indica que suas propriedades e funções são diretamente dependentes desta conformação estrutural básica (Britton, 1995) e modulada pelos diferentes grupos funcionais, peculiares a cada grupo de carotenóides (Di Mascio *et al.*, 1991).

É também atribuído aos carotenóides efeito antioxidante devido à sua habilidade de remover radicais livres (Sies & Stahl, 1995; Burton & Ingold, 1984) como o β -caroteno, que apresenta propriedade de interceptar certos radicais livres e desativar moléculas reativas de oxigênio singlete, gerado como subproduto de muitos processos metabólicos normais (Di Mascio *et al.*, 1991).

2. 4. 2 Carotenóides e estresse oxidativo: mecanismo de ação

Em virtude de sua estrutura, carotenóides são compostos que podem atuar seqüestrando e inativando radicais livres.

Genericamente, três mecanismos são propostos para explicar esta ação dos carotenóides sobre espécies reativas: adição radical, abstração de hidrogênio do carotenóide e reação de transferência de elétrons (El-Agamey et al., 2004).

Um dos mecanismos conhecidos é a desativação do oxigênio singlete. Essa desativação pode se dar pela transferência física da energia de excitação do oxigênio singlete para o carotenóide ou pela reação química do carotenóide com o oxigênio singlete. Em condições normais no organismo, 95% da desativação do oxigênio singlete é física, restando somente 5% para reagir quimicamente (Barreiros & David, 2006; Sies & Stahl, 1995).

Um outro mecanismo no qual carotenóides podem estabelecer sua ação antioxidante é seqüestrando radicais peroxila formados na peroxidação lipídica, interrompendo, assim, a sucessão de reações que podem danificar compartimentos lipofílicos.

Dessa forma, os carotenóides desempenham um papel importante na proteção de membranas celulares e lipoproteínas contra danos oxidativos (Sies & Stahl, 1995; Stahl & Sies, 2003).

Pelo exposto, diante da complexidade dos antioxidantes, dos diferentes mecanismos de atuação, é possível inferir que haja um certo grau de especificidade na ação das substâncias antioxidantes. O que poderia explicar resultados conflitantes. Então, um efeito neutro ou até mesmo negativo de um tipo de antioxidante para prevenir ou tratar uma

determinada doença, não significa que outro tipo de antioxidante possa também falhar. O que justificaria novos experimentos envolvendo diferentes tipos de substâncias com propriedades antioxidantes para o tratamento de doenças degenerativas e outras relacionadas ao estresse oxidativo.

2. 4. 3 Estudos que relacionam carotenóides e processos patológicos

Vários estudos epidemiológicos têm revelado que o consumo de dietas com alimentos ricos em carotenóides está associado à redução de várias desordens degenerativas (Kritchevsky, 1999).

No que se refere aos antioxidantes de forma geral, há estudos populacionais indicando seus efeitos positivos para eventos relacionados especificamente a doenças cardiovasculares, como os estudos: *Cambridge Heart Antioxidant Study* (Stephens *et al.*, 1996); *Atherosclerosis Risk in Communities* (Kritchevsky *et al.*, 1995); EURAMIC (Kohlmeier *et al.*, 1997); *Zutphen Elderly* (Hertog *et al.*, 1993). Há também, vários estudos que indicam uma associação inversa entre ingestão de carotenóides, especificamente β -carotenos, e o risco de doenças cardiovasculares (Gaziano *et al.*, 1995), (Tavani *et al.*, 1997). Foi relatado que β -caroteno apresentou efeito protetor parcial ou completo em células hepáticas humanas (HepG2) contra peroxidação lipídica induzida por oxidantes (Martin *et al.*, 1996).

Lin *et al.*, (1998) mostraram que depleção de β -caroteno em mulheres saudáveis, aumentou a suscetibilidade a oxidação de LDL, e que uma ingestão normal resultou em proteção da LDL.

Romanchick *et al.* (1997) suplementando partículas de LDL, *in vitro*, com vários carotenóides observaram que β -caroteno apresentou um pequeno, mas significativo efeito protetor contra oxidação em LDLs.

Resultados obtidos por Shaish, *et al.* (1995) sugerem que metabólitos derivados de β -caroteno podem inibir aterosclerose em coelhos hipercolesterolêmicos, embora o mecanismo não esteja claro. Os resultados de estudos *in vitro*, epidemiológicos ou de intervenção com carotenóides são, contudo, conflitantes na literatura.

Algumas tentativas de intervenção em humanos que utilizaram β -caroteno produziram resultados contraditórios resultando em efeito protetor, neutro ou até mesmo, em alguns casos, efeitos nocivos.

Em um estudo realizado com pacientes com *diabetes mellitus*, a aumentada suscetibilidade para oxidação de LDL foi normalizada por β -caroteno (Levy *et al.*, 2000).

Três grandes estudos com tentativas clínicas de suplementação com β -caroteno, a longo prazo, não apresentaram nenhum efeito. Um destes estudos foi o *Alpha Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study* (ATBC) em 1994, quando 27.271 homens com faixa etária entre 50-69 anos de idade, fumantes sem problemas coronários receberam suplemento de 20 mg de β -caroteno por 6 anos. Não houve alteração na mortalidade para todos os casos coronários (Virtamo *et al.*, 1998).

Um outro estudo que não apresentou efeito para taxas de mortalidade em doenças foi o *Skin Cancer Prevention Study* (SCPS), onde 1.188 homens e 532 mulheres pacientes com câncer de pele, de ambos os sexos, com menos de 85 anos de idade, receberam suplementação de 50 mg de β -caroteno num período de 8 anos (Greenberg *et al.*, 1996).

No estudo observacional *Physicians Health Study* (PHS) também não foi encontrado nenhum efeito na incidência de neoplasmas maligno, doença cardiovascular, ou morte por todas as causas. Neste último estudo 22.071 homens (médicos: 11% fumantes atuais e 39%: fumavam antes do estudo) de 40 a 84 anos de idade receberam durante 12 anos, em dias alternados, 50 mg de β -caroteno como suplemento alimentar (Hennekens *et al.*, 1996).

Contrariando as expectativas, há também, registro de casos de intervenção com suplementação de β -caroteno que resultaram em efeitos adversos. É o caso do *Alpha Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study* (ATBC), onde 29.133 homens, fumantes e sem problemas médicos, com a faixa etária variando entre 50 a 69 anos de idade, recebendo por 6 anos, 20 mg de β -caroteno, apresentaram aumento na mortalidade global no grupo que recebeu β -caroteno (Kris-Etherton *et al.*, 2004).

Em 1996, o estudo *Carotene and Retinol Efficacy Trial* (CARET) com 14.254 homens e mulheres (50-69 anos) fumantes receberam suplementação de 2500 IU retinol por 5 anos, não apresentou efeito (Omenn *et al.*, 1996).

Em um estudo de intervenção com suplementação de antioxidantes, conduzido com homens (50 a 69 anos de idade da Finlândia), efeitos adversos foram atribuídos ao tratamento com β -caroteno em fumantes: houve um aumento na incidência de câncer pulmonar entre os fumantes que receberam 20 mg de β -caroteno, quando comparados aos que não haviam recebido (Heinonen *et al.*, 1994).

Em modelos animais, Muzandu *et al.*, 2006 sugerem que carotenóides como licopeno e β -caroteno possam aliviar alguns efeitos danosos em DNA e proteínas celulares provocados por espécies reativas como peroxinitrito e possivelmente outras espécies reativas de nitrogênio (RNS) em hamsteres chineses.

Em sistemas biológicos, os efeitos preventivos dos carotenóides têm sido atribuídos à sua atividade antioxidante, que possivelmente, protege células e tecidos de danos oxidativos, inibindo reações de radicais livres (Sies & Stahl, 1995).

Com base no grande corpo de evidência que associa patologias ao estresse oxidativo, atualmente, os antioxidantes vêm atraindo considerável atenção como alvo de pesquisa.

2. 5. Urucum

Annatto (*Bixa orellana* L.), conhecido comumente no Brasil como “urucum”, é um corante natural vermelho-amarelado extraído do pericarpo da semente de uma planta arbustiva da família *Bixaceae*, nativa das florestas tropicais das Américas Central, do Sul e possivelmente originária da região do Acre, na Amazônia.

Os primeiros relatos de utilização de urucum referem-se a tribos indígenas sul-americanas que tenham utilizado a planta como medicamento e as sementes como pintura para o corpo durante séculos (Paumgarten *et al.*, 2002; Sandi & Cuen, 2003).

Na Índia Ocidental, um remédio popular conhecido como “chá de arbusto”, preparado com uma suspensão das sementes de *Bixa orellana* em óleo, era utilizado no tratamento do *diabetes mellitus* (Morrison & West, 1982).

Na arte culinária do nordeste brasileiro é utilizada uma mistura de fubá ou farinha de mandioca com urucum em pó ou em extrato oleoso, conhecida popularmente como “colorífico”. Esta mistura de uso doméstico proporciona cor avermelhada a diversas preparações (arroz, risotos, bifes, frangos, farofas, molhos e queijos).

Na medicina tradicional, popular, o urucum é usado para tratar: diarreia, amidalites e ainda como: estimulante e diurético (Sandi & Cuen, 2003).

No Brasil, a cultura do urucum visa principalmente à produção de corantes extraídos a partir de suas sementes.

O urucunzeiro é uma planta perene que mede entre 3 a 10 metros de altura, adaptada a diferentes tipos de solo, clima, altitude (100m até 1.000 metros) e temperatura (de 24° a 35° C) e que pode reproduzir-se por sementes, estacas e enxerto. Ela apresenta frutos na forma de cápsulas ovóides, cobertas por espinhos flexíveis, em cujo interior encontram-se de 10 a 50 pequenas sementes (Sandi & Cuen, 2003) (Figura 9).

Além de seu uso tradicional na América tropical, atualmente, urucum tem sido alvo de interesse das indústrias de produtos cosméticos, farmacêuticos com destaque para a indústria alimentícia. Como elemento aditivo de cor para alimentos (laticínios, coloríficos,

salsicharia, lingüiças, sorvete, temperos e massas) (JECFA, 1982), sua utilização tem sido intensificada, desde a década de 70, em face da crescente proibição da utilização de corantes sintéticos que podem ser carcinogênicos ou mutagênicos (Sandi *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2002).

A alta resistência a agentes químicos, tornando o urucum ideal para colorir todo tipo de alimento e bebida; o aumento na demanda de corantes naturais, apresentando vantagens econômicas no mercado nacional e internacional (Estados Unidos, Europa, China, Japão, Índia e Argentina) e suas propriedades químicas tornam esta substância promissora para estudos e pesquisas.

Figura 9 - Frutos do urucunzeiro *Annatto* (*Bixa orellana* L.), contendo as sementes.



2. 5. 1. O pigmento ativo bixina

O extrato, uma das formas de comercialização do urucum, é composto por duas substâncias principais: o carotenóide lipossolúvel, bixina e o hidrossolúvel, norbixina que é obtido por hidrólise do grupo éster metil da bixina (De-Oliveira *et al.*, 2003).

A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) (Figura 10), um carotenóide destituído de atividade pró- vitamina A (De-Oliveira *et al.*, 2003) representando cerca 80% dos carotenóides totais presentes no urucum é o principal pigmento vermelho do extrato (Pedrosa *et al.*, 1999).

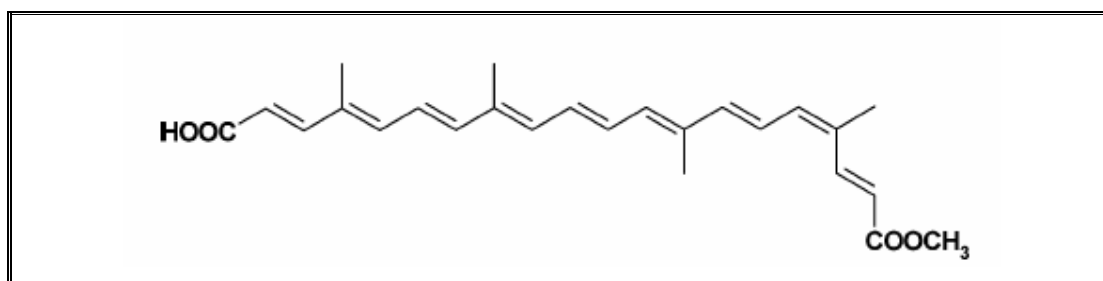
O método utilizado para obtenção do extrato determina sua composição em função das propriedades químicas da bixina que isomeriza com o calor (aumentando no teor de isobixina) e hidroliza em meio alcalino (aumentando no teor de norbixina).

A torta bixina é obtida a partir de extração e prensagem do pigmento do pericarpo de sementes de urucum.

Em escala industrial a extração dos pigmentos, normalmente é feita utilizando solventes orgânicos (Sandi & Cuen, 2003).

Entre os carotenóides naturais, bixina se destaca por ser capaz de interceptar e desativar moléculas reativas de oxigênio singlete, atuando na defesa antioxidante (Di Mascio, 1990) e protegendo contra efeitos mutagênicos e genotóxicos induzidos (Thresiamma *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2001).

Figura 10 - Fórmula estrutural da bixina ($C_{25}H_{30}O_4$)



Adaptado de: Antunes *et al.*, 2005.

Zhang *et al.* (1991) estudaram o efeito de inibição da peroxidação, avaliando alguns carotenóides, incluindo bixina, constatando sua eficácia na inibição dos conseqüentes efeitos de transformações neoplásicas induzidas (Zhang *et al.*, 1991).

Em estudo realizado em 2001, Silva *et al.* obtiveram no tratamento com bixina (2.5 ou 5.0 mg/kg de peso corporal) redução no número total de aberrações cromossômicas, inibição do aumento da peroxidação lipídica e da depleção de glutathiona renal induzidos por cisplatina em ratos (Silva *et al.*, 2001).

Lima *et al* em outro estudo, também realizado em 2001, tratando coelhos da raça Nova Zelândia com bixina (0.01 mol/kg de peso corporal) encontraram redução dos níveis séricos de colesterol total e aumento dos níveis de colesterol HDL (Lima *et al.*, 2001).

Também trabalhando com coelhos hiperlipidêmicos da mesma raça, Lima *et al.* verificaram redução dos níveis séricos de colesterol total e de triglicérides, além do aumento dos níveis do colesterol HDL, no tratamento com bixina (0.01 mol/Kg) (Lima *et al.*, 2003).

Comparando os efeitos do flavonóide naringenina e do carotenóide bixina associados ao leite de cabra, Carvalho *et al.* verificaram que a mistura contendo bixina resultou em redução das concentrações de colesterol total (17,03% com 16 dias e 8,14% com 31 dias) e aumento nas concentrações de colesterol HDL (56,79% com 16 dias e 40,39% com 31 dias) em coelhos da raça Nova Zelândia (Carvalho *et al.*, 2004).

Avaliando a ação da quercetina, norbixina e bixina (0,01mol/kg/dia/28 dias) em coelhos hiperlipidêmicos, Lima *et al.* (2003) obtiveram resultados que demonstraram que a bixina foi mais efetiva na redução dos níveis séricos de colesterol total (-4,03%) quando comparado ao flavonóide e ao corante hidrossolúvel.

2. 5. 2. Toxicidade

Segundo a organização Mundial de Saúde (OMS), a bixina não apresenta toxicidade como corante dérmico nem como corante de alimentos (Sandi & Cuen, 2003).

Diferentemente de outros corantes naturais que podem apresentar efeitos mutagênicos (Agarwal, *et al.*, 1994), experimentos com *annatto* têm resultado em ausência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos.

Após testar várias doses (0,07; 0,080 e 4,23) de *annatto*, Agner *et al.* (2004) não encontraram efeito tóxico ou hepatocarcinogênico em ratos.

Há evidências indicando que bixina, além de não ser tóxica, pode apresentar efeito protetor contra dano cromossomal induzido por irradiação-gama em ratos (Thresiamma *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos por Antunes *et al.* (2005) em uma investigação para avaliar a possibilidade de bixina (1.0; 2.5; 5.0; 10µg/mL) induzir aberrações cromossômicas em linfócitos humanos, *in vitro*, apontaram para um efeito anti-clastogênico e uma ação protetora deste carotenóide.

Na avaliação de Bautista *et al.* (2004) sobre efeitos tóxicos do tratamento com *annatto* (2000 mg/Kg/dia/bixina 27%) em ratos Wistar, machos e fêmeas, em regime subagudo de administração (4 semanas, 20 doses, por 28 dias) sugere que *annatto* não é tóxico para os roedores.

Quanto à toxicidade reprodutiva, extrato de *annatto* (28% de bixina), em doses progressivas (0; 31,2; 62,5; 125; 250 e 500 mg/Kg de peso corporal) não apresentou nenhum efeito tóxico materno fetal em ratos tratados durante 21 dias (Paumgartten *et al.*, 2002).

A associação entre baixa toxicidade, o potencial antioxidante e sua possível atuação no metabolismo lipídico tornam a bixina um alvo atraente de pesquisa.

2. 6. MODELO EXPERIMENTAL

2. 6. 1 Hamsteres

Para entender melhor a relação entre desordens do metabolismo de colesterol e aterogênese, vários modelos animais têm sido utilizados.

Diferenças no metabolismo de lipídios plasmáticos foram descritas levando em consideração as espécies animais. Estudando seis espécies diferentes de modelos animais saudáveis (camundongos, ratos, cachorros, hamster, coelho e macaco) Tsutsumi *et al.*, 2001 verificaram uma forte relação entre níveis plasmáticos de HDL e atividade da CETP. Levando em consideração seus resultados, estes autores também concluíram que os animais poderiam ser divididos em dois grupos distintos: o primeiro tipo que mostrou uma alta taxa HDL/colesterol total com ausência (ratos) ou reduzida (camundongos, cães) atividade da CETP e o segundo grupo de animais com uma baixa relação de HDL/colesterol total e alta atividade de CETP, (hamsteres, coelhos e macacos). Esta relação é observada em todas as espécies com alta atividade da CETP, incluindo, humanos (Tsutsumi *et al.*, 2001).

A CETP promove a transferência de ésteres de colesterol da HDL para as VLDL e LDL (Trigatti, 2003).

Evans *et al.*, 1994 demonstraram que inibição da CETP em hamsteres causou alterações no perfil de HDL e distribuição de apolipoproteínas similares às reportada sem humanos deficientes em CETP (Glenn *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1994).

Os hamsteres têm demonstrado maior grau de similaridade no metabolismo de lipídeos em relação humanos (Bravo *et al.*, 1994) quando comparados a ratos e camundongos.

Camundongos normalmente não são usados neste campo de pesquisa por apresentarem dificuldades de indução de aterogênese, muito provavelmente devido aos altos níveis de HDL e baixa taxa de absorção de colesterol, além destes animais não apresentarem atividade da CETP (Moghadasian, 2002).

Ratos são espécies reconhecidamente resistentes à aterosclerose. Isto é em parte explicado porque estas espécies são geralmente hipo responsivos ao colesterol dietético, não

apresentando CETP e suas lipoproteínas de alta densidade (HDL) são as principais carreadoras de colesterol (Moghadasian, 2002).

Outro aspecto importante que justifica a utilização de hamsteres são os níveis basais de expressão de enzima colesterol 7- α -hidroxilase (CYP7A) que apresentam diferenças quanto à espécie.

A enzima CYP7A é o passo limitante da velocidade da via que converte colesterol em ácidos biliares no hepatócito.

Dados apresentados por Pandak *et al.*, 1991 revelam uma diferença fundamental na regulação da CYP7A em roedor (rato) e hepatócitos humanos. Em hamsteres o gene da CYP7A sofre um controle predominantemente negativo, o oposto do que ocorre em genes homólogos de ratos.

Colesterol induz a expressão da CYP7A1 em ratos, camundongos, cães e certas espécies de primatas não humanos (Pertsemlidis *et al.*, 1973; Jelinek, *et al.*, 1990; Horton *et al.*, 1995) todas as espécies que adaptam a dietas hipercolesterolemiantes com pequena mudança nos níveis plasmáticos de colesterol. Em contraste, colesterol tem pequeno efeito ou até mesmo suprime a CYP7A1 em outras espécies incluindo, hamster, e coelhos (Horton *et al.*, 1995; Rudel *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995).

Outro aspecto que justifica a utilização de hamsteres como modelo para estudo da hipercolesterolemia, se deve ao fato de hamsteres apresentarem uma responsividade ao colesterol dietético, similar à humana (Horton, *et al.*, 1995).

Diferente de outros roedores, hamsteres transportam uma quantidade significativa de colesterol na fração LDL, mostrando mais similaridade ao humano (Lock *et al.*, 2005).

Hamsteres podem desenvolver hipercolesterolemia (Martinello *et al.*, 2006; Fungwe *et al.*, 1994; Spady, *et al.*, 1985) e aterosclerose, precocemente em dietas aterogênicas (Moghadasian, 2002).

2. 6. 2 Diferenças nas respostas a dietas aterogênicas entre hamsteres machos e fêmeas

Experimentos relacionados ao metabolismo de colesterol com hamsteres fêmeas são relativamente escassos na literatura. Porém há trabalhos demonstrando que fatores relacionados ao gênero podem estar envolvidos nas diferentes respostas de hamsteres a dietas aterogênicas.

Analisando diferenças de resposta a uma dieta hipercolesterolemiantes em hamsteres *Golden Syrian F1B* de ambos os sexos, Wilson *et al.* observaram que as fêmeas

apresentaram significativamente maior taxa de oxidação de LDL (34%) comparado aos hamsteres machos (Wilson *et al.*, 1999).

Robins *et al.* (1995) demonstraram que hamsteres machos e fêmeas Syrian híbridos responderam diferentemente a dieta aterogênica (0,05% colesterol), enriquecida com gordura saturada (10% óleo de côco). Fêmeas ganharam mais peso. Ainda neste experimento, após castração das fêmeas, os níveis de triglicérides e colesterol séricos das fêmeas aumentaram à mesma extensão que nos machos (Robins *et al.*, 1995).

Alimentando hamsteres *Golden syrian* machos e fêmeas da linhagem LPN por nove semanas, com dieta contendo 15% de lipídios (12.5% ácidos graxos saturados) e 0.1% de colesterol, Morise *et al.* (2004) observaram que fêmeas exibiram maiores concentrações de LDL (+24%), menor concentração de triglicérides (-34%), VLDL total (-46%), VLDL-colesterol (-37%) e de fosfolipídios biliares (-19%) quando comparadas aos machos. Estes dados sugerem que regulação por genes e ou metabólica de ácidos graxos poderia interagir com hormônios sexuais e explicar por que hamsteres machos e fêmeas respondem diferentemente aos ácidos graxos dietéticos.

Liu *et al.* (1991) sugerem que VLDL hepática de hamsteres machos contém mais apo B e Apo E, enquanto as fêmeas contêm mais triglicérides e Apo A-II/C.

Para investigar os aspectos peculiares relacionados ao gênero e idade e uma possível relação idade/cálculo biliar no metabolismo ácidos biliares, Trautwein *et al.* analisaram hamsteres machos e fêmeas sob diferentes condições fisiológicas e dietéticas. Neste experimento eles verificaram que hamsteres fêmeas submetidas à dieta hipercolesterolemizante apresentaram significativamente maior concentração de colesterol sérico e hepático do que os machos. Além disto, diferentes resultados obtidos nos lipídeos biliares e na incidência de colesterol dos cálculos biliares, em função do gênero, revelaram que os hamsteres machos apresentaram um maior índice litogênico do que as fêmeas (Trautwein *et al.*, 1999).

Ayyad *et al.* 1995 estudando o efeito de uma dieta litogênica (0,3% de colesterol) verificando que hamsteres machos e fêmeas apresentaram respostas diferentes, sugerem que a composição de ácidos biliares parece ser hormônio dependente.

Estes estudos mostram diferentes resultados em hamsteres machos e fêmeas indicando que fatores relacionados ao gênero podem estar interferindo nas respostas metabólicas.

As propriedades e a utilização popular do urucum na culinária brasileira, aliadas ao seu potencial antioxidante, tornam esse carotenóide um bom alvo de pesquisa para os eventos associados à hiperlipidemia e ao processo aterosclerótico. O objetivo do presente

trabalho foi avaliar os efeitos da torta de bixina sobre defesas antioxidantes, sobre perfil lipídico, sérico e tecidual em hamsteres fêmeas, que são utilizadas com menor frequência, comparadas aos machos para estudos relacionados ao metabolismo de colesterol, e que são um modelo experimental com características metabólicas favoráveis aos nossos propósitos, em função das semelhanças metabólicas e genéticas com humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com torta de bixina nas defesas antioxidantes e perfil lipídico de hamsteres fêmeas submetidos às dietas padrão e hipercolesterolemiantes.

3.2 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral fosse atingido, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- ◆ Tratar hamsteres com dieta hipercolesterolemiantes e após duas semanas avaliar colesterol sérico, glicemia e atividade da paraoxonase.
- ◆ Tratar hamsteres normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos com torta de bixina e avaliar:
 - parâmetros de defesas antioxidantes: atividade da catalase, paraoxonase e concentrações de sulfidrilas;
 - perfil sérico de lipídeos, colesterol total, frações do colesterol e o conteúdo de gordura e colesterol hepáticos;
 - influência do tratamento no sobre o perfil glicêmico;
 - função hepática através da determinação no soro da atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina;
 - efeitos dos tratamentos nos níveis séricos de proteínas totais, albumina e hemoglobina, uréia e creatinina.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4. 1. Animais

No experimento foram utilizados hamsteres *Golden Syrian (Mesocricetus auratus)* fêmeas com cerca de 60 dias, pesando em média 100g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto.

Durante o experimento todos os animais foram mantidos em ambiente arejado, com temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 horas) controladas.

4. 2. Dietas

A dieta padrão foi preparada segundo as recomendações da AIN93. A dieta hipercolesterolemiantes diferiu da padrão na quantidade de colesterol, óleo de soja. Uma maior quantidade de amido que foi utilizada na dieta hipercolesterolemiantes para que as dietas fossem isocalóricas (Tabela II).

As dietas foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental, onde foram acondicionadas e armazenadas a -20°C .

A torta bixina (bixina) acrescentada às dietas dos grupos CB e HB foi fornecida pela Corantec Corantes Naturais Ltda. - São Paulo, Brasil e obtida a partir de extração e prensagem do pigmento do pericarpo de sementes de urucum.

Durante o experimento, dietas e a água foram oferecidas à vontade aos animais.

Tabela II – Composição das dietas controle e hipercolesterolemiantes em gramas para cada 1000g da dieta.

Nutrientes	Dietas			
	C	H	CB	HB
Amido	622.5	487.5	621.7	486,7
Caseína	140.0	140.0	140.0	140.0
Celulose	50.0	50.0	50.0	50.0
Colesterol	0.0	5.0	0.0	5.0
Colina	2.5	2.5	2.5	2.5
Mistura de sais ¹	35.0	35.0	35.0	35.0
Mistura de vitaminas ²	10.0	10.0	10.0	10.0
Óleo	40.0	170.0	40.0	170.0
Sacarose	100.0	100.0	100.0	100.0
Bixina	0.0	0.0	0.8	0.8

C: padrão; H: hipercolesterolemiantes; CB: padrão acrescida com bixina; HB: hipercolesterolemiantes com bixina
 (1) Mistura de sais (em g/kg de mistura): NaCl , 139.3; KI, 0.79; MgSO₄.7H₂O, 57.3; CaCO₃, 381.4; MnSO₄.H₂O, 4.01; FeSO₄.7H₂O, 27.0; ZnSO₄.7H₂O, 0.548; CuSO₄.5H₂O, 0.477; CoCl₂.6H₂O, 0.023; KH₂PO₄, 389.0.

(2) Mistura de Vitaminas (g/kg de mistura): acetato de retinol, 2.000.000 UI; colecalciferol, 200.000 UI; ácido *p*- amino benzóico, 10,0; I- inositol, 10,0; niacina, 4,00; pantotenato de cálcio 4,0; riboflavina, 0,80; Tiamina HCl, 0,50; piridoxina HCl, 0,50; ácido fólico 0,20; biotina, 0,04; (cianocobalamina) vitamina B12, 0,003; α-tocoferol, 10.000 UI; sacarose q.s.p.1.000.

4. 3. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em duas etapas. No primeiro, trinta e dois hamsteres *Golden Syrian* foram divididos em dois grupos de 16 animais, denominados C e H de acordo com o tipo de dieta recebida: dieta padrão, dieta hipercolesterolemiantes, respectivamente. Após 15 dias de adaptação às dietas e antes do início do tratamento com a torta de bixina foi coletado sangue do plexo orbital dos animais para dosagem dos níveis séricos de glicose, colesterol total e atividade arilesterase da paraoxonase.

No 15º dia, os dois grupos citados foram divididos novamente: oito animais do grupo C foram separados em um novo grupo denominado CB e o restante continuou como C; oito animais do grupo H foram separados em um novo grupo denominado HB e o restante continuou como H. Assim, os quatro grupos denominados C, H, CB e HB passaram

receber dietas padrão, hipercolesterolemiantes, padrão contendo 0,08%, de torta de bixina e dieta hipercolesterolemiantes contendo 0,08% de torta de bixina, respectivamente.

Após nove semanas de experimento os animais foram anestesiados e sacrificados para determinação dos seguintes parâmetros: biológicos (peso corporal, ganho de peso e peso de órgãos); lipídicos (níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL, relação colesterol HDL/colesterol não HDL, triglicérides, gordura e colesterol no fígado); defesas antioxidantes (paraoxonase - atividade arilesrase e paroxon, catalase, sulfidrilas livre, total e ligada à proteína); e metabólitos séricos (proteínas totais, albumina, hemoglobina e glicose, uréia e creatinina) e atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina.

4. 4. Parâmetros biológicos

4. 4. 1. Peso corporal

Os animais tiveram um período de adaptação às respectivas dietas durante as duas primeiras semanas do experimento. Na terceira semana foi iniciado o tratamento com 0,08% de bixina nos grupos CB e HB. O peso corporal dos animais foi monitorado durante todo o experimento e registrado semanalmente.

4. 4. 2. Peso do fígado, baço, coração e rins

Ao final da nona semana, os animais foram anestesiados e sacrificados. O fígado, coração, baço e rins foram retirados e pesados. Os fígados foram devidamente identificados e congelados para posterior dosagem da gordura e do colesterol hepáticos.

4. 4. 3. Obtenção do soro

Para o 1º ensaio, os animais foram anestesiados, após 12 horas de jejum, com éter etílico, por via inalatória e amostras de sangue foram coletadas através do plexo orbital. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 *rpm* durante 5 minutos para obtenção do soro.

Para o 2º ensaio, os animais foram anestesiados com éter etílico, por via inalatória e amostras de sangue foram coletadas através de uma incisão no plexo axilar. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 *rpm* durante 5 minutos para obtenção do soro. Logo em seguida os animais foram sacrificados para análise dos demais parâmetros.

4 5. Defesas antioxidantes

4. 5. 1 Determinação da atividade arilesterásica da paraoxonase

A atividade arilesterásica da paraoxonase foi determinada como previamente descrito por Beltowski *et al.*, em 2002, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato. Uma solução contendo 1µL de fenilacetato e 1500 µL de Tris HCl 9 mM pH 8 foi preparada, dessa solução foram retirados 0,5 mL e misturados com 2 mL de Tris HCl 9 mM pH 8 contendo CaCl₂ 0,9 mM. Foram colocados 5 µL de amostra e a absorbância foi lida em a 270 nm em 3 minutos, exatamente. Coeficiente de extinção molar, do fenilacetato, 1.310 (mol/L/1cm/1). Os resultados foram expressos em U/mL onde uma unidade de arilesterase hidrolisa 1 mmol de fenilacetato por minuto.

4. 5. 2. Determinação da atividade da paraoxonase sobre o paraoxon

A atividade da paraoxonase foi determinada como previamente descrito por Beltowski *et al.* (2002), tendo como princípio a velocidade de hidrólise do paraoxon.

Inicialmente preparou-se uma solução contendo: 4,8 mL de tampão glicina/NaOH pH 10,6; CaCl₂ 0,9 mM e 1,06 mL de paraoxon. Para cada amostra utilizaram-se 780 µL dessa solução e adicionaram-se 20 µL de amostra. A solução foi homogeneizada e logo após foram feitas três leituras, a cada minuto, obtendo-se a liberação do paranitrofenol por minuto. O branco foi feito como descrito acima, porém sem amostra. Para cálculo da atividade foi utilizada a fórmula $[(T3-T2)+(T2-T1)/2] \times 18290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar do paraoxon) x 1000. Os resultados foram expressos em U/L; 1 U da enzima hidrolisa 1 nmol de paraoxon por minuto.

Observação: T1,T2, T3 e T4 referem-se ao tempo (por minuto) de leitura.

4. 5. 3. Determinação de radicais Sulfidrilas (Totais, livres e ligados à proteína)

Os radicais sulfidrilas representam todos os grupos tióis encontrados em glutathione, proteínas e outros compostos de baixo peso molecular encontrados no plasma como cisteína e hemocisteína.

As sulfidrilas foram determinadas usando ácido 5,5'-Ditio-bis (2-nitrobenzóico) - DTNB (reagente de Ellman), segundo Sedlak *et al.*, 1968. Os grupos tióis reagem com DTNB formando um composto colorido, que absorve luz a 412 nm. Para determinar os grupos sulfidrilas livres, ou seja, compostos de baixo peso molecular contendo sulfidrilas, as proteínas são precipitadas usando tricloroacético (TCA) e é utilizado o sobrenadante para a dosagem.

Para se determinar o SH total foram misturados 40 µl de soro, 150 µl de TrisHCl 30mM pH 8,2, 50 µl de DTNB (Sigma) e 800 µl de metanol. Centrifugou-se por 5 minutos e a leitura foi realizada a 412 nm no espectrofotômetro.

Para se determinar o SH livre foram utilizados 200 µl de soro, 200 µl de ácido tricloroacético (TCA), centrifugados por 15 minutos, 150 µl do sobrenadante foram tratados com 600 µl de Tris pH 8,9, 60 µl de DTNB e feita a leitura à 412 nm no espectrofotômetro.

Foi feita uma curva padrão para o SH livre e para o SH total usando glutathione estoque (20 mM) que foi diluída em Trietanolamina-HCl (TEA). Para a determinação da concentração de grupos SH ligados às proteínas subtraiu-se a concentração de SH total da concentração de SH livre. Para se obter a quantidade de SH ligados à fração protéica (SH LFP) foi subtraído o SH total do SH livre.

4. 5. 4. Catalase

A atividade da catalase foi determinada com base na sua capacidade de hidrolisar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular.

Em tubo de ensaio colocou-se 900 µL de H₂O₂, 50 µL de tampão fosfato pH 7,2, 40 µL de H₂O destilada e 10 µL do soro. Homogeneizou-se a solução. Determinaram-se as absorbâncias a 240 nm a cada minuto, durante cinco minutos. Para cálculo da atividade foi utilizada a fórmula $[(T5-T1)/4 \times 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ (coeficiente de extinção molar do H₂O₂, 39,4 M⁻¹ cm⁻¹) x 1000]. Os resultados foram expressos em U/L; 1 U da enzima hidrolisa 1 µmol de H₂O₂ por minuto. Observação: T1 e T5 referem-se ao tempo inicial e final.

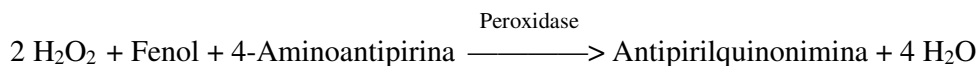
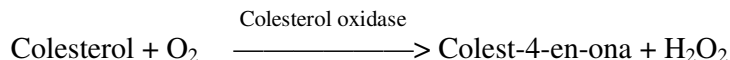
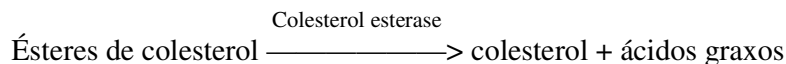
4. 6. Lipídeos no soro

4. 6. 1 Dosagem de Colesterol total

Para executar essa dosagem, foi utilizado o Kit Colesterol COD-ANA (Labtest Diagnóstica S. A). Foram utilizados 1000 µL do reagente de cor* e 10 µL do soro (ou amostra do padrão de colesterol com concentração de 200 mg/dL) que foram misturados e incubados a 37°C. Após 10 minutos, foi realizada a leitura no espectrofotômetro para determinação da absorbância.

Princípio

Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e o 4-aminoantipirina são oxidados formando o antipirilquinonimina de cor vermelha que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra. Seguem as reações descritas:



Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,026 = Unidades SI (mmol/L).

* Reagente de cor: tampão 50mmol/L, pH 7.0; 24,0 mmol/L; colato de sódio 0.5 mmol/L; azida sódica 1.5 mmol/L; colesterol esterase ≥ 250 UL; colesterol oxidase ≥150 UL e peroxidase ≥1.000U/L.

4. 6. 2 Dosagem de Colesterol HDL

Para executar essa dosagem, foi utilizado Kit HDL-Colesterol (Labtest Diagnóstica S.A).

Princípio

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas* e, após centrifugação, o colesterol ligado às proteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante.

A 125 µL de soro foram acrescentados 125 µL de precipitante sendo agitados no vórtex por 30 segundos. Em seguida, foram centrifugados por 15 minutos para obter um sobrenadante límpido que foi, então, pipetado.

10 µL da amostra do sobrenadante (ou amostra do padrão com concentração de 20mg/dL), obtidos na centrifugação, foram misturados a 1000 µL do reagente de cor e logo após incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Logo em seguida foi determinada a absorbância do teste em 500 nm.

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) X 0,026 = Unidades SI (mmol/L).

* Agente precipitante: ácido fosfotúngstico 1.5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

4. 6. 3. Cálculo do Colesterol não HDL

As concentrações séricas de Colesterol não HDL (CN-HDL) foram calculadas através da equação:

$$\text{CN-HDL (mmol/l)} = \text{Colesterol total (mmol/l)} - \text{Colesterol HDL (mmol/l)}.$$

4. 6. 4. Dosagem de Triglicérides

Para esta dosagem foram utilizados 10 µL de amostra e 1000 µL de reagente de cor para cada teste (ou amostra do padrão com concentração de 200mg/dL). Os testes e padrão foram deixados a 37°C em banho-maria por 10 minutos. Em seguida, foram determinadas as absorbâncias em 540nm.

Princípio

Por meio da lipase lipoprotéica, o glicerol é liberado dos triglicerídeos e convertido em glicerol-3-fosfato pela glicerocinase. O glicerol-3-fosfato na presença da glicerolfosfato oxidase é oxidado a diidroxicetona e peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio sofre uma reação de acoplamento com a 4-aminoantipirina e ESPAS (N-etil N-sufopropil n-

anizidine) catalisada pela peroxidase, produzindo a quinoneimina que tem máximo de absorvância em 540 nm.

Esta dosagem foi realizada utilizando Kit Comercial (Labtest, Cat 59-4/50, MS10009010021, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,0113 = Unidades SI (mmol/L).

4. 7. Lipídeos no fígado

4. 7. 1. Gordura no fígado

Amostras dos fígados, previamente secas em estufa ventilada, foram colocadas em cartuchos de papel de filtro e mergulhados em éter no aparelho de extração (Sohxlet) e deixados por 5 horas sob refluxo. Posteriormente os cartuchos foram retirados e o éter evaporado. O balão contendo a gordura extraída das amostras foi colocado em estufa por 90. Após o resfriamento total a porcentagem de gordura foi determinada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ gordura} = \frac{100 \times D}{A}$$

D = Peso do balão contendo a gordura extraída menos o peso do balão vazio.

A = Peso da amostra.

4. 7. 2 Colesterol no fígado

Para executar essa dosagem foram utilizadas amostras de gordura previamente extraídas dos fígados e diluídas em isopropanol. Após homogeneização, o colesterol foi determinado utilizando o Kit Colesterol COD-ANA (Labtest Diagnóstica S. A). Assim, foram utilizados 1000 µL do reagente de cor* e 10 µL da amostra (ou amostra do padrão de colesterol com concentração de 200 mg/dL) que foram misturados e incubados a 37°C. Após 10 minutos, foi realizada a leitura no espectrofotômetro para determinação da absorvância em 500 nm.

4. 8. Metabólitos séricos

A dosagem de albumina, proteínas totais, hemoglobina, glicose sérica, uréia, creatinina e atividade de fosfatase alcalina foram realizadas com Kits comerciais - Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil. Cat. 52, A.N.V.S: 10009010031. (disponível em: www.labtest.com.br).

4. 9 Atividade da Aspartato aminotransferase (AST)

Esta dosagem foi realizada com Kit comercial - Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil. Cat. 52, A.N.V.S: 10009010031. (disponível em: www.labtest.com.br).

4. 10. Atividade Alanina Aminotransferase (ALT)

Esta dosagem foi realizada com Kit comercial - Labtest, Lagoa Santa , MG, Brasil. Cat. 53, A.N.V.S.:10009010027 (disponível em: www.labtest.com.br).

4. 11. Análise estatística

Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas dos dados foram realizadas usando o MINITAB 13 Software (State College, PA). Os dados foram testados pela ANOVA, análise bivariada. Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias. A diferença de $p < 0.05$ foi considerada significativa. Foi utilizado test “t” de Student para o primeiro ensaio.

5 - RESULTADOS

Perfil de metabólitos séricos e de atividade da Paraoxonase 15 dias após início do tratamento com as dietas

Os resultados apresentados na tabela III mostram que após 15 dias de adaptação às respectivas dietas os animais do grupo H apresentaram elevação nos níveis séricos de glicose ($6,5 \pm 0,72$), colesterol total ($9,6 \pm 3,46$). Houve ainda, redução na atividade arilesterase da paraoxonase neste grupo ($54,25 \pm 10,09$). Resultados estes, que viabilizaram o segundo ensaio, ou seja, desde que a hipercolesterolemia estava estabelecida, iniciamos o tratamento com a torta de bixina.

Tabela III - Efeitos da dieta hipercolesterolemiantes (H) nas concentrações séricas de glicose, na atividade arilesterase da enzima paraoxonase (PON arilesterase), colesterol total e peso após 15 dias de adaptação às dietas.

	Glicose (mmol/L)	(PON arilesterase)	Colesterol total (mmol/L)	Peso corporal (g)
C	$5,51 \pm 1,1^b$	$71,50 \pm 15,25^a$	$5,01 \pm 2,14^b$	$94,6 \pm 9,74$
H	$6,50 \pm 0,72^a$	$54,25 \pm 10,09^b$	$9,60 \pm 3,46^a$	$102,7 \pm 7,35$
Dieta	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Avaliação dos efeitos da torta de bixina:

Peso corporal e peso dos órgãos

As tabelas IV, V e VI apresentam parâmetros biológicos e a atividade da fosfatase alcalina obtidos dos animais alimentados com dietas padrão (C) e hipercolesterolemiantes (H) acrescida (CB, HB) ou não com torta de bixina (0,08%).

Tabela IV - Peso inicial e peso final e hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão (C) acrescidas (CB, HB) ou não com bixina (0,08%).

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
C	99,88 ± 5,82	104,43 ± 6,01
H	95,13 ± 9,26	95,11 ± 8,35
CB	101,13 ± 10,79	106,24 ± 13,27
HB	95,00 ± 8,14	108,01 ± 10,43
Dieta	>0,05	<0,05
Bixina	>0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística ao nível de significância de 5% (p<0.05).

A tabela V apresenta o peso do coração, baço e rins.

Com exceção dos rins, o peso destes órgãos não sofreu alterações (p>0,05). Ao observar o peso dos rins, verificamos que houve interação (p<0,05). O peso dos rins dos animais dos grupos C (0,99 ± 0,11) e HB (0,99 ± 0,11) foram iguais entre si e superiores ao grupo H (0,85 ± 0,05). O peso dos rins dos animais dos grupos C (0,99 ± 0,11) e HB (0,99 ± 0,11) e do grupo CB (0,93 ± 0,09) foram iguais entre si. Indicando que a dieta hiper provoca redução dos rins e este efeito é revertido pelo tratamento com a bixina.

Tabela V - Peso do coração, peso do baço e peso dos rins e peso relativo dos rins de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão, (C) acrescidas (CB, HB) ou não com bixina (0,08%).

	Coração (g)	Baço (g)	Rins (g)
C	0,46 ± 0,07	0,23 ± 0,05	0,99 ± 0,11 ^a
H	0,44 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,85 ± 0,05 ^b
CB	0,44 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,93 ± 0,09 ^{a,b}
HB	0,43 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,99 ± 0,11 ^a
Dieta	>0,05	>0,05	>0,05
Bixina	>0,05	>0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	<0,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística ao nível de significância de 5% (p<0.05).

A tabela VI apresenta a atividade da fosfatase alcalina, o peso, peso relativo, gordura, percentual de gordura e colesterol hepáticos.

Em relação ao peso do fígado, verificamos que o tratamento não interferiu ($p>0,05$), porém a dieta aumentou o peso destes órgãos ($p<0,05$). Os animais alimentados com dieta hipercolesterolemia (H + HB) apresentaram valores superiores ($5,7 \pm 0,32$ e $5,81 \pm 0,44$) para o peso do fígado quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão (C + CB) ($3,33 \pm 0,21$ e $3,41 \pm 0,5$), respectivamente.

No peso relativo do fígado houve interação. Os animais do grupo H ($6,11 \pm 0,43$) apresentaram peso relativo maior que os grupos HB ($5,41 \pm 0,49$), C ($3,19 \pm 0,22$) e CB ($3,24 \pm 0,52$), sendo que os dois últimos foram iguais entre si.

Tabela VI - Atividade da fosfatase alcalina, peso, peso relativo, gordura, percentual de gordura, e colesterol hepáticos de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H), padrão (C) acrescidas (HB, CB) ou não com bixina (0,08%).

	Fosfatase Alcalina (U/L)	Peso (g)	Peso relativo	Gordura (g)	% Gordura	Colesterol (mmol/g)
C	$34,55 \pm 7,34$	$3,33 \pm 0,21$	$3,19 \pm 0,22^b$	$0,39 \pm 0,17$	$19,64 \pm 8,37$	$6,54 \pm 6,99$
H	$29,40 \pm 4,41$	$5,70 \pm 0,32$	$6,11 \pm 0,43^a$	$0,90 \pm 0,15$	$45,00 \pm 7,33$	$12,73 \pm 0,95$
CB	$28,53 \pm 6,19$	$3,41 \pm 0,5$	$3,24 \pm 0,52^b$	$0,56 \pm 0,17$	$27,79 \pm 8,33$	$9,83 \pm 4,19$
HB	$26,59 \pm 4,25$	$5,81 \pm 0,44$	$5,41 \pm 0,49^c$	$0,98 \pm 0,50$	$49,07 \pm 24,92$	$17,64 \pm 1,87$
Dieta	$>0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$
Bixina	$>0,05$	$>0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$
Interação	$>0,05$	$>0,05$	$<0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística ao nível de significância de 5% ($p<0,05$).

O tratamento com bixina também afetou a gordura hepática ($<0,05$). Os animais dos grupos tratados com bixina apresentaram valores superiores ($0,56 \pm 0,17$ e $0,98 \pm 0,5$) para CB e HB na gordura hepática quando comparados aos animais não tratados, C + H ($0,39 \pm 0,17$ e $0,90 \pm 0,15$). Os resultados indicam que o tratamento com bixina aumenta a gordura hepática de forma independente à dieta oferecida. O percentual de gordura no fígado apresentou comportamento similar.

Quanto ao colesterol hepático, verificamos que tanto o tratamento com bixina quanto a dieta interferiram. Animais tratados com bixina (HB e CB) apresentaram valores superiores ($9,83 \pm 4,19$ e $17,64 \pm 1,87$, respectivamente) aos não tratados C e H ($6,54 \pm 6,99$ e $9,83 \pm 4,19$, respectivamente).

Quando dosamos a atividade da fosfatase alcalina (tabela VI) verificamos que esta não foi afetada pelo tratamento e/ou dieta ($p>0,05$).

Defesas antioxidantes

A enzima catalase é considerada um importante componente de defesa antioxidante primária, atuando na decomposição de H_2O_2 , dividindo esta função com a glutathione peroxidase (Sies, 1993). Na presença de baixos níveis de H_2O_2 , os peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente pela glutathione peroxidase, enquanto que em altas concentrações de H_2O_2 predomina a ação da catalase (Chung-Man *et al.*, 2001).

Nossos resultados mostraram que a PON (arilesterase) não sofreu alteração pela dieta ou tratamento ($p>0,05$) (Tabela VII). Para PON paraoxon, os animais do grupo C ($806,07 \pm 101,48$) apresentaram valores superiores aos grupos CB ($631,01 \pm 101,56$), H ($401,24 \pm 48,5$) e HB ($426,39 \pm 66,66$), sendo que os dois últimos foram iguais entre si e menores que HB (Tabela VII). Os resultados para PON paraoxon mostram que a dieta diminuiu a sua atividade, assim como a bixina. Entretanto, houve interação entre os dois, assim não houve diferença entre H e HB, ou seja, a redução de atividade da PON pela bixina só foi observada no grupo controle.

A dieta, mas não o tratamento, influenciou a atividade da catalase (Tabela VII). Animais alimentados com dietas hipercolesterolemiantes, H ($171,67 \pm 53,3$) e HB ($206,85 \pm 61,85$) apresentaram valores superiores aos alimentados com dieta padrão, C ($160,06 \pm 46,13$) e CB ($121,89 \pm 92,24$). O tratamento não afetou SH livre, SH total e sulfidrilas ligadas à proteínas ($p>0,05$). A dieta afetou também, os níveis de SH livre (Tabela VIII) sem alterar SH total (Tabela VIII) e sulfidrilas ligadas à proteínas (Tabela XI). Animais alimentados com dieta padrão (C + CB) obtiveram níveis de SH livre superiores ($125,53 \pm 11,08$ e $128,22 \pm 11,4$) aos níveis obtidos nos animais alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (HB + H) ($107,49 \pm 2,19$ e $110,18 \pm 5,69$) para $p<0,05$.

Tabela VII - Atividade da Paraoxonase – paraoxon - (PON paraoxon) e da Paraoxonase – atividade arilesterase (PON arilesterase) e da Catalase de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão, (C) acrescidas (HB, CB) ou não com bixina (0,08%).

Resultado ANOVA			
	(PON paraoxon) (U/mL)	(PON arilesterase) (U/mL)	Catalase (U/L)
C	806,07 ± 101,48 ^a	70,36 ± 24,89	160,06 ± 46,13
H	401,24 ± 48,5 ^b	56,58 ± 10,02	171,67 ± 53,3
CB	631,01 ± 101,56 ^c	56,33 ± 25,79	121,89 ± 92,24
HB	426,39 ± 66,66 ^b	62,82 ± 7,93	206,85 ± 61,85
Valor de p			
Dieta	<0,05	>0,05	<0,05
Bixina	<0,05	>0,05	>0,05
Interação	<0,05	>0,05	>0,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística ao nível de significância de 5% (p<0.05).

Tabela VIII – Concentração de Sulfidrilas totais (SH Total), de Sulfidrilas livres (SH livre), Sulfidrilas ligadas à fração protéica (SH-LFP) (μmol/L) de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão, (C) acrescidas (HB, CB) ou não com bixina (0,08%).

Resultado ANOVA			
	(SH Total)	(SH livre)	(SH-LFP)
C	463,28 ± 92,39	125,53 ± 11,08	337,74 ± 102,23
H	447,28 ± 19,63	110,18 ± 5,69	337,10 ± 16,8
CB	441,78 ± 98,89	128,22 ± 11,4	313,56 ± 108,53
HB	511,64 ± 29,34	107,49 ± 2,19	404,14 ± 30,3
Valor de p			
Dieta	>0,05	<0,05	>0,05
Bixina	>0,05	>0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	>0,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão.

Perfil lipídico

Quanto ao colesterol total verificamos que houve interação entre as dietas e o tratamento ($p < 0,05$). Os animais alimentados com dieta hipercolesterolemizante tratados com bixina (HB) apresentaram valores estatisticamente menores ($6,47 \pm 1,1$) do que animais do grupo H ($8,29 \pm 1,48$). O colesterol total do grupo H ($8,29 \pm 1,48$) também foi maior que os grupos C ($2,92 \pm 0,26$) e CB ($2,57 \pm 0,29$) que foram iguais entre si (Tabela IX). Como esperado, o grupo H apresentou maior concentração de colesterol sérico total e verificamos que houve interação entre as dietas e o tratamento assim, a bixina promoveu efeito hipocolesterolemizante só observado quando os hamsteres receberam dieta hiper.

Também houve interação entre as dietas e o tratamento com bixina ($p < 0,05$) para o colesterol HDL. Nos animais do grupo H ($1,6 \pm 0,29$) os valores obtidos para colesterol HDL sérico foram iguais ao grupo HB ($1,27 \pm 0,24$) e superiores aos grupos C ($0,87 \pm 0,13$) e CB ($1,03 \pm 0,21$) que foram iguais entre si (Tabela IX).

Os valores obtidos para níveis séricos do colesterol não HDL (CN-HDL) mostram que tanto a dieta quanto o tratamento afetaram seus níveis. Animais tratados com bixina HB ($4,94 \pm 0,87$) e CB ($1,58 \pm 0,1$) mostraram valores menores do que os animais não tratados, C ($1,99 \pm 0,26$) e H ($6,85 \pm 1,72$) para o colesterol não HDL. Com relação à dieta, os grupos alimentados com dietas hipercolesterolemizantes (H + HB) tiveram valores superiores ($6,85 \pm 1,72$ e $4,94 \pm 0,87$) aos animais do grupo padrão (C + CB) ($1,99 \pm 0,26$ e $1,58 \pm 0,1$) nos níveis de CN-HDL (Tabela IX).

Tanto a dieta quanto o tratamento afetaram a relação HDL/CN-HDL ($p < 0,05$). Os animais alimentados com dieta padrão C e CB ($0,44 \pm 0,08$ e $0,64 \pm 0,11$) apresentaram valores superiores aos grupos alimentados com dieta hipercolesterolemizante H e HB ($0,25 \pm 0,06$ e $0,26 \pm 0,06$) para a relação HDL/CN-HDL. O tratamento aumentou a relação HDL/CN-HDL, pois os grupos tratados com bixina HB + CB ($0,26 \pm 0,06$ e $0,64 \pm 0,11$) apresentaram níveis superiores quando comparados aos grupos não tratados C + H ($0,44 \pm 0,08$ e $0,25 \pm 0,06$) (Tabela IX).

As taxas de triglicérides séricos não sofreram alteração com o tratamento com bixina ($p > 0,05$) (Figura 21).

Em resumo, o tratamento com bixina diminuiu o colesterol total e o colesterol não HDL (CN-HDL) somente no grupo que recebeu dieta hipercolesterolemizante, mas não quando a dieta foi padrão. Por outro lado, a bixina claramente aumentou a relação

HDL/CNHDL, indicando nos dois casos um efeito benéfico quando consideramos fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose.

Tabela IX – Concentrações de Colesterol Total sérico, Colesterol HDL, Colesterol Não HDL, Relação HDL/Colesterol Não HDL (HDL/CN-HDL) e Triglicérides (mmol/L) no soro de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão, (C) acrescidas (HB, CB) ou não com bixina (0,08%).

Resultado ANOVA					
	Colesterol Total	Colesterol HDL	Colesterol Não HDL (CN-HDL)	Relação HDL/CN-HDL	Triglicérides
C	2,92 ± 0,26 ^c	0,87 ± 0,13 ^c	1,99 ± 0,26	0,44 ± 0,08	1,52 ± 0,16
H	8,29 ± 1,48 ^a	1,60 ± 0,29 ^a	6,85 ± 1,72	0,25 ± 0,06	1,46 ± 0,5
CB	2,57 ± 0,29 ^c	1,03 ± 0,21 ^{b, c}	1,58 ± 0,1	0,64 ± 0,11	1,89 ± 0,57
HB	6,47 ± 1,1 ^b	1,27 ± 0,24 ^{a, b}	4,94 ± 0,87	0,26 ± 0,06	1,49 ± 0,24
Valor de p					
Dieta	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Bixina	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Interação	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística a nível de significância de 5% (p<0.05).

Outros Metabólitos Séricos

Os níveis séricos de albumina apresentaram interação (p<0,05). Os grupos C (318,07 ± 13,77) e HB (304,64 ± 10,89) apresentaram níveis séricos superiores ao grupo CB e iguais ao grupo H (299,36 ± 12,54) que foi igual ao grupo CB (Tabela X).

O tratamento não afetou os níveis de hemoglobina e proteínas totais (p>0,05). A dieta afetou apenas os níveis de proteínas totais (p<0,05), uma vez que os animais dos grupos H e HB mostraram valores superiores (78,83 ± 10,15 + 75,63 ± 6,13) para proteínas totais em relação aos animais dos grupos C e CB (70,58 ± 2,35 + 64,57 ± 7,09) (Tabela X).

Uréia e creatinina (Tabela X) não foram afetadas pelo tratamento (p>0,05).

Houve interação com relação aos níveis séricos de glicose (p<0,05). Os grupos C, H e HB apresentaram valores séricos de glicose estatisticamente iguais entre si e superiores ao

grupo CB (Tabela XI). O tratamento reduziu significativamente a glicose sérica dos animais alimentados com dieta padrão.

Tabela X – Hemoglobina, Proteínas totais, Albumina, Uréia e Creatinina de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H), padrão (C) acrescidas (HB, CB) ou não com bixina (0,08%).

Resultado ANOVA					
	Hemoglobina ($\mu\text{mol/L}$)	Proteínas totais (g/L)	Albumina ($\mu\text{mol/L}$)	Uréia (mmol/L)	Creatinina (mmol/l)
C	25,12 $\pm$ 4,9	70,58 $\pm$ 2,35	318,07 $\pm$ 13,77 ^a	9,96 $\pm$ 1,68	50,87 $\pm$ 14,82
H	26,66 $\pm$ 2,03	78,83 $\pm$ 10,15	299,36 $\pm$ 12,54 ^{a,b}	9,50 $\pm$ 1,54	55,23 $\pm$ 10,96
CB	26,56 $\pm$ 6,36	64,57 $\pm$ 7,09	274,92 $\pm$ 32,6 ^b	7,71 $\pm$ 1,71	52,87 $\pm$ 8,59
HB	26,47 $\pm$ 2,93	75,63 $\pm$ 6,13	304,64 $\pm$ 10,89 ^a	10,09 $\pm$ 2,19	45,55 $\pm$ 12,22
Dieta	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Bixina	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística a nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Tabela XI – Níveis séricos de glicose (mmol/L) de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão, (C) acrescidas (HB, CB) ou não com bixina (0,08%).

Resultado ANOVA	
C	6,00 $\pm$ 0,83 ^a
H	6,01 $\pm$ 0,66 ^a
CB	4,94 $\pm$ 0,87 ^b
HB	6,22 $\pm$ 0,59 ^a
Valor de p	
Dieta	<0,05
Bixina	>0,05
Interação	<0,05

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes superescritas indicam diferença estatística a nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Atividade da AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase)

Quanto à atividade da AST apenas a dieta teve efeito. Os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes (H + HB) apresentaram valores superiores ($52,14 \pm 34,75$ e $33,05 \pm 21,21$) para atividade desta enzima quando comparados aos grupos controle (C + CB), ($17,98 \pm 8,31$ e $28,76 \pm 11,15$) (Tabela XII).

Resultados similares foram apresentados pela ALT: animais dos grupos H e HB apresentaram valores superiores ($63,03 \pm 7,39$ e $57,43 \pm 8,9$) para atividade desta enzima quando comparados aos grupos C e CB ($29,17 \pm 2,23$ e $29,53 \pm 4,36$) (Tabela XII).

O tratamento não afetou a atividade da AST e da ALT já que não houve diferença estatística entre os grupos que receberam tratamento e os grupos não tratados ($p > 0,05$).

Tabela XII - Atividade da Aspartato Aminotransferase (AST) e Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT) de hamsteres alimentados com dietas hipercolesterolemiantes (H) padrão, (C) acrescidas (HB, CB) ou não com bixina (0,08%).

Resultado ANOVA		
	AST (U/mL)	ALT (U/mL)
C	$17,98 \pm 8,31$	$29,17 \pm 2,23$
H	$47,74 \pm 29,4$	$63,03 \pm 7,39$
CB	$28,76 \pm 11,15$	$29,53 \pm 4,36$
HB	$33,05 \pm 21,21$	$57,43 \pm 8,9$
Valor de p		
Dieta	<0,05	<0,05
Bixina	>0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

6 - DISCUSSÃO

Há algum tempo atrás, acreditava-se que a aterosclerose era um processo associado aos mecanismos naturais de envelhecimento, portanto, inevitável (Polanczyk, 2005).

Após a descoberta do colesterol, o grande desafio passou a ser explicar o processo aterosclerótico. Então, multiplicaram-se os esforços para compreender os mecanismos envolvidos na formação e progressão da aterosclerose. Como resultado, vários estudos e hipóteses foram emergindo, desde então, para explicar esse processo.

Em 1844, surgiu a primeira descrição de uma placa de ateroma (Bertolami, 2003). A interpretação de Virchow para os depósitos de gordura na íntima, trouxe a hipótese da insudação, na qual a explicação proposta era a passagem de elementos fluidos vindos do sangue, através da parede endotelial (Virchow, 1989).

Com as observações de Rokitanski, surgia a hipótese da incrustação, sugerindo que o processo ateromatoso seria derivado, inicialmente, de depósitos de fibrina e plaquetas (Rokitansky, 1852). Em meados do século XX, Ross e Glomset criaram a hipótese da injúria-reação endotelial. Nela era proposto que a ateromatose seria devido à injúria da parede do vaso. Haveria uma lesão inicial do endotélio por um ou vários agentes, como um estágio precoce da aterogênese, e com conseqüente disfunção endotelial induzida por fatores de risco, especialmente níveis plasmáticos elevados de LDL que oxidadas eram expostas ao endotélio (Ross & Glomset, 1973 e 1976). Mais tarde o próprio Ross alterou essa teoria propondo que o ateroma seria uma doença com características inflamatórias (Ross, 1999). Embora diversas hipóteses abrissem novas perspectivas para elucidação dos complexos eventos associados com o desenvolvimento da aterosclerose, a hipótese lipídica continuou sendo a dominante. Nela, um dos fatores determinantes que influencia esse processo é a elevação de lipídios séricos.

Um dos estudos mais expressivo, desenvolvido para esclarecer os mecanismos que desencadeiam o processo aterosclerótico, ocorreu a mais de 50 anos, e foi denominado *score de Framingham* (Saad, 2004), onde mais de 5.000 indivíduos saudáveis entre 30-60 anos de idade foram monitorados e periodicamente avaliados, clínica e laboratorialmente, ao longo de sua vida.

A partir deste estudo ficou estabelecida a importância de alguns fatores de risco, efetivamente relacionados ao desenvolvimento da doença aterosclerótica, entre eles, os elevados níveis do colesterol LDL (revisado por Polanczyk, 2005 e Brandão *et al.*, 2004), o

que foi, posteriormente, confirmado por outros estudos populacionais como: INTERHEART (abrangendo 52 países), AFIRMAR (envolvendo 104 hospitais de 51 cidades do Brasil), PROVE-IT (*Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy*) e MRFIT (*Multiple Risk Factors Intervention Trial* – Estudo randomizado de prevenção primária em 12.866 homens de alto risco na faixa etária de 35 a 57 anos, durante 7 anos) (Polanczyk, 2005; Saad, 2004; Filho & Martinez, 2002).

Acrescentam-se ainda, análises de grupos de indivíduos portadores de hipercolesterolemia hereditária, investigações patológicas e diversos estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* que também se somaram às evidências que apóiam a hipótese que elevação dos níveis séricos de LDL está diretamente relacionada à formação da placa (Kaliora *et al.*, 2005; Saad, 2004).

Neste contexto, o interesse pela associação entre hipercolesterolemia, reações de oxidação e progressão da aterogênese é crescente, pois modificações oxidativas na LDL, originariamente proposta por Steinberg são críticas neste processo (Steinberg *et al.*, 1989).

Evidências da relação entre aterosclerose e estresse oxidativo e a possível atuação de substâncias com propriedades antioxidantes já foram relatadas.

Embora haja evidências da ação dos antioxidantes, especificamente de carotenóides atenuando efeitos causados pelo estresse oxidativo (Kritchevsky, 1999; Stephens *et al.*, 1996; Kritchevsky *et al.*, 1995; Kohlmeier *et al.*, 1997; Hertog *et al.*, 1993; Muzandu *et al.*, 2006; Kaliora *et al.*, 2005), a bixina não induziu alterações significativas nas defesas antioxidantes testadas, exceto para a PON paraoxon, que apresentou redução significativa nos animais do grupo CB ($631,01 \pm 101,56$).

Células eucariotas apresentam um sistema de proteção antioxidante altamente complexo, que envolve uma variedade de componentes endógenos e exógenos que funcionando interativamente (Sies, 1993; Bagchi & Puri, 1998). Carotenóides podem ser classificados simultaneamente como exógenos e endógenos o que amplia sua forma de atuação. Compostos que aumentam a atividade de antioxidantes endógenos também são classificados como antioxidantes (Kaliora *et al.*, 2005), portanto potencializar a ação das defesas antioxidantes seria um resultado esperado da efetiva ação da torta de bixina contra o estresse oxidativo. A atividade da PON (arilesterase e paraoxon) não foi afetada. Pelo fato de circular ligada à HDL, intensificando suas propriedades anti-aterogênicas, prevenindo a oxidação de LDLs e peroxidação da própria HDL, a paraoxonase 1 (PON-1) desempenha importante papel na defesa antioxidante. Além disto, a PON-1 apresenta atividade esterase (hidrólise de hidroperóxidos de fosfolípidos e éster de colesterol) (Sorenson *et al.*, 1999),

atividade paraoxon (maior sensibilidade a elementos exógenos) (Durrington, 2001) e atividade peroxidase (degrada peróxido de hidrogênio) (Beltowski *et al.*, 2002). Outra ação importante da PON-1 é sua capacidade de proteger membranas citoplasmáticas de danos oxidativos (Durrington, 2001).

A paraoxonase (PON) é uma esterase amplamente distribuída entre os tecidos do fígado, rim, intestino e no soro. PON-1 liga-se reversivelmente a substratos organofosfatos, hidrolizando-os. PON-1 é um componente do HDL, que inibe a sua oxidação, preserva a função anti-aterogênica destas lipoproteínas, além de apresentar habilidade em metabolizar peróxidos de lipídeos, evitando acúmulos na LDL (Durrington *et al.*, 2001; Cabana *et al.*, 2003). A presença de PON na HDL pode ser um contribuinte importante para antiaterogenicidade dessa lipoproteína (Aviran *et al.*, 1998).

Confirmando os resultados da PON, as sulfidrilas que representam todos grupos tióis encontrados em glutathione, proteínas e outros compostos, também não foram afetadas pelo tratamento. A dosagem da atividade da catalase apresentou resultados similares ao da PON e de sulfidrilas. A enzima catalase que atua na catálise da decomposição de H_2O_2 é considerada um dos maiores componentes da defesa antioxidante primária (Chung-Man *et al.*, 2001) pois, apesar do H_2O_2 não ser uma espécie radicalar, nem ter alto potencial oxidante, o mesmo pode reagir com metais de transição, principalmente o ferro, ligado ou não a grupos heme localizados dentro das células, dando origem ao radical hidroxila (OH), um poderoso oxidante (Yu, 1994). Uma possível explicação para esta aparente ineficiência do tratamento com bixina nos três parâmetros utilizados não inviabiliza a ação antioxidante da bixina, pois não dosamos outros parâmetros do estresse oxidativo. Além do mais, estes resultados podem ser atribuídos a outros fatores, como por exemplo, à dose utilizada, que neste caso não foi alta suficiente para acionar mecanismos específicos de defesa endógenos.

A partir dos resultados obtidos nos parâmetros lipídicos dosados, observamos efeitos benéficos importantes. O tratamento reduziu o colesterol. Os animais hipercolesterolêmicos tratados com bixina apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total. Além disso, o tratamento também reduziu os níveis do CN-HDL (LDL e VLDL) e aumentou a relação HDL/CN-HDL. Quando associado à dieta hiper observamos uma tendência à redução de HDL pelo tratamento com bixina, provavelmente esta redução se deve à redução do colesterol total (< 22%) que também foi observada na fração não HDL, que consiste principalmente no somatório do colesterol presente em LDL e VLDL. Já para os hamsteres alimentados com dieta padrão houve uma tendência de aumento da fração de

colesterol HDL e redução das outras frações (LDL + VLDL) sem alteração na concentração do colesterol total, o que resultou num aumento significativo da relação HDL/outras frações.

Considerados em conjunto estes dados indicam uma melhora no perfil sérico de lipídeos dos animais tratados, indicando que a bixina possa estar afetando o metabolismo lipídico dos animais que receberam dieta padrão ou hiper corroborando dados da literatura para animais.

Lipoproteínas são compostas de proteínas, colesterol livre, ésteres de colesterol, fosfolipídios e triacilgliceróis. O local de síntese, a composição lipídica e o conteúdo de apolipoproteína (porção protéica) determinam a função específica de cada classe de lipoproteína. Quilomícrons ricos em triacilgliceróis (85%) são sintetizados nas células epiteliais da mucosa intestinal entram na circulação linfática e depois na sanguínea para ativar a lipase lipoprotéica nos capilares dos tecidos adiposo, muscular e mamário, permitindo a libertação de AcGx livres, que serão armazenados ou consumidos.

Quilomícrons remanescentes são transportados através da corrente sanguínea até ao fígado, onde liberam o colesterol e são degradados.

As VLDL transportam triglicérides, provenientes dos ácidos graxos e carboidratos em excesso, do fígado para o tecido adiposo, onde é ativada a lipase lipoprotéica para liberação de ácidos graxos livres.

A extração de lipídeos das VLDL (junto a perda de algumas apoproteínas) convertem gradualmente parte delas em LDL, que passam a conter maior quantidade de colesterol e ésteres de colesterol que serão transportados para os tecidos periféricos extra-hepáticos que possuam receptores específicos para sua captação ou são captados de novo pelo fígado. O fígado capta remanescentes de LDL, VLDL e quilomícrons por meio de processo de endocitose mediada por receptores.

As lipoproteínas HDL, sintetizadas no fígado, são capazes de coletar ésteres de colesterol de outras lipoproteínas circulantes e remover o colesterol em excesso dos tecidos extra-hepáticos, transportando-o até ao fígado, através da via de transporte reverso de colesterol.

Lima *et al.*, 2001 comparando os efeitos da norbixina, quercetina e bixina (0,01 mol/kg de peso corporal) em coelhos da raça Nova Zelândia hiperlipidêmicos verificaram que a bixina apresentou maior redução no colesterol total (44%) e menor redução nos níveis de HDL (11%) quando comparada às outras substâncias testadas.

Em outro trabalho, ao avaliar a ação do flavonóide quercetina e carotenóides (norbixina e bixina) (0,01mol/kg/dia por 28 dias) em coelhos, Lima *et al.*, 2003 observaram

que a bixina foi mais efetiva na redução dos níveis séricos de colesterol total quando comparado ao flavonóide e ao corante hidrossolúvel. Neste trabalho após o tratamento com bixina, os níveis de HDL encontrados foram maiores quando comparados ao grupo controle. Além disto, houve também redução dos triglicérides séricos.

Comparando os efeitos do flavonóide naringenina e do carotenóide bixina associados ao leite de cabra, Carvalho *et al.* (2004) verificaram que em coelhos, a mistura com bixina reduziu as concentrações de colesterol total (17,03% após 16 dias e 8,14% após 31 dias), sendo que o melhor resultado para HDL (aumento de 56,8% em 16 dias e 40,4% com 31 dias) também estavam associados ao tratamento com bixina.

Sob condições basais, a homeostase do colesterol, controlada por um balanço – que envolve desde a síntese, absorção, utilização como substrato, até a excreção biliar e fecal – é, em última análise, mantida e regulada pelo próprio colesterol.

Assim, quando há um aumento de excreção ou diminuição da absorção haverá aumento da síntese endógena; da mesma forma, uma maior chegada ou um acúmulo de colesterol nos tecidos leva à inibição de sua biogênese.

Nesta manutenção dos níveis de colesterol são acionados mecanismos distintos, que podem controlar a quantidade e atividade da HMG-CoA redutase, a endocitose mediada por receptores, o excesso intracelular de colesterol livre, através da *Acil Coa colesterol aciltransferase* e o transporte reverso mediado por HDL.

Juntos, estes mecanismos reguladores, que exibem alto grau de complexidade, concorrem para manter o conteúdo de colesterol intracelular relativamente constante.

Animais alimentados com dietas hipercolesterolemiantes tendem a apresentar a síntese de colesterol reduzida.

A biossíntese de colesterol ocorre principalmente no fígado, embora a síntese ocorra também no intestino, sendo substrato utilizado, o acetil-CoA. De forma sucinta, essa biossíntese se processa em quatro fases: condensação de acetato a mevalonato; conversão do mevalonato a unidades isoprênicas; polimerização, formação e ciclização do esqualeno (Lehninger *et al.*, 2004). O passo limitante da velocidade da via global de biossíntese de colesterol é a redução do β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato pela atividade da enzima HMG-CoA redutase. Enzima esta, que está sujeita, em curto prazo, a processos bioquímicos de modulação de atividade como fosforilação e desfosforilação por ação hormonal. A HMG-CoA redutase é desativada por uma proteína quinase via AMPc. O glucagon estimula a fosforilação, inativando a enzima, enquanto a insulina aumenta a

atividade da redutase promovendo sua desfosforilação, favorecendo, neste caso, a síntese de colesterol (Lehninger *et al.*, 2004).

Há estudos mostrando que outros hormônios como, por exemplo, o estrogênio possa estar envolvido no controle da homeostase de colesterol. Spady *et al.*, 1983 ao estudarem os efeitos de estrogênio na expressão do gene da HMG-CoA redutase hepática sugerem que em hamsteres a síntese de colesterol hepática é mais elevada em fêmeas do que em machos.

Trabalhando com ratos hipofisectomizados, Simonet & Ness, 1988 e Sample, *et al.*, 1987 observaram que hormônios tireoidianos também podem estar associados a aumento dos níveis de RNAm da HMG-CoA redutase. A modulação desta enzima também pode ocorrer por modificações de sua própria síntese. A taxa de tradução do RNAm da HMG-CoA redutase é inibida por metabólitos não esteróides derivados do mevalonato e pelo colesterol dietético.

Outro mecanismo de regulação da HMG-CoA redutase é através de sua degradação metabólica. A enzima é bipartida e seus domínios atuam de forma diferente: quando as concentrações de colesterol estão aumentadas, o domínio na membrana capta sinais que acionam sua proteólise e o domínio citossólico executa a catálise (Stryer, 1995). Além disso, a velocidade de síntese do RNAm da HMG-CoA redutase também é controlada por fatores transcricionais que se ligam a uma sequência de seu DNA.

Em termos moleculares, estudos têm demonstrado que a regulação da homeostase de colesterol é feita por uma família de fatores de transcrição designados *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBPs). Estes fatores de transcrição estão associados à regulação da expressão de pelo menos 30 genes envolvidos na síntese de colesterol, lipídios (McPherson & Gauthier, 2004) e de glicose, (Weber *et al.*, 2004) inclusive em hamsteres (Field *et al.* 2001). SREBPs são sintetizados como precursores de proteínas no retículo endoplasmático (RE) onde formam um complexo com uma chaperona, *SREBP Cleavage Activating Protein* (Scap) que contém um domínio sensível a esteróis (Weber *et al.*, 2004).

Quando sintetizadas, as SREBPs estão ancoradas no RE apenas no domínio amino terminal que funciona como ativador transcricional. Contudo, como este domínio não tem acesso ao núcleo, não podendo participar na ativação do gene, enquanto pertencer à molécula SREBP. Deste modo, é necessária a clivagem proteolítica deste domínio ativo, para possibilitar a transcrição de genes (Espenshade, 2006; Horton *et al.*, 2002; Shah, *et al.*, 2003).

Níveis baixos de colesterol são detectados pela Scap (chaperona que possui domínio sensível a esteróis), que sofre então, uma mudança conformacional resultando na liberação

do complexo Scap-SREBP do Reticulo Endoplasmático (RE). Este complexo migrará, dentro de vesículas, para o aparato de Golgi, onde o SREBP é clivado duas vezes, por duas proteases, sendo que na segunda separação ocorre a liberação do domínio amino terminal (S2P) no citossol. Este domínio desloca-se para o núcleo e liga-se a uma curta seqüência de DNA denominada “*Sterol Responsive Element*” (SRE) do gene da enzima, estimulando sua transcrição ou a transcrição de genes relacionados à síntese de colesterol (Horton *et al.*, 2002; Shah, *et al.*, 2003; Rader, 2001).

Quando os níveis de colesterol estão elevados, SREBP forma um complexo com a Scap (Scap-SREBP) que se liga à proteína de membrana (*Insig-1*) do RE, num mecanismo de “*downregulation*” para reter esse complexo no RE, inativando-o (Weber *et al.*, 2004). Em caso de privação de esterol, o complexo Scap/SREBP dissocia-se de “*Insig-1*” que é então, ubiquitinado e degradado no proteasoma (Gong *et al.*, 2006). *Insig* são proteínas já descritas em humanos e hamsteres (Lee, *et al.*, 2005).

Trabalhos têm mostrado que no modelo experimental hamster, dietas hipercolesterolemiantes também resultaram em redução da HMG-CoA redutase. Lopez & Ness, 1997 obtiveram 85% de redução na expressão do gene da HMG-CoA redutase alimentando hamsteres por 14 dias com dieta contendo 2% de colesterol. Resultado similar foi obtido por Beynen *et al.*, 1987, quando foi encontrado 70% de redução na expressão do gene da HMG-CoA redutase em hamsteres, para uma dieta com 0,5% de colesterol por 12 dias.

Assim, considerando os mecanismos descritos para a regulação da síntese de colesterol acreditamos que no nosso experimento a biossíntese está reduzida, logo, a hipercolesterolemia desenvolvida em nossos animais dos grupos H e HB (tabela III) reflete o perfil da dieta, corroborando dados da literatura. De forma geral, hamsteres podem desenvolver precocemente hipercolesterolemia em dietas aterogênicas (Moghadasian, 2002). Nistor *et al.* (1987) e Piyachaturawat *et al.* (1999) alimentando hamsteres com dietas acrescidas de colesterol também obtiveram animais hipercolesterolêmicos.

Por outro lado, Trautwein *et al.* (1999) submetendo hamsteres de ambos os sexos à variadas condições fisiológicas e dietas contendo excesso de colesterol, verificaram que as fêmeas desenvolveram concentrações séricas e hepáticas de colesterol significativamente mais altas quando comparadas aos machos. Assim, escolhemos fêmeas para o nosso trabalho.

Nikkari *et al.* (1991), com uma dieta aterogênica contendo 0,2% colesterol e 10% óleo de coco, obtiveram um aumento significativo (4X) nos níveis plasmáticos de colesterol

total, resultando também em mais 200% de aumento na relação VLDL/IDL, 20% de aumento em LDL e 45% de redução nas HDLs de hamsteres, quando comparados aos controles.

Nossos resultados mostram que após 15 dias submetidos à dieta hipercolesterolemiantes os animais do grupo H apresentaram elevação nos níveis séricos de colesterol total ($9,6 \pm 3,46$). (tabela III).

SREPBs não apenas regulam a transcrição de enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol, como também na transcrição de receptores de LDLs. Estes receptores permitem aos hepatócitos remover colesterol contido em LDLs circulantes. Sua expressão hepática é regulada pelas concentrações intracelulares de esteróis e também por um mecanismo de controle via SREBPs, similar ao descrito anteriormente (figura 11).

Os genes que codificam a transcrição de receptores de LDL também contêm SRE que pode ser ativado via translocação nuclear de uma forma ativa de SREBP-1 e SREBP-2 do Golgi (Grand-Perret *et al.*, 2001; Rader, 2001; Shah, *et al.*, 2003).

Dietas hipercolesterolemiantes preveniriam maturação de SREBPs, não só interrompendo a síntese de colesterol, mas também a transcrição de receptores para LDL (Weber *et al.*, 2004), resultando em altos níveis de colesterol plasmático (Weber *et al.*, 2004).

Em nosso experimento verificamos que o tratamento com bixina diminuiu o colesterol total e o colesterol não HDL (LDL + VLDL) no grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiantes, além disto, a bixina aumentou a relação HDL/CNHDL.

Contudo, parece que há mecanismos mais complexos de regulação das SREBPs e consequentemente, das enzimas envolvidas na síntese de colesterol e de receptores hepáticos de LDL.

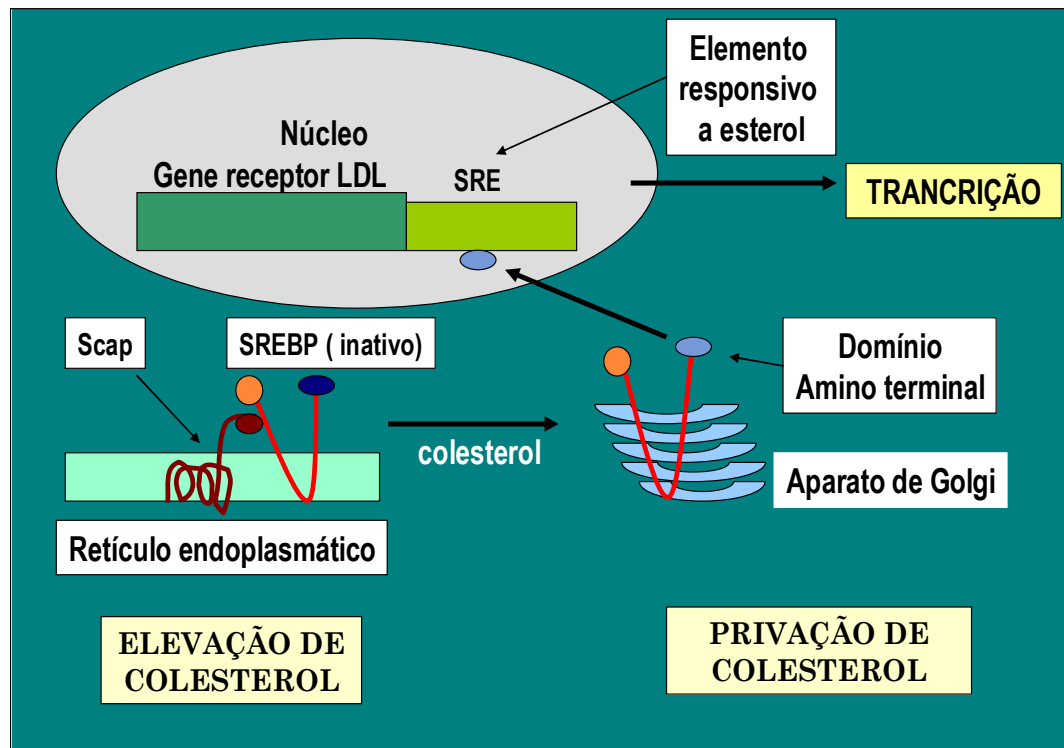
Estudando a captação de LDL em animais com altas (ratos), baixas (hamsteres fêmeas) e muito baixas (hamsteres machos) taxas basais de síntese hepática de esterol, Spady *et al.* (1985) sugerem que a taxa de síntese de colesterol hepático e de receptor de LDL são regulados independentemente.

Há mais de um tipo de SREBP, com diferentes genes alvos e com regulação possivelmente, independente. Shimomura *et al.* (1997) mostraram que fígados de hamsteres, similar ao humano, produzem predominantemente SREBP-2 e a isorforma SREBP 1c.

Em trabalho conduzido por Sheng *et al.* (1995), os resultados com “immunoblotting” sugerem uma regulação independente para SREBP-1 e SREBP-2 em fígados de hamsteres. Neste estudo, a depleção de esteróis através de tratamento com colestipol e mevinolin

conduziu ao aumento na forma nuclear de SREBP-2 e declínio recíproco na forma de SREBP-1.

Figura 11: Mecanismo de síntese de receptores LDL no hepatócito a partir de fatores transcricionais (SREBP).



SREBP: Fator de transcrição; Scap: chaperona que possui domínio sensível a esteróis; SRE: elemento responsivo a esteróis; LDL: lipoproteína de baixa densidade; S2P: domínio amino terminal do SREBP. Adaptado de: Shah, *et al.*, 2003 e Rader, 2001.

Grand-Perret *et al.* (2001) identificaram compostos análogos a esteróides (denominados GWs) que se ligam diretamente a Scap e que quando administrados em hamsteres hiperlipidêmicos, estes ligantes reduziram os níveis de LDL colesterol e triglicérides em até 80%. Foi verificado ainda, um aumento significativo do RNAm de LDLr no fígado. Neste mesmo trabalho, utilizando células de hepatoma humano, seus autores mostraram que estes compostos agem através do SRE (*Sterol Responsive Element*) do promotor do gene de LDLr e ativam o complexo Scap/SREBP, conduzindo a aumento da expressão e da atividade de LDLr, até mesmo em presença de excesso de esteróis (Grand-Perret *et al.*, 2001).

Embora a abordagem deste trabalho não permita supor mecanismos pelos quais a bixina contribua para a redução do colesterol podemos supor que o tratamento com a bixina possa estar estimulando fatores transcricionais envolvidos na síntese de receptores de LDL nos animais alimentados com a dieta hipercolesterolemizante, pois a redução nos níveis séricos de colesterol total e de CN-HDL (LDL e VLDL) que observamos nos animais tratados com bixina sugere uma maior captação e uma possível ação da bixina nos receptores de LDL. Isto poderia explicar, em parte, a redução do colesterol total observada em nossos animais, que mesmo mantidos em dietas hipercolesterolemizantes poderiam expressar receptores de LDL e promover a sua captação.

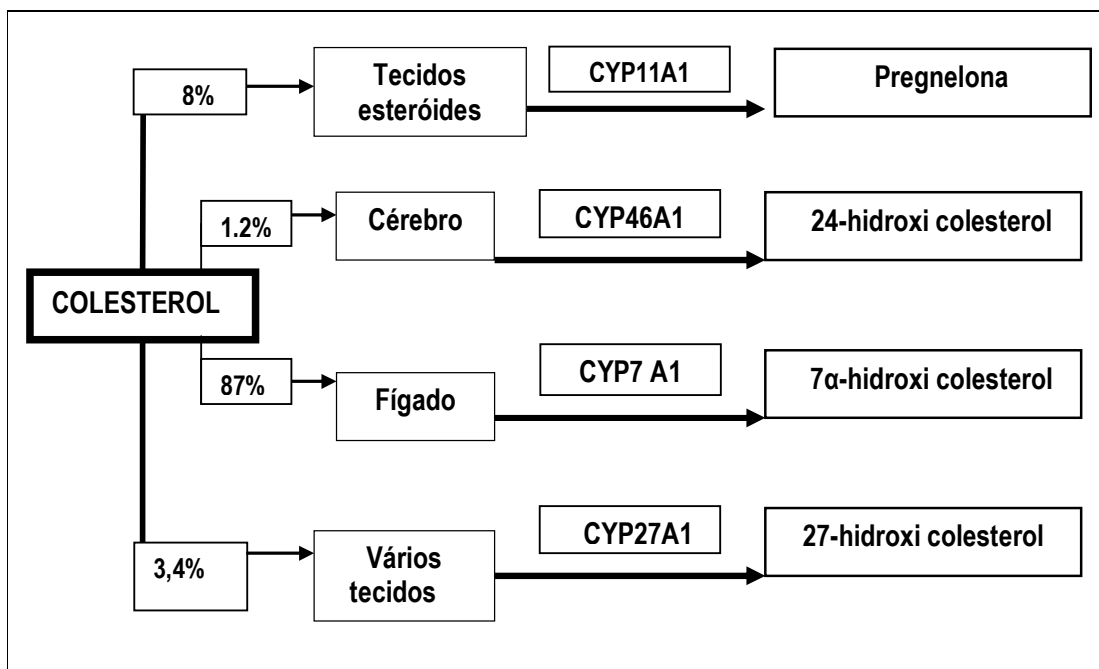
Uma vez internalizado o colesterol, em função da maior captação, surgiria a seguinte questão: que via metabólica este colesterol tomaria no fígado?

O colesterol tem vários destinos no organismo, onde quatro enzimas denominadas citocromo P450 (CYP) catalisam os primeiros passos em diferentes vias do seu metabolismo (Figura 27), embora quantidades significativas sejam metabolizadas apenas nos hepatócitos (Pikuleva, 2006).

O colesterol afeta diretamente duas enzimas que são vitais na sua própria remoção. Alta concentração de colesterol ativa a *Acyl-CoA cholesterol acyl transferase* ACAT e a colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1) (Weber *et al.*, 2004).

As duas isoformas da ACAT conhecidas (ACAT-1 e ACAT-2) esterificam o colesterol para ser armazenado no fígado ou transportado para outros tecidos para utilização. Esta enzima catalisa a transferência de um ácido graxo da coenzima A para o grupo hidroxila do colesterol, que se torna ainda mais hidrofóbico (Leninhger, 2004; Weber *et al.*, 2004). A função principal de ACAT-1 é prevenir acúmulos de colesterol livre em membranas celulares. Já a ACAT-2 pode exercer um papel primário na síntese e secreção de lipoproteínas hepáticas e na absorção de colesterol do intestino delgado (Lee & Carr, 2004).

No fígado o colesterol pode ser excretado através de duas vias diferentes: secreção direta na bile, ou, através da conversão em ácidos biliares, os principais produtos de sua degradação.

Figura 12: Diferentes vias metabólicas do colesterol.

Adaptado de Pikuleva, 2006.

Em mamíferos, o excesso de colesterol é removido principalmente por conversão para ácidos biliares (Turley & Dietschy, 1982). Assim, a compreensão da regulação dessa via é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos que controlam os níveis de colesterol.

A conversão do colesterol a 7- α -hidrocolesterol, catalisada pela enzima hepática específica Citocromo P450 7A (CYP7A1) é a etapa limitante da velocidade da via clássica que converte colesterol em ácidos biliares (Gupta *et al.*, 2002). Estudos têm mostrado que a transcrição de CYP7A1 é inibida por mecanismo “*feed-back*” pelos ácidos biliares e que a regulação de CYP7A1 através de colesterol dietético parece variar de acordo com a espécie (Chiang, 1998). O colesterol dietético induz a expressão de CYP7A1 em ratos (Horton *et al.*, 1995) e camundongos (Goodwin, *et al.*, 2003). Em contraste, colesterol dietético apresenta pequeno efeito, ou até mesmo, suprime a expressão de CYP7A1 em outras espécies, tais como hamsteres (Horton *et al.*, 1995) e coelhos (Xu, *et al.*, 1995).

Comparando os efeitos de dietas contendo diferentes quantias de colesterol (148, 296, 740, 1.480, 2.960 mg/1.000 kcal) em hamsteres Golden Syrian e ratos, Horton *et al.* (1995) verificaram que estas dietas hipercolesterolêmicas não induziram aumento da expressão da CYP7A1 em hamsteres. Assim, hamsteres e coelhos desenvolvem hipercolesterolemia mais facilmente do que ratos.

Dois receptores nucleares, o receptor hepático X (LXR) o receptor “*farnesoid*” (FXR), têm sido implicados na regulação transcricional por “*feed-back*” da atividade da CYP7A1 (Gupta *et al.*, 2002).

Receptores nucleares X (*Liver X Receptors* ou LXR) são membros da super família de proteínas de receptores nucleares (Zhang & Mangelsdorf, 2002; Lehmann, *et al.*, 1997). LXRs apresentam duas isoformas funcionais: LXR α e LXR β . O primeiro é expresso predominantemente no fígado e abundante em tecidos envolvidos no metabolismo de lipídios (Repa & Mangelsdorf, 2000). O segundo é expresso em quase todos os tecidos do organismo (Cortés, *et al.*, 2005).

Segundo dados da literatura, especificamente o LXR α está envolvido na regulação de transcrição do gene da CYP7A1. Lehmann *et al.* (1997) demonstraram que LXR α promove a transcrição do gene da CYP7A1 se ligando diretamente a um LXRE (promotor do gene do receptor de LXR) no promotor deste gene.

Peet *et al.*, 1998 verificaram que camundongos “*knock-out*” para LXR α perdem a habilidade de promover a expressão do gene da CYP7a1, acumulando ésteres de colesterol no fígado, o que pode levar ao comprometimento da função hepática.

Em algumas espécies, o colesterol dietético induz “*up-regulation*” na expressão do gene da CYP7A1 (Repa & Mangelsdorf, 2000). Evidências indicam também, que em hamsteres e em hepatócitos humanos prevalece um controle negativo de LXR α , que reprime a expressão de CYP7A1, ou seja, um mecanismo de “*downregulation*”. Investigando a regulação da enzima CYP7A1 em hamsteres *Golden syrian*, Fabiani *et al.* (1996) verificaram que o gene desta enzima sofre uma regulação predominantemente negativa nestes modelos, o oposto do gene homólogo da CYP7A1 de ratos.

Objetivando examinar os efeitos de certas drogas, esteróis, oxiesteróis e ácidos biliares na modulação da atividade da 27-hidroxilase e da CYP7A-1 em hamsteres, de ambos os sexos, com diferentes idades e dietas, Souidi *et al.* (1999) observaram que hamsteres machos e fêmeas exibiram atividade semelhante para 27-hidroxilase porém, a atividade de 7 α -hidroxilase foi mais baixa em fêmeas quando comparada aos machos, sugerindo que as duas enzimas, importantes na síntese de ácidos biliares são reguladas separadamente.

FXR e LXR α coordenadamente regulam a síntese de ácidos biliares no fígado. Quando aumentam os níveis de ácido biliar nos hepatócitos, FXR inibe CYP7A1 e a CYP8B1 (enzima que sintetiza ácido cólico e quenodeoxicólico) para reduzir a síntese de ácidos biliares e assim, reduzindo também a absorção de ácidos biliares nos hepatócitos.

Desta forma, FXR funciona mantendo a homeostase de ácidos biliares no fígado (Chiang, 2003; Sinal *et al.*, 2000).

Nós verificamos os níveis de gordura e o colesterol no fígado. Na relação fígado/peso corporal, observamos que a dieta hipercolesterolemiaante levou a um aumento do peso deste órgão quando comparado ao grupo controle; este aumento do órgão, em função de dieta hipercolesterolemiaante também foi obtido por Story *et al.* (1981) e Rosa *et al.* (1998).

Nossos resultados mostraram que de fato, os animais tratados com bixina apresentaram maior teor de gordura e colesterol no fígado (Tabela VI) embora, o peso relativo deste órgão no grupo HB foi estatisticamente menor que o grupo H.

Desse modo, podemos supor que a bixina estaria interferindo no SREBP aumentando a síntese do receptor de LDL, reduzindo o colesterol sérico. O aumento do colesterol no fígado estimularia a atividade da CYP7 α em ratos, mas a literatura mostra que em hamsteres, principalmente fêmeas, não é que justifica o maior acúmulo de gordura e colesterol no fígado dos hamsteres. Assim, em trabalhos futuros seria imprescindível verificar a expressão de receptores para LDL e CYP7A bem como a sua atividade posto que as observações feitas com relação ao perfil lipídico podem ser somente resultante de uma injúria celular o que levaria ao metabolismo precário e conseqüente acúmulo de gordura no fígado.

Como o fígado é um órgão central na homeostase de lipídeos, era necessário verificarmos se as alterações vistas poderiam estar associadas à lesão hepática. Então, dosamos os níveis de atividade da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) que são parâmetros da função hepática.

A AST está distribuída nos tecidos corporais, incluindo coração e músculo e aproximadamente 80% nos hepatócitos aparecem localizadas na mitocôndria enquanto a ALT é encontrada principalmente no fígado, fora da mitocôndria. As aminotransferases estão presentes nos hepatócitos e qualquer lesão tissular suficiente para destruir membranas celulares, afetando o parênquima hepático libera uma maior quantidade de enzimas para a corrente sanguínea (Henry, 1996).

Nossos resultados indicaram que o tratamento com bixina não alterou as concentrações séricas de AST e ALT nos grupos tratados. A dieta influenciou as concentrações de ambas as enzimas indicando que os animais que receberam dieta hipercolesterolemiaante apresentaram valores aumentados tanto de AST quanto de ALT.

Beynen *et al.*, 1986 também obtiveram elevação dos níveis de ALT e AST associados à dieta hipercolesterolemiantes. Isto indica que a sobrecarga dietética de lipídeos no grupo H causou possível lesão hepática.

Em nossos resultados, no grupo HB os valores obtidos para transaminases indicam que este aumento estaria associado somente à dieta e não ao tratamento. Neste caso o tratamento não induziu lesão hepática. O que foi confirmado quando dosamos fosfatase alcalina, que também não foi alterada pelo tratamento. A fosfatase alcalina é produzida por muitos tecidos, principalmente pelo fígado e é excretada pela bile. A dosagem sérica desta enzima também é útil na investigação de doenças hepatobiliares.

Para a ALT e AST, resultados diferentes dos nossos foram obtidos por Lima *et al.* (2003) que ao avaliar a ação terapêutica da quercetina, bixina e norbixina, na dose diária de 0,01mol/kg em coelhos, durante 28 dias, observaram que a bixina apresentou uma redução (45,43%) na atividade de ALT e de AST (42,22%). Os resultados mostraram que os teores de colesterol foram menores para os animais tratados com bixina (-4,03%) e quercetina (-35,07%).

Em nosso estudo notamos também que a dieta hipercolesterolemiantes afetou o peso dos rins dos animais do grupo H, e que com o tratamento com bixina, o peso dos rins do grupo HB apresentou valores estatisticamente iguais ao grupo C.

Estudos que analisaram o papel dos lipídeos na progressão das doenças renais sugerem que dislipidemias contribuem tanto para progressão de aterosclerose quanto para doenças renais. Há evidências que anormalidades no metabolismo de lipídeos podem contribuir para progressão de doenças renais (Abrass, 2004; Moorhead *et al.*, 1982; Kasiske *et al.*, 1988; Kees-Folts *et al.*, 1993; Joles *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2000; Zager *et al.*, 2001).

Estes estudos sugerem que excessivo colesterol dietético em animais experimentais poderia associar-se ao desenvolvimento de dano de glomerular e que o tratamento de animais hiperlipidêmicos com drogas redutoras de lipídeos possa prevenir o desenvolvimento de danos renais (Kamanna *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2005).

Estudos histológicos e histoquímicos em animais têm mostrado depósitos contendo colesterol, fosfolipídios, triglicérides e LDL oxidado nos rins (Wheeler & Bernard, 1994).

Ishiyama *et al.* (1999) analisando o papel de radicais livres e da peroxidação lipídica em glomerulosclerose induzida por lipídeos, verificaram que dieta hipercolesterolemiantes causou dano renal em ratos. Neste trabalho os dados sugerem que radicais livres poderiam estar envolvidos neste processo.

Estudos utilizando ratos, como modelos experimentais, mostraram que hipercolesterolemia acelera a taxa de progressão de doença renal e que dieta rica em colesterol leva a infiltração de macrófago e formação de células em espuma (Hattori *et al.*, 1999). Dados de experiências em animais sugerem que tratamento que corrige hiperlipidemia possa ter um efeito positivo na função renal (Grone *et al.*, 1994).

Fried *et al.* (2001) em estudo envolvendo 404 pacientes, demonstraram que o uso de fármacos hipolipemiantes estava associado a um efeito protetor da progressão da disfunção renal. Alimentando ratos com dieta hipercolesterolemia (3% de colesterol e 0.6% de colato), (Hattori *et al.*, 1999) sugerem que hipercolesterolemia possa induzir uma resposta pró-inflamatória em glomérulos renais.

Disfunções renais podem ser avaliadas através de dosagens de alguns parâmetros como uréia e creatinina associadas. Dosamos, então, parâmetros da função renal.

Observamos que em nossos animais, os níveis séricos de creatinina e uréia não foram afetados pelo tratamento com bixina.

Com os resultados de Silva *et al.*, 2001, que avaliando a ação da bixina no estresse oxidativo induzido por cisplatina em ratos Wistar, verificaram que o tratamento com bixina reduziu o número total de aberrações cromossômicas, inibiu o aumento de peroxidação de lipídios, inibiu depleção de glutathione renal induzida, sugerindo um efeito nefroprotetor da bixina.

Lima *et al.*, 2003 avaliando a ação terapêutica de bixina e norbixina, na dose diária de 0,01mol/kg em coelhos, observaram que a bixina foi a que mais reduziu níveis de creatinina (12,88%), de uréia (30,83%) e segundo os autores, embora estes valores tenham sido alterados, os seus níveis continuaram dentro da faixa de valores normais para coelhos, é de 0,8 a 2,57mg/dL.

Os resultados apresentados com tratamento com bixina no grupo HB para peso nos rins sugerem um possível efeito nefroprotetor nos animais tratados corroborando dados na literatura.

Nos animais normocolesterolêmicos tratados com a bixina (CB) houve redução nos níveis de albumina sérica (Tabela X).

A concentração da albumina no soro varia em função da síntese, do catabolismo e de sua distribuição entre os compartimentos intra e extravasculares (Nicholson *et al.*, 2000; Murray *et al.* 1994). Devido à sua relação com o aporte protéico e à produção no parênquima hepático, seus níveis plasmáticos são frequentemente utilizados como parâmetro para avaliação do estado nutricional e função hepática (Peters, 1977; Berne & Levy, 1988).

A síntese de albumina requer um adequado suprimento de aminoácidos (Peters, 1977) e energia (Nicholson *et al.*, 2000). Deficiência de aminoácidos, não seria o caso, pois a dieta padrão de nossos animais foi elaborada para suprir o animal em termos nutricionais. Mas a síntese de albumina também é estimulada pela insulina, tiroxina e cortisol (Margarson & Soni, 1998) e mudanças na pressão coloidosmótica no fluido intersticial são importantes reguladores (Nicholson *et al.*, 2000). A albumina está envolvida também, no transporte de uma ampla variedade de substâncias fisiológicas como ácidos graxos de cadeia longa, bilirrubina, ácidos biliares, hormônios esteróides, tiroxina e pequenos íons (Margarson & Soni, 1998; Peters, 1977; Nicholson *et al.*, 2000). Uma vez que os animais do grupo CB apresentaram redução significativa de glicose sérica, não sabemos se esta redução poderia estar interferindo na síntese de albumina, já que outros fatores também podem estar envolvidos. A síntese de albumina e a homeostase da glicose (degradação do glicogênio e gliconeogênese) são funções hepáticas, pode ser que de alguma forma a bixina esteja alterando esta função. A tendência de aumento da atividade para a AST no grupo CB apóia esta hipótese, que deverá ser comprovada em estudos posteriores por análise histopatológica. Além disto, a oferta de energia parece ter importância na produção fisiológica de albumina, já que além de aminoácidos, a ingestão de energia influencia diretamente a síntese sua síntese sob circunstâncias fisiológicas (Princen *et al.*, 1983).

Como mencionado, nossos os animais submetidos à dieta padrão e tratados com bixina (CB) tiveram redução significativa nos níveis de glicose (Tabela XI).

Em condições normais, após as refeições, o fígado é o primeiro tecido a ter oportunidade de remover glicose do sangue portal. No fígado a captação de glicose ocorre por difusão facilitada por meio de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) responsáveis pelo influxo do substrato no período pós-prandial, e pelo efluxo da glicose no período pós-absortivo e no jejum (Silva *et al.*, 2005).

Os transportadores de glicose são uma família de proteínas com 14 membros, denominadas GLUTs, que permitem a difusão de glicose, por gradiente de concentração, através da membrana plasmática das células. As primeiras 5 variantes descritas (GLUTs 1 a 5) parecem ser as principais, e têm sido foco de estudos que buscam caracterizar os fluxos de glicose, tanto em situações fisiológicas como fisiopatológicas. Os hepatócitos expressam predominantemente a isoforma GLUT-2 (Machado *et al.*, 2006).

No hepatócito, a glicose é então, fosforilada através da glicoquinase. Em situações de hiperglicemia, aumenta a expressão de GLUT-2 no fígado, o que decorre da ativação do fator transcricional SREBP (Im *et al.*, 2005).

Evidências na literatura sugerem que SREBP-1c é o principal mediador da ação da insulina na expressão hepática de genes e um regulador fundamental no metabolismo de glicose e lipídios hepáticos (Foretz *et al.*, 1999; Fofelle & Ferré, 2002; Horton *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998), inclusive da glicoquinase (Foretz *et al.*, 1999a).

Foretz *et al.* (1999b) sugerem que o efeito estimulatório exercido pela insulina na síntese de ácidos graxos é mediado por um aumento no SREBP-1c. Isto justificaria aumento de gordura hepática. Estudando a toxicidade de extrato de *annatto* em ratos e camundongos (0,8, 7,5 e 68 mg/kg), Fernandes *et al.* (2002) observaram nestes animais hiper e hipo insulinemia, respectivamente.

Mais uma vez podemos supor que a bixina caso esteja ativando SREBP, levaria à redução do colesterol sérico, via aumento da expressão de receptores de LDL, acúmulo de gordura hepática (vide Foretz *et al.*, 1999b) e redução da glicose.

As conseqüências fisiológicas da super-expressão hepática de SREBP-1c é um aumento no conteúdo hepático de glicogênio e triacilglicerol e uma diminuição marcada na hiperglicemia de camundongos diabéticos (Bécard *et al.*, 2001).

Além disso, tratamento de ratos com agonistas seletivos de LXR ou RXR induz aumento (4 x) na expressão de RNAm de SREBP-1, como também na expressão das principais enzimas lipogênicas no fígado (Repa *et al.*, 2000).

Diante do exposto e dos resultados obtidos, há várias perspectivas, tais como: analisar a efetiva atuação da bixina na expressão dos genes e receptores de lipoproteínas plasmáticas; verificar a expressão de RNAm dos fatores transcricionais envolvidos na homeostase de colesterol; utilizar diferentes doses para comprovar o potencial hipoglicemiante da bixina, bem como usando modelos experimentais de diabetes; avaliar a produção de ácidos biliares; utilizar outros parâmetros da ação antioxidante e produtos de ação de radicais livres, tais como lipoperóxido e radicais carbonila em proteínas.

7 - CONCLUSÃO

1. Após 15 dias hamsteres alimentados com a dieta hipercolesterolemiantes apresentaram hipercolesterolemia, hiperglicemia e redução da atividade da paraoxonase, comparado aos hamsteres que receberam dieta padrão.
2. Após 60 dias de tratamento com a dieta hiper os hamsteres permaneceram hipercolesterolêmicos, com menor atividade da paraoxonase, mas a glicemia igual a do grupo controle.
3. A dieta hipercolesterolemiantes promoveu redução da concentração de sulfidrilas de baixo peso molecular e aumento da atividade da catalase, sugerindo aumento do estresse oxidativo.
4. A dieta hipercolesterolemiantes promoveu aumento do peso e redução do peso dos rins. Também promoveu aumento da gordura hepática.
5. As atividades das enzimas ALT e AST e fosfatase alcalina estão nos hamsteres que receberam dieta hiper.
6. Nos animais hiper tratados com bixina foram observados: redução do colesterol total (< 22%) e todas as suas frações, HDL (< 22%), LDL + VLDL (< 28%); restabelecimento do peso dos rins.
7. A bixina não restabeleceu os efeitos da dieta hiper com relação às defesas antioxidantes (PON, catalase e sulfidrilas) e as atividades das aminotransferases.
8. Nos animais controle e hiper o tratamento com bixina provocou aumento na concentração de gordura hepática e aumento da relação HDL/CNHDL.
9. Somente nos animais controle a bixina promoveu redução dos níveis de glicose.

Em conjunto os dados sugerem que a bixina pode alterar o metabolismo de lipídeos, resultando numa alteração do perfil sérico e hepático de lipídeos.

Os resultados mostram também que a dieta hipercolesterolemiantes altera o perfil de defesas antioxidantes, mas o tratamento utilizado no presente experimento não reverte tais efeitos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. (2001) *Arq. Bras. Cardiol.* **77**(supl. III):1-48.
- Abrass, C. K. (2004) Cellular Lipid Metabolism and the Role of Lipids in Progressive Renal Disease. *Am J Nephrol.* **24**:46–53.
- Agarwal, K.; Mukherjee, A.; Chakrabarti, J. (1994) *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to natural food colourings. *Food and Chemical Toxicology.* **32**(9):837-838
- Agner, A. R.; Barbisan, L. F.; Scolastici, C.; Salvadori, D. M. F. (2004) Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology.* **42**:1687–1693.
- Ames, B. N. (1989) Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Res.* **214**:41-46.
- Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:7915-7922.
- Antunes, L. M. G.; Pascoal, L. M.; Bianchi, M. L. P., Dias, F. L (2005) Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. *Mutation Reserch.* **585**:113-119.
- Association of Official Analytical Chemists (1980) Official Methods of Analysis 1980 AOAC Washington, D.C.
- Aviram, M.; Rosenblat, M.; Bisgaier, C. L.; Newton, R. S.; Primo-Parmo, S.; La Du, B. N. (1998). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase: *Jornal of Clinical Investigation.* **101**:1581-1590.
- Ayyad, N.; Cohen, B. I.; Mosbach, E. H.; Mikami, T.; Mikam, Y.; Ohshimaz, A. (1995) Hormonal control of cholesterol cholelithiasis in the female hamster. *Journal Lipid Research.* **36**:1483-1488.
- Bagchi, K. & Puri, S. (1998) Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal.* **4**(2):350-360.
- Bahia, L.; Aguiar, L. G. K.; Villela, N. R.; Bottino, D.; Bouskela, E. (2004) Endotélio e aterosclerose. *Rev. SOCERJ.* **17**(1):18-24.
- Barreiros, A. L. B. S.; David J. M. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Quim. Nova.* **29**(1):113-123.

- Bautista, A. R. P. L.; Moreira, E. L. T.; Batista, M. S.; Miranda, M. S.; Gomes, I. C. S. (2004) Subacute toxicity assessment of annatto in rat. *Food Chemical Toxicol.* **42**:625-629.
- Bean, J. W. (1945) Effects of oxygen at increased pressure. *Physiol Rev.* 25:1-4. In: Miquel, J. & Ramírez-Boscá, A. (2004) Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars Pharm.* **45**(2):91-109.
- Bécard, D.; Hainault, I. D.; Azzout-Marniche, D.; Bertry-Coussot, L.; Ferre, P.; Foufelle, F. (2001) Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes.* **50**:2425-2430. In: Foufelle, F. & Ferre, P. (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* **366**:377-391.
- Beltowski, J.; Wojcicka, G.; Jamroz, A. (2002). Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Journal Pharmacology.* **54**(6):661-71
- Beltowski, J.; Wojcicka, G.; Mydlarczyk, M.; Jamroz, A. (2002) The effect of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPARalpha) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (PON1) activity. *Journal Physiology Pharmacology.* **3**:463-75.
- Berne, R. M. & Levy, M. N. (1988) Fisiologia celular 4ª ed. Guanabara. São Paulo.
- Berry, E. M. & Kohen R. (1999) Is the biological antioxidant system integrated and regulated? *Medical Hypotheses* **53**(5):397-401.
- Bert, P. (1943) Barometric Pressure: Researches in Experimental Physiology, translated by Hitchcock MA. Hitchcock FA. Columbus: College Book. In: Miquel J. & Ramírez-Boscá A. (2004) Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars Pharm* **45**(2):91-109.
- Beynen, A. C.; Katan, M. B.; Van; Z. L. F. M. (1987) Hypo and hyper responders: individual differences in the responses of serum cholesterol concentration to changes in diet. *Adv. Lipid Res.* 22:115-171. IN: Ness, C. N. & Chambers, C. M. (2000) Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *P.S.E.B.M.* **224**:8-19.
- Bonnes, T. & Guérin, T. (1992) Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? *Biochemical Pharmacology.* 44(5):985-988. In: Mafra, D.; Abdalla, D. S. P.; Cozzolin, S. M. F. (1999) Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Rev. Nutr.* **12**(3):205-212.

- Borradaile, N. M.; Dreu, L. E.; Huff, M. W. (2003) Inhibition of net hepg2 cell apolipoprotein b secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes* **52**:2554–2561.
- Brandão, M. E. C. M.; Brandão, A. A.; Freitas, E. V.; Pozzan, R.; Brandão, A. P. (2004) Novas Perspectivas no Tratamento das Dislipidemias. *Rev. SOCERJ*. **17**(2):105-111.
- Bravo, E.; Cantafora, A.; Calcabrini, A.; Ortu, G. (1994) Why prefer the golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) to the Wistar rat in experimental studies on plasma lipoprotein metabolism? *Biology*. **107**:347-355.
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The Faseb Journal*. **9**:1551-1558.
- Burton, G. W. & Ingold, K. U. (1994) β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**:569–573.
- Carvalho, F. R.; Toledo, T. O.; Nagem, T. J.; Stringheta, P. C.; Júnior, D. B. F. (2004) Effect of the naringenine and bixin associated with goat milk on lipid metabolism of rabbits. *Rev. Chil. Nutr.* **21**(1):177-182.
- Chen, G.; Liang, G.; Ou, J.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:11245-11250.
- Chiang, J. Y. L. (1998) Regulation of bile acid synthesis. *Front. Biosci.* **3**:176–193.
- Chiang, J. Y. L. (2003) Bile Acid Regulation of Hepatic Physiology. III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G349–G356.
- Chien, P.; Chen, Y.; Lu, S.; Fuu, S.F. (2005) Dietary Flavonoids Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes *Journal of Food and Drug Analysis*. **13**(2):168-175.
- Chung-Man, H. J.; Zheng, S.; Comhair, S. A.; Farver, C.; Erzurum, S. C. (2001) Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* **61**:8578-8585.
- Cortés, V.; Quezada, N.; Rigotti, A.; Maiz, A. (2005) Nuevos receptores nucleares heterodiméricos: reguladores metabólicos con impacto en fisiopatología y su proyección terapéutica en dislipidemias y diabetes mellitas. *Rev. Méd Chile*. **133**:1483-1492.
- Crowther, M. A. (2005) Pathogenesis of Atherosclerosis. *American Society of Hematology*. 436-441.
- Dávalos, A.; Fernandez-Hernando, C.; Cerrato, F.; Martinez-Botas, J.; Gomez-Coronado, D.; Gomez-Cordoves, C.; Lasuncion, M. A. (2006.) Red grape juice polyphenols

- alter cholesterol homeostasis and increase ldl-receptor activity in human cells in vitro. *J. Nutr.* **136**:1766–1773.
- De-Oliveira, A. C. A. X.; Silva, I. B.; Rocha, D. A. M.; Paumgaartten, F. J. R. (2003) Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**(1):113-117.
- Di Mascio, P.; Devasagayam, T. P. A.; Kaiser, S.; Sies, H. (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Society Transactions* **18**:1054–1056.
- Di Mascio, P.; Murphy, M. E.; Sies, H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**:194-200.
- Dominguez, J. H.; Tang, N.; Xu, W.; Evan, A. P.; Siakotos, A. N.; Agarwal, R.; Walsh, J.; Deeg, M.; Pratt, J. H.; March, K. L.; Monnier, V. M.; Weiss, M. F.; Baynes, J. W. Peterson, R. (2000) Studies of renal injury III Lipid-induced nephropathy in type II diabetes. *Kidney Int.* **57**:92–104. In: Abrass, C.K. (2004) Cellular Lipid Metabolism and the Role of Lipids in Progressive Renal Disease. *Am J Nephrol.* **24**:46–53.
- Droge, W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Rev. Physiol.* **82**:47–95.
- Durrington, P. N.; Mackness, B.; Mackness, M. I. Paraoxonase and atherosclerosis (2001) Arteriosclerosis. *Thrombosis and Vascular Biology.* **21**:473-480.
- El-Agamey, G. M.; Lowe, D. J; McGarvey, A.; Mortensen, D. M; Phillip, T. G; (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties *Archives of Biochemistry and Biophysics* **430**(37):48-39.
- Espenshade, P. J. (2006) SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *Journal of Cell Science* **119**:973-976.
- Evans, G. F.; Bensh, W. R.; Alpelgren, D.; Bailey, D.; Kauffman, R. F.; Bumol, T. F.; Zuckerman, S. H. (1994) *Journal of lipid Research.* **35**:1634-1645.
- Fabiani, E. F.; Crestani, M.; Marrapodi, M.; Pinelli, A.; John, Y. L.; Chiang, A. J. Y. L; Galli, G. (1996) Regulation of the hamster cholesterol 7a-hydroxylase gene (CYP7A): prevalence of negative over positive transcriptional control. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **226**:663–671.
- Fang, Y. Z.; Yang, S.; Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. **18**(10):872-878.
- Ferré, P. & Foufelle, F. (2007) SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm. Res.* **68**:72–82

- Field, F. J.; Born, E.; Murthy, S.; Mathur, S. N. (2001) Regulation of Sterol Regulatory Element-binding Proteins in Hamster Intestine by Changes in Cholesterol Flux. *J. B. C.* **276**(20):17576–17583.
- Filho, R. D. S. & Martinez, T. L. R. (2002) Fatores de risco para doença cardiovascular: velhos e novos fatores de risco, velhos problemas ! *Arq Bras Endocrinol Metab.* **46** (3):212-214.
- Ferreira, S. R. C.; Rocha, A. M.; Saraiva, J. F. K. (2005) Estatinas na doença renal crônica. *Arq. Bras. Cardiol.* **85**(5):45-49.
- Forets, M.; Guichard, C.; Ferre, P.; Foufelle, F. (1999a) Sterol regulatory element binding protein 1-c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis related genes. *P.N.A.S.* **96**(22):12737-12742.
- Foretz, M.; Pacot, C.; Dugail, I.; Lemarchand, P.; Guichard, C.; Le Liepvre, X.; Berthelie-Lubrano, C.; Spiegelman, B.; Kim, J. B. (1999b) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell. Biol.* **19**:3760-3768.
- Foufelle, F. & Ferre, P. (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* **366**:377-391.
- Fridovich, I. (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology* **201**:1203–1209.
- Fried, L. F.; Orchard, T. J.; Kasiske, B. L. (2001) Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis. *Kidney Int.* 59: 260-264. In: Ferreira, S. R. C.; Rocha, A. M.; Saraiva, J. F. K. (2005) Estatinas na doença renal crônica. *Arq. Bras. Card.* **85**(5):45-49.
- Fuhrman, B.; Elis A.; Aviram, M. (2002) Hypocholesterolemic Effect of Lycopene and β -Carotene is related to suppression of sholesterol Synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochemical Biophysical Research Communications.* 233:658-662.
- Fungwe, T. V.; Cagen, L. M.; Wilcox, H. G.; Heimberg, M. (1994) Effects of dietary cholesterol on hepatic metabolism of free fatty acid and secretion of VLDL in the hamster. *Biochemical and Biophysical research communications* **200** (3):1505-1511.
- Gaziano, J. M.; Manson, J. E.; Branch, L. G.; Colditz, G. A.; Willett, W. C.; Buring, J. E. (1995) A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Ann Epidemiol.* **5**:255-260.
- Gershman, R.; Gilbert, D. L.; Nye, S. W.; Dwyer, S.; Fenn, W. O. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119**:623-626.
- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1977) The low-density lipoprotein path-way and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 46:897–930. In: Stocker, R. &

- Keaney, J. F. (2003) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**:1381–1478.
- Goldstein, J. L.; Ho, Y. K.; Basu, S. K.; Brown, M. S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:333–337.
- Gong, Y.; Lee, J. N.; Lee, P. C. W.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Jin Ye, J. (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metabolism.* **3**:15–24.
- Goodwin, B.; Watson, M. A.; Kim, H.; Miao, J.; Kemper, J. K.; Kliewer, S. A. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor Liver X Receptor α . *Molecular Endocrinology.* **17**:386–394.
- Grand-Perret, T.; Bouilliot, A.; Perrot, A. (2001) Scap ligands are potent new lipid-lowering drugs. *Nat Med.* **7**:1332-1338.
- Greenberg, E. R.; Baron, J. A.; Karagas, M. R.; Stukel, T. A.; Nierenberg, D. W.; Stevens, M. M.; Mandel, J. S.; Haile, R. W. (1996) Mortality associated with low plasma concentration of beta carotene and the effect of oral supplementation. *JAMA.* **275**:699–703.
- Grone, E. F.; Walli, A. K.; Grone, H. J.; Miller, B.; Seidel, D. (1994) The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis.* **107**(1):1-13
- Groot, P. H. E.; Pearce, N. J.; Yates, J. W.; Stocker, C.; Sauermelch, C.; Doe, C. C. P.; Willette, R. N.; Olzinski, A.; Peters, T.; D'Epagnier, D.; Kathleen, O.; Morasco, K. O.; Krawiec, J. A.; Webb, C. L.; Aravindham, K.; Burgert, J. M.; Ma, C.; Joseph, P.; Marino, J. P.; Collins, J. L.; Macphee, C. H.; Thompson, S. K.; Jaye, M. (2005) Synthetic LXR agonists elevate LDL in CETP species. *J. Lipid. Res.* **46**:2182-21981.
- Gupta, S.; Pandak, W. M.; Hylemona, P. B. (2002) LXR α is the dominant regulator of CYP7A1 transcription. *Biochemical Biophysical Research.* **293**:338–343.
- Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *J. FASEB.* **1**:358-364.
- Halliwell, B. & Cross, C. E. (1994) Oxygen-derived Species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* **102**(10):5-12.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1991) Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford Univ. Press. 198.
- Halliwell, B. & Chrigo, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**(suppl):215-255.

- Harman, D. (1956) Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* **11**:298–300.
- Hattori, M.; Nikolic-Paterson, D. J. Miyazaki, K.; Isbel, N. M.; Lan, H. Y.; Atkin, R. C.; Kawaguchi, H.; Ito, K. (1999) Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury. *Kidney Int. Suppl.* **71**:S47–S50.
- Harman, D. (1984) Free radical theory of aging: the free radical diseases age 7:111-131. In: MA, J. S. The free radical theory of aging. www.springerlink.com.
- Heinonen, O. P. Albanes, D. (1994) The effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *Engl. J. Med.* **330**:1029-1035.
- Hennekens, C. H.; Buring, J. E.; Manson, J. E.; Stampfer, M.; Rosner, B.; Cook, N. R.; Belanger, C. LaMotte, F.; Gaziano, J. M.; Ridker, P. M.; Willett, W.; Peto, R. (1996) Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* **334**:1145–1149.
- Henry, J. B. (1996) Clinical Diagnosis and Management by laboratory Methods. 19^a ed. Saunders Company.
- Hertog, M. G.; Feskens, E. J.; Hollman, P. C. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study. *Lancet.* **342**:1007–1011.
- Horton, J. D.; Bashmakov, Y.; Shimomura, I.; Shimano, H. (1998) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:5987-5992.
- Horton, J. D.; Cuthbert, J. A.; Spady, D. K. (1995) Regulation of hepatic 7 α -hydroxylase expression and response to dietary cholesterol in the rat and hamster. *J. Biolog. Chem.* **270**(10):5381-5387.
- Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**:1125-1131.
- Im, S.S.; Kang, S.Y.; Kim, S.Y.; Kim, H.I.; Kim, J.W.; Kim, K.S. (2005) Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. *Diabetes.* **54**:1684-1691. In: Machado, U. F.; Schaan, B. D.; Seraphim, P. M. (2006) Transportadores de glicose na síndrome metabólica. (2006) *Arq. Bras. Endoc. Met.* **50**(2):177-189.
- Ishiyama, A.; Atarashi, K.; Minami, M.; Takagi, M.; Kimura, K.; Goto, A.; Omata, M. (1999) Role of free radicals in the pathogenesis of lipid-induced glomerulosclerosis in rats. *Kidney International.* **55**(4):1348-1358.
- JECFA (1982) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Twenty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technical Report Series n° 683.

- Jelinek, D. F.; Andersson, S.; Slaughter, C. A.; Russell, D.W. (1990) Cloning and regulation of cholesterol 7-hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **265**:8190–8197. In: Goodwin, B.; Watson, M. A.; Kim, H.; Miao, J.; Kemper, J. K.; Kliewer, S. A. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor Liver X Receptor α . *Molecular Endocrinology*. **17**:386–394.
- Jewell, C. & O'Brien, N. M. (1999) Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. *British Journal of Nutrition*. **81**:235-242.
- Jialal, I. & Devaraj S. (1996) Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry* **42**(4):498-506.
- Joles, J. A.; Kunter, U.; Janssen, U.; Kriz, W.; Rabelink, T. J.; Koomans, H. A.; Floege, J. (2000) Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**:669–683.
- Kaliora, A. C.; Dedoussis, G. V. Z.; Schmidt, H. (2005) Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*. **18**:1-17.
- Kamanna, V. S.; Roh, D. D.; Kirschenbaum, M. A. (2000) Hyperlipidemia and Kidney disease: concepts derived from histopathology and cell biology of the glomerulus. *Nephrology*. **1**:358-364.
- Kasiske, B. L.; O'Donnell, M. D.; Cleary, M. P.; Keane, W. F. (1988) Treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in obese Zucker rats. *Kidney Int.* **33**:667–672. In: Abrass, C. K. (2004) Cellular Lipid Metabolism and the Role of Lipids in Progressive Renal Disease. *Am. J. Nephrol.* **24**:46–53.
- Kees-Folts, D.; Diamond, J. R. (1993) Relationship between hyperlipidemia, lipid mediators, and progressive glomerulosclerosis in the nephritic syndrome. *Am J Nephrol.* **13**:365–375
- Kim, J. B.; Sarraf, P.; Wright, M.; Yao, K. M.; Mueller, E.; Solanes, G.; Lowell, B. B.; Spiegelman, B. (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.* **101**:1-9. In: Foufelle, F. & Ferre, P. (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *J. Biochem.* **366**:377-391.
- Kiokias, S. & Gordon, M. H. (2003) Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry*. **83**:523–529.
- Kohen, R. & Nyska, A. (2002) Oxidation of Biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **30**(6):620–650.

- Kohlmeier, L. Kark, J. D, Gomez-Gracia, E. (1997) Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study *Am. J. Epidemiol.* **146**:618–26.
- Kris-Etherton, P. M.; R. D; Alice H.; Lichtenstein, A. H.; Barbara, V. Howard, B. V.; Steinberg, D.; Joseph, L. Witztum, J. L (2004) Antioxidant Vitamin Supplements and Cardiovascular Disease. *Circulation.* **110**:637– 641.
- Kritchevsky, S. B.; Shimakawa, T.; Tell, G. S.; Dennis, B.; Carpenter, M. S. (1995) Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulatio.* **92**:2142–2150.
- Kritchevsky, S. B. (1999) β -Carotene, Carotenoids and the Prevention of Coronary Heart Disease. *J. Nutr.* **129**:5–8.
- Lee, J. Y. & Carr, T. P. (2004) Dietary fatty acids regulate Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase and cytosolic cholesteryl ester hydrolase in hamsters. *J. Nutr.* **134**: 3239–3244.
- Lehmann, J. M.; Kliewer, S. A.; Moore, L. B. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* **272**:3137–3140.
- Lenhinger, A. Q. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2002) Lehninger Princípios de Bioquímica. 3ª ed. São Paulo. Savier.
- Levy, Y.; Zaltsberg, H.; Ben-Amotz, A. (2000) Dietary supplementation of a natural isomer mixture of β -carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus. *Ann. Nutr. Metab.* **44**:54–60. IN: Kaliora, A. C.; Dedoussis, G. V. Z.; Schmidt, H. (2005) Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* 1-17.
- Lima, L. R. P.; Oliveira, T. T.; Nagem, T. J.; Pinto, A. S.; Stringheta, P. C.; Tinoco, A. L. A.; Silva, J. F. (2001) Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **38**(4):28-32.
- Lima, L. R. P.; Oliveira, T. T.; Nagem, T. J. (2003) Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. *Rev. Nutr.* **16**(3):305-314.
- Lin, Y.; Burri, B. J.; Neidlinger, T. R.; Muller, H. G.; Dueker, S. R.; Clifford, A. J. (1998) Estimating the concentration of beta-carotene required for maximal protection of low-density lipoproteins in women. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**:837–845.
- Liu, G. L.; Fan, L. M.; Redinger, R. N. (1991) The association of hepatic apoprotein and lipid metabolism in hamsters and rats. *Physiology.* **99**(2):223-228.
- Liu, Y., Fiskum, G.; Schubert, D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry* **80**:780-787.

- Lock, A. L.; Horne, C. A. M.; Bauman, D. E.; Salter, A. M. (2005) Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *J. Nutr.* **135**:1934–1939.
- Lofland, J. H. B.; Clarkson, T. B. St.Clair, R. W.; Lehner, N. D. (1972) Studies on the regulation of plasma cholesterol levels in squirrel monkeys of two genotypes. *J. Lipid. Res.* **13**:39–47. In: Goodwin, B.; Watson, M. A.; Kim, H.; Miao, J.; Kemper, J. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor Liver X Receptor α . *Molecular Endocrinology*. **17**:386–394.
- Lopez, D. & Ness, G. C. (1997) Inhibitors of 3-hydroxi-3methylglutaril coenzyme A reductase unmask transcriptional regulation on hepatic low-density lipoprotein receptor gene expression by dietary cholesterol. *Arch. Biochem. Biophys* **344**:215–219. In: Ness, C. N. & Chambers, C. M. (2000) Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *P.S.E.M.B.* **224**:8–19.
- Luo, Y. & Tall, A. R. (2000) Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J. Clin. Invest.* **105**:513–520.
- MA, J. S. The free radical theory of aging. www.springerlink.com.
- Machado, U. F.; Schaan, B. D.; Seraphim, P. M. (2006) Transportadores de glicose na síndrome metabólica. (2006) *Arq. Bras. Endoc. Met.* **50**(2):177–189.
- Margarson, M. P. & Soni, N. (1998) Serum albumin: touchstone or totem? *Anaesthesia*. **53**:789–803.
- Martin, K. R.; Failla, M. L.; Smith, J. C. (1996) β -carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant-induced damage. *J Nutr* **126**:2098–2106.
- Martinello, F.; Soares, S. M.; Franco, J. J.; Santos, A. C.; Sugohara, A.; Garcia, S. B.; Curti, C.; Uyemura, S. A. (2006) Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food and Chemical Toxicology* **44**:810–818.
- Matsubara, L. S. (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **43**(1):122–128.
- Mayne, S. T. (2003) Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* **133**:933–940.
- McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**:6049–6055.
- McPherson, R. & Gauthier, A. (2004) Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochemistry Cell Biology*. **82**(1):201–204.

- Miquel, J. & Ramírez-Boscá, A. (2004) Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars. Pharm.* **45**(2):91-109.
- Moghadasian, M. H. (2002) Experimental atherosclerosis. A historical overview. *Life Sciences* **70**:855–865.
- Moorhead, J. F.; Chan, M. K.; El-Nahas, M.; Varghese, Z. (1982) Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. **11**(83):1309-1311.
- Morel, D. W.; Dicorleto, P. E.; Chisolm, G. M. (1984) Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. **4**(8):357-364. In: Xavier, H. T.; Abdalla, D. S. P. A.; Martinez, T. L. R.; Ramires, A. F.; Gagliardi, A. R. T. (2004) Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea *in vitro* de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq. Bras. Cardiol.* **83**(6):124-132.
- Morise, A.; Serougne, C.; Gripois, D.; Blouquit, M. F.; Lutton, C.; Hermier, D. (2004) Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. *Journal of Nutritional Biochemistry* **15**:51–61.
- Morrison, E. Y. A. & West, M. E. (1982) A preliminary study of the effects of some West Indian medicinal plants on blood sugar levels in the dog. *West Indian Med. J.* **31**:194–197. In: Oliveira, J. S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum. *Bixa orellana L.* (2005) Tese de doutorado em engenharia química. Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina. SC.
- Murray, R. K.; Mayes, P. A.; Harper, J. (1999) Bioquímica. 7ª ed. Atheneu. São Paulo.
- Muzandu, K.; Ishizuka, M.; Sakamoto, K. Q.; Shaban, Z.; Bohi, K. E.; Kazusaka, A.; Shoichi F. S. (2006) Effect of lycopene and β -carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicology Applied Pharmacology*. **215**:330–340.
- Nicholson, J. P.; Wolmarans, M. R.; Park, G. R. (2000) The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.* **85**:599-610.
- Niki, E. (2004) Antioxidants and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*. **32**:156-159.
- Nikkari, S. T.; Solakivi, T.; Jakkola, O. (1991) The hyperlipidemic hamster as an atherosclerosis model. *Artery*. **18**:285-290. In: Moghadasian, M. H. (2002) Experimental atherosclerosis. A historical overview. *Life Sciences* **70**:855–865
- Nistor, A.; Bulla, A.; Filip, D. A.; Radu, A. (1987) The hyperlipidemic hamster as a model of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **68**:159-173.
- Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D.; Balmes, J.; Cullen, M. R.; Glass, A.; Keogh, J. P.; Meyskens, F. L.; Valanis, B.; Williams, J. H.; Barnhart, S.; Hammar, S.

- (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **334**:1150–1155.
- Omoni, A. O. & Aluko, R. E. (2005) The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science & Technology* **16**:344–350.
- Orrenius, S.; McConkey, D. J.; Bellomo, G.; Nicotera, P. (1989) Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends. Pharmacol. Sci.* **10**:281-285.
- Pandak, W. M.; Li, Y. C.; Chiang, J. Y.; Studer, E. J.; Gurley, E. C.; Heuman, D. M.; (1991) Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA and transcriptional activity by taurocholate and cholesterol in the chronic biliary diverted rat. *J. Bio.l Chem.* **266**:3416–3421. In: Goodwin, B.; Watson, M. A.; Kim, H.; Miao, J.; Kemper, J. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor Liver X Receptor α . *Mol. Endoc.* **17**:386–394.
- Paumgarten, F. J. R.; Carvalho, R. R.; Araújo, I. B.; Pinto, F. M.; Borges, O. O; Souza, C. A. M.; Kuriyama, S. N. (2002) Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food. Chem. Toxicol.* **40**:1595–1601.
- Pedrosa, J. P.; Cirne, L. E. M. R.; Neto, J. M. M. (1999) Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* **3**(1):121-123.
- Peet, D. J., Turley, S. D.; Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E.; Mangelsdorf, D. J. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell.* **93**:693–704.
- Pertsemlidis, D.; Kirchman, E.H.; Ahrens, E.H. (1973) Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. *J. Clin. Invest.* **52**:2353–2367. In: Goodwin, B.; Watson, M. A.; Kim, H.; Miao, J.; Kemper, J. K.; Kliewer, S. A. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor Liver X Receptor α . *Molecular Endocrinology.* **17**:386–394.
- Peters, T. (1977) Serum albumin: Recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin. Chem.* **23**:5-12.
- Pikuleva, I. A. (2006) Cholesterol-metabolizing in Cytochromes P450. *Drug Metab.* **34**(4):513-520.
- Piyachaturawat, P.; Charoenpiboonsin, J.; Toskulko, C.; Suksamram, A. (1999). Reduction of plasma cholesterol by curcuma comosa extract in hypercholesterolemic hamsters. *J. Ethnopharmacol.* **66**:199-204.
- Polanczyk, C.A. (2005) Fatores de Risco Cardiovascular no Brasil: os Próximos 50 Anos! *Arq. Bras. Cardiol.* **84**(3):199-201.

- Princen, J.M.G.; Mal-Basks, G.R.B.; Yap, S.H. (1983) Restoration effects of glucose refeeding on reduced synthesis of albumin and total protein on disaggregated polyribosomes in liver of starved rats: evidence of post-transcriptional control mechanism. *Ann. Nutr. Metab.* **27**:182-93. In: Santos, N. S. J.; Draibe, S. A.; Kamimura, M. A.; Cuppari L. (2004) Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Rev. Nutr.* **17**(3):339-349.
- Rader, D. J. (2001) A new feature on the cholesterol-lowering landscape. *Nat. Med.* **7**:1282-1284.
- Radomski, M. W. & Salas, E. (1995) Nitric Oxide Biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis (suppl.)* **118**:69-80.
- Repa, J. J.; Liang, G.; Ou, J.; Bashmakov, Y.; Lobaccaro, J. M.; Shimomura, I.; Shan, B.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L.; Mangelsdorf, D. J. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes Dev.* **14**:2819-2830. In: Foufelle, F. & Ferre, P. (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* **366**:377-391.
- Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. (2000) The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**:459-81.
- Robins, S. J.; Fasulo, J. M.; Patton, G. M.; Schaefer, E. J.; Smith, D. E.; Jose M. Ordovas, J. M. (1995) Gender Differences in the Development of Hyperlipemia and Atherosclerosis in Hybrid Hamsters. *Metabolism.* **44**(10):1326-1331.
- Rodrigues, H. G.; Diniz, Y. S.; Faine, L. A.; Almeida, J. A.; Fernandes, A. A. H.; Novelli, E. L. B. (2003) Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol HDL. *Rev. Nutr.* **16**(3):315-320.
- Rokitansky, C. A. Manual of Pathological Anatomy. London: Sydenham Society, 1852. In: Stocker, R.; Hunt, N. H.; Weidemann, M. J.; Clark, I. A. (1986) Protection of vitamin E from oxidation by increased ascorbic acid content within *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **876**: 294–299.
- Romanchik, J. E.; Harrison, E. H.; Morel, D. W. (1997) Addition of lutein, lycopene, or beta-carotene to LDL or serum in vitro: Effects on carotenoid distribution, LDL composition, and LDL oxidation. *J.Nutr. Biochem.* **8**:681–688.
- Rosa, O. B. C.; Costa, N. M. B.; Nunes, R. M.; Leal, P. F. G. (1998) Efeito dos feijões (*Phaseolus vulgaris*) preto, carioquinha e vermelho na redução do colesterol de ratos hipercolesterolêmicos. *Archivos Latino Americanos Nutrição.* **43**(4): 306-310.
- Ross, R. & Glomset, J. A. (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* **180**:1332–1339. In: Stocker, R.; Hunt, N. H.; Weidemann, M. J.; Clark, I. A. (1986) Protection of vitamin E from oxidation by increased

- ascorbic acid content within *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **876**:294–299.
- Ross, R. & Glomset, J. A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* **295**: 369–377. In: In: Stocker, R.; Hunt, N. H.; Weidemann, M. J.; Clark, I. A. (1986) Protection of vitamin E from oxidation by increased ascorbic acid content within *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **876**:294–299.
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340:115–126. In: Stocker, R.; Hunt, N. H.; Weidemann, M. J.; Clark, I. A. (1986) Protection of vitamin E from oxidation by increased ascorbic acid content within *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **876**:294–29.
- Rudel, L.; Deckelman, C.; Wilson, M.; Scobey, M.; Anderson, R. (1994) Dietary cholesterol and downregulation of cholesterol 7-hydroxylase and cholesterol absorption in African green monkeys. *J. Clin. Invest.* **93**:2463–2472. In: Goodwin, B.; Watson, M. A.; Kim, H.; Miao, J.; Kemper, J. K.; Kliewer, S. A. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor Liver X Receptor α . *Molecular Endocrinology*. **17**:386–394.
- Saad, E. A. (2004) Prevenção Primária e Secundária da Aterosclerose: perspectivas atuais e futuras. *Arq. Bras. Cardiol.* **17**(2):112-132.
- Sample, C. E.; Pendleton, L. C.; Ness, G. C. (1987) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase RNAm levels by 1-triiodothyronine. *Biochemistry* **26**:727-731.
- Sandi, M. P. & Cuen, B. R. (2003) Biodiversitas, El Achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. **7**(46):7-11.
- Sasaki, Y. F.; Kawaguchi, S.; Kamaya, A.; Ohshita, M.; Kabasawa, K.; Iwama, K.; Taniguchi, K.; Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research* **519**:103–119. In: Oliveira, J. S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum. *Bixa orellana L.* (2005) Tese de doutorado em engenharia química. Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina SC.
- Sedlak, J.; Lindsay, R. H. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. **25**:192-205.
- Shah, P. K. (2003) Emerging non-statin LDL-lowering therapies for dyslipidemia and atherosclerosis. *Rev. Cardiovasc. Med.* **4**(3):136–141.
- Shaish, A.; Daugherty, A. F. O. S.; Schonfeld, G.; Heinecke, J. W. (1995) β -carotene inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J. Clin. Invest.* **96**:2075–2082.
- Sheng, Z.; Otani, H.; Brown, M. S.; Goldstein, J. I. (1995) Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:935-938.

- Shimano, H.; Yahagi, N.; Amemiya-Kudo, M.; Hasty, A. H.; Osuga, J.; Tamura, Y.; Shionoiri, F.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Harada, K. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* **274**:35832-35839
- Shimomura, I.; Bashmakov, Y.; Shimano, H.; Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (1997) Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Biochemistry.* **94**:12354-12359.
- Shimomura, I.; Bashmakov, Y.; Ikemoto, S.; Horton, J. D.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:13656-13661.
- Sies, H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress*. New York: Academic. 1-8. In: Stocker R., Keaney J. F. (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Rev Physiol.* **84**:1381-1478.
- Sies, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. A. Chemise, International Edition in English 25: 1058-1071. In: Stocker R., Keaney J. F. (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Rev. Physiol.* **84**:1381-1478.
- Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. Review. *Eur. J. Biochem.* **215**(2):213-219.
- Sies, H. & Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition.* **62**(6):1315-1321.
- Silva, C. R.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P. (2001) Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological Research.* **43**(6):561-566.
- Silva, J. L.; Giannocco, G.; Furuya, D. T.; Lima, G. A.; Moraes, P. A.; Nachev, S. (2005) NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **240**(2):82-93. IN: Machado, U. F.; Schaan, B. D.; Seraphim, P. M. (2006) Transportadores de glicose na síndrome metabólica. (2006) *Arq. Bras. Endoc. Met.* **50**(2):177-189.
- Simionescu, M.; Stancu, C.; Costache, G.; Sima, A. (2002) Endothelial cell response to hyperlipemia Activation-dysfunction-injury, the protective role of simvastatin. *Vascular Pharmacology* **38**:275- 282.
- Simonet, W. S.; Ness, G. C. (1988) Transcriptional and post-transcriptional regulation of rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by thyroid hormones. *J. Biol. Chem.* **263**:12448-12453.
- Sinal, C. J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J. M.; Lambert, G.; Gonzalez, F. J. (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* **102**:731-44.

- Singh, R. P. & Kapur, S. (2004) Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*. **5**(3):218-225.
- Souidi, M.; Parquet, M.; Férezou, J.; Lutton, C. (1999) Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Sciences*. **64**(17):1585-1593.
- Spady, D. K.; Turkey, S. D.; Dietschy, J. M. (1983) Dissociation of hepatic cholesterol synthesis from hepatic low-density lipoprotein uptake and biliary cholesterol saturation in female and male hamsters of different ages. *Biochim. Biophys. Acta*. **753**:381-392. In: Ness, C. N. & Chambers, C. M. (2000) Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *P.S.E.M.B.* **224**:8-19.
- Spady, D. K.; Turley, S. D.; Dietschy, J. M. (1985) Rates of low density lipoprotein uptake and cholesterol synthesis are regulated independently in the liver. *J. Lipid. Res.* **26**:465-472.
- Stadtman, E. R. (2003) Role of Oxidant Species in Aging. *Current Medicinal Chemistry*. **11**:1105-1112.
- Stahl, W. & Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **24**:345 –351.
- Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C.; Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**:915–924.
- Stephens, N. G.; Parsons, A.; Schofield, P. M. (1996) Randomised controlled trial of Vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. **347**:781–786.
- Stocker, R. & Keaney, J. F. (2003) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**:1381–1478.
- Stocker, R.; Hunt, N. H.; Weidemann, M. J.; Clark, I. A. (1986) Protection of vitamin E from oxidation by increased ascorbic acid content within *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. **876**:294–299.
- Story, A. J. & Baldino, A. (1981) Modification of cholesterol accumulation by dietary fiber in rats. *Nutrition Reports International*. **24**:1213-1217.
- Stryer, L. (1995). Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Tavani, A.; Negri, E.; D'Avanzo, B.; La Vecchia, C. (1997) Beta-carotene intake and risk of nonfatal acute myocardial infarction in women. *Eur. J. Epidemiol.* **13**:631-637.
- Tennant, D. R. & O'Callaghan, M. (2005) Survey of usage and estimated intakes of annatto extracts. *Food Research International*. **38**:911–917.

- Thresiamma, K. C.; George, J.; Kuttan, R. (1998) Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J. Exper. Clin. Canc. Res.* **17**:431–434.
- Trautwein, E. A.; Siddiqui, A.; Hayes, K. C. (1999) Characterization of the bile acid profile in developing male and female hamsters in response to dietary cholesterol challenge. *Biochem. Physiol.* **124**(1):93-103.
- Trigatti, B. L. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**(10):1732-1738.
- Turley, S. D. & Dietschy, J. M. (1982) The Liver: Biology and Pathobiology. *Raven Press*. IN: Pikuleva I. A. (2006) Cholesterol-metabolizing Cytochromes P450. *Drug Metab.* **34**(4):513-520.
- Turrens, J. F. & Boveris, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *J. Biochem.* **191**:421-427.
- Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**:335-344.
- Tsutsumi, K.; Hagi, A.; Inoue, Y. (2001) The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* **24**(5):579-581.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. (2005) Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**:1161-1208.
- Vannucchi, H.; Moreira, E. A.; Cunha, D. F.; Franco, M. V. M. J.; Bernardes, M.M.; Júnior, A. A. J. (1998) Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: Nutrição Clínica.* **31**:31-44.
- Virchow, R. (1989) Cellular pathology. As based upon physiological and pathological history. Lecture XVI–Atheromatous effection of arteries. *Nutr. Rev.* **47**:23–25. IN: Stocker, R.; Hunt, N. H; Weidemann, M. J.; Clark, I. A. (1986) Protection of vitamin E from oxidation by increased ascorbic acid content within *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **876**:294–299.
- Virtamo, J.; Rapola, J. M.; Ripatti, S.; Heinonen, O. P.; Taylor, P. R.; Albanes, D.; Huttunen, J. K. (1998) Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch Intern Med.* **158**:668–675.
- Weber, L.; W.; Boll, M.; Stampfl, A. (2004) Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol.* **10**(21):3081-3087.
- Wheeler, D. C.; Bernard, D. B. (1994) Lipid abnormalities in the nephrotic syndrome: causes, consequences and treatment. *Am J. Kidney Dis.* **23**:331-346. IN: Majumdar, A. & Wheeler, D. C. (2000) Lipid abnormalities in renal disease. *J. Soc. Med.* **93**:178-182.

- Wei, Y. H. & Lee, H. C. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Soc. Exp. Biol. Med.* 227:671-682.
- Whitney, K. D.; Watson, M. A.; Collins, J. L.; William G. Benson, W. G.; Stone, T. M.; Numerick, M. J.; Tippin, T. K.; Wilson, J. G.; Winegar, D. A.; Klierer, S. A. (2002) Regulation of Cholesterol Homeostasis by the Liver X Receptors in the Central Nervous System. *Molecular Endocrinology*. **16**:1378–1385.
- Wilson, T. A.; Nicolosi, R. J.; Lawton, C. W.; Babiak, J. (1999) Gender differences in response to a hypercholesterolemic diet in hamsters: effects on plasma lipoprotein cholesterol concentrations and early aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **146**(1):83-91.
- Witztum, J. L. (1994) The oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 344:793-795. IN: Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G. (1999) Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* 12(2):123-130.
- Witztum JL, Steinberg D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 88:1785-92. In: França, H. H. (2002) O paradoxo da doença coronariana. *Arq. Bras. Cardiol.* 79(4) 419-421.
- World Health Organization. Report of the WHO Expert Committee on Disability Prevention and Rehabilitation. Disability Prevention and Rehabilitation. Geneva 1981.
- Xavier, H. T.; Abdalla, D. S. P. A.; Martinez, T. L. R.; Ramires, A. F.; Gagliardi, A. R. T. (2004) Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea *in vitro* de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq. Bras. Cardiol.* **83**(6):124-132.
- Xu, G.; Salen, G.; Shefer, S.; Ness, G. C.; Nguyen, L.B.; Parker, T. S. Chen, T. S.; Zhao, Z.; Donnelly, T. M.; Tint, G. S. (1995) Unexpected inhibition of cholesterol-7 α -hydroxylase by cholesterol in New Zealand white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Clin. Invest.* **95**:1497–1504.
- Yang, T.; Espenshade, P. J.; Wright, M. E.; Yabe, D.; Gong, Y.; Aebersold, R.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of Scap to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. **110**:489-500.
- Yoshikawa, T.; Shimano, H.; Amemiya-Kudo, M.; Yahagi, N.; Hasty, A. H.; Matsuzaka, T.; Okazaki, H.; Tamura, Y.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Osuga, J.; Harada, K.; Gotoda, T.; Kimura, S.; Ishibashi, S.; Yamada, N. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein-1c gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**:2991–3000.
- Zalasky, K. M.; Holland, L. (2004) Regulation of cholesterol transport processes in the liver by citrus flavonoids. *Medical Pharmacology and Physiology*. **25**:2654-2658.

- Zecchin, H. G.; Carvalheira, J. B. C.; Saad, M. J. A. (2004) Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo* **4**:574-589.
- Zhang, Y. & Mangelsdorf, D. J. (2002) Luxuries of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing. *Mol. intervention* **2**(2):78-87.
- Zhang, L. X.; Cooney, R.V.; Bertram, J. S. (1991) Carotenoids gap junction communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relations to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*. **12**:2109-2114.

9. ANEXOS

Anexo I – Curva de calibração para a dosagem de aspartato aminotransferase (AST).

Técnica – Foram tomados 5 tubos de ensaio e seguiu-se a tabela abaixo:

Tubo nº	1	2	3	4	5
Padrão	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4
AST substrato	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6
Água deionizada	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Reagente de cor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Os volumes indicados na tabela abaixo são em mL.

Após homogeneização foram deixados na temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada tubo de ensaio 10 mL de NaOH de uso que foram homogeneizados e deixados na temperatura ambiente por 5 minutos. Foram determinadas as absorbâncias em 505 nm.

Padrão: Piruvato de sódio 2mg/dL.

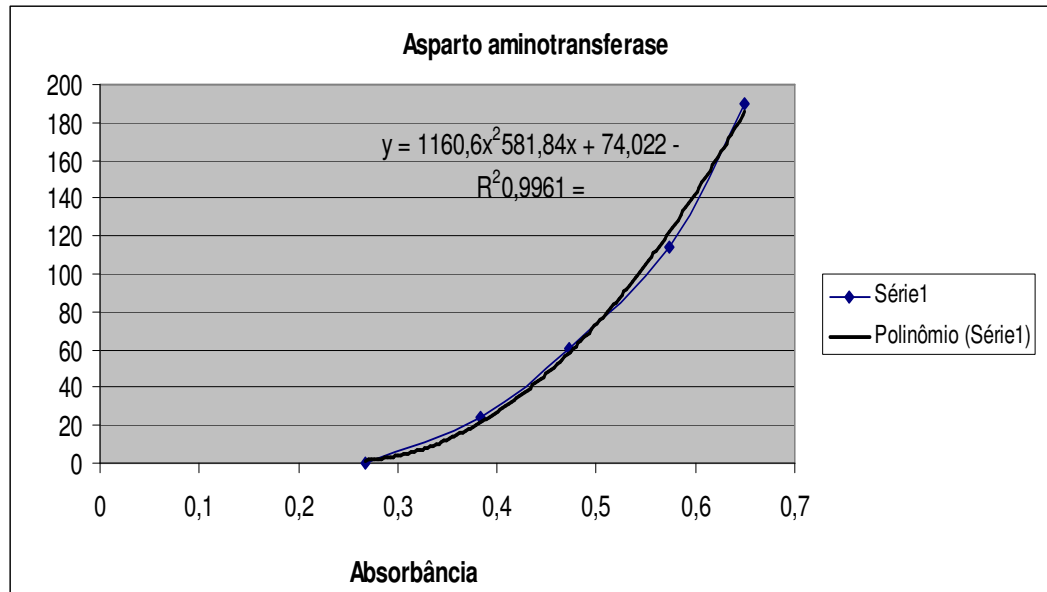
ALT substrato contendo: tampão fosfato 67mmol/L pH 7,4 ácido alfaetoglutárico 2 mmol/L, ácido L-aspartico 99 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/L.

Reagente de cor: 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L.

Padrão U/mL	ABS.
0	0,268
24	0,384
61	0,472
114	0,573
190	0,650

Curva de calibração para dosagem de aspartato aminotransferase (AST).

$$UI = U/mL \times 0,482$$



Anexo II – Curva de calibração para a dosagem de alanina aminotransferase (ALT).

Técnica – Foram tomados 5 tubos de ensaio e seguiu-se a tabela abaixo:

Tubo nº	1	2	3	4	5
Padrão	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4
AST substrato	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6
Água deionizada	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Reagente de cor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

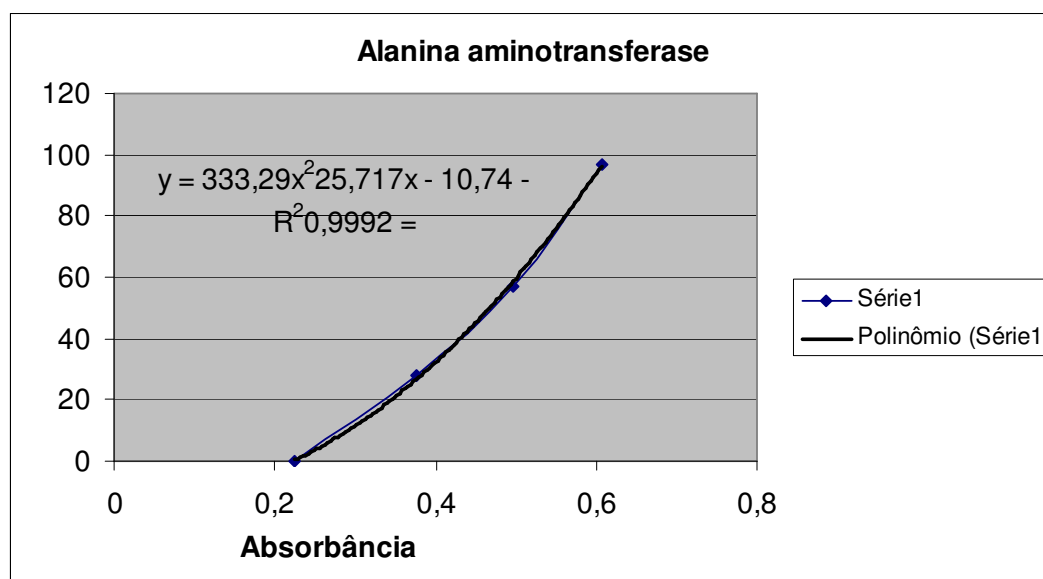
Após homogeneização foram deixados na temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada tubo de ensaio 10 mL de NaOH de uso que foram homogeneizados e deixados na temperatura ambiente por 5 minutos. Foram determinadas as absorbâncias em 505 nm.

- Padrão: Piruvato de sódio 2mg/dL.
- ALT substrato contendo: tampão fosfato 67 mmol/L pH 7,4 ácido alfa-cetoglutarico 2 mmol/L, ácido L-alanina 100 mmol/L.
- Reagente de cor: 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L.

Curva de calibração para a dosagem de alanina aminotransferase

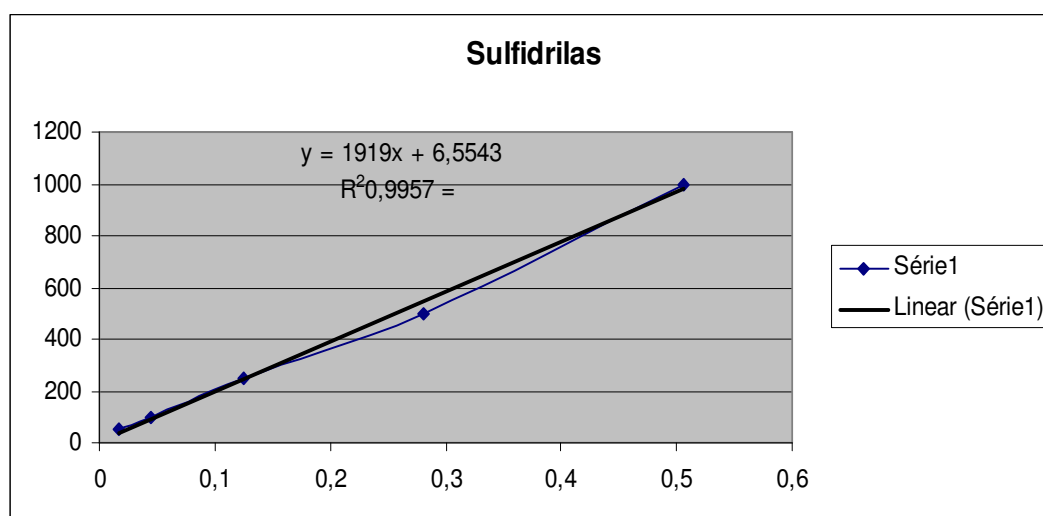
Padrão U/mL	ABS.
0	0,225
28	0,376
57	0,496
97	0,607

$$UI = U/mL \times 0,482$$

**Anexo III – Curva de calibração para a dosagem Sulfidrilas - Curva Padrão**

GSH 1 mM	K 1M/ PH 7,4	TNB 10mM	Água destilada
-	850 µL	50 µL	100 Ml
10 µL	850 µL	50 µL	90 Ml
25 µL	850 µL	50 µL	75 µL
50 µL	850 µL	50 µL	50 Ml
100 µL	850 µL	50 µL	-

Curva	Valores de referência
50	0,017
100	0,017
250	0,125
500	0,28
1000	0,506



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)