



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Papel das antocianinas no contexto da prevenção da aterosclerose: mecanismos moleculares de protecção contra a apoptose e inflamação em células endoteliais

Tese de Doutoramento em Farmácia,
na especialidade de Bioquímica, apresentada
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
para obtenção do grau de Doutor

Orientadores: Prof. Doutora Leonor Martins de Almeida e
Prof. Doutora Teresa do Carmo Pimenta Dinis

Coimbra, 2012

Os estudos apresentados nesta tese foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra no âmbito das actividades do Centro de Neurociências e Biologia Celular.

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela bolsa SFRH/BD/31568/2006 atribuída a Joana Isabel Félix Paixão e pelos projectos POCTI/AGR/59919/2004 e PTDC/SAU-OSM/102907/2008 atribuídos à Prof^a Dr^a Leonor Almeida pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Lisboa, Portugal.

*À memória de minha avó
Celeste Pereira de Carvalho*

Índice

<i>Abreviaturas</i>	I
<i>Resumo</i>	VII
<i>Abstract</i>	XIII
Capítulo 1 – Introdução geral	1
1. <i>O processo aterosclerótico</i>	4
1.1. <i>Endotélio: alvo e mediador da doença cardiovascular</i>	6
1.1.1. <i>Biologia do endotélio, lesão, activação e disfunção</i>	6
1.1.2. <i>Papel do endotélio na aterogénese</i>	9
1.2. <i>Etiologia e fisiopatologia da aterosclerose</i>	10
1.2.1. <i>Etapas da aterogénese</i>	11
1.2.2. <i>Hipóteses mecánísticas da aterogénese</i>	13
1.2.3. <i>As lipoproteínas e a aterosclerose</i>	16
1.2.4. <i>Papel do óxido nítrico na aterosclerose</i>	20
1.3. <i>Aterosclerose e stress oxidativo/nitrosativo</i>	25
1.3.1. <i>Oxidantes intracelulares: espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)</i>	25
1.3.1.1. <i>O anião superóxido e o peróxido de hidrogénio</i>	28
1.3.1.2. <i>Outros oxidantes vasculares</i>	30
1.3.1.3. <i>O caso particular do peroxinitrito</i>	31
1.3.1.3.1. <i>A biosíntese do peroxinitrito</i>	31
1.3.1.3.2. <i>O peroxinitrito como promotor de reacções de oxidação/nitração</i>	32
1.3.1.3.3. <i>O peroxinitrito na aterosclerose</i>	35
1.3.2. <i>Sistemas de defesa antioxidante celulares</i>	38
1.3.2.1. <i>Defesas arteriais contra o peroxinitrito</i>	38
2. <i>A apoptose na doença aterosclerótica</i>	39
2.1. <i>As caspases</i>	40
2.2. <i>Mecanismos de apoptose</i>	41
2.2.1. <i>A via mitocondrial</i>	43
2.2.1.1. <i>Factores apoptogénicos mitocondriais</i>	43
2.2.1.2. <i>A permeabilidade da membrana mitocondrial</i>	44
2.2.2. <i>Via dos receptores de morte</i>	46
2.3. <i>A morte celular desencadeada pelo peroxinitrito</i>	47
3. <i>Inflamação e doença cardiovascular</i>	48
4. <i>Vias implicadas na agressão vascular mediada pelo peroxinitrito</i>	50
4.1. <i>A via do NF-κB</i>	50
4.1.1. <i>A activação do NF-κB</i>	50
4.1.2. <i>A ativação do NF-κB pelo peroxinitrito</i>	53
4.2. <i>A via da PI3K/Akt</i>	55
4.3. <i>A via do Nrf2 e a produção de HO-1</i>	57

5. <i>As antocianinas e a aterosclerose</i>	63
5.1. <i>Considerações químicas e distribuição</i>	63
5.2. <i>Absorção, metabolismo e biodisponibilidade</i>	66
5.2.1. <i>Papel da microflora intestinal</i>	68
5.2.2. <i>Influência da matriz alimentar</i>	69
5.2.3. <i>A controvérsia da biodisponibilidade</i>	70
5.3. <i>Actividade biológica</i>	71
5.3.1. <i>Actividade antioxidante</i>	71
5.3.1.1. <i>Captação e neutralização de espécies reactivas de oxigénio e de azoto</i>	71
5.3.1.2. <i>Actividade antioxidante indirecta</i>	73
5.3.1.3. <i>A controvérsia da actividade antioxidante in vivo</i>	73
5.3.1.4. <i>Antocianinas, stress oxidativo e aterosclerose</i>	74
5.3.2. <i>Actividade anti-inflamatória e doença cardiovascular</i>	76
5.3.2.1. <i>Antocianinas e o óxido nítrico</i>	79
5.3.2.2. <i>Implicação das antocianinas em vias sinalizadoras</i>	80
6. <i>Objectivos gerais do trabalho</i>	81
7. <i>Referências bibliográficas</i>	83

Capítulo 2 - As antocianinas protegem as células endoteliais da morte apoptótica induzida pelo peroxinitrito

1. <i>Introdução</i>	125
2. <i>Materiais e Métodos</i>	127
2.1. <i>Reagentes</i>	127
2.2. <i>Cultura primária de células endoteliais da aorta bovina</i>	128
2.3. <i>Síntese do peroxinitrito</i>	129
2.4. <i>Tratamento das células com peroxinitrito</i>	129
2.5. <i>Internalização das antocianinas pelas células endoteliais</i>	129
2.6. <i>Avaliação da morfologia nuclear</i>	130
2.7. <i>Avaliação da viabilidade celular</i>	130
2.8. <i>Avaliação da actividade antioxidante das antocianinas</i>	131
2.8.1. <i>Ensaio de oxidação da dihidrorodamina</i>	131
2.8.2. <i>Ensaio de oxidação das LDL</i>	131
2.8.2.1. <i>Isolamento das LDL</i>	131
2.8.2.2. <i>Oxidação das LDL avaliada pela formação de dienos conjugados</i>	132
2.8.3. <i>Determinação das espécies reactivas intracelulares</i>	132
2.8.4. <i>Avaliação da formação de grupos carbonilo</i>	133
2.9. <i>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial</i>	134
2.10. <i>Determinação da Bax nuclear por imunocitoquímica</i>	134
2.11. <i>Determinação da actividade das caspases</i>	135
2.12. <i>Determinações por Western Blot</i>	135
2.13. <i>Análise estatística</i>	136

3.	<i>Resultados</i>	136
3.1.	<i>As antocianinas protegem as células endoteliais da apoptose desencadeada pelo peroxinitrito</i>	136
3.2.	<i>As antocianinas apresentam elevada capacidade scavenger de espécies reactivas</i>	138
3.2.1.	<i>Capacidade scavenger do peroxinitrito</i>	138
3.2.2.	<i>Diminuição da oxidação das LDL mediada por radicais peróxido</i>	140
3.3.	<i>As antocianinas inibem a formação de espécies reactivas e de grupos carbonilo em células endoteliais submetidas à agressão pelo peroxinitrito</i>	140
3.4.	<i>As antocianinas previnem a dissipação do potencial de membrana mitocondrial provocado pelo peroxinitrito</i>	142
3.5.	<i>As antocianinas inibem a activação das caspases-3 e -9, induzida pelo peroxinitrito</i>	144
3.6.	<i>As antocianinas diminuem os níveis citoplasmáticos de Bax e impedem a sua translocação para o núcleo em células endoteliais agredidas pelo peroxinitrito</i>	146
3.7.	<i>As antocianinas impedem a inactivação da via da PI3K/Akt mediada pelo peroxinitrito</i>	150
4.	<i>Discussão</i>	151
5.	<i>Referências bibliográficas</i>	156

Capítulo 3 - A malvidina-3-glucósido protege as células endoteliais da agressão mediada pelo peroxinitrito estimulando a NO sintase endotelial e inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios dependentes do NF- κ B

		161
1.	<i>Introdução</i>	163
2.	<i>Materiais e Métodos</i>	165
2.1.	<i>Reagentes</i>	165
2.2.	<i>Cultura celular</i>	166
2.3.	<i>Determinação da produção de óxido nítrico</i>	166
2.4.	<i>Análise por Western Blot</i>	167
2.5.	<i>RT-PCR em tempo real</i>	168
2.6.	<i>Imunoprecipitação</i>	168
2.7.	<i>Determinação dos níveis de IL-6</i>	169
2.8.	<i>Análise estatística</i>	169
3.	<i>Resultados</i>	169
3.1.	<i>A Mv3glc potencia a libertação de óxido nítrico em células endoteliais, particularmente quando submetidas à agressão com peroxinitrito</i>	169
3.2.	<i>A Mv3glc induz a fosforilação da Akt e da eNOS e diminui a expressão da iNOS na presença de peroxinitrito</i>	171
3.3.	<i>A Mv3glc aumenta a expressão da eNOS e diminui a expressão da iNOS, desencadeadas pelo peroxinitrito alterando os níveis de RNA mensageiro</i>	173
3.4.	<i>A Mv3glc impede a activação do NF-κB, mediada pelo peroxinitrito, prevenindo a nitração do IκB</i>	174
3.5.	<i>A Mv3glc reduz os níveis de COX-2 e a produção de IL-6 induzidas pelo peroxinitrito</i>	176
4.	<i>Discussão</i>	177
5.	<i>Referências bibliográficas</i>	181

Capítulo 4 - A malvidina-3-glucósido interfere com os factores de transcrição NF- κ B e Nrf2 em células endoteliais humanas contribuindo para o equilíbrio entre mediadores pró- e anti-inflamatórios 185

1. <i>Introdução</i>	187
2. <i>Materiais e Métodos</i>	189
2.1. <i>Reagentes</i>	189
2.2. <i>Cultura celular e tratamento das células com peroxinitrito</i>	190
2.3. <i>Avaliação da viabilidade e morfologia celulares</i>	191
2.4. <i>Análise por Western Blot</i>	191
2.5. <i>Actividade do proteassoma</i>	192
2.6. <i>Análise estatística</i>	192
3. <i>Resultados</i>	192
3.1. <i>A Mv3glc protege as células endoteliais HMEC contra a apoptose mediada pelo peroxinitrito</i>	192
3.2. <i>A Mv3glc impede a activação do NF-κB, mediada pelo peroxinitrito</i>	194
3.3. <i>A Mv3glc impede a activação do NF-κB e a produção de iNOS e COX-2, mediada pelo peroxinitrito</i>	195
3.4. <i>A Mv3glc impede o aumento da actividade do proteassoma protagonizado pelo peroxinitrito</i>	196
3.5. <i>A Mv3glc prolonga a activação do Nrf2 desencadeada pelo peroxinitrito provocando o aumento da expressão da HO-1</i>	197
4. <i>Discussão</i>	199
5. <i>Referências bibliográficas</i>	203

Capítulo 5 - Conclusões gerais 209

Agradecimentos

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina assimétrica, do inglês, <i>asymmetric dimethyl arginine</i>
AFC	7-amido-4-trifluorometilcumarina
AIF	Factor indutor da apoptose, do inglês, <i>apoptosis-inducing factor</i>
AM	Adrenomedulina
AMC	7-amido-4-metilcumarina
ANT	Transportador dos nucleótidos de adenina, do inglês, <i>adenine nucleotide translocase</i>
Apaf-1	Do inglês, <i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
ARE	Elemento de resposta antioxidante, do inglês, <i>antioxidant responsive element</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
Bach1	Do inglês, <i>BTB and CNC homologue 1</i>
BAEC	Células endoteliais da aorta bovina, do inglês, <i>bovine aortic endothelial cell</i>
BH4	Tetrahidrobiopterina
CAD	Desoxiribonuclease activada por caspases, do inglês, <i>caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CARD	Domínio de recrutamento de caspases, do inglês, <i>caspase-recruitment domain</i>
CaM	Calmodulina
CML	Células musculares lisas
CMV	Citomegalovírus
Cy3glc	Cianidina-3-glucósido
CORMs	Moléculas libertadoras de monóxido de carbono, do inglês, <i>CO-releasing molecules</i>
DCV	Doenças cardiovasculares
DED	Domínio efector de morte, do inglês, <i>death-effector domain</i>
DIABLO	Proteína de ligação directa ao IAP com baixo pI, do inglês, <i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte, do inglês, <i>death inducing signaling complex</i>

DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
Dp3glc	Delfinidina-3-glucósido
ECF	Do inglês, <i>enhanced chemifluorescence reagent</i>
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado do endotélio, do inglês, <i>endothelium derived hyperpolarizing factor</i>
EDRF	Factor de relaxamento derivado do endotélio, do inglês, <i>endothelial-derived relaxing factor</i>
EGF	Factor de crescimento epidérmico, do inglês, <i>epidermal growth factor</i>
ET-1	Endotelina-1
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina, do inglês, <i>flavin adenine dinucleotide</i>
FADD	Do inglês, <i>Fas-associated protein with death domain</i>
GADPH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
γ -GCS	γ -Glutamilcisteína sintetase
GSH	Glutatião reduzido
GST	Glutatião-S-transferase
HDL	Lipoproteínas de elevada densidade, do inglês, <i>high density lipoproteins</i>
HMEC	Células microvasculares endoteliais humanas, do inglês, <i>human microvascular endothelial cells</i>
IAPs	Proteínas inibidoras da apoptose, do inglês, <i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1, do inglês, <i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
Keap 1	Do inglês, <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês, <i>low density lipoproteins</i>
LDLmm	LDL minimamente modificadas
LDLox	LDL oxidadas
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas cinases activadas por mitogénios, do inglês, <i>mitogen-activated protein kinases</i>

MCP-1	Proteína quimiotáctica de monócitos, do inglês, <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
M-CSF	Do inglês, <i>macrophage colony stimulating factor</i>
Mv3glc	Malvidina-3-glucósido
NF- κ B	Factor nuclear κ B, do inglês, <i>nuclear factor-κB</i>
NLS	Sequência de localização nuclear, do inglês, <i>nuclear localization sequence</i>
NOS	Óxido nítrico sintase, do inglês, <i>nitric oxide synthase</i>
Nrf2	Do inglês, <i>nuclear factor E2 p45-related factor 2</i>
NQO1	NADPH:quinona oxidoreductase 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	Do inglês, <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>
hsPCR	Proteína C reactiva de elevada sensibilidade, do inglês, <i>high sensitivity C reactive protein</i>
PDGF	Factor de crescimento derivado das plaquetas, do inglês, <i>platelet-derived growth factor</i>
Pg3glc	Pelargonidina-3-glucósido
PI3K	Do inglês, <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PNC	Péptido natriurético C
PPT	Poros de permeabilidade transitória
RNS	Espécies reactivas de nitrogénio, do inglês, <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Espécies reactivas de oxigénio, do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
Smac/Diablo	Do inglês, <i>second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pI</i>
SREBP	Proteína de ligação a elementos de resposta a esteróis, do inglês, <i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SOD	Superóxido dismutase
TG	Triglicerídeos
TGF- β	Factor de transformação do crescimento- β , do inglês, <i>transforming growth factor-β</i>
TNF α	Factor de necrose tumoral, do inglês, <i>tumor necrosis factor α</i>
TRADD	Do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor type-1-associated death domain protein</i>

TRAIL	Do inglês, <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1, do inglês, <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade, do inglês, <i>very low density lipoproteins</i>

Resumo

Actualmente, a aterosclerose é reconhecida como uma doença resultante de uma resposta inflamatória da parede vascular a diferentes formas de lesão. O carácter crónico do processo conduz à formação de lesões na parede arterial ou placas que poderão ocluir o lúmen dos vasos, directamente ou através de complicações trombóticas. No decorrer das últimas duas décadas, diversos alvos moleculares de cascatas inflamatórias foram identificados. Níveis supra-fisiológicos de espécies reactivas de oxigénio e de azoto, excedendo a capacidade dos sistemas *scavenger* celulares, causam *stress* oxidativo e a activação de mecanismos pró-inflamatórios. Nestas circunstâncias, o anião superóxido produzido reage com o óxido nítrico vascular gerando níveis elevados de peroxinitrito, donde resulta a diminuição drástica do óxido nítrico biodisponível. Para além de ser um poderoso oxidante, o peroxinitrito é, também, um agente nitrante de biomoléculas, particularmente de proteínas, comprometendo a sua função fisiológica. Assim, as espécies reactivas contribuem para a disfunção endotelial e subsequente formação de lesões ateroscleróticas.

Neste contexto, estabelecer como alvo espécies altamente reactivas, como o peroxinitrito, constitui uma estratégia promissora na prevenção das doenças cardiovasculares. Os produtos naturais derivados de plantas têm sido uma fonte de moléculas bioactivas para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios e dentro destas, os polifenóis, um dos principais grupos de metabolitos secundários das plantas de que fazem parte as antocianinas, têm merecido particular interesse. Os frutos e vegetais contêm uma panóplia de compostos benéficos considerados responsáveis pelos seus efeitos protectores contra uma série de patologias crónicas, incluindo as cardiovasculares. O papel das antocianinas na prevenção destas patologias é, de entre os produtos naturais, seguramente dos mais estudados e com mais evidências até à data. A causalidade de tal interesse recai na capacidade destes polifenóis actuarem sobre as principais células implicadas no processo aterosclerótico.

É neste contexto que a presente tese encontrou motivação e razão para o seu desenvolvimento. Neste estudo, pretendeu-se, em primeiro lugar, investigar a capacidade de quatro antocianinas de reconhecida prevalência na dieta e com diferentes padrões de substituição no anel B, a cianidina-3-glucósido (Cy3glc), delphinidina-3-glucósido (Dp3glc), a malvidina-3-glucósido (Mv3glc) e a pelargonidina-3-glucósido (Pg3glc), em prevenir a morte de células endoteliais mediada pelo peroxinitrito, utilizando como modelo experimental células endoteliais da aorta de bovinos (BAEC).

Numa primeira fase deste trabalho, demonstrou-se que uma pré-incubação das células endoteliais com as diferentes antocianinas protege as mesmas da lesão oxidativa mediada pela adição de peroxinitrito 500 μ M, de uma forma dependente da concentração. A concentração de

antocianina 25 μ M foi a seleccionada para os estudos subsequentes, em virtude de proporcionar uma quantidade intracelular mensurável, de acordo com os resultados de análises por HPLC.

Ulteriormente, investigaram-se os mecanismos através dos quais as antocianinas conseguem prevenir a morte celular apoptótica induzida pelo peroxinitrito, focando a atenção em vias a montante e a jusante da mitocôndria. Todas as antocianinas testadas impedem o dano celular infligido pelo peroxinitrito interrompendo a via de morte mitocondrial, ao inibirem a actividade das caspases-3 e -9, mas não da caspase-8; diminuem, igualmente, os níveis intracelulares da proteína Bax e inibem ainda a translocação nuclear desta proteína pró-apoptótica, facto demonstrado, pela primeira vez, neste trabalho, em células endoteliais, em consequência do processo de apoptose (Capítulo 2).

No Capítulo 3, optou-se por seleccionar apenas uma das antocianinas para prosseguir os estudos, considerando o grau de protecção similar manifestado por todas elas. Optou-se pela Mv3glc, tendo em conta a sua prevalência alimentar, as suas características estruturais particulares e, bem assim, a escassez de trabalhos com esta antocianina, quando comparada com as demais. Esclarecidos que estavam os principais aspectos relativos às suas propriedades antioxidantes, direccionou-se então o estudo para o seu papel na inflamação endotelial despoletada pelo peroxinitrito, em vias reconhecidamente implicadas no processo aterogénico. Em concreto, constatámos a capacidade da Mv3glc não só em aumentar a biodisponibilidade do \cdot NO dependente da eNOS, através da fosforilação do Akt, como também em inibir a activação do NF- κ B induzida pelo peroxinitrito o que se traduziu na supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, a COX-2 e a iNOS, em células endoteliais activadas por aquele oxidante. Esta inibição da activação do NF- κ B resultou do impedimento da nitração, devida ao peroxinitrito, do inibidor citoplasmático deste factor de transcrição, o I κ B α . Confirmou-se, também, que a acção da Mv3glc se exerce ao nível transcricional, ao diminuir os níveis de mRNA da iNOS, aumentando os da eNOS, situação particularmente evidente em células tratadas com peroxinitrito.

Por fim, consolidámos os estudos efectuados em células endoteliais isoladas de aortas bovinas, confirmando a transposição dos resultados obtidos para células endoteliais microvasculares de origem humana (HMEC) (Capítulo 4). Procurou-se ainda explorar, neste modelo celular, outras vias de acção da Mv3glc como agente de protecção endotelial, em particular, o seu papel modulador na activação do proteassoma e na produção de heme oxigenase-1 (HO-1) decorrente da activação do factor de transcrição Nrf2, induzidas pelo peroxinitrito. Os resultados alcançados, para além de corroborarem os obtidos até então, consentiram a conclusão de que a Mv3glc permite que seja alcançado um equilíbrio favorável entre os factores de transcrição NF- κ B e Nrf2 através, respectivamente, da inibição e da estimulação, de proteínas resultantes da activação de ambos, balanço este crucial para a homeostase vascular. Em concreto, esta acção, por parte da antocianina estudada, parece dever-se a uma inibição não tóxica da actividade proteassómica exacerbada pelo peroxinitrito, traduzindo-se, por um lado, na estabilização citoplasmática do

NF- κ B e por outro, na activação dos sistemas de defesa orquestrados pelo Nrf2, traduzida no aumento dos níveis de HO-1. Conclui-se ainda, que a intervenção da Mv3glc contribui para a diminuição do grau de inflamação e do nível oxidativo do endotélio vascular sob a acção deletéria do peroxinitrito e, conseqüentemente, para o restabelecimento da homeostasia celular.

Globalmente, os resultados apresentados neste trabalho esclarecem e desvendam novos mecanismos celulares implicados na actividade antiapoptótica e anti-inflamatória das antocianinas, expandindo assim, modesta mas convictamente, os nossos conhecimentos acerca dos seus potenciais efeitos protectores vasculares, no contexto da prevenção da disfunção endotelial e da aterosclerose. Reforçam ainda o potencial das antocianinas como moléculas promissoras no desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos direccionados, fundamentalmente, para a normalização da disfunção endotelial.

Abstract

Nowadays, atherosclerosis is recognized as a disease resulting from an inflammatory response of the vessel wall to different forms of injury. The chronic nature of the process leads to the formation of lesions in the arterial wall or plaque which may occlude the vessel lumen, directly or through thrombotic complications. During the last two decades, several molecular targets for inflammatory cascades have been identified. Supraphysiological levels of reactive oxygen and nitrogen species, exceeding the capacity of endogenous cellular defenses, are capable of causing oxidative stress and activation of pro-inflammatory mechanisms. In these circumstances, the superoxide anion produced reacts with vascular nitric oxide generating high levels of peroxynitrite, resulting in a drastic decrease of the bioavailability of nitric oxide. Besides being a powerful oxidant peroxynitrite is also a nitrating agent of biomolecules, particularly proteins, compromising its physiological function. Therefore, the reactive species contribute to endothelial dysfunction and subsequent formation of atherosclerotic lesions.

In this context, targeting highly reactive species such as peroxynitrite, is a promising strategy in the prevention of cardiovascular diseases. Natural products derived from plants have been a source of bioactive molecules for the development of anti-inflammatory drugs and among these, polyphenols, one of the major groups of plant secondary metabolites which comprises anthocyanins, have received particular interest. Fruits and vegetables contain an array of beneficial compounds considered responsible for their protective effects against a number of chronic diseases, including cardiovascular ones. The role of anthocyanins in preventing these pathologies is, among natural products, certainly one of the most investigated and with more promising evidences to date. The causality of such interest lies in the ability of these polyphenols to act on the main cells involved in the atherosclerotic process.

It is in this context that this thesis found motivation and reason for its development. This study was intended primarily to investigate the ability of four anthocyanins with recognized prevalence in the diet and with different substitution patterns on the B ring, cyanidin-3-glucoside (Cy3glc), delphinidin-3-glucoside (Dp3glc), malvidin-3-glucoside (Mv3glc) and pelargonidin-3-glucoside (Pg3glc) in preventing the death of endothelial cells mediated by peroxynitrite, using, bovine aortic endothelial cells (BAEC), as an experimental model.

In a first phase of this study, it was demonstrated that pre-incubation of endothelial cells with different anthocyanins protects them from oxidative damage mediated by 500 μM peroxynitrite in a concentration-dependent manner. The concentration of 25 μM anthocyanin was selected in order to provide a detectable amount of intracellular anthocyanin, according to the results of HPLC analysis.

Subsequently, we investigated the mechanisms by which anthocyanins can prevent apoptotic cell death induced by peroxynitrite, focusing attention on pathways upstream and downstream of mitochondria. All anthocyanins tested prevent cell damage inflicted by peroxynitrite interrupting the mitochondrial death pathway, by inhibiting the activity of caspases-3 and -9, but not of caspase-8; they also decrease the intracellular levels of Bax protein and inhibit the nuclear translocation of this pro-apoptotic protein. This fact was demonstrated for the first time in this work, as a result of apoptosis in endothelial cells (Chapter 2).

In Chapter 3, we decided to select only one of the anthocyanins for further studies, considering the similar degree of protection manifested by all of them. Mv3glc was chosen, given its prevalence in the diet and particular structural features and the lack of studies with this anthocyanin, when compared with the others. Once clarified the main aspects related to its antioxidant properties, we aimed to investigate this anthocyanin protective role in endothelial inflammation triggered by peroxynitrite, with a focus in known pathways involved in the atherogenic process. In particular, we have demonstrated the ability of Mv3glc in increasing the bioavailability of eNOS-derived NO•, through Akt-dependent phosphorylation. Mv3glc was also capable to inhibit peroxynitrite-induced NF-κB activation which resulted in the downregulation of pro-inflammatory mediators such as IL-6 and the expression of COX-2 and iNOS. This inhibition of NF-κB activation resulted from the prevention of its cytosolic inhibitor (IκBα) nitration, due to peroxynitrite. It was also confirmed that the action of Mv3glc occurs at the transcriptional level, by decreasing iNOS mRNA and increasing eNOSm RNA, a situation particularly evident in cells treated with peroxynitrite.

Finally, in order to transpose the results obtained so far in endothelial cells isolated from bovine aortas, the studies were carried out in human microvascular endothelial cells (HMEC) (Chapter 4). We further explored, in this cellular model, other action mechanisms of Mv3glc as an endothelial-protecting agent, in particular, its role in modulating proteasome's activity and in the production of heme oxygenase-1 (HO-1) resulting from activation of the transcription factor Nrf2, induced by peroxynitrite. These results, besides corroborating those already obtained, also permitted the conclusion that Mv3glc leads to a favorable balance between NF-κB and Nrf2 transcription factors, through, respectively, inhibition and stimulation, of the production of proteins resulting from their activation, contributing by this way to vascular homeostasis. Furthermore, this anthocyanin action appears to be due to a nontoxic inhibition of the proteasomal activity exacerbated by peroxynitrite, resulting, not only in the stabilization of cytoplasmic NF-κB but also, in the activation of defense systems orchestrated by Nrf2, namely the increase in HO-1 levels. Thus, Mv3glc contributes to reduce the degree of inflammation and vascular endothelial stress in cells submitted to peroxynitrite deleterious action, hence restoring cellular homeostasis.

Overall, the results presented here clarify and uncover new cellular mechanisms involved in the anti-apoptotic and anti-inflammatory properties of anthocyanins, thus expanding modestly but firmly, our knowledge about their potential vascular protective effects in the context of prevention of endothelial dysfunction and atherosclerosis, reinforcing their potential as promising molecules in the development of functional foods and nutraceuticals.

Capítulo 1

Introdução geral

Introdução geral

A doença aterosclerótica, não obstante constituir um dos principais alvos de investigação desde os anos 50, é considerada de forma persistente a principal causa de morte nas sociedades ocidentais (Ramsey *et al.* 2010). Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam em cerca de 17 milhões as mortes anuais causadas pelas doenças cardiovasculares (DCV) que incluem as doenças cardíacas, vasculares cerebrais e periféricas, as quais apresentam como denominador comum o processo aterosclerótico. A mesma instituição prevê que esta situação se mantenha inalterada durante os próximos 20 anos (OMS 2010). Deste número total de mortes, cerca de 2.6 milhões/ano são atribuídos ao consumo inadequado de frutos e vegetais (Lock *et al.* 2005).

Segundo a teoria da transição epidemiológica, os países desenvolvidos encontrar-se-ão na fase das “doenças degenerativas adiadas”, na qual se inserem as doenças inflamatórias, incluindo a aterosclerose, condição base para o aparecimento das doenças cardiovasculares (Olshansky e Ault 1986). Tem-se assistido a um crescimento exponencial destas patologias nas sociedades ocidentais, cada vez mais envelhecidas, e, com o aumento da esperança de vida nos países subdesenvolvidos, as doenças cardiovasculares têm sofrido e irão continuar a sofrer uma explosão na sua prevalência (OMS 2009). Para travar esta realidade são necessárias novas abordagens que deverão passar pelo cabal esclarecimento da sua etiologia e factores de risco e pelo estabelecimento de alternativas terapêuticas e dietéticas acessíveis ao maior número de indivíduos.

A aterosclerose é um processo complexo que envolve a deposição de lipoproteínas plasmáticas, a proliferação de elementos celulares e uma resposta inflamatória da parede arterial. Afecta vasos arteriais de médio e grande calibre e envolve inúmeras formas de apresentação clínica. Nas últimas décadas, os progressos nesta área têm sido evidentes, em particular no que diz respeito à definição dos factores de risco e das principais interacções envolvidas, o que permitiu constatar que a aterosclerose não é apenas uma simples patologia degenerativa resultante do envelhecimento mas, fundamentalmente, um processo inflamatório crónico com risco de agudização por ruptura da placa e trombose (Ramsey *et al.* 2010).

Embora a causa precisa da aterosclerose ainda não esteja totalmente estabelecida, a principal hipótese é a de que ela envolve múltiplos mecanismos fisiopatológicos, especialmente a incorporação e retenção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na parede do vaso. Este evento leva à lesão e disfunção endotelial, estimulando o desencadear de respostas inflamatórias e imunológicas prolongadas, o que parece exercer um papel fundamental na progressão da doença. A presença de elevados níveis plasmáticos de LDL em termos de colesterol-LDL (>160 mg/dl) é considerado como o principal factor de risco da aterosclerose prematura (Ross 1999;

Serrano *et al.* 2007). No entanto, os factores de risco actualmente conhecidos, apenas explicam cerca de 40% da incidência da doença coronária pelo que nos últimos anos muitas têm sido as tentativas de apurar a origem dos restantes 60%.

Inúmeros estudos epidemiológicos apontam correlações entre a ingestão de determinados componentes dietéticos, nomeadamente polifenóis, e a prevenção das DCV. O papel das antocianinas neste âmbito é, de entre os produtos naturais, seguramente dos mais explorados e com mais evidências até à data. A causalidade de tal interesse recai na capacidade destes polifenóis actuarem sobre as principais células implicadas no processo aterosclerótico. O enorme impacto potencial do aumento da ingestão de frutos e vegetais na diminuição da incidência de diversas patologias, particularmente as do foro cardiovascular foi avaliado num estudo de Lock *et al.* (Lock *et al.* 2005). Esta investigação determinou que o aumento do consumo individual de frutos e vegetais para cerca de 600 g/dia poderia traduzir-se numa diminuição de cerca de 30% das mortes por doença cardíaca isquémica.

Apesar das consideráveis repercussões económicas e sociais da aterosclerose e patologias dela resultantes, a sua grande complexidade etiológica tem condicionado a elucidação completa das suas vias celulares e moleculares pelo que o cabal entendimento dos mecanismos subjacentes permitirá direccionar e mesmo personalizar o seu diagnóstico e tratamento (Scholtes *et al.* 2011).

1. O processo aterosclerótico

A aterosclerose é uma doença vascular multifactorial e complexa que pode ocorrer em qualquer artéria embora os principais alvos sejam a aorta, as artérias coronárias e as cerebrais. Caracteriza-se pela formação, na íntima, de placas fibrolipídicas, designadas por placas de aterosclerose, as quais resultam da acumulação de células inflamatórias, lipoproteínas e tecido fibroso, geralmente apresentando um núcleo central rico em lípidos (Lusis 2000).

Estudos epidemiológicos demonstraram que existem diversos factores de risco independentes associados à doença (Figura 1), incluindo a idade, as dislipidémias aterogénicas, caracterizadas por elevados níveis plasmáticos de LDL e/ou triglicéridos (TG), e reduzidos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), a hipertensão arterial, a diabetes *mellitus*, a hiperhomocisteínemia, a obesidade visceral e os hábitos tabágicos (Previtali *et al.* 2011). A adopção do chamado estilo de vida ocidental, incluindo dietas altamente calóricas e vida sedentária, tem sido igualmente responsável pelo aumento na incidência mundial de DCV, síndrome metabólica e diabetes *mellitus* tipo 2. Muitos destes factores de risco actuam de uma forma sinérgica ou coordenada através de uma ou mais vias que envolvem essencialmente três tipos de células: as

células endoteliais, as células musculares lisas e as células do sistema imune (monócitos/macrófagos e linfócitos T). A lesão e/ou alterações da actividade metabólica destas células pode conduzir à doença cardiovascular, sendo o processo inflamatório um dos principais responsáveis por alterações no normal funcionamento das mesmas. Os intervenientes no risco cardiovascular que possuem um componente pró-inflamatório incluem o *stress* oxidativo, a interleucina-6, a lipoproteína (a), a proteína C-reativa de elevada sensibilidade (*hsPCR*), a molécula de adesão intracelular-1 e as LDL (Osiecki 2004).

Neste contexto, foram adoptadas medidas, como por exemplo, a introdução de fármacos hipocolesterolemiantes, que nos últimos anos têm contribuído para minimizar a taxa de mortalidade devida a aterosclerose. Não obstante, a incidência desta doença não tem sido significativamente reduzida o que poderá explicar-se pela ausência de intervenção directa ao nível de alguns dos seus mecanismos básicos, uma vez que estes permanecem por esclarecer na sua totalidade.

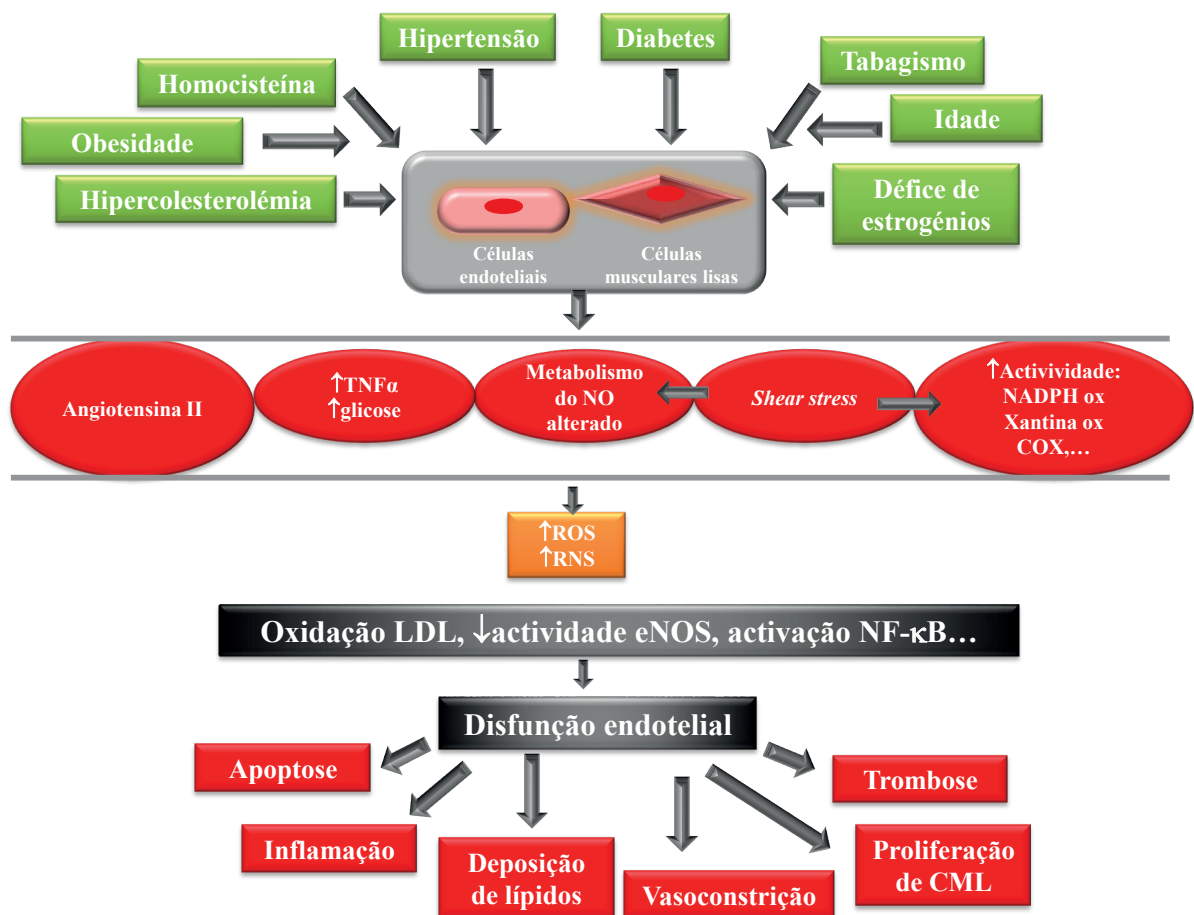


Figura 1. Factores de risco aterosclerótico e disfunção endotelial.

1.1. Endotélio: alvo e mediador da doença cardiovascular

1.1.1. Biologia do endotélio, lesão, activação e disfunção

O endotélio actua como uma barreira selectivamente permeável entre o sangue e os tecidos. Para além das suas funções sensoriais e executivas ele comporta-se de uma forma similar às glândulas endócrinas ou parácrinas ao produzir e libertar mediadores químicos activos capazes de regular a trombose, inflamação, tónus e remodelação vascular (Lusis 2000; Gong *et al.* 2004).

São diversas as funções desempenhadas pelo endotélio vascular, salientando-se a mediação do tónus vasomotor, a regulação celular e o transporte de nutrientes, para além de manter a fluidez sanguínea, contribuir para o equilíbrio entre mediadores anti e pró-inflamatórios e participar na angiogénese (Bombeli *et al.* 1997; Gross e Aird 2000). As células endoteliais vivem em média 10 anos e raramente se dividem. Contudo, elas podem ser estimuladas para uma rápida divisão por forma a recuperar uma área lesada. Embora este processo de recuperação demore cerca de uma semana, ele é, em regra, seguido por vários meses de alterações morfológicas e de perturbação de diversas funções do endotélio, nomeadamente a resposta ao óxido nítrico (NO) (Weidinger *et al.* 1990).

As células endoteliais intactas são capazes de responder a vários estímulos, quer através das suas funções constitutivas quer através de propriedades induzidas especificamente, gerando várias moléculas activas em resposta à lesão, a químicos tóxicos ou a estímulos oxidantes. Concretamente, estas células podem ser activadas, principalmente por citocinas, conduzindo à indução de moléculas de adesão (molécula de adesão intracelular, ICAM-1, molécula de adesão celular vascular, VCAM-1, moléculas de adesão de leucócitos), factores de crescimento (TGF- β e PDGF) (Chauhan, Seggara *et al.* 2003), outras citocinas e mediadores vasoactivos como a fibronectina, selectinas, interleucina-1 e sulfato de heparina (Balanescu *et al.* 2010). O endotélio produz ainda factores envolvidos na coagulação (factor tecidular e factor de von Willebrand) tromboxanos e prostaglandinas, como a prostaciclina (Vane e Botting 1992), factores de fibrinólise (activador do plasminogénio tecidular) (Pearson 1999) e componentes do sistema renina-angiotensina (Higgins 2003). Na Tabela 1 estão indicados os principais factores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio e as suas funções mais relevantes. Uma das funções mais importantes das células endoteliais é a regulação do tónus vascular através da libertação de NO e endotelina-1 (ET-1) (Harrison e Cai 2003). As propriedades do NO foram já descritas em todo o território vascular e em todas as espécies animais estudadas (Furchgott 1983; Collins *et al.* 1986; Forstermann 2010).

Tabela 1. Factores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio

Factores vasodilatadores	
Prostaciclina (PGI₂)	Diminui a adesão e a agregação plaquetares; promove o relaxamento do músculo liso vascular; inibe a libertação de endotelina-1 (Harrison <i>et al.</i> 2003).
Adrenomedulina (AM)	Potente peptídeo vasodilatador e antioxidante (Lah e Frishman 2000).
Factor hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)	Hiperpolariza o músculo liso vascular activando a bomba K ⁺ /Ca ²⁺ membranar, prevenindo assim a contracção muscular. É activado pela pressão associada ao fluxo sanguíneo (Harrison <i>et al.</i> 2003).
Peptídeo natriurético tipo-C (PNC)	Sinónimo de factor derivado do endotélio; é um vasodilatador que também inibe o crescimento e proliferação das CML (Chauhan, Nilsson <i>et al.</i> 2003).
Óxido Nítrico (•NO)	Gás que difunde através de ambientes lipídicos ou aquosos, sendo um potente vasodilatador. A sua produção é influenciada pelo <i>shear stress</i> hemodinâmico, estrogénios, acetilcolina, bradicinina, substância P, histamina, insulina, endotoxinas bacterianas, adenosina e tromboxano (Harrison <i>et al.</i> 2003).
Factores vasoconstritores	
Endotelinas (ET)	Existem várias isoformas (ET-1, ET-2 e ET-3); são potentes vasoconstritores cuja libertação é estimulada pela angiotensina II, hormona antidiurética, trombina, citocinas e ROS e inibida pelo •NO, prostaciclina e peptídeo auricular natriurético (Vane <i>et al.</i> 1992; Harrison <i>et al.</i> 2003).
Tromboxano (TXA₂)	Activa o seu próprio receptor nas CML levando à vasoconstricção (Vane <i>et al.</i> 1992; Harrison <i>et al.</i> 2003).
Prostaglandina H₂	Activa os receptores dos tromboxanos (Harrison <i>et al.</i> 2003).
Angiotensina II	Potente vasoconstritor produzido pela conversão da angiotensina I (Harrison <i>et al.</i> 2003).
Anião superóxido (O₂⁻)	Reage com o •NO originando peroxinitrito; é produzido durante a infecção, inflamação e <i>stress</i> oxidativo (Harrison <i>et al.</i> 2003).

O sistema vascular encontra-se num constante estado de vasodilatação resultante da libertação basal contínua de •NO a partir do endotélio, induzida pela acetilcolina (ACh) ou pela serotonina. O •NO é sintetizado a partir da L-arginina, pela óxido nítrico sintase (NOS). Nas artérias, o relaxamento do endotélio é inibido pela NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), um inibidor da NOS, e recuperado pela L-, mas não pela D-arginina (Richard *et al.* 1990). A libertação basal de •NO pelas células endoteliais reduz consideravelmente a resposta vasoconstritora à norepinefrina e endotelina-1 (Ludmer *et al.* 1986). O papel destas células não se esgota na regulação do tónus vascular e função vasomotora, mas estende-se ainda à regulação da inflama-

ção, da activação plaquetar e da trombose (Behrendt e Ganz 2002). Assim, o comprometimento estrutural e funcional do endotélio vascular constitui um pressuposto fundamental em qualquer das etapas da aterogénese, desde a lesão inicial à ruptura da placa (Ross 1993; Libby 2001). Os termos *activação* (por exemplo por citocinas), *disfunção* e *lesão endoteliais*, associadas à aterogénese, não reúnem consenso absoluto acerca do seu significado fisiopatológico e consequentes implicações. Por essa razão, vários indicadores têm sido usados para aferir o conjunto destas alterações, nomeadamente os níveis plasmáticos de moléculas derivadas do endotélio, o número de células endoteliais circulantes bem como o de células progenitoras endoteliais circulantes e a reactividade vascular a um determinado estímulo (Brevetti *et al.* 2008).

A integridade e a normal função do endotélio são indispensáveis para a saúde humana; de facto, a lesão endotelial, a apoptose e a activação de leucócitos são observadas em diversas doenças que se acompanham de disfunção endotelial, concretamente a aterosclerose, a vasculopatia alográfica, a hipertensão e a sépsis (Stefanec 2000). O endotélio não apresenta sinais significativos de perturbação na ausência de doença; por exemplo, é raro encontrarem-se células apoptóticas na íntima de vasos saudáveis. A circulação humana normal contém em média 2.6 células endoteliais nucleadas circulantes por mililitro de sangue (Solovey *et al.* 1999), donde se depreende que os factores antiapoptóticos serão predominantes em situações basais normais. Contudo, teores elevados de células endoteliais circulantes resultantes de lesão endotelial ocorrem em várias situações patológicas reconhecidas como causadoras de dano vascular grave (Lee *et al.* 2005; Boos *et al.* 2006) e estão positivamente correlacionadas com o marcador plasmático de disfunção endotelial, o factor de von Willebrand (Makin *et al.* 2004). Por seu lado, as células progenitoras endoteliais parecem desempenhar importantes funções na reparação endotelial (Szmítko *et al.* 2003) sendo que níveis reduzidos destas células estão associados com um pior prognóstico cardiovascular (Werner *et al.* 2005). Para além de assegurarem a reparação endotelial contínua, estas células parecem promover a angiogénese e a neovascularização, sugerindo o seu potencial na revascularização de tecidos isquémicos (Rumpold *et al.* 2004).

A activação endotelial inclui uma panóplia de respostas que ocorrem em condições quer fisiológicas quer patológicas. Em condições normais, as células endoteliais estão permanentemente a detectar e a responder a alterações no ambiente extracelular, que podem passar por uma bacteriémia transitória, um trauma *minor* ou qualquer outro *stress* diário comum, isto é, fisiologicamente, o endotélio vascular produz activamente uma resposta adaptativa benéfica, cuja natureza e duração depende não só do tipo de estímulo mas também da dinâmica temporal e espacial do sistema. Contudo, o endotélio activado também é responsável por mediar uma série de processos patológicos, particularmente aqueles envolvidos na inflamação e na aterosclerose. A título de exemplo, o aumento da expressão de moléculas de adesão promove a adesão

e *trafficking* de monócitos/macrófagos através da barreira endotelial. A sobreprodução local de espécies reactivas de oxigénio (ROS) pode também causar dano celular, tendo sido implicada em patologias, tais como a aterogénese e as neoplasias. A disfunção endotelial é, provavelmente, o primeiro evento no processo da formação das lesões.

No contexto da aterogénese, são vários os agentes e factores capazes de causar disfunção endotelial, tal como indicado na Figura 1, destacando-se a hiperlipidémia (Anderson *et al.* 1995) e a diabetes tipo 2 (Williams *et al.* 1996). A diabetes pode promover a inflamação, em parte devido à formação de produtos avançados de glicosilação que interagem com os receptores endoteliais (Hofmann *et al.* 1999). Na realidade, na maioria destes casos, a disfunção endotelial é causada, quer pela diminuição da formação de NO , quer pelo aumento da sua degradação, maioritariamente em resultado das espécies reactivas e LDLox produzidas. Várias intervenções terapêuticas têm como alvo os aspectos acima mencionados, interferindo ao nível da actividade do NO e no *stress* oxidativo com repercussão clínica, o que confirma o importante papel da função endotelial na saúde do organismo.

1.1.2 Papel do endotélio na aterogénese

Pela sua posição anatómica estratégica entre o sangue circulante e o músculo liso vascular, as células endoteliais constituem candidatos de eleição como alvos e mediadores da doença cardiovascular. Durante um longo período de tempo o seu papel foi negligenciado já que a maior parte dos estudos relacionados com a inflamação e aterosclerose focava, essencialmente, o desempenho dos macrófagos e linfócitos T.

O endotélio existente em locais predispostos ao desenvolvimento de aterosclerose parece ser morfológica e funcionalmente diferente dos restantes locais (Ross 1993), podendo mesmo promover activamente o processo aterosclerótico devido à sua menor capacidade de protecção (Yamamoto e Ando 2011). A agressão crónica ou repetida do endotélio parece constituir a pedra angular que sustenta a hipótese da “resposta à agressão” para o desenvolvimento do processo aterogénico.

Ainda que em animais de experiência, as lesões endoteliais que originam áreas desprovidas de células, estejam descritas como locais de início das modificações que culminam na aterogénese, tal parece não se verificar em humanos já que nestes as lesões se desenvolvem de forma muito mais subtil e em zonas não desnudadas. Endotoxinas circulantes, hipóxia, produtos derivados do fumo do cigarro, vírus e toxinas endoteliais específicas como a homocisteína, parecem estar envolvidas, actuando concertadamente com as perturbações hemodinâmicas (al-

teração do fluxo laminar) (Ando e Kamiya 1993; Yamamoto *et al.* 2011) e hipercolesterolemia (Steinberg 2005), no desenvolvimento da aterogénese. De um modo geral, todos os factores de risco que perturbam a homeostase vascular, levam à activação do endotélio resultando na produção exacerbada de citocinas e de moléculas de adesão celular. Estas últimas desempenham um papel crucial na interacção da superfície endotelial com os leucócitos circulantes e respectiva acumulação na íntima da parede do vaso.

Enquanto a hipercolesterolemia e a inflamação persistirem, a adesão dos monócitos, a migração subendotelial de células musculares lisas e a acumulação de lípidos tanto nos macrófagos como nessas células, também irão continuar, conduzindo à formação de agregados de células esponjosas na íntima, cuja aparência macroscópica se designa por estrias gordas. Diversos estudos mostraram que a hipercolesterolemia decorrente de dietas ricas em gorduras e colesterol perturba o relaxamento vascular dependente do endotélio em várias espécies animais sendo que, a vasodilatação devida a substâncias que não interferem com o endotélio, tais como a nitroglicerina, nitroprussiato de sódio ou adenosina, não é comprometida (Minor *et al.* 1990).

Assim, de forma resumida, podemos considerar que a disfunção endotelial implica um ou vários dos seguintes processos: i) síntese e libertação pelas células endoteliais de citocinas que atraem os monócitos circulantes ao vaso afectado; ii) aumento da permeabilidade do vaso; iii) aumento da adesão à parede do vaso de monócitos e outras células circulantes por expressão de moléculas de adesão (CAMs); iv) vasoconstrição devida ao predomínio de factores endoteliais vasoconstrictores (endotelina-1, tromboxano A2, angiotensina II) sobre os vasodilatadores (óxido nítrico); v) diátese trombótica; vi) proliferação de células musculares lisas e fibroblastos na parede do vaso causado pelo desequilíbrio entre os factores endoteliais inibidores (NO) e estimuladores (ET-1, angiotensina II) da proliferação.

1.2. Etiologia e fisiopatologia da aterosclerose

As investigações ao longo das últimas décadas revolucionaram o nosso entendimento acerca da patogénese da aterosclerose (Goldschmidt-Clermont *et al.* 2012). Esta patologia era inicialmente vista como um processo passivo de acumulação de colesterol na parede dos vasos e cujas manifestações clínicas eram atribuídas essencialmente ao grau de estenose. Actualmente, ela é encarada como um processo activo e complexo cuja apresentação clínica resulta da interacção entre diversos tipos de células e sistemas de órgãos (Corti *et al.* 2004; Libby e Theroux 2005) o que, em parte, justifica a multiplicidade de factores de risco conhecidos. Importa acrescentar que, frequentemente, estes factores de risco não são simplesmente aditivos, podendo verificar-

-se um aumento exponencial do risco de enfarte agudo do miocárdio até quatro vezes quando se conjugam dois factores e até sete vezes quando se associam três factores. Estas observações justificam o porquê da designação da aterosclerose como patologia originariamente multifactorial.

A aterosclerose resulta da contribuição de variáveis provenientes de vários órgãos, destacando-se o sistema vascular, o sistema endócrino, o tecido adiposo, o fígado, o tracto gastrointestinal e os rins. Estudos epidemiológicos demonstraram que esta doença é modelada por uma grande variedade de factores genéticos e ambientais (Morrison *et al.* 2009) os quais, associados a um crescente incremento da esperança de vida média, conduzem a um preocupante aumento na incidência de DCV. Por exemplo, a concentração relativa das várias lipoproteínas plasmáticas como a das LDL e HDL, é considerada de extrema importância no desenvolvimento da doença, sendo influenciada por múltiplos factores genéticos (mutação no receptor das LDL-hipercolesterolemia familiar; mutação no gene ABCA1 responsável pela ausência de HDL- doença de Tangier), para além da dieta, actividade física e fármacos (Steinberg e Witztum 2010).

1.2.1. Etapas da aterogénese

Esta patologia progride em múltiplos estádios, desde as estrias gordas precoces até às lesões avançadas e ruptura da placa de ateroma, sendo que em cada uma destas etapas intervêm diferentes componentes celulares e moleculares. As estrias gordas, os primeiros sinais do processo, são agregados de células esponjosas na íntima que apresentam o citoplasma vacuolizado e que resultam, essencialmente, de macrófagos que incorporaram LDL oxidadas. Tais células secretam diversos factores de crescimento e citocinas, estimulando a migração e proliferação de células do músculo liso e a produção de componentes da matriz extracelular. Desta forma, a estimulação parácrina do crescimento destas células, um dos aspectos característicos da aterosclerose, é considerada como sendo um processo reactivo resultante da agressão ao endotélio (Figura 2).

As estrias gordas, ainda que não condicionem sintomatologia, encontram-se na aorta na primeira década de vida, nas artérias coronárias na segunda década e nas artérias cerebrais na terceira ou quarta décadas de vida (Lusis 2000) podendo eventualmente desaparecer (Hansson 2005). Observam-se muitas vezes linfócitos T nas margens das estrias gordas/placas de ateroma, indicando o envolvimento de mecanismos de resposta imune neste processo (Hansson *et al.* 1988).

A placa ateromatosa é, sem dúvida, um dos elementos chave da aterosclerose. Com a progressão da doença, as placas vão sofrendo modificações pela deposição de células musculares lisas, colagénio, elastina e proteoglicanos, formando uma cápsula fibrosa. À medida que as

placas vão aumentando de dimensões, elas podem formar protusões para o lúmen das artérias e comprometer o fluxo sanguíneo. Podem ainda causar atrofia e fibrose na camada média, alterando a elasticidade da parede vascular. Os trombos murais podem formar-se nas placas, particularmente quando a camada de células endoteliais está muito danificada. Alterações na morfologia de placas ateroscleróticas crónicas, tais como a ulceração na superfície luminal e formação de hemorragias em zonas lesadas, aumentam o risco de agregação plaquetar e trombose nesse local, o que poderá conduzir à completa oclusão arterial. Em detrimento da estenose, estudos angiográficos mostraram que a situação mais grave é a activação da placa que pode resultar em oclusão aguda devida à formação de um trombo ou coágulo sanguíneo, podendo assim esta precipitar a isquémia e o enfarte agudo do miocárdio (Hansson 2005).

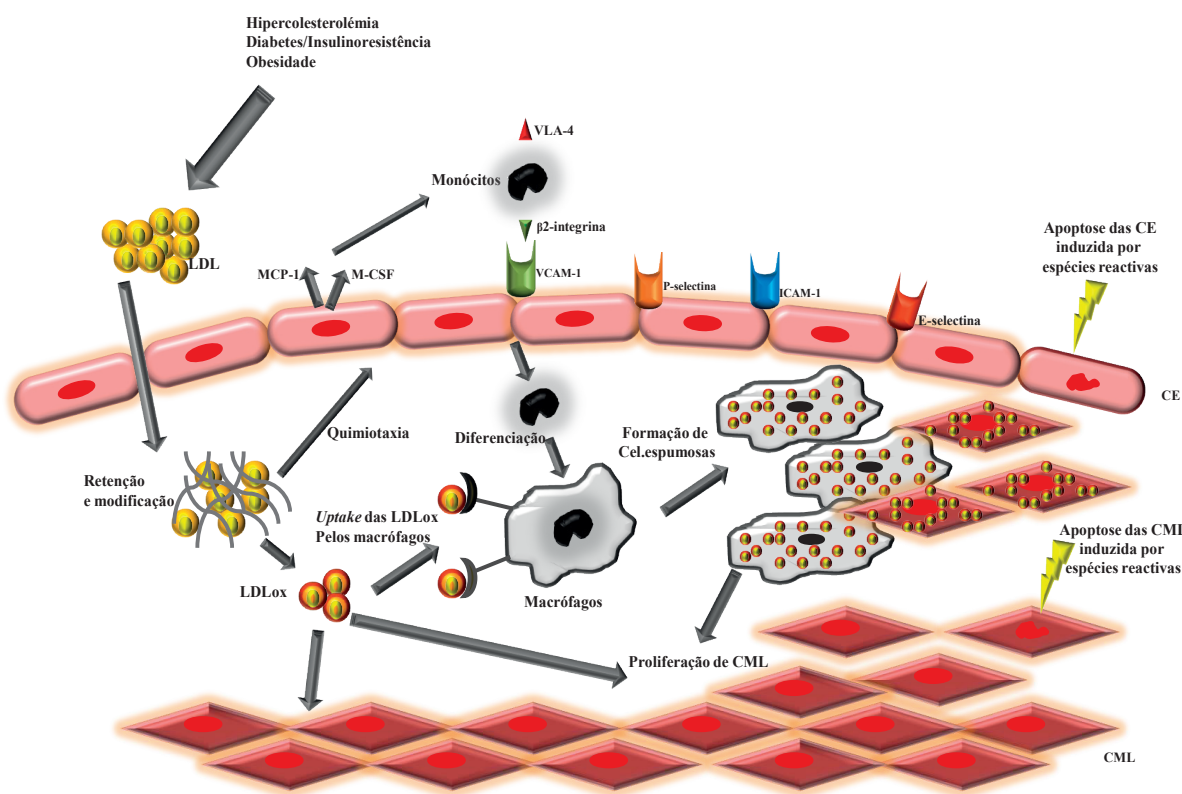


Figura 2. Representação esquemática que pretende ilustrar, simplificada, alguns eventos do processo aterogénico, desde a transcitose endotelial à retenção pela matriz de proteoglicano, das LDL em excesso devido a várias alterações metabólicas, como são exemplo a hipercolesterolemia, diabetes, insulino-resistência e obesidade. Esta acumulação de lipoproteínas na íntima acelera a sua modificação oxidativa que parece despoletar uma cascata pró-inflamatória que leva à migração e adesão de monócitos ao endotélio, à sua entrada na íntima onde são diferenciados em macrófagos, que ao internalizarem LDL alteradas formam as células esponjosas, precursoras das placas de ateroma. A proliferação das células musculares lisas arteriais (CML), bem como a apoptose destas e também das células endoteliais (CE), por acção das várias espécies reactivas formadas no vaso, contribuem igualmente para a aterogénese. Adaptado e modificado a partir de Stocker *et.al* 2004.

Existem duas causas principais de trombose coronária, a ruptura da placa (60-70% dos casos) e a erosão endotelial. A primeira é perigosa pelo facto de expor componentes pró-trombóticos da placa, particularmente fosfolípidos, factor tecidual e moléculas de adesão (Falk e Fernandez-Ortiz 1995). A ruptura da placa ocorre, preferencialmente, em locais onde a cápsula fibrosa é mais fina ou está lesada. Nestes locais, existem inúmeras células imunes que produzem moléculas inflamatórias e enzimas proteolíticas que enfraquecem ainda mais a cápsula para além de activarem células no interior da placa, aumentando a sua instabilidade e potenciando a ocorrência de uma síndrome vascular aguda (Stoll e Bendszus 2006).

1.2.2 Hipóteses mecánísticas da aterogénese

Diversas hipóteses mecánísticas para o processo da aterogénese têm sido propostas. Neste subcapítulo tentaremos aludir, sucintamente, a algumas das que mais têm constituído alvo de investigação, concretamente as hipóteses da “resposta à agressão”, da “resposta à retenção” e da “modificação oxidativa”. Para a hipótese da “resposta à agressão”, as lesões ateroscleróticas eram resultado de uma excessiva resposta inflamatória/ fibroproliferativa a diversas formas de insulto ao endotélio que resultavam da sua desnudação (Ross e Glomset 1976). Sabe-se hoje que a descamação endotelial é pouco comum em humanos e que os fenómenos descritos ocorrem em áreas propícias ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e que estas últimas se encontram revestidas por células endoteliais (Stocker e Keaney 2004). Estas zonas predispostas a lesões são, por exemplo, locais em que o fluxo laminar normal é substituído por um fluxo turbulento/oscilatório (*shear stress*) característico de segmentos vasculares angulosos (Ando e Yamamoto 2009). De acordo com esta teoria da “resposta à agressão modificada”, pequenas áreas de endotélio lesado, resultam num aumento compensatório da permeabilidade local, aumento da adesão de leucócitos e plaquetas e acumulação de lípidos no espaço subendotelial. Estes leucócitos e plaquetas recrutados produzem citocinas, agentes vasoactivos e factores de crescimento que promovem uma resposta inflamatória que se caracteriza pela migração de células musculares lisas para a íntima e sua proliferação nesse local. Estas são consideradas alterações precoces no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e constituem evidências da activação e disfunção endotelial, sendo encontradas nas primeiras etapas da aterogénese e das quais resultam interações celulares entre as células endoteliais, monócitos/macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas, nesse local de lesão.

A hipótese da “resposta à retenção” defende que é a retenção das lipoproteínas o evento inicial da aterosclerose sendo que este aprisionamento na parede arterial parece estar fortemente

relacionado com componentes da matriz extracelular. Por exemplo a apolipoproteína B-100 associada às LDL é retida por proteoglicanos arteriais (Stocker *et al.* 2004). A intervenção de enzimas lipolíticas e lisossomais da matriz extracelular também parece desempenhar um papel relevante (Stocker *et al.* 2004)

A hipótese da “modificação oxidativa” baseia-se no conhecimento de que as LDL oxidadas são rapidamente internalizadas pelos macrófagos através de receptores *scavenger*, ao contrário das LDL nativas (Goldstein *et al.* 1979). As LDL atravessam a parede vascular, em particular em locais de maior turbulência sanguínea (*shear stress*), acumulando-se na íntima onde são sujeitas à acção de diversas espécies reactivas produzidas pelas células vasculares podendo ser modificadas em maior ou menor extensão. A oxidação da parte lípidica das LDL e a modificação da apolipoproteína B-100 (Steinbrecher *et al.* 1984) torna-as susceptíveis à captação pelos macrófagos e consequente formação das células esponjosas, a partir das quais se vai desenvolver a lesão aterosclerótica. Quando a oxidação das LDL ocorre sem alteração da Apo B-100, as partículas designam-se LDL minimamente modificadas (LDLmm) e são capazes de induzir *in vitro* a síntese da proteína quimiotáctica de monócitos-1 (MCP-1) quer nas células endoteliais quer nas células musculares lisas, levando ao recrutamento de células inflamatórias (Cushing *et al.* 1990). As LDL altamente modificadas, normalmente designadas por LDL oxidadas são quimiotácticas para monócitos (Quinn *et al.* 1987) e linfócitos T (McMurray *et al.* 1993), estimulam a proliferação de células musculares lisas, são imunogénicas e levam à formação de complexos imunes o que potencia a sua captação pelos macrófagos (Stocker *et al.* 2004). Este recrutamento contínuo de células inflamatórias resulta na progressão e agravamento das lesões ateroscleróticas. As três hipóteses referidas têm como denominador comum um componente inflamatório e as LDL como elemento central do processo.

Actualmente, é amplamente aceite que a aterosclerose consegue reunir todas as características fundamentais de uma doença inflamatória, e, uma vez que a sua incidência está intimamente relacionada com a idade, tem sido considerada como doença degenerativa, cursando com perturbações persistentes do metabolismo lipídico durante longos períodos de tempo. Para além disso, opiniões mais recentes consideram que existe um mecanismo imune envolvido na formação da placa aterosclerótica (de Boer *et al.* 2000). De facto, estudos epidemiológicos demonstraram a existência de uma relação entre a doença aterosclerótica e a presença de anticorpos contra determinados agentes infecciosos como o citomegalovírus (CMV) o *Helicobacter pylori* e a *Chlamydia pneumoniae* (High 1999).

Trata-se de um assunto envolto em grande controvérsia principalmente devido à ausência de explicações mecanísticas para o comportamento de agentes infecciosos, já que a presença de

microrganismos nas placas ateroscleróticas e a resposta humoral por eles desencadeada não pode ser considerada como prova irrefutável da relação causal entre a infecção e o processo aterosclerótico, podendo apenas especular-se acerca do seu potencial papel na iniciação ou exacerbação do processo. Assim, uma vez que vários tipos de patogénios parecem estar implicados na DCV, parece mais plausível considerar que seja a actuação do somatório de agentes infecciosos existentes no organismo a afectar a progressão da aterosclerose e a desencadear manifestações clínicas.

De acordo com a já aludida teoria da “resposta à agressão modificada”, uma vez induzida a disfunção endotelial esta conduz a uma doença de progressão gradual associada á ingestão de lípidos e inflamação crónica relacionada com estes nutrientes. O facto de a doença aterosclerótica estar clinicamente relacionada com um decréscimo do vasorelaxamento endotelial resultante, por exemplo do processo inflamatório intraplaca, indicia que a disfunção endotelial constitui um processo progressivo, não se limitando às etapas iniciais da doença.

A presença de um infiltrado inflamatório na placa aterosclerótica está, invariavelmente, associada a uma maior gravidade dos sintomas coronários (Willerson 2002). Estudos serológicos efectuados demonstraram que na doença aterosclerótica existem níveis aumentados de marcadores inflamatórios, tais como a proteína C reactiva de alta sensibilidade (*hsPCR*) no sangue periférico sendo que esta generalização do processo inflamatório tem como consequência a indução da resposta imune, por parte do organismo (Whicher *et al.* 1999). Efectivamente, a *hsPCR* tem um efeito directo ao estimular muitos dos eventos precoces da aterogénese incluindo a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e a internalização de LDL pelos macrófagos, para além de inibir a produção de $\cdot\text{NO}$ derivado da eNOS e de aumentar a produção do potente vasoconstritor endotelina-1 (Zwaka *et al.* 2001). No processo inflamatório local, os níveis elevados de $\cdot\text{NO}$ resultantes do aumento da expressão de iNOS, constituem, por um lado, um factor tóxico para microrganismos invasores e, por outro, um segundo mensageiro responsável pela activação de mais genes pró-inflamatórios.

Estudos de imunohistoquímica revelaram a presença em placas ateroscleróticas humanas, de macrófagos, células T activadas e em menor extensão, mastócitos, sugestivos da existência de uma resposta celular imune intraplaca. Contudo se esta resposta se prolonga excessivamente no tempo ou se ocorre a produção de auto-anticorpos, este mecanismo de defesa imune pode levar à agressão celular (van der Wal *et al.* 1989). Como resultado da activação de células inflamatórias, a consequente produção de factores de crescimento, citocinas e outras proteínas podem regular uma variedade de processos que se traduzem em sintomatologia aguda, afectando a estabilidade da placa aterosclerótica e podendo culminar na sua ruptura.

Concluindo, a aterosclerose assemelha-se a outras doenças inflamatórias crónicas no que diz respeito à existência de um infiltrado celular, envolvimento da matriz extracelular e mecanismos patogénicos (Ross 1999).

1.2.3. As lipoproteínas e a aterosclerose

As LDL são partículas esféricas que possuem um núcleo central hidrofóbico constituído por ésteres de colesterol, triacilgliceróis e pequenas quantidades de colesterol livre. Este núcleo está envolvido por uma camada de fosfolípidos, colesterol livre, uma proteína glicosilada (a apolipoproteína B-100) e ainda compostos lipofílicos com actividade antioxidante, maioritariamente o α -tocoferol (Esterbauer *et al.* 1992). É o conteúdo em proteína bem como a componente polar fosfolipídica que confere às LDL estabilidade e solubilidade na fase aquosa (Esterbauer *et al.* 1992).

A sua internalização por parte das células pode ou não ser mediada por um receptor que reconhece um N-domínio terminal da apo B-100, sendo a primeira situação a mais comum. Estes receptores de LDL existentes no fígado são os principais responsáveis pelos níveis circulantes destas lipoproteínas. Após o reconhecimento da apo-B pelo receptor específico, o complexo formado sofre internalização e posterior dissociação nos endolisossomas fruto do seu pH ácido. Os receptores são reciclados para a membrana e as LDL degradadas. A relevância dos receptores de LDL é posta em evidência pelo facto de, na hipercolesterolemia familiar homozigótica, caracterizada pela total ausência dos mesmos, se observar uma acumulação massiva de LDL (Goldstein e Brown 1977). A expressão dos receptores de LDL é sujeita a retrocontrolo negativo pelos níveis intracelulares de colesterol. Níveis reduzidos levam à activação do factor de transcrição SREBP que estimula a transcrição do gene do receptor e de outros envolvidos na síntese do colesterol (Goldstein *et al.* 1977).

Uma percentagem considerável dos ácidos gordos presentes nas LDL são polinsaturados o que as torna importantes alvos susceptíveis à peroxidação lipídica. A modificação oxidativa das LDL é um processo extremamente complexo porque quer a sua componente lipídica quer a proteica podem ser alvo de oxidação, incluindo os vários antioxidantes existentes nestas partículas. A extensão da alteração oxidativa das LDL depende do ambiente pró-oxidante e do tempo de exposição ao mesmo. Assim, não existe um padrão definido de LDL oxidadas, mas sim um espectro alargado de alterações para as quais a contribuição da genética e dos hábitos dietéticos dos indivíduos têm que ser tidos em consideração (Chisolm e Steinberg 2000). Importa referir que existe uma série de modificações das LDL para além das oxidativas que potenciam a sua internalização por macrófagos *in vitro*, nomeadamente, a auto-agregação, formação de complexos com proteoglicanos, formação de complexos imunes e degradação por enzimas hidrolíticas (Steinberg *et al.* 2010)

Actualmente, à disfunção endotelial é atribuída a responsabilidade pelas etapas iniciais da aterogénese (Hansson 2005; Lee *et al.* 2012). Entre as principais causas da disfunção do endotélio

salientam-se o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol-LDL e LDLox, na íntima (Navab *et al.* 1995). A disfunção endotelial induzida pelo colesterol parece estar mais relacionada com o grau de oxidação das LDL do que com a concentração das mesmas (Sawamura *et al.* 1997). As LDL atravessam passivamente as junções intercelulares endoteliais acumulando-se, na matriz subendotelial nos locais mais predispostos à lesão e parecem ser oxidadas em microdomínios da parede arterial após serem sequestradas por proteoglicanos e outros constituintes da matriz extracelular (Lusis 2000), tornando-as assim indisponíveis à acção dos antioxidantes plasmáticos. Para além das LDL, existem outras lipoproteínas que também contêm apo-B, como a lipoproteína (a) e as partículas remanescentes que também se acumulam na íntima promovendo a aterogénese. A lipoproteína (a) parece ser particularmente aterogénica devido aos seus efeitos adicionais na fibrinólise e proliferação das células musculares lisas (Weissberg *et al.* 1993).

Vários tipos de células parecem ser capazes de oxidar as LDL contudo, a lesão aterosclerótica parece estar intimamente relacionada com uma situação de *stress* oxidativo nas células da parede arterial, nomeadamente nas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos (Kita *et al.* 2001; Higashi *et al.* 2009). As alterações nas LDL podem ser mínimas (LDL minimamente modificadas- LDLmm), não afectando o seu reconhecimento por parte do seu receptor, ou modificações extensas em que a apo-B é fragmentada e os resíduos de lisina covalentemente modificados com produtos de degradação de lípidos oxidados. Estas partículas não se vão ligar ao receptor convencional mas sim a receptores *scavenger* nos macrófagos da íntima.

A importância dos receptores *scavenger* dos macrófagos tem sido objecto de discussão em torno do facto de ainda estar por esclarecer se estes estimulam a progressão da lesão formando as células esponjosas ou se, pelo contrário, têm um efeito benéfico ao permitirem a *clearance* de substâncias citotóxicas como as LDLox e outras células alteradas (Steinberg 1997). Estes receptores *scavenger*, particularmente os dos macrófagos, não são saturáveis o que permite que estas células imunes fiquem sobrecarregadas com colesterol derivado das LDLox captadas, originando as células esponjosas. Para além disso, os macrófagos e os seus receptores parecem estar implicados na determinação da natureza da lesão aterosclerótica avançada. Assim, se as células apoptóticas da lesão são fagocitadas pelos macrófagos antes do seu conteúdo intracelular extravasar, tendencialmente formar-se-á uma lesão fibrótica, a qual poderá eventualmente desencadear estenose. No entanto, se uma célula esponjosa se torna necrótica, quer por falha na internalização por parte dos macrófagos, quer por deficiência no seu processo apoptótico, irá ocorrer uma acumulação extracelular de lípidos, tornando a lesão mais instável e propícia a ruptura e conseqüente trombose por exposição do seu conteúdo pró-coagulante ao fluxo sanguíneo (Stoll *et al.* 2006).

A infiltração da íntima arterial por lipoproteínas é um facto incontornável. Contudo, permanece por esclarecer o seu papel nessa localização. Le Brazidec, suportado por dados recentes da literatura, propôs que a acumulação de lipoproteínas na íntima arterial é, na sua génese, um processo fisiológico constituindo parte das defesas do organismo contra a infecção por microrganismos (Le Brazidec 2007). Os lípidos resultantes da oxidação das lipoproteínas (incluindo oxiesteróis e lisofosfatidilcolina) actuariam como agentes microbicidas e moléculas sinalizadoras vasculares, constituindo sinais de alarme que iriam alertar o organismo para a presença de uma lesão, infecção ou inflamação, activando desta forma uma complexa rede de respostas defensivas arteriais.

As LDL, após sofrerem oxidação, são capazes de induzir a activação de várias células, concretamente, células endoteliais com conseqüente expressão de moléculas de adesão na sua superfície que, por sua vez, levam ao recrutamento, adesão e imobilização de monócitos e sua diferenciação em macrófagos na íntima arterial; estimulam a formação de células esponjosas por internalização das LDL oxidadas em macrófagos (Rajavashisth *et al.* 1990); constituem antigénios para células imunes (Stemme *et al.* 1995) e condicionam a apoptose ou necrose das células endoteliais. Induzem ainda a migração de células musculares lisas, interfindo com o relaxamento endotelial e activando propriedades pró-coagulantes vasculares (Berliner *et al.* 1995).

A ocorrência de oxidação das LDL *in vivo*, quer em animais de experiência quer em humanos, foi evidenciada por várias constatações, designadamente: o isolamento de partículas lipoproteicas provenientes de lesões ateroscleróticas humanas, com características de LDLox, nomeadamente a mobilidade electroforética aumentada (Yla-Herttuala *et al.* 1989); a presença de material antigénico compatível com anticorpos monoclonais anti-LDLox (Hessler *et al.* 1983) e que não reage com LDL nativas nas lesões ateroscleróticas (Yla-Herttuala *et al.* 1989); a presença de anticorpos circulantes reactivos perante LDLox cujos níveis eram proporcionais ao estado evolutivo das lesões ateroscleróticas (Chisolm *et al.* 2000). Importa ressaltar que, devido à semelhança química com outros epítomos, a imunoreactividade com estes anticorpos poderá reflectir a presença não só de de LDLox como também de outras proteínas modificadas por produtos da peroxidação lipídica ou ainda, células apoptóticas (Akishima *et al.* 2005).

Os efeitos citotóxicos das LDL podem também ser responsabilizados pelos seus efeitos ateroscleróticos. As LDLox são uma mistura de componentes citotóxicos tais como hidroperóxidos lipídicos (por exemplo, o hidroperoxioctadecadienoato de colesterol), aldeídos (4-hidroxinonenal e aldeído malónico), e oxiesteróis (7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicoolesterol). Vários trabalhos demonstraram que a citotoxicidade em células de cultura como fibroblastos,

células endoteliais e musculares lisas, se deve na sua maioria aos lípidos modificados (Hessler *et al.* 1983; Kita *et al.* 2001). Por exemplo, o aldeído malónico estabelece ligações cruzadas entre proteínas membranares e também no DNA, resultando em toxicidade e mutagenicidade (Basu e Marnett 1983). Outros efeitos destes produtos da oxidação lipídica foram já descritos passando pela inactivação de enzimas cruciais (Esterbauer *et al.* 1987), indução de factores apoptóticos como a Bax (Isner *et al.* 1995) e inibição de factores antiapoptóticos como a Bcl-2 (Kluck *et al.* 1997). A lisofosfatidilcolina, um componente activo das LDLox actua como ionóforo de cálcio e pode assim iniciar diversos processos celulares citotóxicos dependentes daquele catião (Serhan *et al.* 1981).

São vários os trabalhos de investigação dedicados ao estudo de potenciais sistemas geradores de agentes oxidantes cujo alvo sejam as LDL incluindo a mieloperoxidase (Podrez *et al.* 2000), óxido nítrico sintase e 15-lipoxigenase (15-LO) (Rubbo e O'Donnell 2005). O $\cdot\text{NO}$ é produzido quer pelas células endoteliais quer pelos macrófagos e parece desempenhar um duplo efeito actuando, como agente aterogénico ou como factor protector arterial, dependendo da sua fonte e níveis de produção (Hogg *et al.* 1993). O $\cdot\text{NO}$ sintetizado pela NOS endotelial tem uma função vasodilatadora e, portanto, protectora, uma vez que a deleção do gene da eNOS resulta em hipertensão e aumento da aterosclerose (Kawashima e Yokoyama 2004), efeitos estes também desencadeados pelos níveis deletérios de $\cdot\text{NO}$ resultantes do aumento da expressão e actividade da iNOS. Como já foi referido, a reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o superóxido originando peroxinitrito é uma das mais fáceis reacções de recombinação radicalares na biologia dos radicais livres, sendo que este último tem também capacidade de oxidar as LDL (Rubbo *et al.* 2005).

De facto, a produção de níveis muito superiores de $\cdot\text{NO}$ resultantes da NOS indutível, expressa em macrófagos e células endoteliais activadas, tem efeitos oxidantes graves por si só, mas sobretudo devido à formação de peroxinitrito, uma vez que a produção de anião superóxido também está exacerbada neste contexto. A acumulação de LDLox, mesmo nas lesões ateroscleróticas mais precoces, afecta profundamente a função endotelial, facto que é parcialmente devido à inibição da formação de $\cdot\text{NO}$ por aquelas lipoproteínas alteradas, as quais podem também reduzir a biodisponibilidade da L-arginina (Tanner *et al.* 1991) e induzir a expressão de ET-1 em culturas de células endoteliais (Boulanger *et al.* 1992). Quer as LDL oxidadas, quer as nativas inactivam o $\cdot\text{NO}$ (Galle *et al.* 1991, Rubbo *et al.* 2005). Estas alterações no tónus vascular potenciadas pelas LDLox podem estar envolvidas quer na iniciação, quer na progressão da aterosclerose (Vanhoutte 2009).

Apesar do que foi dito, diferentes mecanismos de oxidação parecem predominar consoante a etapa de desenvolvimento da placa ateromatosa. Por exemplo, a oxidação mediada por metais de transição parece ocorrer em lesões avançadas enquanto o dano oxidativo protagonizado

por espécies reactivas de azoto, como o peroxinitrito, parece não só surgir desde as fases mais precoces da doença como também constituir um insulto permanente (Heinecke 1998).

Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de antioxidantes, particularmente a vitamina E, carotenóides e flavonóides, está associado a um menor risco de doença cardiovascular (McMurray *et al.* 1993; Rimm e Colditz 1993). Contudo, outros ensaios clínicos não revelaram qualquer benefício (Hollman *et al.* 2011). Estes resultados discrepantes entre os estudos em modelos animais e em humanos podem, em grande parte, explicar-se pela evolução distinta da patologia induzida em animais, a qual se faz num espaço temporal de semanas a poucos meses, enquanto no homem é um processo crónico que se prolonga por várias décadas. É também um facto conhecido que compostos conhecidos como antioxidantes possuem efeitos biológicos que são independentes da sua acção antioxidante. No que concerne aos ensaios clínicos, aspectos de dosagem, natureza do antioxidante, matrizes alimentares utilizadas e o recurso a indivíduos com a patologia cardiovascular já instalada e muitas vezes avançada, não devem ser negligenciados ao reflectir sobre os resultados negativos. Neste último aspecto e considerando, uma vez mais, o factor tempo, importa ressaltar que as LDLox poderão ter um efeito mais preponderante na formação das estrias gordas do que na lesão avançada, pelo que o benefício dos antioxidantes da dieta será mais notório se usados precocemente e de forma regular ao longo da vida. A abordagem farmacológica e dietética com antioxidantes deve ser encarada nesta perspectiva como adjuvante na prevenção e tratamento das DCV (Reiner *et al.* 2011).

Entre os factores que influenciam de forma negativa a aterogénese, os níveis aumentados de colesterol-HDL, são dos mais importantes. Sucintamente, salientam-se como mecanismos responsáveis pelos efeitos cardioprotectores das HDL o facto de i) efectuarem o transporte reverso de colesterol a partir da parede arterial, ii) protegerem as LDL contra o *stress* oxidativo, iii) possuírem propriedades anti-inflamatórias e iv) actividade antitrombótica. Estudos recentes demonstraram ainda que as HDL são também capazes de proteger as células da parede arterial, sobretudo as endoteliais, contra a apoptose induzida pelas LDLox (Suc *et al.* 1997).

1.2.4. Papel do óxido nítrico na aterosclerose

O óxido nítrico foi inicialmente descrito como um radical gasoso extremamente deletério, constituinte da poluição atmosférica, responsável pela destruição da camada de

ozono e potencial carcinogénio. O seu reconhecimento como importante mediador fisiológico só foi alcançado no final dos anos 80 quando diferentes grupos liderados por Ignarro, Moncada e Furchgot, identificaram o NO como o factor de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Ignarro *et al.* 1987; Palmer *et al.* 1987; Furchgott 1999).

Desde então, foram inúmeras as descobertas acerca do papel fisiológico e fisiopatológico do NO . Esta molécula é um segundo mensageiro versátil envolvido em importantes acontecimentos fisiológicos, incluindo o relaxamento do músculo liso vascular, a prevenção da agregação e adesão plaquetar, da oxidação do colesterol das LDL, da proliferação das células musculares lisas, a diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios, a comunicação neuronal (Gally *et al.* 1990) e a regulação da resposta imune (Moilanen e Vapaatalo 1995).

Contudo, o NO actua de formas opostas, sendo por um lado, tal como acima referido, um mensageiro intracelular benéfico e por outro uma molécula tóxica associada a várias situações patológicas como a disfunção pulmonar aguda, a esclerose lateral amiotrófica, a esclerose múltipla, a artrite reumatóide, a inflamação crónica, a endotoxémia e a lesão por isquémia/reperfusão (Forstermann 2010).

O termo disfunção endotelial, como já foi abordado, refere-se a uma série de situações patológicas que envolvem o endotélio vascular, incluindo alteração das suas propriedades anticoagulantes, antitrombóticas e anti-inflamatórias. Contudo, grande parte da literatura actual utiliza este termo para designar uma perturbação do vasorelaxamento dependente do endotélio, causado por uma perda da actividade do NO nos vasos. A hiperlipidémia crónica, particularmente a hipercolesterolemia-LDL, induz uma série de alterações na homeostase vascular incluindo uma diminuição na bioactividade do NO e um aumento da produção do anião superóxido, de ET-1 e de moléculas de adesão (Casino *et al.* 1994; Rubbo *et al.* 2005).

Estudos clínicos demonstraram que os factores de risco mais preponderantes para a doença vascular aterosclerótica, tais como hipercolesterolemia, diabetes, hipertensão e tabagismo (Ross 1999), têm sido invariavelmente associados à disfunção endotelial devida a perturbações na actividade do NO (Panza *et al.* 1995). Este declínio na biodisponibilidade do NO pode ser causado por diversos mecanismos, nomeadamente, diminuição da expressão da eNOS, depleção de substrato ou cofactores para a eNOS, alterações da sinalização celular impedindo a activação da enzima, e a rápida degradação do NO por ROS (Harrison *et al.* 2003). Efectivamente, diversos estudos sugerem que o NO é uma potente molécula antiaterosclerótica endógena capaz de suprimir processos chave na aterosclerose ao desempenhar um papel fundamental no tónus e na reactividade vascular (Ross 1999).

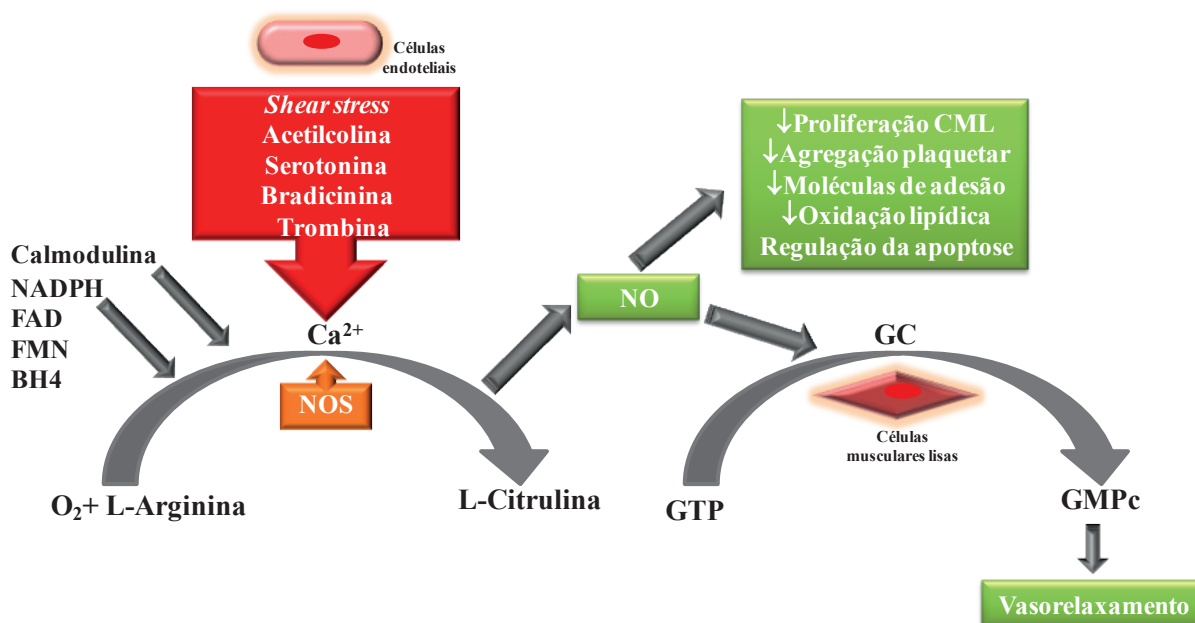


Figura 3. Síntese e efeitos fisiológicos do óxido nítrico no contexto cardiovascular.

O NO é um gás solúvel com um tempo de meia vida de ~2-5 s. Tal como representado esquematicamente na Figura 3, ele é continuamente sintetizado pela óxido nítrico sintase a partir do aminoácido L-arginina e oxigénio, com libertação de NO e L-citrulina (Moncada e Higgs 1993). O referido tempo de meia vida *in vivo* é determinado principalmente pela sua reacção com a oxihemoglobina e anião superóxido (Beckman e Koppenol 1996). Os cofactores requeridos para esta reacção incluem a tetrahydrobiopterina (BH4), o FAD, o FMN e o heme (ferro ligado a protoporfirina IX) (Alp e Channon 2004). A reacção catalisada pela NOS, ocorre em duas etapas e requer O_2 e NADPH como co-substratos, para além do substrato L-arginina, para a formação do radical NO, L-citrulina e NADP. Ainda que o seu curto tempo de meia vida condicione uma resposta localizada, reagindo com um número reduzido de moléculas, intra ou extracelularmente, o NO difunde rapidamente através das membranas celulares endoteliais, exercendo o seu efeito de vasodilatação no músculo liso vascular (Figura 3), activando a guanilato ciclase (GC) e levando ao aumento da produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e redução do cálcio intracelular (Rapoport e Murad 1983).

O NO libertado pelas células endoteliais e pelos nervos nitrérgicos é um vasodilatador endógeno *major* que reequilibra a vasoconstrição produzida pelo sistema nervoso simpático e pelo sistema renina-angiotensina. A maioria dos estudos, hoje em dia, utiliza a função vasomotora mediada pelo NO como uma ferramenta para avaliar a integridade funcional do endotélio vascular *in vivo* (Corretti *et al.* 2002; Inoue *et al.* 2008).

Nos mamíferos, identificaram-se três isoenzimas da NOS as quais são codificadas por genes distintos: duas são constitutivas, a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), e uma é indutível (iNOS) (Stuehr 1997; Crane *et al.* 1998; Marletta *et al.* 1998). Todas são homodímeros em que cada monómero possui uma massa molecular que oscila entre os 130 e os 150 kDa (Li e Poulos 2005).

As duas formas constitutivas, a eNOS e a nNOS são activadas pelo complexo cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) quando a concentração de cálcio é elevada (Huang e Lo 1998) e permanecem activas por curtos períodos de tempo (segundos a minutos) originando baixas concentrações de $\cdot\text{NO}$ (Moncada *et al.* 1993; Peng *et al.* 1998). No entanto, na ausência da L-arginina ou da BH₄, as NOS actuam como NADPH oxidases nas quais o oxigénio molecular se torna aceitador de electrões em vez da L-arginina. Tal situação leva à produção de anião superóxido e peróxido de hidrogénio em vez de $\cdot\text{NO}$ (“desacoplamento da NOS”) (Stroes *et al.* 1998). O anião superóxido actua como *scavenger* do $\cdot\text{NO}$, diminuindo o seu efeito vasoprotector. Uma das explicações possíveis para a diminuição da L-arginina e/ou BH₄ *in vivo* poderá ser a sobre-expressão de iNOS. Outros autores defendem que este desacoplamento é parcial, resultando na produção simultânea de $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$ que podem reagir entre si formando peroxinitrito, um poderoso oxidante (Cai e Harrison 2000). A expressão da forma indutível (iNOS) depende da acção de determinadas moléculas, como por exemplo, citocinas e peroxinitrito (Buttery *et al.* 1996), ambos aumentados nas lesões ateroscleróticas (Luoma *et al.* 1998). Neste caso, a CaM encontra-se fortemente ligada à iNOS independentemente da concentração de cálcio intracelular, não sendo, portanto, a actividade da enzima afectada pela concentração deste ião. A iNOS origina concentrações elevadas de $\cdot\text{NO}$ durante longos períodos de tempo (de horas a dias desde que não ocorra depleção dos substratos) denotando actividade bactericida e tumoricida, mas também lesiva dos tecidos (Moncada *et al.* 1993). Devido à sua afinidade para o ferro proteico, o $\cdot\text{NO}$ pode interagir com um número considerável de alvos fisiológicos incluindo as proteínas, mas também com outras moléculas nomeadamente com o DNA e com moléculas contendo grupos tiol (Radomski e Salas 1995).

A capacidade do $\cdot\text{NO}$ interagir quer com o complexo I e II da cadeia respiratória mitocondrial, quer com o ciclo do ácido cítrico e com a aconitase (Nathan e Hibbs 1991), têm sido relacionadas com a sua citotoxicidade, dirigida não só a microrganismos como também às células e tecidos do hospedeiro. Foi demonstrado que a apoptose de células do miocárdio durante a rejeição cardíaca alográfica é paralela à expressão da iNOS, sugerindo que a apoptose pode ser desencadeada pelo $\cdot\text{NO}$ e pelo peroxinitrito (Szabolcs *et al.* 1996).

As grandes quantidades de $\cdot\text{NO}$ produzidas pela iNOS podem também afectar a função endotelial através da depleção de substratos e cofactores para a eNOS. De facto, respostas

anómalas, dependentes do endotélio, durante as fases iniciais da aterogénese podem dever-se a quantidades reduzidas de substrato e/ou cofactores para a eNOS. Tal facto poderá explicar porque a administração de L-arginina ou do cofactor BH4 melhoram a função endotelial em situações de hipercolesterolemia e *angina pectoris* (Egashira et al. 1996).

Nos anos 90, grupos de investigação independentes identificaram uma outra forma de NOS constitutiva, a mitocondrial, detectada na membrana interna da mitocôndria. Esta isoforma, para alguns autores considerada uma variante da nNOS (Kanai et al. 2001), parece estar implicada no controlo não só do consumo de oxigénio, como do potencial da membrana mitocondrial e da síntese de ATP. Apesar da controvérsia (Lacza et al. 2006), vários grupos de investigação defendem a sua contribuição para a patologia cardiovascular (Hulsmans et al. 2012).

In vivo, os níveis de $\cdot\text{NO}$ dependem de um equilíbrio rigoroso entre a sua síntese e a respectiva degradação sendo que, actualmente, vários estudos mostram que a actividade da eNOS está comprometida na hipercolesterolemia e na aterosclerose (Luoma et al. 1998; Kawashima et al. 2004). O $\cdot\text{NO}$ é um paradigmático factor vasoactivo capaz de promover a vasodilatação, para além de outros efeitos vasoprotectores, tais como inibir a adesão de leucócitos e monócitos, suprimir a proliferação e migração de células musculares lisas e atenuar a inflamação vascular (Beckman et al. 1996). Num endotélio normal, o fluxo sanguíneo laminar desencadeia a libertação imediata de $\cdot\text{NO}$, para além de aumentar a expressão da eNOS e da superóxido dismutase (Yamamoto et al. 2011). Assim, em resultado da combinação de todos estes efeitos, os níveis baixos de $\cdot\text{NO}$ produzido pela eNOS são considerados antiateroscleróticos.

A eNOS é também activada pela acetilcolina, bradicinina, serotonina, substância P e ionóforos de cálcio. A importância fisiológica da regulação da actividade da eNOS permanece por esclarecer. Foi observado em células endoteliais bovinas que o TNF- α , isolado ou em combinação com a IL-1 β ou IFN γ , reduzem não só a actividade da eNOS mas também a sua expressão (Lamas et al. 1992; Forstermann et al. 1994).

Por outro lado, a exposição do endotélio a um fluxo oscilatório, associado a outros factores de risco vascular, como a deposição de LDLox, inibe a libertação de factores vasoactivos, tais como o $\cdot\text{NO}$, a prostaciclina, o activador do plasminogénio tecidual e o TGF β , desencadeando alterações hemodinâmicas que predispõem a processos envolvidos na aterogénese. Nestas condições patológicas, parece também existir um desacoplamento da eNOS, constituindo uma fonte adicional de anião superóxido (Vanhoutte 2009). O balanço entre a formação destes dois radicais livres, $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$, constitui um determinante *major* na formação da lesão endotelial. O mecanismo exacto não é conhecido, mas uma hipótese adiantada é que a alteração da composição lipídica da membrana celular possa desempenhar um papel neste

processo. Existem evidências da redução da transcrição e aumento da degradação de transcritos de NOS à medida que aumentam os níveis de LDLox (Jessup 1996). De igual modo, a hipercolesterolemia está associada ao aumento das concentrações circulantes de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da NOS, quer em animais de experiência, quer em humanos (Goumas *et al.* 2001; Rassaf *et al.* 2006).

Todas estas observações culminaram na constatação de que a redução da síntese de $\cdot\text{NO}$ derivado da eNOS é o primeiro processo envolvido na disfunção endotelial e que a sua redução pode resultar da inibição devida ao $\cdot\text{NO}$ ou mesmo à sua destruição por compostos nitrosados tóxicos produzidos pela sobreactivação da iNOS (Griscavage *et al.* 1995).

Pelo exposto, resultam evidenciados os diferentes papéis desempenhados pela iNOS e eNOS na aterogénese. Em condições normais, a eNOS origina concentrações baixas de $\cdot\text{NO}$ favorecedoras de um ambiente antiaterosclerótico. Não obstante, durante a hiperlipidémia e inflamação, as concentrações elevadas de $\cdot\text{NO}$ resultante da iNOS podem contribuir para uma situação de *stress* oxidativo devido à redução da formação de $\cdot\text{NO}$ dependente da eNOS e formação de anião superóxido. Tratam-se de circunstâncias propícias ao desenvolvimento de concentrações tóxicas de peroxinitrito, sobretudo na placa aterosclerótica. A combinação de todos estes efeitos constitui, provavelmente, a base do mecanismo inflamatório e de *stress* oxidativo subjacentes à aterogénese.

1.3. Aterosclerose e *stress* oxidativo/nitrosativo

1.3.1. Oxidantes intracelulares: espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)

O balanço intrínseco entre a vida e a morte celular pode ser influenciado por diversos agentes de *stress* no meio envolvente. As ROS e as espécies reactivas de azoto (RNS) encontram-se entre as mais potentes e omnipresentes ameaças enfrentadas pelos organismos vivos. Pequenas quantidades de ROS, os principais oxidantes das células, tais como o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$), radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) e radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) são permanentemente produzidos nos organismos vivos durante a sua normal função como resultado do metabolismo aeróbio (Halliwell e Cross 1994; Ray *et al.* 2012) e também da resposta inflamatória (Duvall 2005) (Figura 4). Uma situação de aumento dos níveis intracelulares de espécies reactivas é referida como uma situação de *stress* oxidativo (Sies 1997). Actualmente, esta definição sofreu uma actualização por forma a torná-la mais abrangente e não conceptualmente limitadora. Uma vez que existem múltiplas

vias de sinalização redox, muitas vezes específicas para um tecido e órgão, considera-se uma situação de *stress* oxidativo aquela em que ocorra uma perturbação da sinalização redox e/ou do seu controlo (Jones 2006).

Embora a fosforilação oxidativa mitocondrial constitua um dos principais locais de produção de espécies reactivas nas células eucarióticas, estas também podem resultar da actividade de enzimas (por exemplo, xantina oxidase, NADPH oxidase, lipoxigenases, NOS, entre outras), de células fagocíticas (em resposta à agressão por microrganismos ou células tumorais), do metabolismo do ácido araquidónico, da auto-oxidação de catecolaminas e da exposição a radiação ionizante ou a químicos oxidantes (Ray *et al.* 2012).

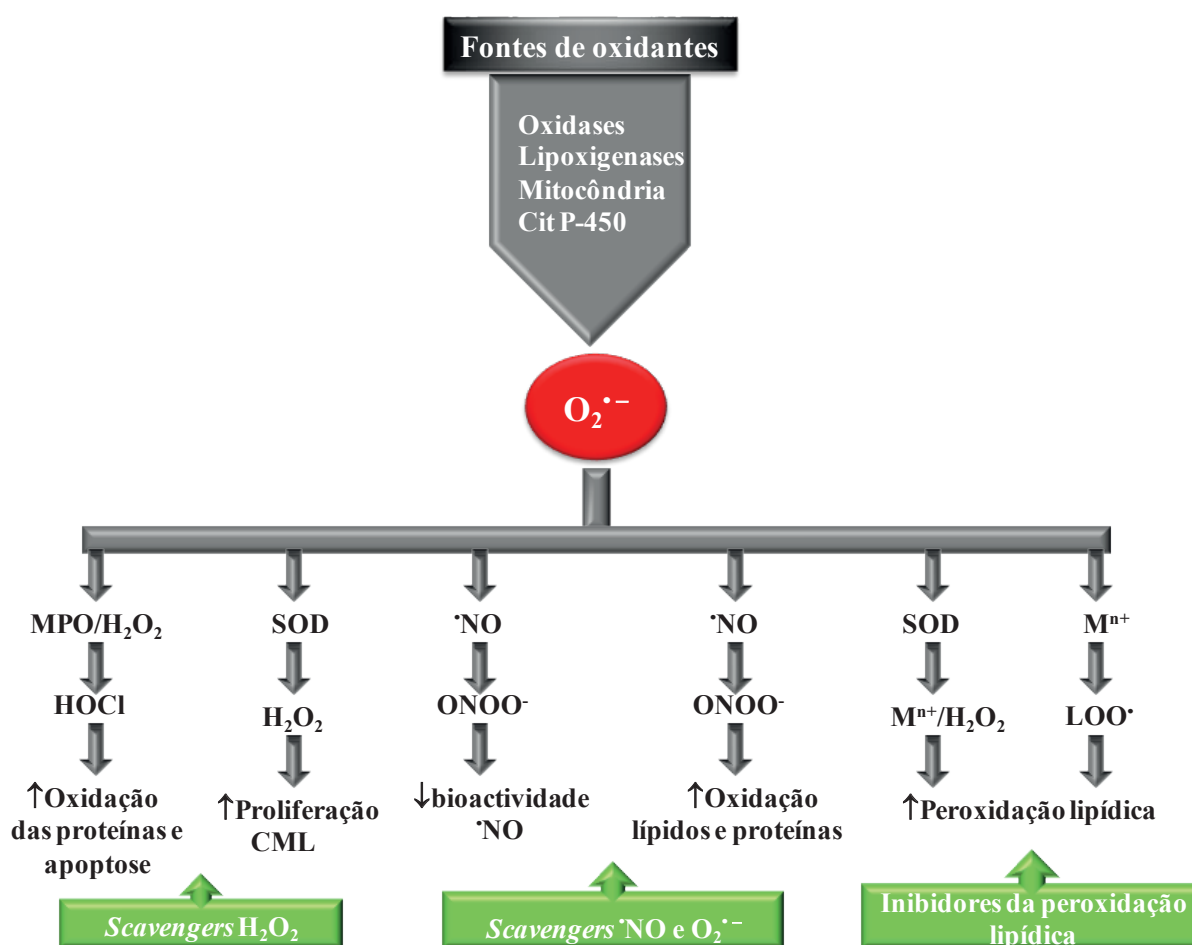


Figura 4. Diversidade de potenciais oxidantes implicados na aterosclerose e formas de os neutralizar. Adaptado de Stocker *et al.* 2004.

A formação de oxidantes é inevitável, mas a acumulação intracelular de espécies reactivas, isto é, quando a sua produção se sobrepõe às defesas antioxidantes, tem sido implicada em muitos processos patológicos, como o envelhecimento, a carcinogénese e a inflamação crónica, incluindo a aterosclerose. Estas espécies reactivas, caracterizadas por elevados potenciais de oxi-

dação-redução (Cadenas *et al.* 1997) podem dividir-se em espécies radicalares e não radicalares. Uma vez que os radicais livres são moléculas que contêm um ou mais electrões desemparelhados na sua orbital externa, eles reagem facilmente com estruturas biológicas, particularmente lípidos poli-insaturados das membranas, DNA e aminoácidos. Estes agentes, em baixas concentrações, constituem moléculas sinalizadoras, regulando a activação e proliferação celular, ao actuarem como segundos mensageiros em resposta a factores de crescimento e citocinas (Simon *et al.* 1998). Por exemplo, o NF- κ B é um importante factor de transcrição que é regulado pelo estado redox intracelular, estando implicado na expressão de vários genes envolvidos em mecanismos de resposta celular ao *stress* oxidativo (Schreck *et al.* 1991). Contudo, quando produzidos em excesso, produzem efeitos deletérios potenciados pelo facto da reacção de um radical com um não radical poder originar uma cadeia de reacções que levam a formação de uma nova espécie radicalar. Já os oxidantes não radicalares (peróxido de hidrogénio, ácido hipocloroso, entre outros), que podem até resultar da reacção entre dois radicais (por exemplo, o peroxinitrito) são também de extrema relevância fisiopatológica, considerando, particularmente, as modificações oxidativas na parede vascular. Todas as espécies reactivas referidas causam danos a lípidos, proteínas e ao DNA (Halliwell e Aruoma 1991; Steinberg *et al.* 2010), e estão implicadas na aterogénese. Na Figura 4 estão indicadas as espécies reactivas consideradas mais relevantes no processo aterosclerótico, a sua origem e as diferentes formas de impedir os seus efeitos deletérios.

As ROS, em particular, podem levar à oxidação de resíduos de aminoácidos, à formação de ligações cruzadas entre proteínas e mesmo à sua fragmentação (Berlett e Stadtman 1997). Levam ainda à depleção das reservas energéticas endoteliais (Spragg *et al.* 1985), aumento da adesão de monócitos ao endotélio (Lewis *et al.* 1988), aumento da permeabilidade endotelial (Siflinger-Birnboim *et al.* 1996) e estimulação da libertação de prostaciclina (prostaglandina I₂) pelo endotélio (Harlan e Callahan 1984).

A resposta celular ao distúrbio redox consite numa plétora de mecanismos biológicos por forma a evitar que uma situação de *stress* se transforme em dano oxidativo, ou seja, em lesão tecidual. Estas respostas adaptativas incluem a paragem de crescimento da célula, a transcrição de genes, a modulação dos níveis de antioxidantes, a iniciação de diversas vias de transdução de sinal, a modificação de proteínas e lípidos e a reparação do DNA lesado (Stocker *et al.* 2004). Estes eventos precoces, em regra, vão determinar o destino da célula o qual poderá passar por necrose, senescência, apoptose ou sobrevivência e proliferação.

Estudos de imunohistoquímica em tecidos ateroscleróticos indicaram a presença de marcadores de oxidação e nitração, como por exemplo, hidroperóxidos lipídicos e nitrotirosina, evidenciando a presença de espécies reactivas de oxigénio e de azoto (Beckman *et al.* 1996). Na realidade, o interior de uma lesão aterosclerótica humana possui um ambiente pró-oxidante

(Smith *et al.* 1992). Um grande número de macrófagos e linfócitos T, os quais são fontes ricas de ROS, afluem a estas áreas devido à resposta inflamatória e imune. As células endoteliais e as células musculares lisas são também capazes de produzir anião superóxido, assim como $\cdot\text{NO}$ (Moncada *et al.* 1993). Várias investigações, usando tecidos humanos e animais têm evidenciado que as propriedades antiaterogénicas e vasodilatadoras do $\cdot\text{NO}$ são reduzidas por um aumento do *stress* oxidativo na parede vascular aterosclerótica (Huie e Padmaja 1993).

Os sistemas de defesa antioxidante endógenos têm como função proporcionar um ambiente celular saudável ao minimizar, e mesmo reverter, os efeitos nefastos resultantes da produção excessiva de espécies reactivas. Estes sistemas incluem *scavengers* enzimáticos (SOD, catalase e glutatíão peroxidase) e *scavengers* não enzimáticos (vitaminas A, C, E, β -caroteno, flavonóides, cisteína, coenzima Q, ácido úrico e o glutatíão).

Algumas das espécies reactivas com maior relevância na activação e na disfunção do endotélio serão abordadas com maior detalhe nos subcapítulos seguintes. De salientar que o $\cdot\text{NO}$, dada a sua relevância como espécie reactiva vascular foi abordado separadamente no item 1.2.4.

1.3.1.1. O anião superóxido e o peróxido de hidrogénio

O anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) resulta da redução univalente do oxigénio molecular e é produzido por várias enzimas em diferentes tipos de células. Apesar das suas características redutoras ele dá origem a espécies que têm grande poder oxidante. As células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos) produzem este radical para inactivar vírus e bactérias, mas o anião superóxido pode ser também produzido por fibroblastos, células musculares lisas e células endoteliais vasculares sendo, nestes casos, importante como molécula sinalizadora intracelular, participando na regulação do crescimento. A produção vascular excessiva do anião superóxido tem sido implicada no desenvolvimento da aterosclerose (White *et al.* 1994).

Na realidade, este radical parece intervir na oxidação das LDL (Steinbrecher *et al.* 1984), sendo que a fonte de excesso deste anião parece não ser a camada muscular lisa mas sim as próprias células endoteliais (Ohara *et al.* 1993). Neste contexto, é possível prever que uma produção aumentada de superóxido pelo endotélio na hipercolesterolemia possa exacerbar a modificação das LDL e a sua acumulação na parede vascular. De referir que todas as células aeróbias possuem as enzimas superóxido dismutases (SOD) que catalisam a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual, por sua vez, pode gerar outras espécies reactivas.

De entre as enzimas produtoras de anião superóxido, as NAD(P)H oxidases (Nox) merecem destaque uma vez que constituem uma das principais fontes de ROS na vasculatura

(Pagano *et al.* 1995). As NAD(P)H oxidases encontram-se associadas à membrana das células e utilizam o NADH ou NADPH como dador de electrões para produção de $O_2^{\cdot-}$ a partir da redução do oxigénio molecular (Griendling *et al.* 2000) de acordo com a reacção 1: $NAD(P)H + 2O_2 \rightarrow NAD(P)^{\cdot-} + H^+ + 2O_2^{\cdot-}$.

Não obstante alguma controvérsia relativa ao local da reacção catalisada por estas enzimas nas diferentes células vasculares e fagócitos, sabe-se que estas diferem em termos de componentes proteicos e níveis de produção de $O_2^{\cdot-}$.

As NAD(P)H oxidases vasculares apresentam actividade basal durante o metabolismo celular normal, podendo ocorrer um incremento desta actividade quando estão sujeitas a diferentes estímulos, tais como aqueles que estão envolvidos na patogénese da doença aterosclerótica, nomeadamente, a angiotensina II, a trombina, o factor de crescimento derivado das plaquetas, o TNF- α , a IL-1, e, particularmente, o *shear stress* e o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Ushio-Fukai *et al.* 2002). Por seu lado, a enzima fagocítica é capaz de gerar grandes quantidades de anião superóxido na presença de microrganismos invasores. De salientar os aumentos da actividade e da expressão das subunidades proteicas da NAD(P)H oxidase observados em situação de hipercolesterolemia, o que realça a sua potencial responsabilidade, pelo menos em parte, pelo *stress* oxidativo subjacente à aterosclerose (Stokes *et al.* 2001).

Outra das fontes reconhecidas de anião superóxido é uma flavoproteína que contém molibdénio, ferro e enxofre, denominada xantina oxidase. Esta enzima desempenha múltiplas funções e está presente em concentrações elevadas nas células endoteliais (Jarasch *et al.* 1981). Ela existe sob duas formas, xantina desidrogenase e oxidase, sendo a primeira a mais prevalente. Ambas catalisam a oxidação da xantina ou da hipoxantina a ácido úrico, mas enquanto a desidrogenase produz NADH a oxidase origina anião superóxido. No entanto, a xantina desidrogenase pode ser convertida em oxidase através de uma clivagem proteolítica irreversível ou por oxidação reversível dos seus grupos tiol (Stocker *et al.* 2004). A assinalar o aumento da expressão de xantina oxidase observado em locais de *shear stress*, situação conhecida como predisponente para formação de lesões ateroscleróticas (McNally *et al.* 2003).

Importa ainda acrescentar que a cadeia respiratória mitocondrial constitui um dos principais locais de produção intracelular de anião superóxido. Efectivamente, 1 a 2% do oxigénio molecular consumido ao longo da cadeia de transporte de electrões na membrana interna da mitocôndria, pode ser convertido em anião superóxido. Esta conversão é levada a cabo, principalmente, ao nível do complexo I (NADH desidrogenase) e complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase). São várias as respostas celulares que têm sido relacionadas com o anião superóxido mitocondrial, incluindo a paragem do crescimento, apoptose e necrose celulares (Hughes *et al.*

2005). Os níveis de $O_2^{\cdot-}$ mitocondriais estão directamente dependentes da superóxido dismutase (Mn-SOD) da matriz mitocondrial que converte o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 . A monoamina oxidase da membrana mitocondrial externa constitui uma fonte adicional de H_2O_2 .

Assim, o peróxido de hidrogénio é produzido em todos os compartimentos celulares e sofre difusão de acordo com os gradientes de concentração (Boveris *et al.* 1972). No contexto vascular, a hiperglicémia e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas têm sido relacionados com disfunção mitocondrial associada à produção mitocondrial de ROS (Ramachandran *et al.* 2002; Szabo *et al.* 2007; Hulsmans *et al.* 2012) incluindo níveis significativos de peroxinitrito, como será objecto de posterior discussão.

1.3.1.2. Outros oxidantes vasculares

A mieloperoxidase é a única enzima humana que catalisa a conversão de Cl^- em ácido hipocloroso (reacção 2: $H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$). O sistema mieloperoxidase/ H_2O_2/Cl^- e o HOCl são, por sua vez, capazes de originar uma série de produtos de reacção secundários que conseguem oxidar diferentes biomoléculas e as LDL (Stocker *et al.* 2004). Este sistema é ainda responsável pela oxidação do nitrito ao oxidante não radicalar cloreto de nitrilo (NO_2Cl) e ao radical dióxido de azoto (NO_2^{\cdot}), ambos com capacidade de promover nitração e de converter a tirosina em 3-nitrotirosina (van der Vliet *et al.* 1997), detectada em lesões ateroscleróticas humanas.

Outros autores constataram que as células endoteliais são capazes de iniciar a oxidação das LDL através de uma via independente do superóxido e que envolve enzimas citosólicas existentes também em macrófagos e células musculares lisas, designadas lipoxigenases (Takahashi *et al.* 2005). As lipoxigenases são dioxigenases que contêm ferro e que são responsáveis pela inserção de um oxigénio molecular em ácidos gordos poli-insaturados originando uma série de lípidos bioactivos, nomeadamente, prostaglandinas e leucotrienos (Schewe 2002).

Da decomposição do H_2O_2 e de outros peróxidos por reacção com metais de transição/metaloproteínas, podem resultar radicais hidroxilo e peroxilo capazes de iniciar a peroxidação lipídica (Beckman *et al.* 1990). Os radicais peroxilo lipídicos daí resultantes estão implicados numa sequência de reacções que culminam com a formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), encontrados em lesões ateroscleróticas humanas. Esta cascata de reacções radicalares na parede arterial envolve também as lipoproteínas e pode conduzir à formação do radical derivado do α -tocoferol ($\alpha\text{-TO}^{\cdot}$), que parece também ser responsável pela propagação da peroxidação lipídica, em determinadas condições (Stocker *et al.* 2004).

Importa ainda fazer referência aos metais de transição, em particular o ferro, já que as suas formas biológicas como o heme, a hemoglobina e a mioglobina, são todas potenciais catalisadores de reacções de oxidação na parede dos vasos (Miller *et al.* 1996). De facto, através da reacção de Fenton, o H_2O_2 pode sofrer redução por um ião metálico como o Fe^{2+} , formando o radical hidroxilo HO^\cdot . Este radical pode também ter origem através da reacção directa entre o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio (Reacção de Haber-Weiss). Os radicais HO^\cdot são bastante lesivos para as células sendo capazes de iniciar a peroxidação lipídica, como já se referiu, para além de alterarem hidratos de carbono, proteínas e DNA.

1.3.1.3. O caso particular do peroxinitrito

1.3.1.3.1. A biosíntese do peroxinitrito

A investigação ao longo das últimas décadas revolucionou os nossos conhecimentos acerca da patogénese da aterosclerose e o peroxinitrito (ONOO^-) tornou-se um interveniente inquestionável como potente agente oxidante capaz de múltiplos danos biológicos incluindo a fragmentação do DNA, a modificação de proteínas, a oxidação de grupos tiol, a indução da peroxidação lipídica e a apoptose (Szabo *et al.* 2007).

O ONOO^- resulta, *in vivo*, da reacção do $\text{O}_2^{\cdot-}$ com o $^\cdot\text{NO}$ ($\text{O}_2^{\cdot-} + ^\cdot\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$) com uma constante de velocidade limitada apenas pela difusão dos reagentes ($k \approx 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Radi *et al.* 1991; Beckman *et al.* 1994; Squadrito e Pryor 1995), sendo produzido por vários tipos de células, incluindo as imunes durante a resposta inflamatória, neurónios e células endoteliais (Huie *et al.* 1993; Griendling *et al.* 2000). Como já foi referido, o anião superóxido forma-se em todas as células com metabolismo aeróbio e é continuamente dismutado em H_2O_2 e O_2 pela SOD, pelo que o tempo de meia vida deste radical se traduz em alguns milisegundos, conseguindo permear as membranas apenas através de canais iónicos (Fridovich 1995). Por seu lado, em condições fisiológicas, o $^\cdot\text{NO}$ é formado em concentrações da ordem dos picomolar a nanomolar (Weyrich *et al.* 1994), tem um tempo de meia vida de alguns segundos (2-5 s) e difunde facilmente através das membranas (Denicola *et al.* 1996). Uma vez que o peroxinitrito é sintetizado a partir de concentrações equimolares de $^\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$ e tendo estes dois radicais tempos de meia vida tão curtos, não é provável que aquele oxidante alcance concentrações elevadas, em situações fisiológicas normais, para além de que a sua formação deverá estar associada espacialmente com os locais de produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Wever e colaboradores referiram que, em condições fisiológicas, a concentração de $^\cdot\text{NO}$ excede a de $\text{O}_2^{\cdot-}$, o que permite que o

primeiro actue como antioxidante (Wever *et al.* 1998). Para além disso, numa situação não patológica, a SOD é capaz de neutralizar todo o $O_2^{\cdot-}$ em excesso.

Contudo, e uma vez que a velocidade da reacção do $O_2^{\cdot-}$ com o $\cdot NO$ é cerca de cinco vezes superior à dismutação do $O_2^{\cdot-}$ catalisada pela SOD (Huie *et al.* 1993), quando ocorre um aumento patológico das concentrações destes dois radicais, tal resulta em acções nefastas para as células, particularmente as vasculares. Estas concentrações deletérias podem ser encontradas em lesões ateroscleróticas nas quais se verifica, simultaneamente, o aumento da formação quer de anião superóxido pelas oxidases endoteliais quer de $\cdot NO$ devido à indução da iNOS por citocinas (Buttery *et al.* 1996). Para além disso, nas situações de hipercolesterolemia subjacentes a tais lesões, verificou-se que os mecanismos de destoxificação contra o peroxinitrito, proporcionados pelo glutatião, estão diminuídos (Ma *et al.* 1997).

O anião peroxinitrito tem um tempo de meia vida 0.1-1s a pH 7.4, 37°C (Beckman *et al.* 1990; Pryor e Squadrito 1995) mas o facto de ser capaz de atravessar as membranas celulares implica que ele pode influenciar células alvo vizinhas (a distâncias de 5-20 μm). Devido ao seu $pK_a=6.8$ ao pH fisiológico, ele está em equilíbrio com a sua forma protonada, o ácido peroxinitroso (ONOOH) (Radi *et al.* 2001). Este ácido é mais reactivo que o ONOO \cdot , embora também decaia rapidamente numa mistura de produtos de reacção (Pryor *et al.* 1995). O peroxinitrito e o ácido peroxinitroso aumentam dramaticamente a toxicidade, quer do superóxido quer do $\cdot NO$ isolados (Beckman *et al.* 1990). Existem outros processos biológicos de síntese de peroxinitrito cuja contribuição é mínima quando comparados com as fontes até agora discutidas.

A mitocôndria é considerada um local privilegiado de produção e de intervenção do peroxinitrito (Radi *et al.* 2002; Poderoso 2009); este pode formar-se no interior da mitocôndria ou sofrer difusão a partir de compartimentos extramitocondriais. Enquanto que o $\cdot NO$ é uma molécula neutra, hidrofóbica e difusível (Romero *et al.* 1999), a difusão do $O_2^{\cdot-}$ é limitada principalmente pela acção das SOD. Assim, os locais intramitocondriais mais prováveis para a formação do ONOO \cdot serão aqueles onde existe produção de $O_2^{\cdot-}$; ou seja, a matriz mitocondrial (Boveris *et al.* 1976; Grivennikova e Vinogradov 2006) e, em muito menor extensão, o espaço intermembranar (Okado-Matsumoto e Fridovich 2001).

1.3.1.3.2. O peroxinitrito como promotor de reacções de oxidação/nitração

Tal como indicado na Figura 5, o peroxinitrito em meio biológico pode originar diversas espécies com maior ou menor reactividade.

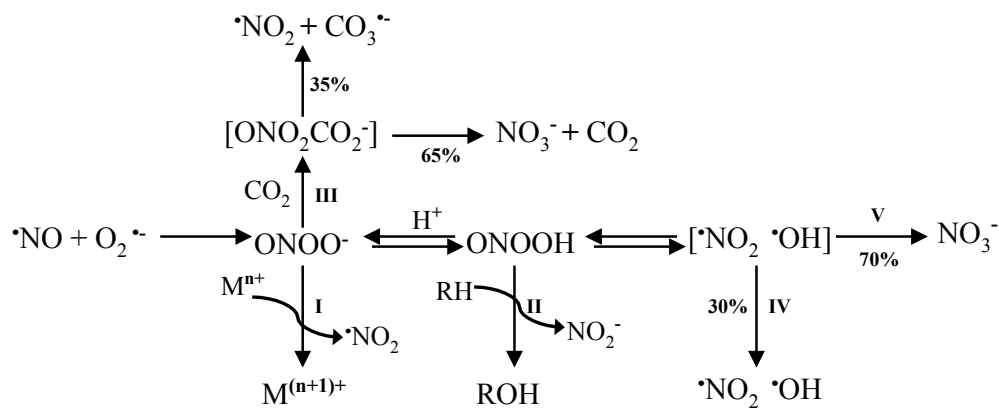


Figura 5. Potenciais reacções químicas do peroxinitrito em meio biológico. I) reacção directa de oxidação por um electrão com metais de transição (Fe, Mn, Cu); II) reacção directa de oxidação por 2 electrões, com um substrato alvo, RH; III) reacção com o dióxido de carbono, formando o composto nitroso-peroxocarboxilato o qual se decompõe rapidamente em radicais secundários nocivos para as células; IV) homólise do ONOOH em radicais agressivos, ocorrendo predominantemente nas membranas, onde tem início a peroxidação lipídica e a nitração de lípidos e proteínas; V) rearranjo do ONOOH em nitrato. Adaptado de Radi *et al.* 2001.

O principal alvo biológico do ONOO[•] é o dióxido de carbono dadas as suas elevadas concentrações fisiológicas próximas de 25 mM, daí resultando uma série de produtos capazes de promoverem reacções de nitração (adição de um grupo nitro –NO₂), nitrosação (adição de –NO) e outras oxidações. Assim, da reacção do ONOO[•] com o CO₂ forma-se um aducto instável, o nitrosoperoxocarboxilato (ONOOOCO₂^{•-}) (Pavlovic e Santaniello 2007) que sofre homólise (35%), originando os radicais CO₃^{•-} e [•]NO₂, e isomerização em NO₃⁻ e CO₂ (65%). Embora os produtos estáveis da reacção do peroxinitrito com o CO₂ sejam o nitrato e o dióxido de carbono, na presença de alvos biológicos a maioria do peroxinitrito origina nitrito (NO₂⁻) (Radi *et al.* 2001). O CO₃^{•-} é um oxidante relativamente forte e o [•]NO₂ um oxidante mais moderado, mas também é um agente nitrante, pelo que, a estes dois radicais é atribuída parte da responsabilidade pelos efeitos deletérios do ONOO[•] em sistemas biológicos. Cerca de 30% do ácido peroxinitroso pode também sofrer homólise decompondo-se em HO[•] e [•]NO₂ enquanto que a restante percentagem isomeriza directamente a nitrato (NO₃⁻) (Beckman *et al.* 1990; Merenyi *et al.* 1998).

In vivo, mais de 95% do peroxinitrito formado é consumido em reacções directas com biomoléculas pelo que a contribuição dos produtos da clivagem homolítica do ONOOH parece ser diminuta devido à reduzida velocidade desta reacção (Radi *et al.* 2001). Apesar disso, e uma vez que o ONOOH atravessa facilmente as membranas celulares, a sua decomposição

em $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{NO}_2$ torna-se relevante em ambientes hidrofóbicos, podendo iniciar processos de peroxidação lipídica (Szabo *et al.* 2007; Rubbo *et al.* 2009).

O peroxinitrito promove, essencialmente, oxidações directas dos componentes mitocondriais em particular ao nível dos complexos I, II e V da cadeia respiratória mitocondrial, conduzindo à sua inactivação, enquanto que os seus derivados protagonizam reacções de nitração e nitroação (Radi *et al.* 2002). O complexo IV (citocromo c oxidase, conhecida como altamente resistente aos danos oxidativos, não parece ser afectada pelo ONOO^- (Pearce *et al.* 2001).

Sendo o ONOO^- mais reactivo que os compostos que lhe deram origem (Crow e Beckman 1995; Pryor *et al.* 1995), são múltiplos os alvos moleculares que são oxidados e/ou nitrados por este anião e pelos seus derivados, incluindo resíduos de tirosina, tióis, tioéteres, ácidos nucleicos, lípidos e antioxidantes (Gunaydin e Houk 2009; Rubbo *et al.* 2009). O ONOO^- promove a nitração de resíduos aromáticos e alifáticos. Enquanto que a cisteína e a metionina são particularmente vulneráveis à oxidação pelo peroxinitrito, a tirosina e o triptofano são alvos para a nitração dependente deste anião ou dos seus produtos secundários (Alvarez e Radi 2003). Concretamente, o radical tirosilo resultante, entre outras reacções, da nitração da tirosina, combina-se rapidamente com o $\cdot\text{NO}_2$ formando a 3-nitrotirosina (Goldstein e Merenyi 2008), um marcador de eleição para confirmar a produção de peroxinitrito (Ischiropoulos 1998). A nitração dos resíduos de tirosina reveste-se de importância singular uma vez que esta reacção impede que os resíduos de tirosina sofram interconversão cíclica entre a forma fosforilada e não fosforilada (Hunter 1995). Desta forma, a nitração compromete um dos mais importantes mecanismos de regulação celular de enzimas chave e vias de sinalização. A nitração dos resíduos de tirosina é um processo irreversível, podendo desta forma inactivar enzimas (Gow *et al.* 1996). A oxidação e a nitração de proteínas mediada pelo ONOO^- pode também induzir alterações na sua estrutura terciária, tornando-as disfuncionais e em última análise, inacessíveis à degradação pelo proteassoma (Grune *et al.* 2001). Estas proteínas modificadas tendem a acumular-se e a formar agregados insolúveis, facto que parece contribuir de forma crítica para a patogénese de várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, a de Huntington e a de Parkinson, sendo que o envolvimento do peroxinitrito nestas patologias tem sido avançado (Torreilles *et al.* 1999).

Outro dos alvos do peroxinitrito e derivados é o DNA. A nitração e nitroação das bases púricas do DNA resultam em nitroductos e outros compostos oxidados, sendo a 8-oxo- e a 8-nitro-guanina dois dos principais produtos obtidos e que são considerados mutagénicos (Jourdeuil *et al.* 1997). O ONOO^- oxida também as oses do DNA e induz quebras na sua cadeia (Kennedy *et al.* 1997).

Embora seja amplamente aceite que o aumento da síntese de ONOO^- é citotóxico, várias evidências na literatura recente sugerem que teores fisiológicos de peroxinitrito po-

dem desempenhar funções importantes como reguladores do normal funcionamento celular. Diversos autores constataram que concentrações baixas de peroxinitrito se comportam de forma similar ao $\cdot\text{NO}$, isto é, podem causar vasodilatação, diminuir a agregação plaquetar e a adesão de leucócitos ao vaso, exercendo assim efeitos citoprotectores (Adachi *et al.* 2004; Uppu *et al.* 2007), para além da destruição oxidativa de microrganismos invasores. Estes efeitos parecem estar relacionados com a formação de S-nitrosotióis que já foram detectados no plasma e em outros fluidos biológicos (Stamler *et al.* 1997). A activação da guanilato ciclase pelo peroxinitrito é também promovida pela presença de tióis e parece envolver a formação de intermediários nitrosotiol (Moro *et al.* 1994).

Assim, é possível que os efeitos benéficos ou deletérios do peroxinitrito dependam do balanço peroxinitrito/tióis. A partir do momento em que os níveis de ONOO^- excedem a capacidade dos tióis em assegurarem a sua modificação, os seus efeitos negativos começam a prevalecer. Será, provavelmente, o que acontece na aterosclerose, caracterizada pela produção contínua e excessiva de ROS e RNS.

Porém, foi recentemente reportado que os nitrosotióis não são tão benéficos como se suspeitava à partida, o que demonstra quão complexas podem ser as interações do ONOO^- *in vivo* (Kitagawa *et al.* 2005). Embora ainda não se conheça a extensão de tal realidade, os nitrosotióis, para além dos efeitos protectores vasculares, podem também degradar-se em compostos deletérios.

1.3.1.3.3. O peroxinitrito na aterosclerose

Como já foi mencionado, as células da parede vascular conseguem produzir simultaneamente $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\cdot\text{NO}$, pelo que a formação de ONOO^- poderá ocorrer, em particular, precipitada por aumentos bruscos de $\text{O}_2^{\cdot-}$ como os que ocorrem em casos de inflamação, isquémia-reperfusão, hipercolesterolemia e hipertensão induzida pela angiotensina (Beckman *et al.* 1996; Rubbo *et al.* 2005). Nessas condições, o peroxinitrito formado nas células endoteliais pode exercer localmente diversos efeitos nefastos, como esquematizado na Figura 6, alterando o vasorelaxamento e podendo levar à activação da via do NF- κB , como se abordará mais à frente.

Embora actualmente seja inquestionável o envolvimento do ONOO^- e dos seus derivados na aterosclerose como agentes oxidantes *major* das LDL, os mecanismos subjacentes ainda permanecem por esclarecer cabalmente, muito devido ao facto de não existirem métodos directos para o detectar e quantificar *in vivo*. Esta limitação deve-se não só ao seu reduzido

tempo de meia vida, como também às múltiplas proveniências, ao seu envolvimento em diversas reacções e de não se saber quais os derivados que estão implicados nessas mesmas reacções.

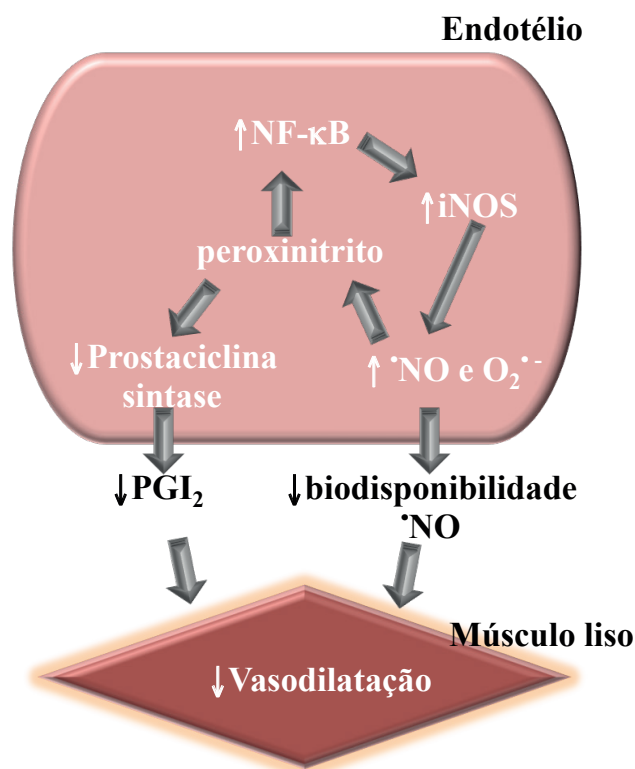


Figura 6. Alguns dos efeitos propostos para o peroxinitrito no endotélio vascular. O peroxinitrito é capaz de aumentar a expressão da enzima iNOS nas células endoteliais através da activação do factor de transcrição NF-κB. Assim, numa situação de *stress* oxidativo, a produção de peroxinitrito vai aumentar, provocando o decréscimo da biodisponibilidade de óxido nítrico, necessário à vasodilatação. Para além disso, o peroxinitrito reduz as concentrações de prostaciclina sintase, inibindo assim a PGI₂ vasodilatadora e favorecendo a acção vasoconstritora da PGH₂ e do tromboxano. Adaptado de Cooke *et al.* 2002.

Estudos *in vitro* demonstraram que a adição, em bólus, de ONOO⁻ não conduziu a uma significativa peroxidação lipídica, contrastando com a eficiente peroxidação lipídica levada a cabo por infusões contínuas de ONOO⁻ (Botti *et al.* 2004), que asseguraram uma produção sustentada de radicais lipídicos (Rubbo *et al.* 2005). Na primeira situação, a apolipoproteína e os carotenóides das LDL parecem ser os alvos preferenciais do ONOO⁻ (Pannala *et al.* 1998; Dinis *et al.* 2002). Uma das principais alterações decorrente da oxidação de LDL mediada pelo ONOO⁻ é a formação de aductos lípido-proteína que constituem ligandos para os receptores *scavenger* dos macrófagos, para além de originarem hidroperóxidos que se decompõem em aldeídos (aldeído malónico e hidroxinonenal) e outros produtos bioactivos, que estabelecem ligações cruzadas

com grupos amina livres, tornando a partícula de LDL mais electronegativa (Troostchansky *et al.* 2001). Importa, neste ponto, ressaltar que outros agentes nitrantes, tais como o sistema mieloperoxidase/H₂O₂/NO₂⁻ podem igualmente contribuir para a nitração lipídica e proteica durante o processo inflamatório vascular (Podrez *et al.* 2000).

A formação de nitrotirosina, reconhecido marcador da modificação proteica mediada pelo peroxinitrito (Beckman *et al.* 1996) está aumentada em placas ateroscleróticas humanas, quer nas suas fases iniciais quer nas etapas crónicas da doença (Leeuwenburgh *et al.* 1997), o que indicia o envolvimento desta espécie reactiva na aterogénese. De facto, Leeuwenburgh *et al.* verificaram, ao isolar LDL de lesões ateroscleróticas humanas, que a produção de peroxinitrito nessas lesões, inferida pelas concentrações de 3-nitrotirosina, era cerca de 90 vezes superior à encontrada em partículas de LDL circulantes (Leeuwenburgh *et al.* 1997). Esta espécie reactiva tem a capacidade de modificar as LDL de forma a que estas sejam reconhecidas pelos receptores *scavenger* de macrófagos na íntima, levando à formação de células esponjosas e de estrias gordas, que constituem a lesão inicial aterosclerótica (Steinberg *et al.* 1989).

Igualmente, na reperfusão após uma situação de isquémia, ocorre a formação de elevados níveis de espécies reactivas, incluindo peroxinitrito, superóxido e radical hidroxilo. Os neutrófilos e macrófagos que se dirigem a esses tecidos isquémicos sujeitos a reperfusão, a fim de eliminarem as células inviáveis, também libertam quantidades apreciáveis de ROS e RNS, incluindo anião superóxido e óxido nítrico que exacerbam a lesão dos tecidos envolvidos (Ronsion *et al.* 1999).

O ONOO⁻ produzido pelas células vasculares, em determinadas situações adversas, influencia profundamente as respostas inflamatórias vasculares a vários níveis. Durante o processo inflamatório, no qual estão reunidas as condições propícias à formação de ONOO⁻, as reacções deste ião com mediadores inflamatórios, como as interleucinas e a iNOS, constituem importantes vias de modulação desta resposta celular. Ele próprio é capaz de exacerbar a produção de muitos destes mediadores, principalmente devido à activação das vias de transdução de sinal dependentes do NF-κB e do PARP (Matata e Galinanes 2002). Outras acções pró-inflamatórias consistem no aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) e de P-selectina pelas células endoteliais. Para além do que foi dito, são inúmeras as acções biológicas desencadeadas pelo peroxinitrito e/ou pelos seus derivados cujos efeitos têm implicações directas e indirectas no contexto aterosclerótico. Sucintamente, a inibição de enzimas antioxidantes (SOD, glutatião redutase), a depleção de antioxidantes (glutatião, cisteína) e de cofactores enzimáticos (BH₄, NADH), a activação de enzimas e proteínas (metaloproteínases da matriz, ciclooxigenase-2, citocromo c, fibrinogénio, glutatião-S-transferase) e a inibição de enzimas específicas (eNOS, SOD), a modificação de receptores, a lesão do DNA e a disfunção mitocondrial (inactivação dos

complexos I, II e V, e a libertação de factores apoptóticos), são apenas alguns desses efeitos (Szabo *et al.* 2007).

São, portanto, múltiplos os factores e mecanismos potencialmente envolvidos na aterogénese, tendo particular destaque o *stress* nitroxidativo mediado pelo ONOO⁻ indutor de resposta inflamatória/imune e também de morte celular, como se falará mais adiante nesta dissertação.

1.3.2. Sistemas de defesa antioxidante celulares

Uma das muitas definições de antioxidante resume-os como qualquer composto que, quando presente em pequenas concentrações comparativamente ao substrato oxidável, consegue atrasar ou impedir de forma significativa a oxidação daquele substrato (Halliwell *et al.* 1995). Os mecanismos de defesa antioxidantes são cruciais à sobrevivência dos organismos e são proporcionados por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos incluem enzimas extensamente estudadas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, as quais actuam especificamente sobre espécies reactivas de oxigénio (ROS), a glutatião peroxidase (GPX), a glutatião reductase, tioredoxina reductase, a heme oxigenase-1 (HO-1), a peroxidase eosinofílica e os sistemas enzimáticos regeneradores do glutatião (Stocker *et al.* 2004). Por outro lado, os sistemas não enzimáticos, geralmente menos específicos, conseguem também actuar como *scavengers* de radicais. Estes antioxidantes podem classificar-se como hidrossolúveis (ácido ascórbico e urato) ou lipossolúveis (ubiquinóis, retinóides e tocoferóis) consoante actuem primariamente na fase aquosa ou na região lipofílica das membranas celulares. O organismo possui antioxidantes endógenos, incluindo determinadas proteínas plasmáticas, o glutatião, e o urato, mas necessita de suplementação a este nível, a qual lhe é proporcionada pela dieta alimentar que lhe fornece, por exemplo, ácido ascórbico, carotenóides, retinóides, tocoferóis e polifenóis (Mates 2000). São vários os estudos que reportam o efeito benéfico dos antioxidantes alimentares ao actuarem de forma sinérgica com os sistemas antioxidantes endógenos promovendo o reequilíbrio redox celular (Laranjinha *et al.* 1994).

1.3.2.1. Defesas arteriais contra o peroxinitrito

Alguns autores consideram que existem três níveis básicos de defesa contra o peroxinitrito, a prevenção da sua formação, a sua intercepção antes de alcançar os respectivos alvos biológicos e a reparação dos danos infligidos (Arteel *et al.* 1999; Klotz e Sies 2003). As vias de sinalização relacionadas com o ONOO⁻ podem afectar qualquer uma destas três estratégias defensivas.

A prevenção da exposição das células ao ONOO^- passará por impedir a sua produção excessiva e descontrolada. Tal desiderato poderá ser conseguido inibindo os sistemas enzimáticos responsáveis pela formação do $\cdot\text{NO}$ (NOS) e/ou do anião superóxido (xantina oxidase, NADPH oxidase) ou impedindo a sua sobreactivação induzida por processos inflamatórios como o aterosclerótico; a neutralização prévia do $\cdot\text{NO}$ e O_2^- por *scavengers* também será útil.

São vários os compostos, incluindo o CO_2 , tióis, ascorbato, polifenóis e também certas proteínas como as peroxidases, hemoglobina, albumina e selenoproteínas que demonstraram reagir com o ONOO^- (Koppenol 1998). Nem todas podem ser consideradas vias de destoxificação, mas para além do glutatião endógeno, os produtos de origem natural, de que são exemplo os flavonóides, têm adquirido reconhecida importância (Heijnen *et al.* 2001; Rahman, Ichiyanagi *et al.* 2006), não só por actuarem como *scavengers* do ONOO^- mas também por interagirem com produtos intermediários formados (radical tirosilo).

A reparação do dano provocado pelo peroxinitrito é levada a cabo, em circunstâncias não patológicas, pelos mecanismos de reparação celulares normais que podem passar, por exemplo, pela degradação de proteínas oxidadas ou nitradas (Grune *et al.* 2001). Contudo, a produção sustentada desta espécie reactiva, característica de processos inflamatórios crónicos como o aterosclerótico, torna muitas vezes insuficientes estas estratégias de recuperação tecidual.

2. A apoptose na doença aterosclerótica

A apoptose ou morte celular programada, pode ser desencadeada por estímulos intrínsecos ou extrínsecos e caracteriza-se pela diminuição do tamanho da célula, fragmentação do DNA, activação de endonucleases, condensação da cromatina que se desloca para a periferia do núcleo, despolarização da mitocôndria, alterações do citoesqueleto e formação de invaginações membranares que resultam em vesículas, designadas por corpos apoptóticos, que são posteriormente fagocitados, limitando a ocorrência de um processo inflamatório (Kerr *et al.* 1972; Green e Kroemer 1998). Este tipo de morte celular desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dos tecidos e na manutenção da homeostase nos organismos multicelulares. Quando activada, esta morte programada permite a eliminação de células produzidas em excesso, com crescimento inapropriado ou portadoras de alterações genéticas que, de outra forma, constituiriam uma ameaça para o organismo. A apoptose distingue-se da necrose, uma vez que esta última é sempre um processo patológico de morte celular caracterizado por um influxo de água e iões extracelulares, resultando em perda de integridade das membranas celulares (Searle *et al.* 1982). Esta lise celular, muitas vezes associada a um extenso dano tecidual (infecções virais,

bacterianas e trauma), liberta o conteúdo citoplasmático para o meio extracelular desencadeando um intenso processo inflamatório.

Em virtude da sua relevância biológica, a apoptose é um processo complexo mas altamente controlado, estando a sua desregulação implicada no desenvolvimento de várias patologias, quer por deficiência (cancro e doenças autoimunes), quer por exacerbação do processo (doenças degenerativas). Diversos estudos demonstraram que a morte celular apoptótica tem um importante papel na aterosclerose e doença cardiovascular, concretamente, no enfarte do miocárdio e insuficiência cardíaca (Kang, Yue *et al.* 2002). A apoptose endotelial tem um papel essencial nas alterações da parede vascular, tendo sido observada na doença arterial coronária humana e parece ser causada pela citotoxicidade induzida por linfócitos T citolíticos (Dong *et al.* 1996). Foi igualmente detectada em lesões ateroscleróticas de enxertos de veias safena, assim como em lesões de reestenose (Vallet e Wiel 2001). Ela ocorre tanto em macrófagos presentes na placa aterosclerótica, como em células musculares lisas e células endoteliais. Uma das principais implicações clínicas da apoptose na doença aterosclerótica é a destabilização da placa. A perda de células endoteliais e musculares lisas da capa fibrótica, associada à proteólise da matriz extracelular, leva à erosão e/ou ruptura da placa, com consequente trombose (Kockx e Herman 2000).

A apoptose das células endoteliais é um processo altamente regulado. Por exemplo, mediadores libertados em infecções sistémicas e processos inflamatórios podem levar ao aumento da apoptose endotelial e actividade pró-inflamatória dentro da lesão aterosclerótica, explicando assim a associação entre a aterosclerose sintomática e a inflamação sistémica (Ridker *et al.* 1997; Hotchkiss *et al.* 2002). A resposta do endotélio difere consoante a natureza do estímulo agressor, as condicionantes genéticas do organismo, a idade e a localização do leito vascular (Stefanec 2000). Factores como o LPS, TNF- α , IL-1, interferão, ONOO \cdot e a hipóxia (Messmer *et al.* 1999) podem induzir a apoptose de células endoteliais. Diversos estudos demonstram também que as LDLox são capazes de induzir a apoptose de células endoteliais (Vieira *et al.* 1998). Para além disso, a interacção destas com outras circulantes pode ainda aumentar a sinalização pró-apoptótica.

No intuito de esclarecer os diversos intervenientes nos mecanismos de morte apoptótica far-se-á, em seguida, uma descrição genérica dos mesmos, focando os aspectos mais relevantes, tendo em conta o trabalho experimental desenvolvido.

2.1. As caspases

As caspases pertencem a uma família de cisteína proteases que clivam os substratos após um resíduo de aspartato. São intervenientes chave na apoptose, sendo sintetizadas na forma de monómeros

inactivos (pró-enzimas), necessitando de ser activadas para exercer a sua actividade catalítica. Esta activação ocorre através de múltiplos sinais apoptóticos, como as ROS e as RNS (Salvesen e Abrams 2004). A clivagem proteolítica das caspases, nos seus domínios N-terminais, leva à formação de subunidades activas de diferentes dimensões (p10 e p20) que vão constituir tetrâmeros p10/p20 activos. A activação das caspases é impedida por inibidores específicos pertencentes à família de inibidores da apoptose (IAP) de que se falará mais à frente (Verhagen *et al.* 2001). Durante o processo apoptótico, estas IAPs são antagonizadas por proteínas libertadas pela mitocôndria, tais como a Smac/Diablo e a Omi/HtrA2 (Du *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2004).

As caspases de mamíferos são cerca de 14 e classificam-se, consoante a sua ordem e mecanismo de activação, em caspases iniciadoras (caspases-2,-8,-9 e -10) e efectoras (caspases-3, -4, -5, -6, -7) (Nicholson 1999). As caspases iniciadoras ou apicais são recrutadas ao nível do receptor de morte através do seu domínio DED (*death effector domain*) (caspases-8 e -10) ou no citosol, através do domínio RD (*recruiting domain*) (caspases-2 e -9). Estas caspases activadas vão clivar as caspases executoras, como a -3 e a -7, activando-as, conduzindo, desta forma, à apoptose através da clivagem de diversos alvos celulares, que incluem mediadores e reguladores da apoptose, proteínas estruturais, e proteínas relacionadas com a reparação do DNA e com o ciclo celular (Li e Yuan 2008). Para além disso, a caspase-3 activada promove a activação da -2 e da -6 num mecanismo amplificador que acentua a via controlada pela caspase-9 (Slee *et al.* 1999).

A forma como o estado redox celular pode controlar a apoptose tem sido objecto de estudo. As modificações pós-tradução da cisteína no local catalítico parecem ser importantes no controlo da actividade das caspases, uma vez que estes resíduos são susceptíveis à oxidação, nitroação, nitração e glutatilação, tendo já sido publicados vários trabalhos que documentam este facto (Borutaite e Brown 2001; Barbouti *et al.* 2007).

2.2. Mecanismos de apoptose

Existem duas vias *major* que promovem a morte celular: a via dos receptores de morte (via extrínseca) e a via mitocondrial (via intrínseca) (Hengartner 2000), tal como mostra, esquematicamente, a Figura 7.

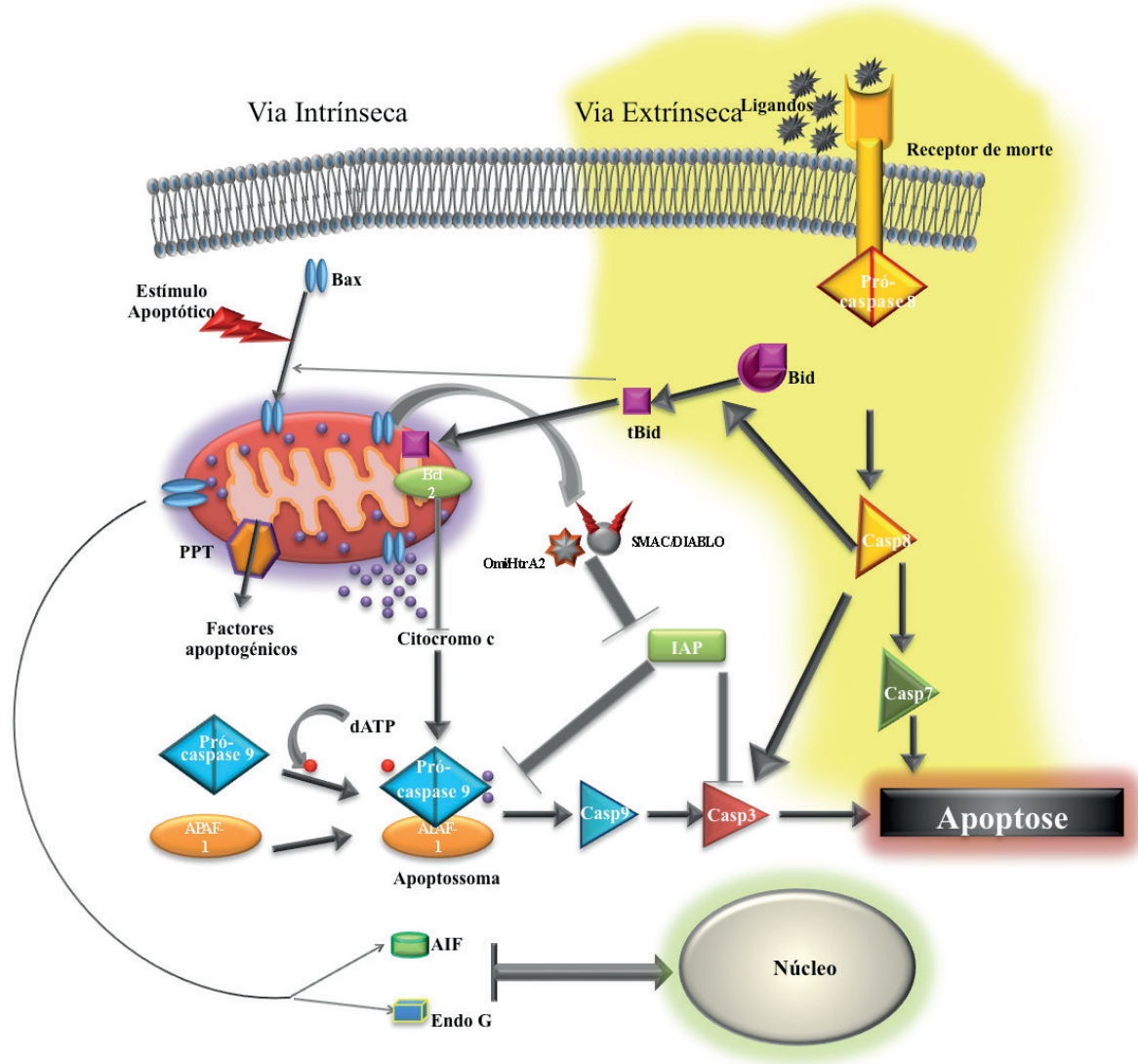


Figura 7. As duas principais vias de apoptose celular. A **via intrínseca ou mitocondrial** é caracterizada pela libertação de factores apoptogénicos, como o citocromo c, o AIF, a Endo G, a Omi/HtrA2 e a SMAC/DIABLO, a partir da mitocôndria. Para que ocorra libertação destes factores, é necessário que ocorra a permeabilização da membrana externa mitocondrial, a qual poderá ser promovida por acção das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, ou através do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPT). No citosol, o citocromo c associa-se com o Apaf-1 e com a pró-caspase-9, formando-se o apoptossoma, que conduz à activação da caspase-9. Esta caspase vai activar caspases efectoras, como a caspase-3, que, por sua vez, são responsáveis por clivagens proteolíticas, conducentes às alterações bioquímicas e morfológicas que caracterizam a apoptose. As IAP, proteínas inibidoras das caspases, são neutralizadas pela Omi/HtrA2 e pela SMAC/DIABLO. O AIF e a Endo G, após serem libertados pela mitocôndria para o citosol, translocam para o núcleo onde, de uma forma independente das caspases, induzem a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear. A **via extrínseca ou dos receptores de morte**, é activada pela ligação de ligandos de morte ao receptor, conduzindo à sua trimerização e formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que vai activar a caspase-8. Esta caspase pode activar a caspase-3 ou clivar a Bid, originando a tBid, que vai interagir directamente com proteínas multidomínio como a Bax, induzindo a sua activação e oligomerização, permeabilização da membrana externa mitocondrial e libertação dos factores apoptogénicos.

2.2.1. A via mitocondrial

Na via apoptótica mitocondrial, sinais intrínsecos como o dano no DNA mitocondrial, o *stress* causado por oxidantes (ROS) ou a ausência de factores de crescimento, podem induzir permeabilização da membrana mitocondrial e libertação de factores apoptogénicos do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol (citocromo c, AIF, Omi/HtrA2, Endo G e Smac/Diablo)(Figura 7) em resultado de um processo regulado por proteínas da família Bcl-2, na membrana externa da mitocôndria e que vão activar vários processos de sinalização, dependentes ou não das caspases (Ryter *et al.* 2007). Na via dependente das caspases, o citocromo c forma o complexo apoptossoma juntamente com o factor apoptótico activador de proteases-1 (Apaf-1) e a pró-caspase-9, a qual, por sua vez, vai activar as caspases efectoras, principalmente a caspase-3. Para além disso, o segundo activador de caspases de origem mitocondrial/proteína de ligação directa ao IAP com baixo pI (Smac/Diablo, *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*) antagoniza o efeito inibitório das IAPs, o que exacerba a activação das caspases. O factor indutor da apoptose (AIF, *apoptosis inducing factor*) é um mediador de sinalização independente das caspases que vai sofrer translocação para o núcleo e induzir condensação da cromatina e fragmentação nuclear (Susin *et al.* 1999).

As ROS conseguem desencadear a via apoptótica intrínseca através de interacções com proteínas do complexo do poro de permeabilidade transitória (PPT) mitocondrial (Tsujimoto e Shimizu 2007). Os vários componentes do PPT são todos alvos das ROS que, ao induzirem hiperpolarização da membrana mitocondrial, conduzem ao colapso do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), à translocação da Bax e Bad para a mitocôndria e à libertação do citocromo c (Skulachev 2006). A libertação do citocromo c, por sua vez, conduz a um incremento dos níveis de ROS devido ao colapso da cadeia transportadora de electrões (Chen e Lesnefsky 2006).

2.2.1.1. Factores apoptogénicos mitocondriais

O citocromo c, em células normais, encontra-se no espaço intermembranar mitocondrial, fazendo parte da cadeia respiratória, onde é responsável pelo transporte de electrões do complexo III para o IV. Após a permeabilização da membrana mitocondrial decorrente de um estímulo apoptótico, o citocromo c é libertado para o citosol, ligando-se ao Apaf-1 que, na presença de dATP e/ou ATP, sofre oligomerização, permitindo-lhe expor o seu domínio CARD (*caspase-recruitment domain*) e assim recrutar a pró-caspase-9. Forma-se assim um complexo macromolecular designado apoptossoma que leva à activação da caspase-9 e por fim das caspases executoras da morte celular, nomeadamente as caspases-3, -6 e -7 (Riedl e Salvesen 2007). As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), são inibidores naturais das caspases que se ligam, quer

a estas quer às pró-caspases, impedindo a sua activação (Shiozaki e Shi 2004). Desta forma, a presença de IAPs no citosol assegura que não ocorra uma inapropriada indução do mecanismo apoptótico.

Os factores apoptogénicos proteicos Smac/Diablo, uma vez libertados para o citosol, são capazes de se ligar a várias IAPs, sendo, por essa razão, considerados activadores das caspases (Verhagen e Vaux 2002). A Omi/HtrA2, em particular, parece possuir igualmente uma actividade proteolítica contribuindo, neste caso, para a apoptose de uma forma independente das caspases (Suzuki *et al.* 2004).

O factor indutor da apoptose (AIF) é uma flavoproteína normalmente localizada no espaço intermembranar mitocondrial. Após estímulo apropriado, a sua forma activa transloca para o citosol e em seguida para o núcleo, onde induz a condensação periférica da cromatina e a fragmentação nuclear (Daugas *et al.* 2000). Os mecanismos subjacentes a estes efeitos não são totalmente conhecidos, embora tenha sido sugerido o recrutamento de proteases e nucleases (Hong *et al.* 2004) e mesmo o eventual envolvimento das caspases (Cande *et al.* 2004). Importa salientar ainda que o AIF parece exercer um papel protector contra o *stress* oxidativo (Miramar *et al.* 2001).

Por fim, a endonuclease G (Endo G) tem a mesma localização do AIF e sofre o mesmo tipo de translocação, culminando com a fragmentação do DNA nuclear, num processo independente das caspases (van Loo *et al.* 2001).

2.2.1.2. A permeabilização da membrana mitocondrial

Um factor transversal à permeabilização e libertação de factores apoptogénicos mitocondriais é o poro de permeabilidade transitória (PPT). Este poro estende-se da membrana mitocondrial externa à interna e é constituído essencialmente por três componentes proteicos, a ciclofilina D (CypD), o canal aniónico dependente de voltagem na membrana externa (VDAC, *voltage-dependent anion channel*) e a translocase dos nucleótidos de adenina na membrana interna (ANT, *adenine nucleotide translocase*). De todos eles, apenas a CypD é um constituinte permanente e modulador do PPT (Schinzel *et al.* 2005).

A abertura deste poro, despoletada por vários estímulos incluindo, o Ca^{2+} e as ROS, tem sido implicada quer na apoptose quer na necrose, conduzindo a uma dissipação do $\Delta\psi_m$ e, conseqüentemente, a uma diminuição da síntese de ATP. Se esta depleção de ATP for drástica, resultará em necrose celular; se, pelo contrário, subsistir uma subpopulação de mitocôndrias funcionais, poderá ocorrer morte celular por apoptose. De facto, a abertura do PPT, dada a elevada concentração de solutos na matriz mitocondrial, conduz ao influxo de água, levando ao intumescimento dessa

matriz, expansão da membrana interna e eventual ruptura da membrana externa mitocondriais, com libertação para o citosol de proteínas envolvidas na morte celular (Marchetti *et al.* 1996).

São múltiplos os efeitos reportados ao ONOO⁻ ao nível mitocondrial (Radi *et al.* 2002). Vários autores referem que o peroxinitrito é capaz de induzir apoptose por abertura do PPT, conduzindo à libertação do citocromo c e à activação das caspases (Scarlett *et al.* 1996; Packer *et al.* 1997; Borutaite *et al.* 2000). Este efeito é em parte conseguido devido à oxidação de tióis cruciais na translocase do nucleótido de adenina da membrana interna mitocondrial (ANT) (Vieira *et al.* 2001) e também no canal aniónico dependente de voltagem (VDAC), os componentes principais do PPT. O ONOO⁻ promove também a libertação de Ca²⁺ pela mitocôndria através da oxidação de tióis críticos da via de libertação de cálcio dependente do nucleótido de piridina (Schweizer e Richter 1996), sistema este que parece existir em estreita ligação com o PPT (Radi *et al.* 2002).

Embora subsista alguma controvérsia relativamente aos mecanismos de permeabilização mitocondrial, as hipóteses propostas que envolvem o PPT e a família das proteínas Bcl-2, são as que reúnem maior consenso. As proteínas da família Bcl-2 são reguladores centrais da susceptibilidade da mitocôndria à apoptose e da permeabilização da sua membrana (Kelekar e Thompson 1998). De acordo com a sua função e com a conservação dos domínios de homologia (BH1 a BH4) elas podem dividir-se em três grupos (Petros *et al.* 2004). O grupo I, constituído por proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, Bcl-XL, e Bcl-w, apresentam quatro domínios de homologia BH (BH1 a BH4). O grupo II é formado por proteínas pró-apoptóticas como a Bax, Bak ou Bok, que possuem três domínios de homologia. Por fim, o grupo III também constituído por proteínas pró-apoptóticas, tais como a Bad, Bim, e Bid, com apenas um domínio de homologia (BH3) (Antonsson 2004).

Tanto a localização, como a actividade intracelular destas proteínas são controladas, fundamentalmente, pela sua dimerização, fosforilação e proteólise. De facto, a Bax está normalmente presente sob a forma de um monómero citosólico ou fracamente ligada à mitocôndria e, após um estímulo apoptótico, sofre modificações conformacionais que conduzem à sua oligomerização e translocação para a membrana externa mitocondrial (Antonsson 2001; Kuwana e Newmeyer 2003); por seu lado, a Bak já se encontra inserida nesta membrana, sofrendo aí igual oligomerização (Degenhardt *et al.* 2002). Ambas vão posteriormente conduzir à permeabilização da membrana mitocondrial e à libertação de factores apoptogénicos para o citosol.

Uma vez que o equilíbrio entre proteínas pró e antiapoptóticas é determinante para a sobrevivência ou morte celular, as proteínas do grupo I, em particular a Bcl-2, que normalmente se encontram na membrana externa mitocondrial, conseguem inibir o processo anterior, através da formação de heterodímeros e sequestração das proteínas pró-apoptóticas multidomínio

(Chipuk *et al.* 2008). No que diz respeito às proteínas que contêm apenas o domínio BH3, a sua função parece ser exercida através da activação directa ou indirecta das proteínas pró-apoptóticas multidomínio Bax e Bak. Por exemplo, na presença de um estímulo apoptótico, a Bid truncada (tBid), resultante da clivagem proteolítica da Bid pela caspase-8, promove a oligomerização da Bax e da Bak e a inserção na membrana no caso da primeira, o que resulta na formação do megaporo (Eskes *et al.* 2000). A contribuição da Bid truncada para a sinalização apoptótica quer na via mitocondrial quer na dos receptores de morte permite a interligação entre estas duas vias de apoptose (Luo *et al.* 1998). Du e colaboradores observaram, muito recentemente, que outros peptídeos (Bmf e Noxa) para além da Bim e Bid eram também capazes de activar a Bax/Bad, ainda que de uma forma menos potente que os primeiros, alterando a permeabilidade mitocondrial e libertando o citocromo c (Du *et al.* 2011)

As restantes proteínas contendo apenas o domínio BH3, como a Bad e a Bik actuam sequestrando as proteínas antiapoptóticas, impedindo-as de actuar (Zha *et al.* 1996). Embora os mecanismos de indução da permeabilidade transitória mitocondrial pelos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, sejam ainda controversos, os modelos actualmente mais aceites sugerem que a sua actuação passa por: i) formação de poros proteicos, através da síntese *de novo* de proteínas (Epand *et al.* 2002), ii) formação de poros lipídicos (Terrones *et al.* 2004) e iii) interacção com componentes do PPT (Sharpe *et al.* 2004).

2.2.2. Via dos receptores de morte

Na via dos receptores de morte, sinais extrínsecos como o ligando Fas, o TNF- α ou o TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) ligam-se aos respectivos receptores transmembranares que oligomerizam formando trímeros. Os principais receptores de morte incluem o receptor Fas, também conhecido como CD95 ou APO-1, o receptor do TNF- α (TNF-R1) e os receptores TRAIL (TRAIL-R1 ou DR4 e TRAIL-R2 ou DR5) (Ashkenazi e Dixit 1999). Os receptores TRAIL-R3, TRAIL-R4 e a osteoprotegerina são considerados receptores “*decoy*”, uma vez que, por não possuírem o domínio citosólico funcional, a ligação dos ligandos não leva à transmissão de um sinal apoptótico (LeBlanc e Ashkenazi 2003).

Após a referida trimerização, são recrutadas proteínas adaptadoras, como por exemplo a FADD (*Fas-associated protein with death domain*) ou a TRADD (*tumor necrosis factor receptor type-1-associated death domain protein*), que possuem um domínio efector de morte (DED) que vai interagir com um domínio homónimo na pró-caspase 8, formando um complexo de sinali-

zação multiproteico designado DISC (*death-inducing signaling complex*). É este complexo que por clivagem da pró-caspase-8, leva à activação da caspase-8 (Huang *et al.* 2007). Em células em que existe uma quantidade significativa de caspase-8 activada ao nível do DISC (células do tipo I), esta protease vai activar directamente as caspases executoras, nomeadamente a caspase-3, que, por sua vez, vão executar a apoptose através da degradação de proteínas reguladoras. Pelo contrário, em células com níveis reduzidos de caspase-8 activada (células do tipo II), essa quantidade não é suficiente para activar as caspases efectoras, pelo que cliva inicialmente uma proteína pró-apoptótica, a Bid, gerando a tBid, que vai activar a via apoptótica mitocondrial induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial externa por interações da tBid com as Bax/Bad (Figura 7) (Barnhart *et al.* 2003). Consequentemente, ocorre a libertação de factores apoptogénicos mitocondriais (citocromo c, Smac/Diablo ou AIF) que vão, por sua vez, activar a pró-caspase-3, libertando a caspase-3. Esta via constitui um sistema de amplificação do sinal de morte.

Evidências recentes sugerem a possibilidade das ROS serem responsáveis pela activação directa de receptores de morte através da formação de complexos lipídicos sinalizadores (Zhang, Yi *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007). No entanto, ainda está por esclarecer a relevância fisiológica desta via de apoptose alternativa comparativamente com a clássica.

2.3. A morte celular desencadeada pelo peroxinitrito

Quando o *stress* oxidativo induzido pelo ONOO⁻ excede a capacidade de resposta celular reparativa podem ser activados mecanismos que levam à iniciação do processo apoptótico ou necrótico (Calcerrada *et al.* 2011). Enquanto a exposição a elevadas concentrações de peroxinitrito leva a uma rápida morte celular associada com distúrbios energéticos, baixas concentrações deste ião, após várias horas, podem levar à morte apoptótica dependente da libertação do citocromo c da mitocôndria e activação das caspases-3, -2, -8 e -9 (Virag *et al.* 1998; Zhuang e Simon 2000).

Embora ainda não se conheça totalmente o mecanismo de iniciação da morte celular apoptótica desencadeada pelo ONOO⁻, a primeira evidência foi referida em timócitos pelo grupo de investigação liderado por Pryor, em meados dos anos 90 (Salgo *et al.* 1995). Mais tarde, a caspase-3 também demonstrou ser importante nesta via de morte, em vários tipos de células (Virag *et al.* 1998). São inúmeros os investigadores que se dedicaram ao estudo dos efeitos citotóxicos do ONOO⁻ (Ronson *et al.* 1999; Radi *et al.* 2001; Szabo 2003; Botti *et al.* 2005; Brito *et al.* 2006; Paixao *et al.* 2011; 2012) contudo, a forma exacta como o ONOO⁻ despoleta uma ou outra via

de morte permanece por esclarecer na íntegra embora a mitocôndria pareça desempenhar um papel chave (Radi *et al.* 2002; Ferrer-Sueta e Radi 2009).

A mitocôndria é reconhecida como fulcral na apoptose, decorrendo neste organelo uma sequência de importantes acontecimentos, incluindo a abertura do poro mitocondrial de permeabilidade transitória, a despolarização mitocondrial, a produção de anião superóxido e a libertação de mediadores apoptóticos para o citoplasma (Green *et al.* 1998). Alguns dos mediadores apoptogénicos libertados pela mitocôndria actuam como nucleases (endonuclease G), activadores das nucleases (AIF, citocromo c) ou serina proteases (Omi/HtrA2). O peroxinitrito parece inibir a cadeia respiratória mitocondrial inactivando os complexos I, II e III (Lizasoain *et al.* 1996) e tem também como alvo um componente do poro de permeabilidade transitória, o ANT (Vieira *et al.* 2001). O papel da mitocôndria na apoptose induzida pelo peroxinitrito é também suportado pelo facto da Bcl-2, uma proteína antiapoptótica, inibir a apoptose induzida pelo peroxinitrito (Virag e Szabo 2000). A nitrotirosina, libertada por proteínas nitradas pelo peroxinitrito também parece contribuir para a disfunção do endotélio vascular e citotoxicidade através da promoção de dano no DNA e/ou apoptose (Mihm *et al.* 2000; Gunaydin *et al.* 2009).

A activação de caspases, particularmente a caspase-3, foi também observada em células apoptóticas tratadas com peroxinitrito (Green *et al.* 1998; Zhuang *et al.* 2000; Paixao *et al.* 2011), evidenciando a via mitocondrial.

3. Inflamação e doença cardiovascular

A inflamação constitui uma resposta normal do organismo quando sujeito a uma agressão tecidular ou infecção e tem como objectivo combater invasores como vírus e bactérias e remover células lesadas ou mortas. Os tecidos envolvidos libertam mediadores inflamatórios (citocinas) como o TNF- α e a IL-1 que, numa complexa cascata de sinalização, controlam outras citocinas e imunoglobulinas de leucócitos activados, os quais, por sua vez, levam à produção de moléculas de adesão nos tecidos inflamados. A fagocitose das bactérias pelos neutrófilos leva à produção de ROS de forma a neutralizar esses microrganismos. Existe, simultaneamente, a activação de diversos sistemas enzimáticos, incluindo a fosfolipase A2, a ciclooxigenase, a 5-lipoxigenase (5-LOX), óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e o regulador central do processo inflamatório, o NF- κ B.

Nas últimas décadas, diversos factores metabólicos foram implicados na patogénese da DCV incluindo a dislipidémia, hipertensão, alteração da tolerância à glicose e hiperinsulinémia

(Previtali *et al.* 2011). Apesar das abordagens terapêuticas dirigidas, em particular, à dislipidemia e à hipertensão terem revelado apreciável eficácia na redução da progressão da DCV, os resultados não têm sido satisfatórios, principalmente no que diz respeito às complicações da doença. Com o aprofundar dos conhecimentos verificou-se que outros factores, para além dos níveis elevados de colesterol, desempenhavam um papel relevante, pelo que novos marcadores do risco cardiovascular passaram a ser considerados: a disfunção endotelial, a inflamação vascular, o *stress* oxidativo e a insulinoresistência (Zalba *et al.* 2007; Balanescu *et al.* 2010). Os trabalhos de investigação mais recentes têm incidido na relação entre a disfunção endotelial/tónus vascular e a inflamação (Forstermann 2010; Yamamoto *et al.* 2011).

Em 1995, Stern propôs a “*Common Soil Hypothesis*” que estabelecia a ligação entre a aterosclerose, a inflamação e a síndrome metabólica (Stern 1995), e desde essa altura inúmeras investigações têm vindo a corroborar esta hipótese (Ziegler 2005; Koshiyama *et al.* 2006). O endotélio vascular tem um papel fundamental na regulação da homeostase vascular e várias evidências sugerem que as alterações na sua função contribuem para a patogénese da DCV (Vita e Keaney 2002). Tal regulação ocorre através da produção de factores que actuam localmente na parede e lúmen do vaso, sendo o NO um dos mais importantes (Forstermann 2010; Giles *et al.* 2012). O normal funcionamento vascular pode ficar comprometido por alterações na produção de NO e de factores pró-inflamatórios como a endotelina-1 (ET-1), aumento da formação de peroxinitrito e lesão no endotélio (Saini *et al.* 2011). Este estado de disfunção endotelial constitui a primeira etapa do desenvolvimento da aterosclerose, fazendo parte de uma cascata de eventos pró-inflamatórios e pró-trombóticos.

A proteína C-reativa (PCR), em particular, a de alta sensibilidade (*hsPCR*), um importante parâmetro biológico da inflamação crónica subclínica, tem sido reconhecida como um componente chave na etiologia da doença macrovascular (Slevin e Krupinski 2009; Li *et al.* 2012) e considerada um marcador de risco independente para DCV, como indicador do processo inflamatório crónico subjacente (Ridker *et al.* 2003; Slevin *et al.* 2009). Esta proteína de fase aguda pode interagir com as células endoteliais, contribuindo para a progressão do processo aterosclerótico ao induzir a expressão de moléculas de adesão (Siasos *et al.* 2011). Tal processo inflamatório pode causar disfunção endotelial, reduzir a biodisponibilidade do NO e aumentar o *stress* oxidativo, tendo sido sugerido como um mecanismo iniciador da doença (Clapp *et al.* 2004).

O factor nuclear κB (NF- κB) é um factor de transcrição eucariótico indutível da família de proteínas *rel*, crítico na regulação da transcrição de genes específicos, a maioria dos quais implicados na resposta inflamatória e imune. A activação do NF- κB conduz a um estado pró-inflamatório resultante da indução de vários agentes como a IL-1, IL-6, COX-2, iNOS e

moléculas de adesão, pelo que compostos capazes de contrariar esta activação podem trazer benefícios e contrariar a aterogénese.

4. Vias implicadas na agressão vascular mediada pelo peroxinitrito

As vias de sinalização celular com as quais o peroxinitrito pode interferir, no contexto vascular, são diversas e com múltiplos pontos de interligação entre si, originando uma complexa rede de acções reconhecidamente implicadas na génese e no desenvolvimento de patologias cardiovasculares, em particular, na aterosclerose. Neste ponto, pretende-se, não uma abordagem exaustiva desses mecanismos de actuação, mas apenas referenciar, sucintamente, aqueles que foram objecto de estudo neste trabalho, em concreto, as vias do NF- κ B, PI3K/Akt e Nrf2. Os efeitos do ONOO⁻ ao nível das óxido nítrico sintases foram já atrás referenciados no ponto 1.2.4.

4.1. A via do NF- κ B

4.1.1. A activação do NF- κ B

Os distúrbios metabólicos como a obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 e, particularmente, a aterosclerose foram, durante muito tempo, considerados meras consequências da dislipidémia decorrente da sobrenutrição. Actualmente, é amplamente consensual, que um processo inflamatório de baixo nível está implicado na iniciação e no desenvolvimento das doenças metabólicas. Consistente com o seu papel central na coordenação da resposta inflamatória, muitos estudos recentes têm relacionado o factor de transcrição NF- κ B com o desenvolvimento destas patologias, estabelecendo assim a inflamação como factor crítico na sua etiologia. Os factores de transcrição da família Rel/NF- κ B estão envolvidos no controlo de uma vasta série de processos, particularmente os que dizem respeito à resposta celular a estímulos de *stress*, iniciação e manutenção da resposta inflamatória e imune, processos de desenvolvimento e crescimento e ainda na morte celular programada (Karin e Ben-Neriah 2000). Este factor de transcrição coordena a indução de uma grande variedade de genes que codificam inúmeras citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α), quimiocinas (IL-8, MIP-1 α e MCP-1), moléculas de adesão (ICAM, VCAM e E-selectina), proteínas de fase aguda, receptores imunes, factores de crescimento (VEGF), enzimas indutíveis (iNOS, COX-2 e metaloproteinases da matriz, MMPs), todas as moléculas envolvidas na inflamação, proliferação celular, adesão, migração e invasão (Nam 2006).

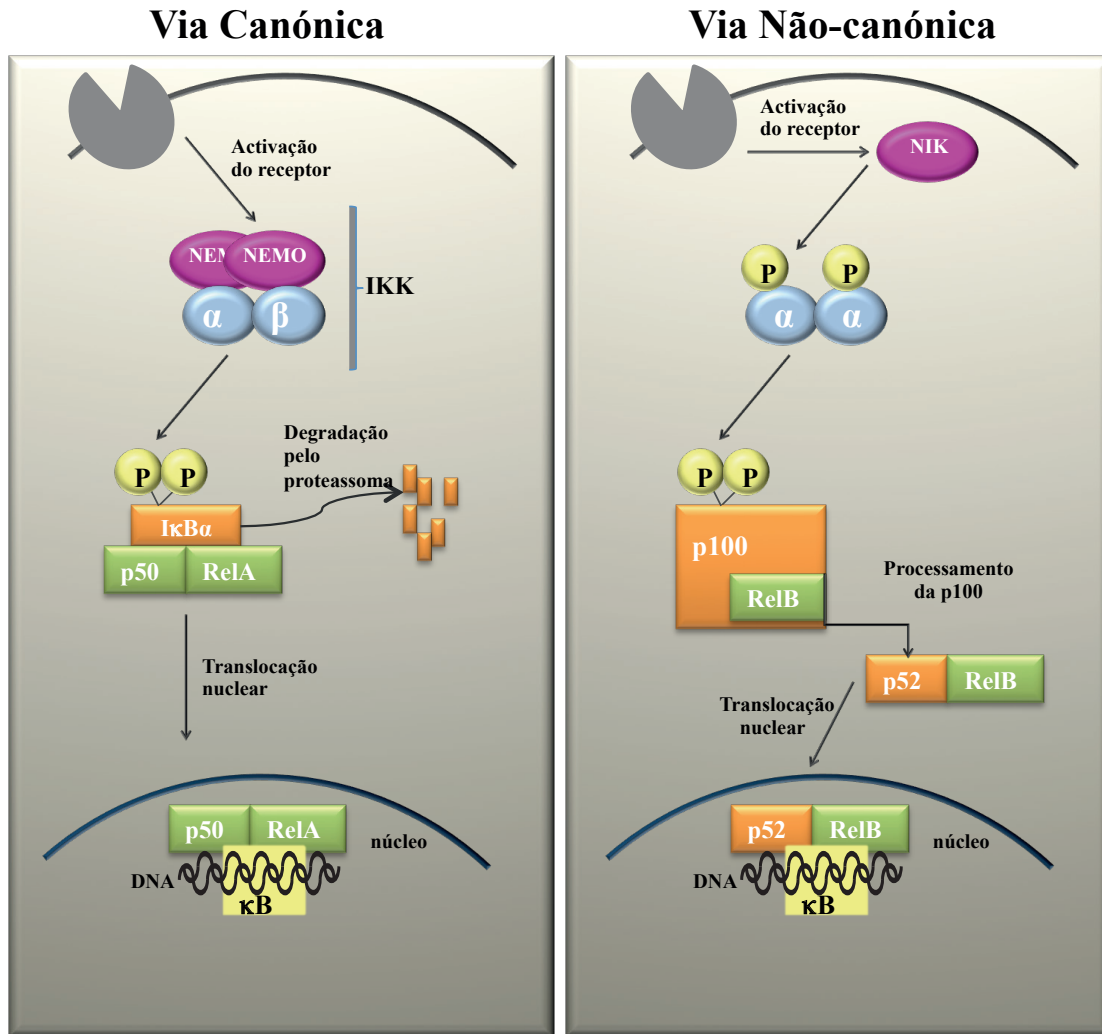


Figura 8. As principais vias de activação do NF-κB (para detalhes ver texto principal).

O NF-κB é um factor de transcrição pleiotrópico e consiste num complexo de duas sub-unidades, que vão variando, pertencentes à família de proteínas Rel/NF-κB. Esta família é composta por cinco membros: NF-κB1 (p50/p105; precursor da p50), NF-κB2 (p52/p100; precursor da p52), RelA (p65), RelB (p68) and c-Rel (p75). As subunidades p50 e p52 são sintetizadas como proteínas precursoras, respectivamente, p105 e p100, que pertencem à família IκB. Vários complexos NF-κB podem translocar para o núcleo, por vezes com consequências distintas (Lernbecher *et al.* 1993), mas o heterodímero mais comum é formado pelas subunidades p50 (NF-κB1) e p65 (RelA). Todas as subunidades NF-κB contêm um domínio de homologia Rel (RHD, *Rel homology domain*), uma longa sequência de 300 aminoácidos que é responsável pela formação do dímero, translocação nuclear, reconhecimento de sequências específicas no DNA e interacção com proteínas inibitórias no citosol (IκBs). Em células não estimuladas, as subunidades do NF-κB mantêm-se inactivas no citoplasma sob a forma de homo ou heterodímeros, devido à

ligação com IκBs (Karin *et al.* 2000), uma família de proteínas com quatro membros conhecidos, a IκBα, IκBβ, IκBε e a Bcl3, as quais contêm repetições de anquirina que são importantes para a manutenção do NF-κB no citoplasma (Jobin e Sartor 2000). Estas proteínas estabelecem múltiplas ligações com o NF-κB que impedem o reconhecimento da sequência de localização nuclear (NLS) deste factor de transcrição, impedindo a sua translocação nuclear e ligação ao DNA (Ghosh *et al.* 1995), embora assegurem uma imprescindível activação transcricional basal (Janssen-Heininger *et al.* 2002).

A ligação de citocinas ou outros estímulos a receptores celulares de superfície inicia cascatas de sinalização que convergem na activação da IκB cinase (IKK), um sistema enzimático que fosforila as IκBs (Ghosh e Hayden 2008). Esta fosforilação promove a degradação das IκB, seguida por ubiquitinação e consequente degradação proteolítica, libertando o NF-κB, que transloca para o núcleo, onde vai activar a transcrição dos genes alvo (Janssen-Heininger *et al.* 2002). O referido complexo IKK consiste em três subunidades, as catalíticas, IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) e a subunidade reguladora NEMO (IKKγ). As subunidades IKKβ e NEMO são imprescindíveis à sobrevivência celular, devido à sua intervenção em funções metabólicas vitais (Perkins 2007).

A activação do NF-κB pode efectuar-se, principalmente, por duas vias, esquematicamente representadas na Figura 8, e que se classificam em clássica (canónica) e não clássica (não canónica). Esta distinção baseia-se na degradação induzida das IκBs, particularmente da IκBα, ou no processamento da subunidade p100, precursora da p52 (Pomerantz e Baltimore 2002). Na via clássica, a principal via de activação deste factor de transcrição, as células estimuladas por TNF-α ou IL-1, por exemplo, levam à degradação da IκBα mediada pela sua fosforilação promovida pelo complexo IKK. A subunidade IKKβ, mas não a IKKα, fosforilam a IκB em dois resíduos de serina terminais (ser 32 e ser 36), tornando esta última um alvo para a ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteassoma. Existem ainda outros alvos de fosforilação pela IKK menos usuais, como por exemplo resíduos de tirosina (Beraud *et al.* 1999). Em contraste com a fosforilação da serina da IκBα, a fosforilação da tirosina da mesma molécula é capaz de activar o NF-κB na ausência de degradação dependente da ubiquitina (Imbert *et al.* 1996).

Por outro lado, a intervenção das cinases NIK e IKKα é fundamental na activação da via alternativa de activação do NF-κB (Sun 2011). A estimulação de receptores específicos leva à activação da cinase NIK, que por sua vez activa a IKKα, a qual vai fosforilar a subunidade p100 em dois resíduos de serina C-terminais, levando à degradação do seu domínio similar ao IκB, pelo proteassoma (Xiao *et al.* 2001). A subunidade p52 resultante, juntamente com a Rel B, translocam então para o núcleo, regulando a expressão génica (Hacker e Karin 2006). Uma das principais características desta via não clássica é a reduzida velocidade de processamento da

p100, que poderá durar várias horas, contrastando com os escassos minutos necessários para a degradação do I κ B na via clássica de activação do NF- κ B. Uma das explicações adiantadas para este facto está relacionada com a maior afinidade do IKK para a p100 comparativamente com o I κ B. Importa acrescentar que formas atípicas ou alternativas de activação do NF- κ B existem, quer na via canónica quer na não canónica. A título de exemplo, foi demonstrado que a IKK e outras cinases (caseína cinase II, cinases activadas por *stress* ou mitogénios e a PKC), são capazes de activar o NF- κ B de uma forma independente do I κ B α (Schmitz *et al.* 2001).

4.1.2. A activação do NF- κ B pelo peroxinitrito

As evidências acumuladas até agora sugerem que o NF- κ B é sensível ao estado redox da célula. Contudo, o papel das ROS e RNS parece estar intimamente dependente do tipo de célula e dos níveis de oxidantes e antioxidantes existentes, uma vez que o mesmo estímulo, por exemplo o \cdot NO, pode ter efeitos opostos. Por um lado, é um activador do NF- κ B (Umansky *et al.* 1998) e, por outro, parece impedir a activação prolongada deste factor de transcrição e assim limitar um processo de inflamação crónica, em resultado de um mecanismo de retrocontrolo protagonizado pelo \cdot NO derivado da iNOS, ela própria expressa por acção do NF- κ B (Peng *et al.* 1998). Importa acrescentar que, em geral, situações que levam a um aumento da expressão de iNOS, pelo menos numa primeira fase, levam também à estimulação da actividade da SOD. Esta, ao neutralizar o anião superóxido formado, poupará o \cdot NO, ao impedir a reacção deste com aquele para dar peroxinitrito. Portanto, as células capazes de assegurar a actividade da SOD conseguirão manter o \cdot NO dentro dos limites necessários para impedir a sobreactivação do NF- κ B.

O peroxinitrito é uma das espécies reactivas reconhecidas como capazes de activar o NF- κ B (Matata *et al.* 2002). Recentemente, alguns autores (Bar-Shai e Reznick 2006) demonstraram em células expostas ao peroxinitrito, a activação do NF- κ B dependente da nitração de resíduos de tirosina do I κ B α e independente da fosforilação e degradação da serina. Demonstraram, igualmente, que a exposição prolongada ao peroxinitrito resultou numa activação não transitória do NF- κ B, contrastando com a observada para o óxido nítrico, que leva apenas a uma activação transitória (Figura 9). Embora a fosforilação e a nitração de resíduos de tirosina não sejam mutuamente exclusivas (Monteiro 2002), várias equipas de investigação verificaram que, para baixas concentrações de peroxinitrito (10-250 μ M) a fosforilação é preponderante enquanto que para elevadas concentrações esta torna-se diminuída ou mesmo inibida, prevalecendo a nitração daqueles resíduos (Kong *et al.* 1996; Mondoro *et al.* 1997). Por outro lado, verificou-se que o peroxinitrito até 250 μ M promovia uma inibição da IKK β por oxidação, enquanto estimulava a NIK e a IKK α (Levrant *et al.* 2005).

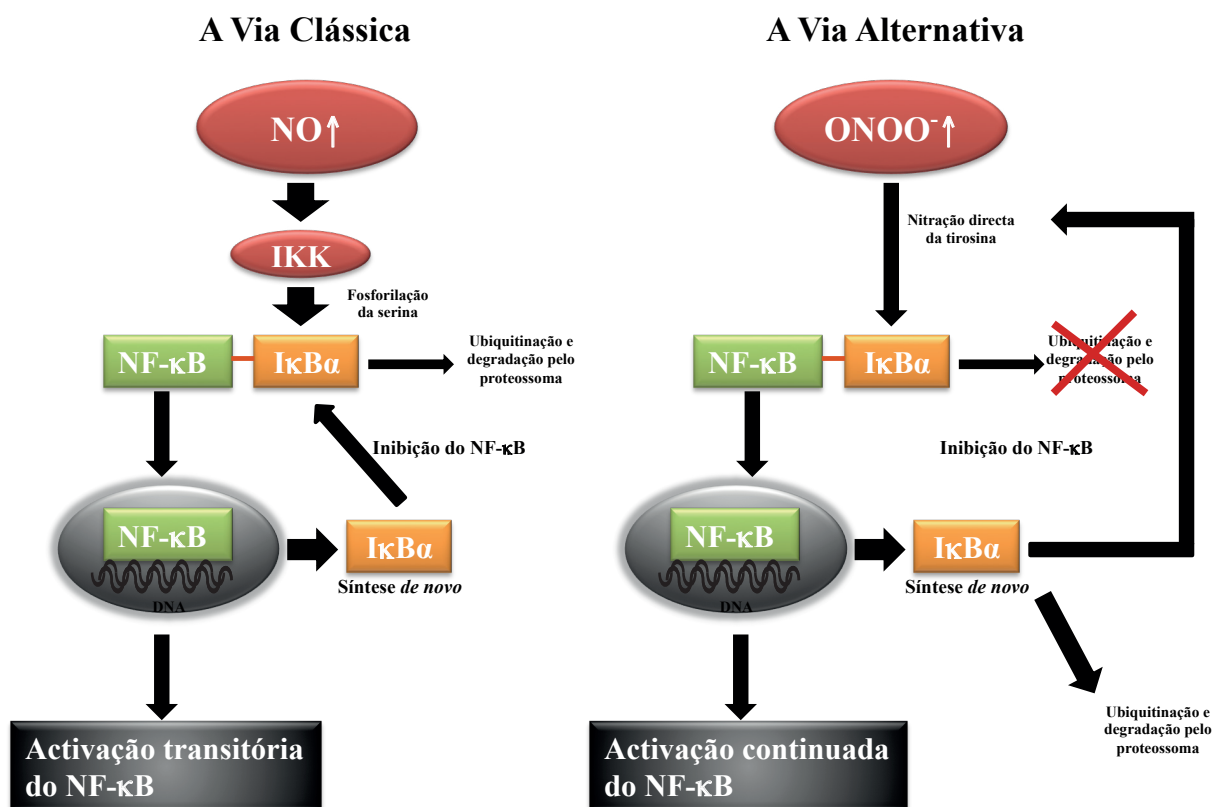


Figura 9. Activação do NF- κ B promovida quer pelo peroxinitrito quer pelo óxido nítrico. O aumento dos níveis de óxido nítrico conduz a uma activação transitória (clássica) do NF- κ B. Em concreto o NO activa a IKK que, por sua vez, fosforila I κ B α , conduzindo à sua ubiquitinação e subsequente degradação. O NF- κ B assim libertado é translocado para o núcleo onde activa a expressão de vários genes, incluindo o do próprio I κ B α , permitindo a síntese *de novo* deste inibidor, causando assim o retrocontrolo inibitório e a inactivação do NF- κ B. Em contraste, a activação do NF- κ B pelo peroxinitrito segue uma via alternativa que conduz a uma resposta inflamatória sustentada. Este facto advém da nitração do I κ B α e não da sua fosforilação o que parece impedir a ubiquitinação e posterior degradação proteossómica deste inibidor, o que origina uma activação prolongada do NF- κ B. Adaptado e modificado a partir de Bar-Shai *et al.* 2006.

Assim, o ONOO⁻ parece exibir um padrão de comportamento bastante controverso, activando (Janssen-Heininger *et al.* 2002) ou inibindo o NF- κ B (Levrard *et al.* 2005), consoante as condições. De facto, foi observado que a nitração dependente do ONOO⁻ de resíduos de tirosina do I κ B α impediam a fosforilação nesse resíduo e portanto a sua degradação (Kong *et al.* 1996). Gow e colaboradores observaram que a exposição de células endoteliais ao ONOO⁻ leva à diminuição do nível de proteínas fosforiladas e aumento das nitradas (Gow *et al.* 1996). Outros autores demonstraram ainda que a nitração da tirosina pode mimetizar a acção da sua fosforilação, activando a proteína (MacMillan-Crow *et al.* 2000). O ONOO⁻ parece ser um mediador chave no balanço entre a nitração e a fosforilação da tirosina do I κ B, podendo impedir esta última reacção, na presença de elevadas concentrações de ONOO⁻, permitindo que a nitração seja a mais prevalente (Brito *et al.* 1999; Monteiro 2002).

Dependendo das concentrações locais desta RNS, a nitração e a fosforilação de resíduos críticos de tirosina podem ser processos competitivos (Brito *et al.* 1999). As moléculas de I κ B α com tirosinas nitradas parecem elas próprias constituir alvos para vias degradativas alternativas que resultam no aumento de actividade do NF- κ B. De referir que, em contraste com a fosforilação da serina mediada pela IKK, a fosforilação da tirosina do I κ B α é capaz de activar o NF- κ B, mesmo na ausência de degradação dependente da ubiquitinação do I κ B α alterado (Imbert *et al.* 1996; Bar-Shai *et al.* 2006). Assim, em contraste com a fosforilação canónica do I κ B nos dois resíduos de serina, tanto a fosforilação como a nitração da tirosina, constituem duas formas atípicas de promover a activação do NF- κ B. O facto da nitração da tirosina poder prevenir ou reduzir os efeitos da sua fosforilação, pode ser uma das razões pelas quais se observa que a exposição ao ONOO $^-$ não bloqueia a activação de vias de sinalização que se baseiam na fosforilação da tirosina, podendo mesmo potenciar algumas delas (Klotz *et al.* 2002). Contudo, esta situação deixa de ser possível, quer na via clássica quer na não clássica, para concentrações elevadas de ONOO $^-$, a partir das quais a nitração da tirosina passa a prevalecer (Bar-Shai *et al.* 2006).

Segundo o grupo de investigação liderado por Reznick, quando a nitração da tirosina não é impedida, ocorre a activação não canónica do NF- κ B. Por outro lado, quando essa nitração está impedida, com agentes como a epigalocatequina-3-galato, ocorre a via canónica. Contudo, o bloqueio da nitração não exclui a possibilidade de ocorrência da via oxidativa de activação do NF- κ B pelo ONOO $^-$ através da fosforilação da NIK e IKK (Bar-Shai *et al.* 2006).

Assim, estas duas químicas do ONOO $^-$, oxidativa e nitrativa, não se excluem mutuamente. Na realidade, pode assumir-se que as vias alternativas de activação do NF- κ B e modificações pós-tradução podem ser desencadeadas pelo ONOO $^-$ através da nitração e/ou oxidação, consoante o balanço redox da célula pelo que constitui um desafio saber qual das vias está a contribuir para os efeitos observados. A exposição celular às RNS está também associada com a depleção do GSH e conseqüente *stress* oxidativo, aumentando a activação do NF- κ B (Sen *et al.* 1997). Salienta-se ainda que em circunstâncias conducentes ao aumento da expressão da iNOS, as células incapazes de aumentar a actividade e/ou expressão da SOD, por forma a que não ocorra depleção do \cdot NO pelo superóxido (permitindo assim um retrocontrolo negativo para a sinalização pelo NF- κ B), reúnem condições propícias para se verificar aumento do ONOO $^-$ e então ocorrer uma forma alternativa de activação do NF- κ B (Janssen-Heininger *et al.* 2002).

4.2. A via da PI3K/Akt

A via de sinalização da fosfatidil-inositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt) está envolvida em múltiplos aspectos da homeostasia celular nomeadamente na proliferação, crescimento e sobrevivência, uma vez que constitui um ponto de partida para muitos outros processos de sinalização celulares.

Os fosfatidilinositóis são fosfolípidos situados na porção citosólica das membranas eucarióticas e que constituem substratos para cinases lipídicas que fosforilam especificamente o inositol em 3'-OH. A PI3K é uma cinase lipídica heterodimérica que consiste numa subunidade reguladora (p85) e numa subunidade catalítica (p110), sendo capaz de desencadear uma série de respostas biológicas (Wymann e Pirola 1998). A PI3K é activada pela fosforilação de resíduos de tirosina da p85 por tirosinas cinases provenientes de receptores de factores de crescimento activados (Heldin 1995) ou de não receptores (p60-src) (Kapeller e Cantley 1994), através de ligações estabelecidas com os domínios SH2 deste complexo enzimático. A ligação da PI3K a moléculas sinalizadoras leva ao recrutamento dos complexos p85/p110 para a membrana plasmática e a activação subsequente da subunidade catalítica, p110. A p110 activada fosforila fosfatidilinositóis, originando assim moléculas que constituem segundos mensageiros necessários para a o recrutamento da Akt para a membrana plasmática e consequente activação.

Citocinas, factores de crescimento e certos oncogenes demonstraram actuar como inibidores da apoptose, sendo que, em muitas situações esse efeito é mediado pela activação da Akt induzida pela PI3K (Kennedy *et al.* 1997; Marte e Downward 1997).

A diversidade de formas de activação da PI3K associada à sua afinidade para múltiplos substratos decorrente da sua dupla actividade enzimática como cinase lipídica e proteica, determinam para esta enzima uma intervenção importante no controlo do crescimento celular mas, o seu efeito principal verifica-se ao nível da resposta ao *stress* constituindo um dos principais factores responsáveis pela transmissão de sinais antiapoptóticos, controlando assim a sobrevivência celular (Franke *et al.* 1997; Gerber *et al.* 1998). Neste contexto, estudos das vias de activação da Akt demonstraram a intervenção da PI3K (Burgering e Coffey 1995; Franke *et al.* 1995). A activação da Akt ocorre através da ligação de produtos lipídicos resultantes de reacções da PI3K, seguida da sua translocação para a membrana e fosforilação pelas proteínas cinases PDK1 e PDK2. Está descrito que a activação da Akt pode inibir a morte apoptótica em vários tipos de células (Dudek *et al.* 1997; Kennedy *et al.* 1997; Fujio *et al.* 2000). No que diz respeito às células endoteliais, a activação da Akt parece ser essencial para a citoprotecção induzida pela matriz e pelo factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF, *vascular endothelium growth factor*) (Gerber *et al.* 1998; Fujio e Walsh 1999).

São conhecidos vários mecanismos independentes de activação da Akt (Krasilnikov 2000) que impedem ou bloqueiam o processo apoptótico. Contudo, até à data, de todos os membros da família Bcl-2, apenas a Bad, parece constituir alvo para a Akt (Zha *et al.* 1996; Zundel e Giaccia 1998). Para além disso, em certos tipos de células, a Akt parece inibir directamente a actividade das caspases, o que também poderá estar na base dos seus efeitos antiapoptóticos.

Como já foi anteriormente discutido, o $\cdot\text{NO}$ produzido pela eNOS é um importante regulador da homeostase cardiovascular ao promover a vasodilatação, inibir a agregação plaquetar e

a adesão de leucócitos, e a proliferação de células musculares lisas. Por estas razões, a activação da eNOS e a libertação do NO são altamente reguladas (Corson *et al.* 1996; Garcia-Cardena *et al.* 1996). Fulton e colaboradores demonstraram que, após exposição de células endoteliais ao VEGF ou ao *shear stress* fisiológico, a Akt activava a eNOS através da sua fosforilação, levando a um aumento da produção de NO pelas células endoteliais (Fulton *et al.* 1999). A activação da via da PI3K/Akt, causa a fosforilação e activação da eNOS, independente dos níveis de Ca^{2+} , coexistindo com um mecanismo dependente deste ião (Dimmeler *et al.* 1999). Em situações patogénicas, esta via da PI3K/Akt encontra-se inibida, o que origina uma redução dos níveis de expressão e actividade da eNOS, pelo que o estado de activação da Akt endotelial, deverá ser considerado na avaliação do tónus vasomotor do endotélio. O reconhecimento de que a Akt é um regulador da eNOS sugere que a perturbação da síntese de NO que ocorre na hipercolesterolemia e aterosclerose podem resultar de alterações na interacção Akt-eNOS.

A activação da via da PI3K tem sido igualmente implicada na activação do NF- κ B induzida pela fosforilação da tirosina-42 do I κ B α (Beraud *et al.* 1999).

4.3. A via do Nrf2 e a produção da HO-1

O factor nuclear E2 p45-*related factor 2* (Nrf2), expresso de forma ubíqua, é um membro da família de factores de transcrição básicos *leucine zipper* (bZip) (Surh *et al.* 2008) e considerado um regulador chave no sistema de defesas antioxidantes celulares, ao controlar a expressão basal e induzida de mais de 200 genes (Li, Ichikawa *et al.* 2009).

Em condições normais o Nrf2 encontra-se sequestrado no citoplasma associado a uma proteína inactivadora, a Keap 1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) (Kang, Choi *et al.* 2002; Jaiswal 2004). A associação do Nrf2 a esta proteína inibidora também faz dele alvo para a ubiquitinação e posterior degradação pelo sistema catalítico proteassómico, resultando na reduzida expressão basal dos genes associados a este factor de transcrição (Zhang 2006; Niture *et al.* 2010).

A activação do Nrf2 ocorre numa situação de agressão celular resultante, por exemplo, do aumento dos níveis intracelulares de ROS (Itoh *et al.* 2004), do *shear stress*, ou da estimulação por outro tipo de compostos, incluindo fitoquímicos (Eggleter *et al.* 2008). A proteína Keap 1 é extremamente rica em resíduos de cisteína, actuando como um sensor redox celular. Embora estas modificações oxidativas dos resíduos de cisteína do Keap1 sejam cruciais para a activação do Nrf2, dados recentes sugerem que a fosforilação de resíduos de serina/treonina no próprio Nrf2 por cinases modula também o movimento deste factor de transcrição e a sua acumulação nuclear (Surh *et al.* 2008). Após indução pelos compostos referidos, ocorrem alterações estru-

turais na Keap1, que conduzem à dissociação do complexo Keap1/Nrf2, impedindo a ubiquitinação do Nrf2, e permitindo a sua translocação nuclear (Dinkova-Kostova *et al.* 2002). Estão descritos activadores do Nrf2 que actuam não através da indução da sua translocação nuclear, mas sim impedindo a respectiva degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (Dreger *et al.* 2010). Importa ainda acrescentar que o sistema Keap 1/Nrf2 poderá não ser apenas regulado por estímulos pró-oxidantes, mas também por vias independentes de *stress* como a sinalização mediada pela cinase da glicogénio sintase (GSK)-3 β (Paine *et al.* 2010).

Após translocação para o núcleo, o Nrf2 forma heterodímeros com pequenas proteínas, as Maf, ligando-se em seguida, a elementos de resposta antioxidante/electrófila (ARE/EpRE) situados em regiões promotoras de genes que codificam várias proteínas antioxidantes e enzimas de destoxificação de fase II.

Os genes activados pelo Nrf2 asseguram a homeostase redox das células, o seu crescimento e apoptose, a biogénese mitocondrial (Piantadosi *et al.* 2008), funções inflamatórias e a expressão de enzimas de fase II (Zhang 2006). Algumas destas últimas incluem a heme oxigenase-1 (HO-1), a catalase, a glutatião peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD), a tioredoxina, a NADPH:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e a glutatião S-transferase (GST) (Surh *et al.* 2008) (Figura 10). O gene *nrf2* apresenta um elevado nível de conservação nos vertebrados (Kobayashi e Yamamoto 2006).

Uma vez que a acumulação crónica do Nrf2 no núcleo é lesiva, ele é localmente degradado, por autoregulação, após ligação à Keap1 entretanto deslocada para o núcleo, interrompendo assim a expressão génica (Niture *et al.* 2010).

São inúmeras as patologias que implicam a desregulação do Nrf2, incluindo as doenças cardiovasculares. O Nrf2 é fundamental para o normal funcionamento cardíaco e vascular. Em células da aorta bovina, dadores de NO demonstraram aumentar os níveis de Nrf2 e, em células aórticas humanas, o fluxo laminar teve resultados semelhantes (Griendling e FitzGerald 2003). O papel do Nrf2 na protecção celular é sugerido como um dos mais importantes mecanismos de resposta ao insulto oxidativo (Surh *et al.* 2008) e diversos estudos em animais *knockout* para este factor (Zhu *et al.* 2008) ou que o sobreexpressam (Levonen *et al.* 2007) suportam esta afirmação.

A indução coordenada de enzimas citoprotectoras dependentes do Nrf2, capazes de neutralizar directa ou indirectamente espécies reactivas, incluindo as RNS, é crucial para que as células consigam sobreviver. A intervenção do peroxinitrito na activação do Nrf2 é particularmente dependente dos tecidos envolvidos e das concentrações atingidas.

Um dos elementos chave na resposta celular ao *stress* é a heme oxigenase-1 (HO-1), enzima que catalisa a etapa limitante da degradação do heme livre, potencialmente tóxico, a biliverdina (rapidamente metabolizada a bilirrubina), ferro livre e monóxido de carbono e que apresenta acti-

vidade antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica (Tenhunen *et al.* 1968; Ryter *et al.* 2006). A deficiência desta enzima tem sido implicada em várias doenças incluindo a aterosclerose, hipertensão, lesão pulmonar devida a hipóxia, neoplasias, rejeição de transplantes, enfarte do miocárdio, doença de Alzheimer e doença renal do diabético (Gozzelino *et al.* 2010). Esta enzima apresenta uma reduzida expressão basal na maioria dos tecidos e embora o seu substrato, o grupo heme, seja o seu principal indutor, a HO-1 pode ser estimulada por muitos outros factores, em concreto, radiação UV, endotoxinas, produtos bacterianos, citocinas, factores de crescimento, metais pesados, *shear stress* e oxidantes tais como o peróxido de hidrogénio e o peroxinitrito (Maines 2005; Paine *et al.* 2010).

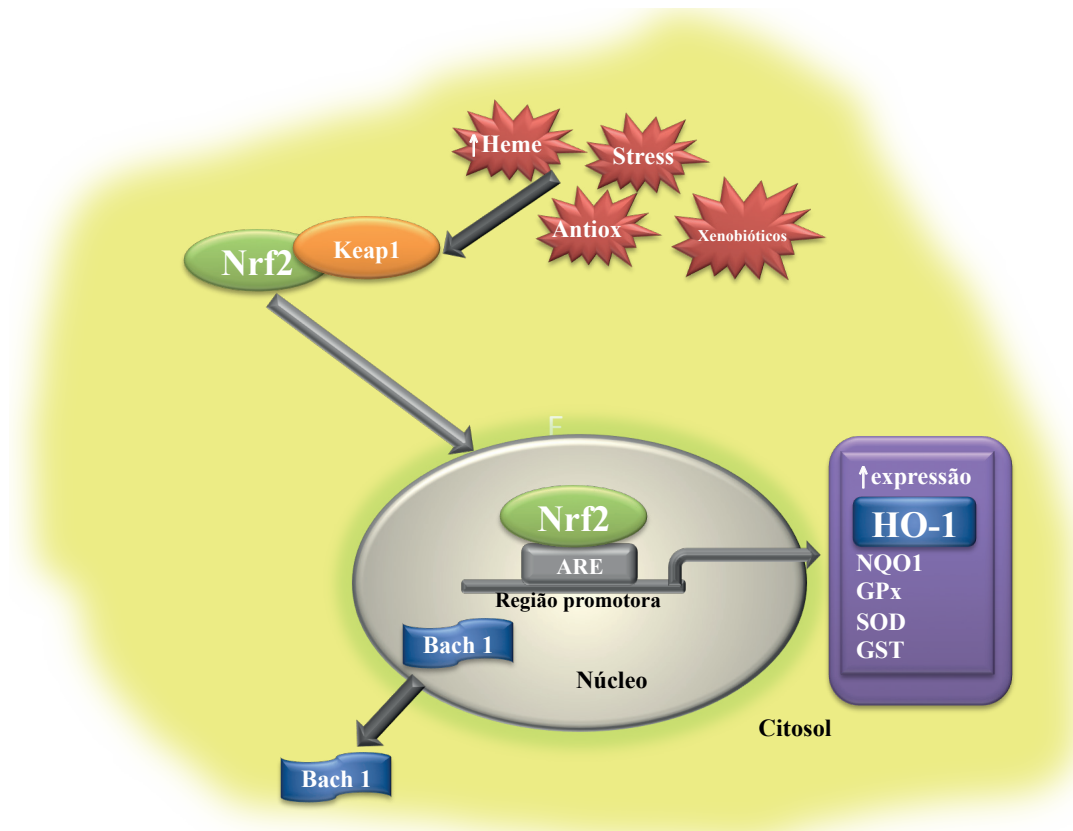


Figura 10. Esquema representativo da regulação da transcrição génica mediada pelo Nrf2. São vários os mecanismos propostos para a regulação do Nrf2 em resposta ao *stress* oxidativo. Na ausência de agressão oxidativa, o Nrf2 é continuamente degradado pelo proteassoma. Em resposta ao *stress* oxidativo, a xenobióticos ou a antioxidantes, o Nrf2 dissocia-se do Keap1 e transloca para o núcleo. No caso específico da regulação da HO-1, o repressor da transcrição Bach1 desempenha um importante papel. Em condições basais este repressor da transcrição está ligado à região promotora da HO-1. Quando a célula é agredida por um estímulo oxidante ou por níveis elevados de heme, o Bach1 é removido da região promotora, permitindo a ligação, a esse mesmo local, do Nrf2 entretanto translocado para o núcleo. São vários os factores aparentemente responsáveis pela dissociação do Keap1, nomeadamente a oxidação dos seus grupos tiol, a fosforilação do Nrf2, a localização nuclear do Keap1 e Nrf2 ou ainda sinais nucleares para o sistema Keap1/Nrf2. A transcrição génica mediada pelo Nrf2 via ARE inclui vários genes envolvidos na resposta ao stress, metabolismo de compostos, destoxificação e transporte. Abreviaturas: ARE, *antioxidant response element*; Bach1, *BTB and CNC homologue 1*; HO-1, heme oxigenase-1; Keap1, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; Nrf2, *NF-E2-related factor 2*; ROS; *reactive oxygen species*. Adaptado e modificado de Paine *et al.* 2010.

Os produtos da actividade da HO-1 desempenham importantes funções sistémicas, salientando-se a intervenção vascular: o CO é um importante vasodilatador, modulando o tónus vascular, em particular, quando existe depleção do $\cdot\text{NO}$, e a biliverdina e o produto da sua oxidação enzimática, a bilirrubina, são potentes antioxidantes. Apesar de ocorrer também um aumento dos níveis de ferro livre, a indução simultânea da ferritina intracelular pela HO-1, diminui os efeitos citotóxicos daquele catião.

Só recentemente foi indiscutivelmente reconhecido o papel da HO-1 como imunomoduladora e anti-inflamatória, continuando a ser alvo de intensa investigação, em particular, no contexto vascular. A monocamada endotelial, ao constituir uma barreira entre a circulação sanguínea e os tecidos inflamados, está intimamente relacionada com a inflamação. Como já foi descrito neste capítulo introdutório, o endotélio regula o recrutamento e a transmigração de leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T para o local da lesão (Cook-Mills e Deem 2005). Em culturas de células endoteliais a HO-1, e em particular os seus produtos, biliverdina e bilirrubina, demonstraram afectar a interacção daquelas células imunes com o endotélio, diminuindo a sua adesão. A título de exemplo, animais de experiência *knockout* para a enzima foram mais susceptíveis à lesão endotelial e à morte apoptótica (Hayashi *et al.* 1999; Kawamura *et al.* 2005). A sua actividade anti-inflamatória parece decorrer de vários efeitos nas funções endoteliais, nomeadamente da inibição da expressão de várias moléculas de adesão induzidas pelo TNF- α e também do recrutamento de células progenitoras endoteliais (Wagener *et al.* 2003; Soares *et al.* 2004; Wu *et al.* 2009). As LDL oxidadas demonstraram também aumentar a expressão da HO-1 em culturas de células endoteliais e musculares lisas e também durante a aterogénese, particularmente no local das lesões ateroscleróticas (Hoekstra *et al.* 2004).

Embora o CO seja genericamente considerado um gás tóxico, aquele especificamente derivado da HO-1, apresenta importantes funções fisiológicas como molécula sinalizadora (Kim *et al.* 2006). Parece estar implicado na regulação da apoptose, vasodilatação e inflamação ao ponto de constituir uma promissora abordagem terapêutica, intensamente estudada através do recurso a moléculas libertadoras de CO (CORMs, *CO-releasing molecules*), capazes de fazer chegar o CO às células alvo, contornando os seus efeitos tóxicos (Motterlini *et al.* 2005).

A expressão da HO-1 é primariamente regulada ao nível transcricional, sendo vários os factores de transcrição implicados na sua indução, todos eles dependentes do estado redox celular, em concreto, o Nrf2, o Bach1 (*BTB and CNC homolog 1*), o NF- κ B e o AP-1, sendo o Nrf2 dos mais importantes no controlo da expressão desta enzima. Contudo, não é conclusivo se a indução de HO-1 dependente do Nrf2 faz parte de uma resposta protectora genérica, orquestrada pelo Nrf2, e que inclui outros genes como a NQO1 ou a tioredoxina reductase-1, ou se, constituirá um mecanismo específico de indução da HO-1 envolvendo o gene *brahma-*

-related 1 (BRG1). Este gene parece ser necessário para o recrutamento específico do Nrf2 para a região promotora do gene da HO-1, mas não para a região promotora de genes que codificam outras proteínas destoxicantes de fase II (Zhang, Ohta *et al.* 2006).

O repressor da transcrição Bach1 é considerado um regulador chave na expressão induzida da HO-1 (Figura 10). Tal como o Nrf2, pertence à família CNC de factores de transcrição e também se liga a proteínas Maf nucleares, que, por sua vez, se ligam a regiões promotoras específicas como as ARE da HO-1 (Igarashi e Sun 2006). No entanto, ao contrário do Nrf2, o Bach1 tem seis motivos reguladores hémicos, que são cruciais nas suas funções, concretamente na repressão da expressão da HO-1, na presença de quantidades intracelulares reduzidas de heme. Assim que os níveis de heme aumentam, o Bach1 altera a sua conformação e dissocia-se da região promotora da HO-1, permitindo a ligação do Nrf2 e a expressão da enzima (Ogawa *et al.* 2001). Recentemente, foi também demonstrado que concentrações elevadas de heme condicionam a degradação proteassómica do Bach1, controlando os seus níveis celulares (Zenke-Kawasaki *et al.* 2007).

Evidências experimentais têm revelado que, em células vasculares, a expressão da HO-1 é induzida não só pela activação da PI3K/Akt (Martin *et al.* 2004) mas também por um mecanismo dependente da mitocôndria, em resposta a vários estímulos, incluindo citocinas e factores de crescimento (Hamdulay *et al.* 2010). A indução da expressão da HO-1 pelo NF- κ B está envolta em alguma controvérsia, tendo sido sugerido o seu envolvimento directo, uma vez que foram detectados elementos κ B na região promotora da HO-1, em ratos (Li, Guo *et al.* 2009); contudo, este facto foi posto em causa por outros autores que defendem que a indução da enzima é independente deste factor de transcrição (Min *et al.* 2011).

São vários os autores que demonstraram a activação do Nrf2 e conseqüentemente da HO-1, em diversos tipos de células tratadas com peroxinitrito através de diferentes vias incluindo a da PI3K/Akt atribuindo a este *stress*, dito moderado, a capacidade de conferir às células um mecanismo adaptativo de sobrevivência (Kang, Choi *et al.* 2002; Li *et al.* 2006; Mattart *et al.* 2012). Todavia, é necessário ter em consideração a sobreprodução contínua de espécies reactivas, particularmente de peroxinitrito, que ocorre no processo inflamatório que caracteriza a aterogénese, conducente à disfunção endotelial e morte celular; ou seja, a permanente exposição do endotélio vascular a um forte oxidante, como o peroxinitrito, não constituirá, a médio/longo prazo, uma agressão de carácter moderado. Para além disso, nos vasos sujeitos a *shear stress* ou com lesão, a produção desta e de outras espécies reactivas, está comprovadamente exacerbada, traduzindo-se numa agressão de elevada toxicidade incapaz de ser mitigada pelas defesas celulares.

O restabelecimento do normal metabolismo celular implica a interligação de respostas provenientes de sistemas antagonizantes, em particular do sistema Nrf2/Keap1 e NF-κB (Figura 11). Por exemplo, a activação do Nrf2 através de alterações do Keap1 por produtos da COX como a 15d-PGI₂, o H₂O₂ ou quaisquer outros oxidantes resultantes da actividade de enzimas como a NOX e LOX, parece ser uma realidade (Brigelius-Flohe e Flohe 2011). Não existem evidências absolutamente conclusivas indicando que o Nrf2 possa directamente inibir a sinalização pelo NF-κB (Li, Khor *et al.* 2008). Porém, o inverso parece ser uma realidade, já que o NF-κB consegue reprimir directamente o Nrf2, ao nível transcrricional, ao competir por uma proteína co-activadora, a proteína ligadora do CREB (*cAMP Responsive Element Binding Protein*), a CBP (*CREB binding protein*) (Liu, Qu *et al.* 2008).

Concluindo, são diversas as vias de transdução de sinal que podem potencialmente ser influenciadas pelo peroxinitrito, sendo que, para a sua maioria, é possível encontrar pontos de ligação, directos ou indirectos entre elas, o que justifica a complexidade de respostas celulares despoletadas por este oxidante.

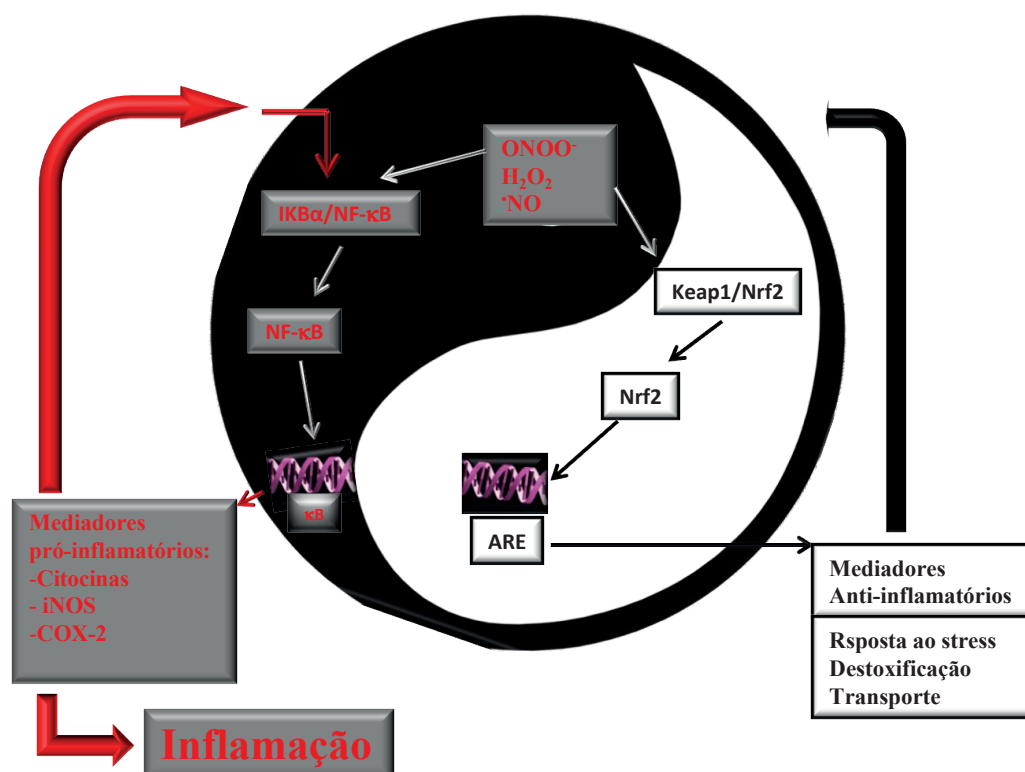


Figura 11. NF-κB e Nrf2: duas vertentes opostas na resposta inflamatória. A formação de espécies reactivas leva à activação do NF-κB mas também oxida o sistema Keap1/Nrf2. O NF-κB exacerba e perpetua a resposta inflamatória ao desencadear a expressão de mediadores pró-inflamatórios como enzimas e citocinas. Por sua vez, a activação do Nrf2, resultante da oxidação do Keap1, minimiza aquela resposta inflamatória, através do aumento da expressão de proteínas com propriedades anti-inflamatórias. Abreviaturas: ARE, *antioxidant response element*; Keap1, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; Nrf2, *NF-E2-related factor 2*. Adaptado e modificado de Brigelius-Flohe *et al.* 2011.

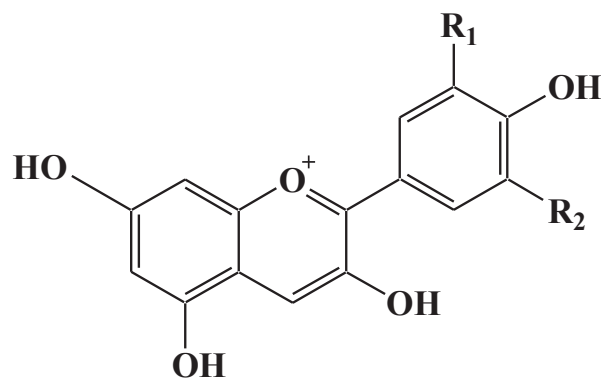
5. As antocianinas e a aterosclerose

As antocianinas (do Grego *ánthos*, flor e *kýanos*, azul) constituem uma das principais classes de flavonóides e encontram-se amplamente distribuídas em flores, vegetais e frutos. Este grupo de pigmentos hidrossolúveis tem sido alvo de grande interesse nos últimos anos devido ao seu elevado consumo na dieta regular humana, quando comparado com outros flavonóides e ao qual são atribuídos inúmeros benefícios ao nível da promoção, prevenção e tratamento de várias patologias, nomeadamente as do foro cardiovascular.

5.1. Considerações químicas e distribuição

As antocianinas encontram-se dissolvidas na seiva vacuolar dos tecidos epidérmicos de flores e frutos, aos quais emprestam cor rosa, vermelha, azul ou violeta. Podem estar presentes em todos os órgãos da planta, frutos, flores, caules e raízes, onde desempenham funções antioxidantes, fotoprotectoras, de defesa (por exemplo, a cianidina-3-glucósido inibe o crescimento de larvas na planta do tabaco) e perpetuação das espécies. Servem ainda como critério taxonómico na classificação de plantas. Os níveis de antocianinas dentro do mesmo tipo de fruto podem variar devido a factores internos e externos, incluindo factores genéticos, intensidade e tipo de luz, temperatura, processamento e armazenamento.

A estrutura química básica de uma antocianina é a de um difenilpropanóide [C6 (anel A)-C3(anel C)-C6(anel B)] baseado numa estrutura em anel polifenólica (Figura 12). Estes compostos ocorrem principalmente como glicósidos da respectiva aglicona (antocianidina), com a molécula do hidrato de carbono geralmente ligada à posição 3 do anel C, ou à posição 5,7 do anel A. A glicosilação em 3',4',5' do anel B é muito rara. Existem mais de 600 antocianinas descritas sendo classificadas em diferentes tipos consoante os substituintes no anel B, o tipo e o número de açúcares conjugados e a presença ou ausência de grupos acilo (Prior e Wu 2006). Existem seis tipos principais de antocianidinas: pelargonidinas, cianidinas, delphinidinas, peonidinas, petunidinas e malvidinas (Figura 12) que podem estar ligadas a resíduos de glicose, galactose, rarnose, xilose ou arabinose sob a forma de mono-, di-, ou trissacarídeos. A sua estabilidade é, essencialmente, atribuída à presença de uma molécula de glicose na posição 3, para além de poderem formar complexos com outros flavonóides (copigmentação). Salvo raras excepções, as agliconas raramente existem nas plantas.



Antocianidina	R1	R2
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 12. Estrutura química das antocianidinas.

Na dieta humana, as antocianinas são encontradas no vinho tinto, em algumas variedades de cereais, em vários vegetais folhosos e tubérculos (couve, feijão, cebola, beringelas e rabanete), mas a sua maior abundância ocorre nos frutos. Para a maior parte destes compostos os pesos moleculares oscilam entre 400 a 1200 Da. As uvas, por exemplo, são essencialmente constituídas por cinco monoglucósidos de malvidina, peonidina, petunidina, cianidina e delfinidina. As antocianinas das uvas apresentam uma enorme simplicidade estrutural mas permitem que a coloração do vinho tinto persista durante longos períodos de tempo (Brouillard *et al.* 2003). Na maior parte dos frutos destaca-se a cianidina-3-glucósido (Cy3glc), sendo que no vinho tinto é a malvidina-3-glucósido (Mv3glc) a mais abundante (Ogawa *et al.* 2008).

A percentagem de antocianinas nos alimentos é geralmente proporcional à intensidade da cor e pode alcançar valores de 2-4 g/kg de peso fresco em groselhas e amoras, valores que, em regra, aumentam à medida que o fruto amadurece. Encontram-se, preferencialmente, na pele, embora algumas também existam na polpa, como são exemplo os frutos vermelhos (morangos e cerejas). O vinho contém entre 100 a 1000 mg de antocianinas /L sendo que estas são transformadas em várias estruturas complexas à medida que o vinho envelhece (Es-Safi *et al.* 2002; Andlauer *et al.* 2003).

Estes pigmentos apresentam diferentes formas químicas, coradas ou não, consoante o pH (Figura 13). Em condições fortemente ácidas, as antocianinas assumem a forma de um ião flavílio, apresentam cor vermelha e são relativamente estáveis. Em condições de pH pouco ácidas ou neutras elas são convertidas em pseudo-bases incolores devido à reacção com a água, tornando-se assim instáveis (Brouillard *et al.* 2003). As cianidinas, com dois grupos hidroxilo no anel B são as mais amplamente distribuídas, seguindo-se as delphinidinas. A distribuição das antocianinas nos principais alimentos vegetais tem sido alvo de extensa investigação (de Pascual-Teresa *et al.* 2010) ainda que se saiba que os consumos diários são muito variáveis (Chun *et al.* 2007).

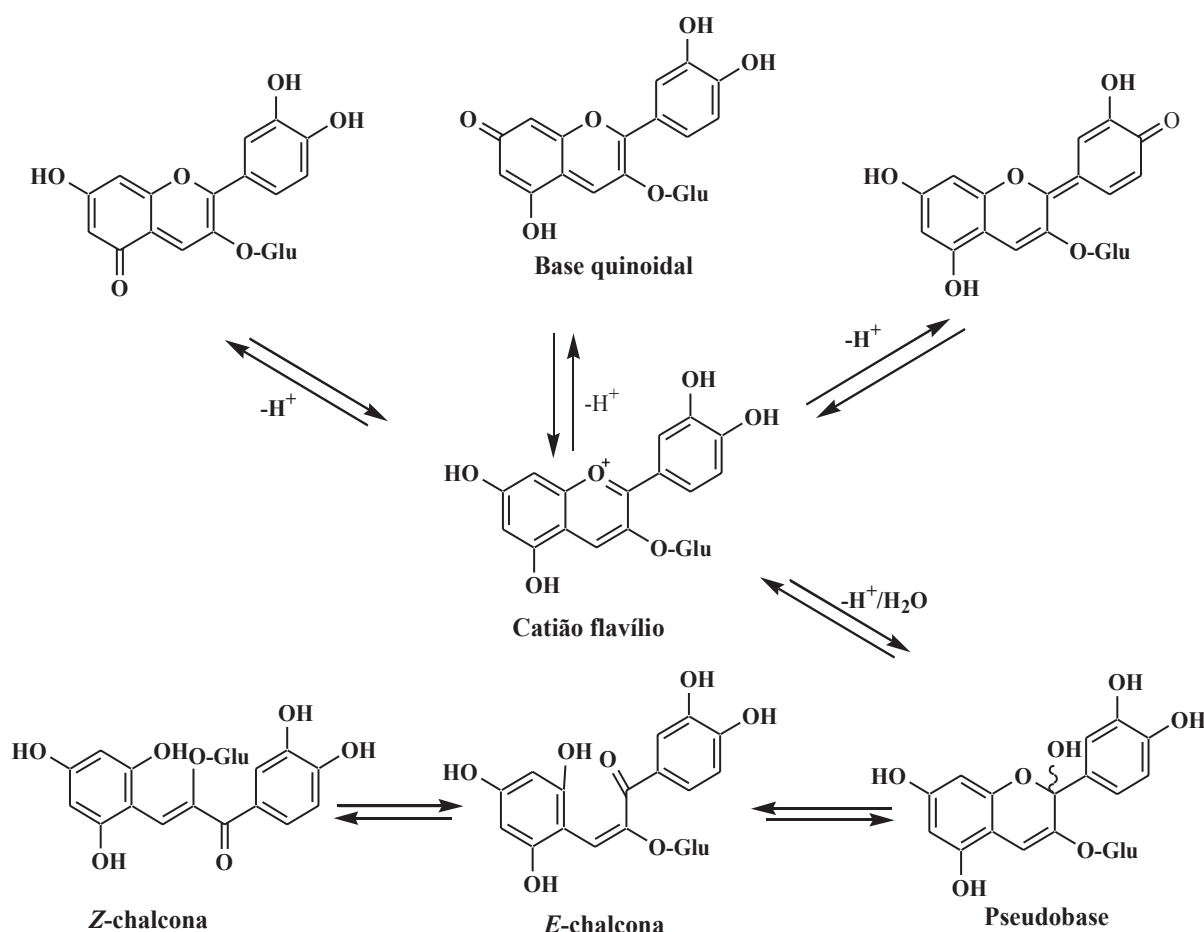


Figura 13. Alterações estruturais das antocianinas, exemplificadas para a Cy3glc, numa solução aquosa, em função do pH. A antocianina ocorre na forma de chalcona a pH neutro (pH 7-8). Em condições ligeiramente ácidas forma-se uma pseudobase carbinol (pH 4-5). Num meio fortemente ácido (pH 1), o anel C transforma-se em anel aromático, o que confere a intensa coloração vermelha à molécula. A oxidação do anel B, a pH 6-7, origina uma estrutura quinoidal igualmente corada, com eliminação da carga positiva. Abreviaturas: Glu-glucose. Adaptado de (Lapidot *et al.* 1999).

5.2. Absorção, metabolismo e biodisponibilidade

São inúmeros os trabalhos dedicados à problemática questão da biodisponibilidade das antocianinas e que se encontram sintetizados em várias revisões (McGhie e Walton 2007; Crozier *et al.* 2009; Williamson *et al.* 2009; Del Rio *et al.* 2010; Tsuda 2012), pelo que neste subcapítulo apenas serão referenciados alguns dos dados considerados mais relevantes sobre este assunto.

A ingestão humana de antocianinas varia consideravelmente com os hábitos alimentares estando a sua actividade biológica intimamente ligada à respectiva absorção e metabolismo. Em países ocidentais, o consumo de antocianinas foi estimado em 180-215 mg/dia (Wu *et al.* 2006) pelo que em países como Portugal, onde ainda se pratica a chamada dieta mediterrânica, se prevejam valores mais expressivos. O seu consumo, sob a forma de vinho tinto, foi proposto como parte da justificação do designado “Paradoxo Francês” no qual, uma dieta rica em gordura saturada associada a consumos moderados de vinho tinto, não conduz ao aumento do risco cardiovascular observado noutros países (Renaud e de Lorgeril 1992). Contudo, os estudos que discriminam as concentrações necessárias a uma efectiva actividade biológica são muito escassos. Refere-se, a título de exemplo, um estudo clínico sobre a visão no qual se concluiu que uma dose diária de 50 mg de antocianinas conferia melhorias a esse nível (Kalt *et al.* 2010).

De acordo com Prior e colaboradores (Prior *et al.* 2006) existem pelo menos cinco características particulares das antocianinas, não encontradas nos restantes polifenóis, e que, reconhecidamente, condicionam a sua absorção: i) podem ser absorvidas na sua forma intacta, isto é como glucósidos; ii) são rapidamente absorvidas e eliminadas embora a eficácia da sua absorção seja reduzida; iii) a natureza da sua estrutura química altera a absorção; iv) a sua degradação é mais reduzida no tracto gastrointestinal quando comparada com outros polifenóis; v) outros componentes da dieta podem alterar a sua absorção.

Em concreto, diversos estudos demonstraram, consistentemente, que as antocianinas são rapidamente absorvidas, em maior ou menor grau, na forma intacta no estômago e no intestino, quer em animais de experiência (Wu *et al.* 2005; He *et al.* 2009) quer em humanos (McGhie *et al.* 2003; Garcia-Alonso *et al.* 2009). O facto de tal não ocorrer com outros flavonóides tem merecido especial atenção. As razões para este comportamento diferente permanecem por elucidar na sua totalidade, embora as características estruturais particulares das antocianinas possam constituir parte da resposta, já que estes compostos possuem carga positiva a pH ácido ao passo que os restantes flavonóides são maioritariamente neutros.

Para além da sua forma intacta, as antocianinas surgem na circulação sistémica e na urina, na forma metilada, como derivados glucoronido e/ou formas sulfoconjugadas, alcançando o pico de concentração plasmática entre a 0.5 e as 3 h após consumo, tempo este muito inferior

a qualquer uma das outras subclasses de flavonóides (Kay *et al.* 2005; Prior *et al.* 2006). Os processos de conjugação, principalmente a metilação, sulfatação e glucoronidação, quer no intestino delgado quer no fígado, facilitam a sua eliminação através da bÍlis e da urina, uma vez que aumentam o seu carácter hidrofílico.

Diversos trabalhos de investigação referem que a absorção gástrica das antocianinas, ao pH baixo do estômago, sob a forma de catião flavílio corado, a sua forma mais estável (Crozier *et al.* 2009), se efectua através de um mecanismo mediado pela bilitranslocase, uma proteína transportadora expressa na mucosa gástrica (Passamonti *et al.* 2003; Maestro *et al.* 2010; Ziberna *et al.* 2012). Estudos *in vitro* recentes demonstraram que células endoteliais humanas e de rato expressam igualmente a bilitranslocase e que este transportador específico da bilirrubina está implicado no transporte das antocianinas para o interior das células (Maestro *et al.* 2010; Ziberna *et al.* 2012). Embora se argumente que estes compostos são demasiado hidrofílicos para serem absorvidos directamente pelas células, alguns trabalhos suportam esta via para pequenas moléculas como os glicósidos, justificando assim o seu rápido aparecimento sistémico (Passamonti *et al.* 2003). Após a absorção gástrica, as antocianinas entram na circulação sistémica, depois de passarem pelo fígado onde são parcialmente metabolizadas por reacções de metilação e glucoronidação, sendo alguns desses metabolitos transportados para o intestino através da bÍlis.

As antocianinas não absorvidas no estômago, ao atingirem o intestino delgado são convertidas, devido ao pH mais elevado, numa combinação de hemicetal, chalcona e formas quinoidais. A este nível existem dois mecanismos propostos para a sua absorção. Um deles defende que os glucósidos são transportados para o interior dos enterócitos através de transportadores da glucose dependentes do sódio SGLT1 (Hollman *et al.* 1995; Gee *et al.* 1998) e uma vez ali são hidrolisados pelas β -glicosidades citosólicas (O'Leary *et al.* 2003). A outra hipótese implica a hidrólise extracelular através de uma glicosidase (lactase-floricina hidrolase), presente na membrana da bordadura em escova do intestino delgado, e a sua posterior difusão através das microvilosidades (Day *et al.* 2000). Segue-se também a circulação sistémica após metabolização hepática. Por fim, as antocianinas que alcançam o cólon são expostas à microflora entérica, podendo ser degradadas por hidrólise, catalisada por enzimas bacterianas como a β -glicosidase, em glucose e componente fenólico (Gonzalez-Barrio *et al.* 2010; Gonzalez-Barrio *et al.* 2011). Este último pode ainda ser convertido, por ruptura do anel C, em ácidos fenólicos e aldeídos. Tais produtos poderão ter também efeitos benéficos ao actuarem directamente no tracto gastrointestinal ou após absorção sistémica. No intestino distal, os metabolitos conjugados das antocianinas excretados pela bÍlis podem igualmente ser submetidos à acção das enzimas bacterianas e reabsorvidos através do ciclo enterohepático, permitindo assim uma presença mais prolongada no organismo (Manach *et al.* 2005).

Embora as concentrações sistémicas efectivas destes compostos sejam alvo de recorrente controvérsia, a farmacocinética em voluntários saudáveis revela que cerca de 1-2% da dose total de antocianinas é absorvida intacta (Garcia-Alonso *et al.* 2009; Del Rio *et al.* 2010; Wiczowski *et al.* 2010; Tsuda 2012). Em estudos com humanos é referido que, após a sua rápida absorção, são atingidas concentrações plasmáticas máximas de 1–100 nmol/l após ingestão de doses entre 0.7–11 mg/kg, apresentando uma *clearance* plasmática de cerca de 6 h (Prior 2003; Mullen *et al.* 2008). Recentemente, Garcia Alonso e colaboradores (Garcia-Alonso *et al.* 2009) publicaram um estudo que refere níveis plasmáticos de cerca de 4 nM de Mv3glc inalterada, após ingestão de 90 mg dessa antocianina por voluntários saudáveis. O tempo de meia vida plasmático das antocianinas é variável, sendo, por exemplo, de 2 h, para a Mv3glc e de 3,3 h para o seu rutinósido. As antocianinas e os seus metabolitos persistem na urina até 24 h mantendo a sua estrutura básica (Wiczowski *et al.* 2010; Stalmach *et al.* 2011). No entanto, a percentagem de antocianinas com eliminação renal, quer na sua forma intacta, quer como conjugados ou agliconas, em relação ao total ingerido é muito reduzida, da ordem de 0,004-5,1% segundo alguns autores (Manach *et al.* 2005; Wu *et al.* 2005). Estudos farmacocinéticos demonstraram que os glicósidos e os derivados glucoronido são os mais prevalentes no plasma nas primeiras 5 h, sendo progressivamente metilados, podendo desta forma reduzir a sua bioactividade, ao longo do tempo (Mazza 2007).

De referir ainda a importância da variabilidade individual na biodisponibilidade das antocianinas, que poderá ser devida a diferenças no seu metabolismo ao nível do tracto gastrointestinal, fígado e outros tecidos, uma vez que os polimorfismos humanos se manifestam em genes como os da catecol-*O*-metiltransferase, glutatíão S-transferases e UDP glucuronosil transferase (Lampe e Chang 2007). Também a variação interindividual na microflora intestinal humana merece atenção por poder condicionar a biodisponibilidade destes polifenóis uma vez que, como já se referiu, quando não são absorvidos no estômago ou intestino delgado, estes compostos são substancialmente modificados por estas bactérias entéricas. Apesar deste conhecimento, a literatura nesta área é ainda escassa.

5.2.1. Papel da microflora intestinal

Importa ainda assinalar a potencial contribuição de metabolitos das antocianinas, formados pela acção da microflora intestinal humana, nos seus efeitos fisiológicos. Por exemplo, o ácido protocatecuico foi já identificado como sendo um dos produtos da degradação da Cy3glc por clivagem do anel B (Seeram *et al.* 2001) e, mais recentemente, para além

deste ácido, também o siríngico, o vanílico e o gálico, para além de outros ácidos e aldeídos, foram reconhecidos como metabolitos derivados das antocianinas (Borges *et al.* 2010; Forester e Waterhouse 2010). A maior parte destes compostos demonstra propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias similares aos compostos de que derivam. Pensa-se que todos estes ácidos fenólicos resultam do processamento metabólico das antocianinas pela flora bacteriana entérica (Kay *et al.* 2009) tendo também sido detectados na circulação sistémica em humanos (Vitaglione *et al.* 2007; Azzini *et al.* 2010). Assim, é necessário ter em conta a potencial contribuição destes metabolitos ao avaliar os efeitos fisiológicos das antocianinas.

5.2.2 Influência da matriz alimentar

Embora os flavonóides sejam tipicamente consumidos como parte de uma refeição, existe escassa informação sobre a forma como a sua biodisponibilidade é afectada por outros componentes da dieta. Por exemplo, a quercetina parece inibir a absorção da Cy3glc (Walton *et al.* 2006). Pelo contrário, quando as antocianinas de groselhas e o ácido fítico são administrados em simultâneo verifica-se um aumento considerável das primeiras na corrente sanguínea, quer em ratos quer em humanos, quando comparado com a sua administração isolada (Matsumoto *et al.* 2007). Outros trabalhos de investigação *in vivo* sugerem que a matriz alimentar influencia de forma significativa a absorção e metabolismo das antocianinas. Alguns autores recuperaram na urina 5% das antocianinas ingeridas no sumo de oxococo (*cranberry*) em voluntários humanos (Ohnishi *et al.* 2006) enquanto outros obtiveram apenas 1.8 -2 % das antocianinas ingeridas em sumo de morangos (Felgines *et al.* 2003; Carkeet *et al.* 2008). Efectivamente, a composição dos alimentos pode ser determinante na eficácia da absorção, condicionando, por exemplo, um atraso no esvaziamento gástrico, aumentando assim, o tempo de permanência no tracto gastrointestinal.

Embora os resultados sejam díspares, está estabelecido que o vinho tinto e as uvas podem conter um teor de antocianinas totais de cerca de 100 a 1000 mg/L e 30 a 750 mg/L, respectivamente (Mazza 1995; Andlauer *et al.* 2003). O álcool presente no vinho, foi desde sempre considerado como factor com potencial impacto na absorção das antocianinas presentes, mas este princípio tem sido questionado (Frank *et al.* 2003). Por outro lado, uma dieta rica em gorduras ou em hidratos de carbono parece prolongar ou atrasar o trânsito das antocianinas ao longo do tracto gastrointestinal, mas tal não parece afectar a sua absorção final (Nielsen *et al.* 2003; Yang *et al.* 2011).

5.2.3 A controvérsia da biodisponibilidade

Sendo atribuídos às antocianinas múltiplos efeitos benéficos na saúde, torna-se importante conhecer a sua distribuição tecidual por forma a compreender os mecanismos subjacentes a esses efeitos. Talavera (Talavera *et al.* 2005) e outros autores (Andres-Lacueva *et al.* 2005; Passamonti *et al.* 2005) referiram a detecção de antocianinas no cérebro; foram também detectadas antocianinas nativas nos tecidos do estômago, enquanto no jejuno, fígado, rins e pulmões encontraram-se estes compostos intactos assim como os seus metabolitos (Talavera *et al.* 2005; El Mohsen *et al.* 2006).

Importa salientar que a aparentemente baixa biodisponibilidade referida poderá não corresponder à realidade já que, por um lado, as antocianinas intactas e os seus metabolitos podem não ser detectados analiticamente devido à sua ligação a proteínas e outros componentes da corrente sanguínea e, por outro, os métodos de quantificação usados poderão não ter a sensibilidade apropriada. De facto, nos frutos, em particular, nos alimentos e no estômago, a forma de catião flavílio é a predominante, enquanto que *in vivo* é, provavelmente, a forma de hemicetal e chalcona a mais provável. Por esta razão, uma vez assumindo estas formas químicas, se as antocianinas não retomarem a estrutura de catião flavílio durante a acidificação conducente à preparação, por exemplo, das amostras para HPLC, elas não serão detectadas por esta técnica, nem espectrofotometricamente a 530 nm. Tal facto poderá explicar a incongruência de alguns ensaios de biodisponibilidade.

No que diz respeito às concentrações plasmáticas alcançadas, e reforçando o que foi dito no item 5.2, estudos com suínos sujeitos durante longos períodos a alimentação com antocianinas demonstraram que estas se mantêm durante muito mais tempo em tecidos do que na corrente sanguínea (Kalt *et al.* 2008). Esta observação, aliada ao facto de que estes compostos afectam a reactividade vascular, sugere também a sua potencial acumulação nos tecidos cardíacos e vasculares. Estudos imunohistoquímicos recentes demonstraram que os flavonóides se acumulam em células esponjosas em lesões ateroscleróticas humanas, mas não em aortas normais, para além de terem suprimido a expressão génica de importantes intervenientes na formação das células esponjosas derivadas dos macrófagos (Kawai, Nishikawa *et al.* 2008; Kawai, Tanaka *et al.* 2008).

Considerando que as antocianinas atravessam a membrana celular e podem ser detectadas no interior das células, estas observações proporcionam uma nova perspectiva para o comportamento dos flavonóides provenientes da dieta, permitindo considerar, de forma fundamentada, a hipótese dos efeitos cumulativos destes compostos, ultrapassando assim a limitação imposta pela sua reduzida biodisponibilidade.

5.3. Actividade biológica

Não se pretende neste subcapítulo do trabalho a descrição exaustiva da diversidade das actividades biológicas imputada às antocianinas. Mesmo aquelas com implicação directa no contexto cardiovascular serão, dada a sua grande extensão, apenas sucintamente abordadas, privilegiando, na medida do possível, ensaios *in vivo*, particularmente, ensaios clínicos.

5.3.1. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante das antocianinas parece desempenhar um papel crucial na prevenção de doenças cardiovasculares (Grassi *et al.* 2010), neuronais (Williams e Spencer 2012), cancro (Wang e Stoner 2008; Thomasset *et al.* 2009) diabetes, entre outras (Konczak e Zhang 2004). Esta actividade é das mais estudadas, ainda que a maior parte dos estudos seja *in vitro* (Wang, Xia *et al.* 2008). Neste tipo de desenho experimental elas parecem actuar de uma forma similar à de outros compostos antioxidantes, inactivando radicais livres tóxicos e quelando iões metálicos divalentes, reduzindo assim o seu potencial oxidativo (Seeram *et al.* 2001; Kahkonen e Heinonen 2003), para além de preservarem a componente lipídica da degradação oxidativa (Chen *et al.* 2010). Contudo, a questão da transposição directa destes estudos para o seu comportamento *in vivo* coloca-se com toda a pertinência.

5.3.1.1. Captação e neutralização de espécies reactivas de oxigénio e de azoto

A capacidade das antocianinas protegerem os tecidos contra o dano oxidativo, pode ser devida, por um lado, à possibilidade destes compostos cederem electrões, inactivando radicais livres e, por outro, à estrutura conjugada das antocianinas que, permitindo a deslocalização electrónica (estabilização por ressonância) conduz à obtenção de produtos radicalares mais estáveis (radicais aroxilo), incapazes de propagarem reacções em cadeia. O radical aroxilo resultante (R-O[•]) é estabilizado não só por deslocalização electrónica, que é tanto maior quanto mais planar for a molécula, mas também por formação de ligações de hidrogénio intramoleculares.

Segundo Bors (Bors *et al.* 1990), a estrutura *o*-catecol (3',4'-OH) no anel B constitui um dos requisitos fundamentais para a captação de radicais. Efectivamente, é esta estrutura que confere estabilidade ao radical resultante porque, quando a ligação O-H é quebrada, forma-se

uma ponte de hidrogénio forte entre o radical, centrado no átomo de oxigénio e o outro grupo OH adjacente, a qual estabiliza o radical e diminui a entalpia de dissociação da ligação OH (Wright *et al.* 2001). A promoção da estabilidade radicalar é ainda potenciada pelos grupos 5-OH e 7-OH. Para além da estabilização do radical formado, estes dois grupos hidroxilo participam na deslocalização electrónica.

São inúmeros os trabalhos desenvolvidos com diversas classes de flavonóides que confirmaram que a presença do grupo *o*-catecol é determinante para uma eficaz actividade antioxidante (Rice-Evans *et al.* 1996; Rossetto *et al.* 2007). Compostos com apenas um grupo hidroxilo no anel B, como é o caso da pelargonidina-3-glucósido, apresentam menor actividade do que aqueles com o grupo catecol no mesmo anel (Cy3glc). Já quanto à importância dos três grupos OH (pirogalhol, 3'4'5'-OH) os resultados são díspares (Rice-Evans *et al.* 1996; Fukumoto e Mazza 2000), existindo mesmo estudos que apontam para uma diminuição da biodisponibilidade e promoção da formação de ROS (Hanasaki *et al.* 1994).

No que concerne à capacidade antioxidante contra radicais gerados em ambiente lipofílico as antocianinas, tal como outros polifenóis, parecem conseguir neutralizar radicais lipídicos alcóxido e peróxido, interrompendo estas cadeias radicalares, ao doarem átomos de hidrogénio, o que lhes permite inibir de forma eficaz a peroxidação lipídica (Chen *et al.* 2010; Yi *et al.* 2010). Estas propriedades advêm do facto destes compostos possuírem potenciais redox relativamente baixos sendo capazes de reduzir espécies reactivas de oxigénio com potenciais redox acima de 1 V. Assim, ao doarem átomos de hidrogénio, as antocianinas conseguem neutralizar radicais lipídicos e não lipídicos (Pietta 2000).

São ainda capazes de regenerar o α -tocoferol através da redução do radical α -tocoferoxilo e o ascorbato (van Acker *et al.* 2000) o que se torna relevante aquando da depleção destes antioxidantes endógenos. Foi ainda proposto que, apesar de dependente do pH, os polifenóis possuem capacidade de quelação de iões de cobre e ferro, principalmente através da estrutura *o*-dihidroxilo (Perron e Brumaghim 2009), impedindo-os de participar em reacções geradoras de ROS (Mira *et al.* 2002; Silva *et al.* 2002).

A acção antioxidante das antocianinas não se esgota na neutralização de espécies radicalares, uma vez que elas conseguem também reagir com outras espécies reactivas de oxigénio e de azoto, como o HOCl e o ONOO⁻. São vários os estudos que demonstraram a sua capacidade em inibir reacções de oxidação mediadas pelo peroxinitrito, apesar do mecanismo subjacente não estar completamente esclarecido. Parece dever-se não só à reacção directa com o peroxinitrito com formação de derivados nitrados, mas também à captação de radicais derivados da homólise do ONOOCO₂⁻ (Pannala *et al.* 1997; Heijnen *et al.* 2001; Santos e Mira 2004; Pollard *et al.* 2006; Pavlovic *et al.* 2007). A neutralização de ONOO⁻ pelas antocianinas parece depender das mesmas

características estruturais descritas para a captação de radicais, ou seja, a presença do *o*-catecol parece ser, uma vez mais, determinante. Tal como foi referido por Bors, a ausência do *o*-catecol pode ser compensada pela dupla ligação 2,3 no anel C juntamente com um grupo OH em três (Bors *et al.* 1990). No entanto, as antocianinas não apresentam essas características químicas e, ainda assim, a sua capacidade neutralizadora do peroxinitrito é bastante notória (Haenen *et al.* 1997; Heijnen *et al.* 2001; Choi *et al.* 2002; Paixao *et al.* 2011).

5.3.1.2. Actividade antioxidante indirecta

Apesar de todas as reservas relativas à acção antioxidante directa dos polifenóis *in vivo*, a sua capacidade protectora observada em culturas celulares contra o *stress* oxidativo, para concentrações fisiologicamente relevantes, levantou a hipótese destes compostos poderem não actuar de forma convencional, devendo por isso existir mecanismos adicionais de protecção.

Estudos recentes mostram que os polifenóis induzem a activação e a inibição de enzimas endógenas e a protecção de sistemas de defesa antioxidantes *in vivo*, exercendo assim um efeito antioxidante indirecto (Brito *et al.* 2006). Importa salientar que a acção destes compostos localmente, ao nível do tracto gastrointestinal pode representar um efeito antioxidante directo.

A inibição de enzimas cuja actividade resulta na produção de ROS é outro dos efeitos reconhecidos das antocianinas. Destacam-se a inibição da NADPH oxidase, geradora de anião superóxido, a xantina oxidase (catalisa a oxidação da hipoxantina e xantina a urato com redução de O_2 a $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2), as glutatião-S-transferases envolvidas na desintoxicação de xenobióticos por conjugação destes com o glutatião e diversas oxigenases, produtoras de várias ROS (Klotz *et al.* 2003; Sies 2010). Esta actividade inibitória estende-se aos intervenientes no processo inflamatório, como a via do ácido araquidónico, modelando a actividade de enzimas como a fosfolipase A2, a ciclooxigenase, a lipoxigenase e as óxido nítrico sintases (Crozier *et al.* 2009).

5.3.1.3. A controvérsia da actividade antioxidante *in vivo*

Segundo a “hipótese antioxidante”, pequenas moléculas antioxidantes provenientes da dieta (por exemplo, urato, ascorbato e tocoferóis) actuam como antioxidantes *in vivo* diminuindo a incidência de determinados processos patológicos. Os polifenóis, incluindo as antocianinas, com base nos dados obtidos *in vitro*, têm sido incluídos nesta classe. Vários estudos foram dedicados à importância da suplementação alimentar com polifenóis como antioxidantes mas, embora

alguns tenham mostrado efeitos benéficos para a saúde (Mertens-Talcott *et al.* 2008; Crozier *et al.* 2009), outros não revelaram qualquer vantagem (Hollman *et al.* 2011). Alguns ensaios com antioxidantes, pelo contrário, ainda que envoltos em grande polémica, apresentaram mesmo efeitos nefastos (Bjelakovic *et al.* 2008).

Os polifenóis em geral, parecem não conseguir alcançar, na circulação sistémica, concentrações suficientemente elevadas para contribuírem de forma significativa para a capacidade antioxidante total do plasma. A concentração combinada de ascorbato e fenóis simples circulantes no homem, tem sido estimada em cerca de 159 a 380 μM (Clifford 2004), uma concentração similar à do urato, outro dos antioxidantes endógenos (Lotito e Frei 2006; Modun *et al.* 2008). Assim, considerando que a concentração máxima total de antioxidantes plasmáticos é estimada em cerca de 500 μM , o acréscimo devido à concentração máxima referida para os polifenóis não ultrapassa os 10-20 μM , representando apenas alguns pontos percentuais (Stevenson e Hurst 2007). Para além disso, a contribuição dos polifenóis para a capacidade antioxidante total é ainda limitada pela conjugação metabólica de fase II o que origina metabolitos com características demasiado polares para poderem interagir significativamente com lípidos (Clifford 2004). No entanto, apesar das reduzidas concentrações sistémicas, a concentração de polifenóis pode atingir valores mais elevados em microdomínios. De facto, podem ficar adsorvidos à superfície de membranas, através de pontes de hidrogénio entre os seus grupos hidroxilo e os grupos polares dos fosfolípidos membranares, contribuindo, desta forma, para incrementar a concentração local de antioxidante. Por analogia, um composto com maior hidrofobicidade e assim mais distribuído pela parte apolar da membrana, actuará mais eficazmente na captação de radicais lipídicos (Rothwell *et al.* 2005).

Portanto, as antocianinas são capazes de prevenir o dano oxidativo de biomoléculas, tais como DNA, lípidos e proteínas, causado por espécies reactivas oxidantes e, apesar da baixa absorção demonstrada, crê-se que a maior parte dos benefícios seja devido a uma acção sistémica ainda que, como já se referiu, por efeitos indirectos, não podendo excluir-se uma acção localizada em determinados domínios. Esta protecção significativa contra o *stress* oxidativo em concentrações muito inferiores às que seriam requeridas para uma protecção antioxidante de natureza química e directa, reforça a ideia de que as antocianinas parecem actuar por outros mecanismos para além da neutralização de radicais.

5.3.1.4 Antocianinas, *stress* oxidativo e aterosclerose

O *stress* oxidativo tem um efeito deletério directo na função endotelial (Schulz *et al.* 2004; Stocker *et al.* 2004; Higashi *et al.* 2009) e este conhecimento direccionou os trabalhos de investigação para a avaliação de moléculas antioxidantes como estratégia terapêutica.

A doença aterosclerótica constitui um exemplo no qual o *stress* oxidativo tem um papel indiscutível (Schulze e Lee 2005; Higashi *et al.* 2009). A hipercolesterolemia é aceite como um factor de risco *major* para o desenvolvimento da aterosclerose, sendo a modificação oxidativa das LDL uma etapa de crucial relevância no desenvolvimento da placa aterosclerótica (Steinberg 2005; Steinberg *et al.* 2010; Previtali *et al.* 2011; Stancu *et al.* 2012). Uma vez que a formação de LDLox é fundamentalmente mediada por radicais livres e outras espécies oxidantes como o peroxinitrito (Darley-Usmar *et al.* 1992; Ronson *et al.* 1999; Botti *et al.* 2005; Uppu *et al.* 2007) o recurso a compostos antioxidantes que possam actuar isoladamente, repondo ou reforçando os seus congéneres endógenos, constitui sem dúvida, uma mais valia.

Em resultado da aparente ineficácia dos suplementos antioxidantes na diminuição do *stress* oxidativo *in vivo*, as investigações mais recentes têm focado a sua atenção em novas formas de induzir uma resposta antioxidante, em particular recorrendo a compostos capazes de aumentar a actividade enzimática antioxidante endógena. Estes compostos, denominados antioxidantes indirectos, activam enzimas citoprotectoras de fase II, desencadeando uma série de respostas antioxidantes duradouras, para além do seu potencial efeito imediato como *scavengers* directos de ROS e RNS (Ross 1999).

Produtos como o vinho tinto, os vários componentes das uvas e o sumo de uvas, para além das restantes fontes alimentares de fitoquímicos já mencionadas, são conhecidos por conterem um leque variado de polifenóis, incluindo antocianinas, com potente capacidade antioxidante, relevante no contexto da prevenção das DCV (Cui *et al.* 2002; Falchi *et al.* 2006). O efeito protector destes compostos naturais é, em parte, devido à sua capacidade em retardar o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas iniciais evitando a sua progressão para placas de ateroma, essencialmente através da redução da oxidação das LDL, um evento chave no processo aterogénico (Qin *et al.* 2009; Kanner *et al.* 2012). Vários ensaios clínicos demonstraram que o consumo de alimentos ricos em antocianinas reduziu as concentrações plasmáticas de colesterol-LDL e aumentou a capacidade antioxidante do plasma (Mink *et al.* 2007; Erlund *et al.* 2008).

Outro dos possíveis mecanismos de cardioprotecção por parte dos polifenóis das uvas mas também dos provenientes de outras fontes alimentares incluem, para além da redução do *stress* oxidativo, a modulação da cascata inflamatória, melhoria na função do endotélio vascular e protecção contra episódios aterotrombóticos, incluindo a isquémia do miocárdio e a inibição da agregação plaquetar (Opie e Lecour 2007; Leifert e Abeywardena 2008; Napoli *et al.* 2008; Perez-Jimenez e Saura-Calixto 2008).

Concretizando, os efeitos antioxidantes vasculares das antocianinas, potenciados pelo facto de serem incorporadas pela membrana e citosol das células endoteliais, são múltiplos e proporcionam potenciais mecanismos protectores, preservando a função endotelial e impedindo

a progressão do processo aterosclerótico (Liu, Lee *et al.* 2008; Kao *et al.* 2009; de Pascual-Teresa *et al.* 2010). Em relação à potencial acção deletéria do peroxinitrito, o equilíbrio entre a sua capacidade oxidante e as defesas antioxidantes do plasma e do endotélio irão determinar a progressão da aterosclerose (White *et al.* 1994). As antocianinas demonstraram ser potentes inibidores da degradação oxidativa mediada pelo peroxinitrito, principalmente ao actuarem como *scavengers* desta espécie reactiva (Haenen *et al.* 1997; Heijnen *et al.* 2001; Choi *et al.* 2002; Rahman, Ichiyangi *et al.* 2006; Paixao *et al.* 2011).

5.3.2. Actividade anti-inflamatória e doença cardiovascular

Embora uma resposta inflamatória aguda seja considerada benéfica, uma reacção prolongada/crónica é nefasta e está implicada na ocorrência de muitas situações patológicas, desde a aterosclerose, às doenças auto-imunes, diabetes e cancro (Germolec *et al.* 2010).

Os compostos naturais derivados de plantas, como as antocianinas, com potencial efeito benéfico na patofisiologia das DCV, têm constituído uma área de investigação de interesse crescente. Inicialmente, a maioria dos estudos abordava as potencialidades dos polifenóis somente numa perspectiva antioxidante. No entanto, muitos dos efeitos demonstrados para estes compostos, apresentados de forma resumida na Figura 14, incluindo as actividades anti-inflamatória, antiaterogénica e antitumoral, não podiam ser explicados apenas com base nas suas propriedades antioxidantes. Assim, embora o mecanismo responsável pelos efeitos dos flavonóides no endotélio permaneça por esclarecer na sua totalidade, foi sendo acumulada informação que indicava que estes não actuavam meramente como neutralizadores de radicais e de outras espécies reactivas deletérias, mas que eram também capazes de modelar processos de sinalização celular ou eles próprios constituir agentes sinalizadores (Santangelo *et al.* 2007).

O processo inflamatório, como descrito anteriormente, desempenha um papel de extrema importância no desenvolvimento da aterosclerose, considerada a principal causa da DCV. Vários mecanismos de acção foram propostos para explicar a acção anti-inflamatória dos flavonóides *in vivo*, e que se traduz em efeitos antiateroscleróticos e cardioprotectores, destacando-se: a inibição da agregação plaquetar (Yang *et al.* 2012), a protecção contra danos no DNA (Acquaviva *et al.* 2003; Aiyer *et al.* 2008), a inibição enzimática (Pergola *et al.* 2006; Wang, Xia *et al.* 2008), a modelação da produção de citocinas, a diminuição da peroxidação lipídica, a redução da fragilidade capilar e o reforço membranar, a inibição da oxidação das LDL, o aumento da expressão de HDL e do glutationa intracelular e a diminuição das concentrações de iNOS e COX-2 (Wang, Xia *et al.* 2008; Domitrovic 2011). Para as antocianinas, a título de exemplo, existem evidências

de que inibem a inflamação induzida *in vitro* pelo TNF- α através de efeitos na MCP-1, no endotélio humano (Garcia-Alonso et al. 2009) mas também em estudos clínicos com voluntários (Beltran-Debon et al. 2010); suprimem o dano resultante da isquemia/reperfusão no músculo cardíaco (Ziberna et al. 2010), actuando ao nível do processo inflamatório subjacente à aterosclerose (Wang et al. 2011; Mauray et al. 2012).

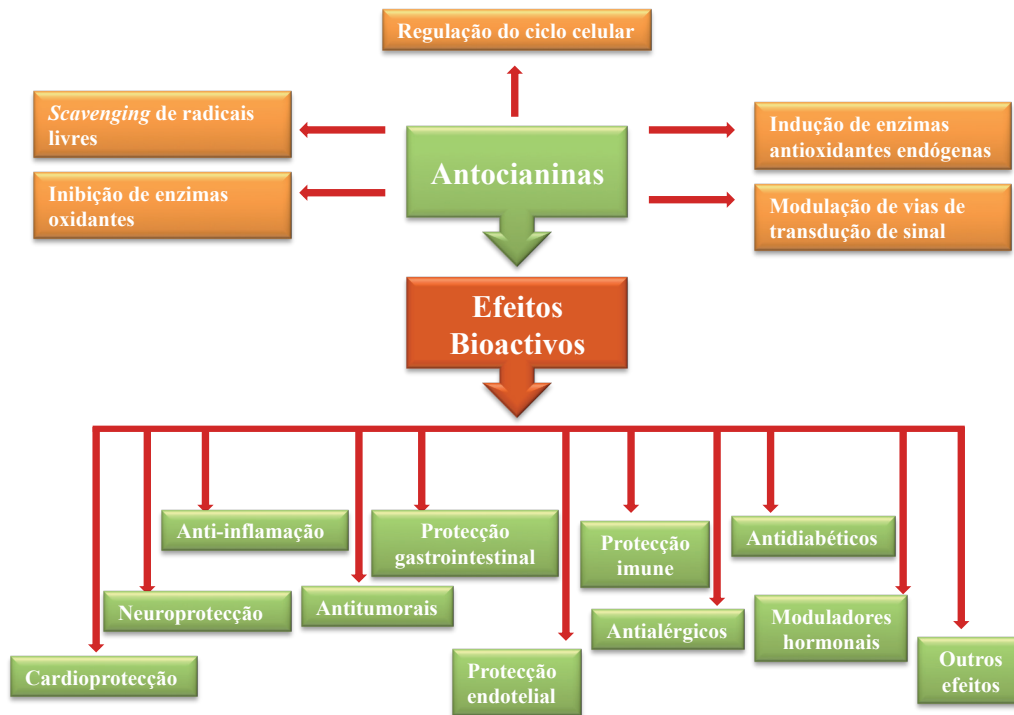


Figura 14. Potenciais efeitos biológicos das antocianinas.

Sucedem-se os ensaios clínicos relativos ao consumo de polifenóis com resultados promissores ao nível cardiovascular. O estudo de factores de risco para doença cardíaca isquémica de Kuopio (*The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study*) demonstrou que, num grupo de pessoas que consumiram uma grande quantidade de bagas ricas em antocianinas (>400 g/dia) apresentaram um risco significativamente menor de morte relacionada com DCV, quando comparadas com outro grupo de baixo consumo (Rissanen et al. 2003; Mursu et al. 2007). O ensaio clínico de Iowa, com mulheres na pós-menopausa, também revelou a existência de uma associação significativa entre o consumo de morangos e a redução da mortalidade devida a DCV (Mink et al. 2007). A ingestão de frutas contendo antocianinas inibiu, igualmente, o processo aterosclerótico em homens idosos (Ellingsen et al. 2008). O consumo regular de bagas vermelhas demonstrou diminuir os níveis de oxidantes no plasma (Basu et al. 2010) e um estudo

prospectivo de 14 anos associou o consumo de antocianinas a uma redução de 8% no risco de hipertensão arterial (Cassidy *et al.* 2011). Kaspar *et al.* verificaram que o consumo de tomate, rico em antocianinas e antocianidinas, foi capaz de reduzir a inflamação em voluntários, avaliada pela diminuição dos níveis de proteína C-reactiva e IL-6 (Kaspar *et al.* 2011). Um outro estudo decorrido nos EUA mostrou uma associação inversa entre o consumo de antocianinas e os teores séricos de *hsPCR* (Chun *et al.* 2008).

Outros ensaios clínicos salientaram que o consumo de bagas vermelhas melhorou não só a tensão arterial, mas também a função plaquetar e os níveis de HDL e LDL (Erlund *et al.* 2008; Qin *et al.* 2009). Meta-análises recentes (Hooper *et al.* 2008; Hooper *et al.* 2012) e outros estudos clínicos (Vita 2005; Chong *et al.* 2010) apontam claramente para um efeito positivo dos polifenóis ao nível cardiovascular. Contudo, outros autores afirmaram que a ingestão de antioxidantes de uma forma geral, incluindo os polifenóis, não afectou os níveis de parâmetros inflamatórios ou ainda que a influência observada não é atribuída às suas propriedades antioxidantes (Curtis *et al.* 2009; van Mierlo *et al.* 2010; Hollman *et al.* 2011; Bjelakovic *et al.* 2012).

De facto, doses relativamente baixas administradas a doentes com patologia vascular foram associadas a reduções significativas na isquémia cardíaca (Sumner *et al.* 2005), na pressão sanguínea (Aviram *et al.* 2004; Davidson *et al.* 2009), nos teores plasmáticos de lípidos (Gorinstein *et al.* 2006) e no estado inflamatório (Naruszewicz *et al.* 2007). Em concordância, um estudo recente evidenciou que antocianinas derivadas do milho tornaram o miocárdio menos susceptível à lesão resultante da reperfusão pós isquémia em ensaios *in vivo* e *ex vivo* quando comparado com o grupo controlo (Toufektsian *et al.* 2008).

Podem enumerar-se muitas outras acções fisiológicas dos polifenóis com repercussão significativa na função cardiovascular. Destaca-se o aumento da libertação de prostaciclina endotelial, inibição da síntese e dos efeitos da endotelina-1, inibição de metaloproteínases 2 da matriz (MMP-2) e da expressão do factor de crescimento vascular endotelial (VCAM-1) (Khan *et al.* 2002; Dell'Agli *et al.* 2004). Ao diminuírem a expressão das moléculas de adesão, ICAM-1 (constitutiva) e VCAM-1 (induzida), os flavonóides conseguem impedir a adesão de moléculas inflamatórias, às células vasculares. Por exemplo a Cy3glc diminui a activação do NF- κ B que leva à subsequente supressão dos genes da VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina (Speciale *et al.* 2010).

De referir ainda que são inúmeros os estudos que demonstram que o vinho tinto, rico em antocianinas, tem efeitos biológicos mais favoráveis que o vinho branco no contexto da prevenção das DCV, facto que tem sido atribuído à maior percentagem de polifenóis, em particular de antocianinas, no primeiro (van Velden *et al.* 2002). Esta realidade foi evidenciada, pela primeira vez, num estudo da OMS, que envolveu populações de 18 países ocidentais e que ficou conhecido como o “Paradoxo Francês”, a que já se aludiu anteriormente. Neste estudo

constatou-se que um grupo populacional do sul de França apresentava um risco de morte por DCV inferior aos restantes apesar do seu consumo mais elevado de gorduras saturadas, facto que foi atribuído ao consumo regular de vinho tinto (Renaud *et al.* 1992).

5.3.2.1 Antocianinas e o óxido nítrico

O endotélio regula a homeostase vascular produzindo factores que actuam localmente na parede e lúmen do vaso nos quais se inclui o $\cdot\text{NO}$. Tal como já foi referido, esta molécula sinalizadora influencia o desenvolvimento da aterosclerose e muitos aspectos da inflamação tendo propriedades vasodilatadoras, antihipertensivas, antitrombóticas, antiaterogénicas e antiproliferativas (Forstermann 2010). A enzima eNOS encontra-se desregulada em situações como a aterosclerose, hipertensão, diabetes e isquémia/reperfusão (Saini *et al.* 2011), situações associadas também a um aumento da produção de espécies reactivas que podem sequestrar o $\cdot\text{NO}$ e/ou lesar o endotélio condicionando a biodisponibilidade do mesmo.

As antocianinas conseguem minimizar a disfunção endotelial ao promoverem o vasorelaxamento arterial e a manutenção da integridade endoteliais. Para isso, aumentam a actividade da eNOS, por incremento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , aumentando a fosforilação da enzima através da via PI3K/Akt (Martin *et al.* 2002), protegendo o co-factor BH₄, ou ainda evitando o desacoplamento da enzima (Fitzpatrick *et al.* 1993; Stoclet *et al.* 2004). Actuando como *scavengers* do anião superóxido, protegem o $\cdot\text{NO}$, ao impedirem a formação de peroxinitrito, aumentando o seu tempo de meia vida e actividade biológica (Lopez-Lopez *et al.* 2004). Os flavonóides conseguem também regular os níveis de óxido nítrico actuando ao nível transcricional e/ou pós-transcricional aumentando a expressão proteica da eNOS (Leikert *et al.* 2002; Wallerath *et al.* 2005; Nicholson *et al.* 2008). Para além disso, podem interferir com os níveis deletérios de $\cdot\text{NO}$ resultantes da iNOS (Leikert *et al.* 2002; Wallerath *et al.* 2003; Pergola *et al.* 2006; Wang, Xia *et al.* 2008). São inúmeras as investigações que documentam os efeitos das antocianinas no controlo da disfunção endotelial, preservando a actividade da eNOS e a biodisponibilidade do óxido nítrico (Xu *et al.* 2004; Edirisinghe *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012).

A protecção contra o enfarte agudo do miocárdio (EAM) e outros distúrbios cardiovasculares, decorrente da ingestão de sumo de uvas e vinho tinto tem sido atribuída à capacidade das antocianinas em reduzirem a inflamação, inibirem a agregação plaquetar e aumentarem a libertação de $\cdot\text{NO}$ dependente da eNOS (Bazzano *et al.* 2003; Leifert *et al.* 2008; Zuchi *et al.* 2010; Wallace 2011).

Pelo que ficou exposto, a actividade da eNOS constitui um alvo preferencial para os flavonóides sendo que os resultados a este nível são ainda mais notórios que a actividade antioxidante (Grassi *et al.* 2010; Domitrovic 2011). De facto, várias investigações referem os efeitos de vasorelaxamento dependente do endotélio para várias antocianinas em diversos modelos experimentais. Aliás, esta actividade, devida a diferentes vinhos tintos, foi correlacionada com a sua concentração de antocianinas (Pais 2007).

5.3.2.2. Implicação das antocianinas em vias sinalizadoras

Para além dos efeitos antioxidantes directos, os polifenóis actuam como indutores de enzimas citoprotectoras envolvidas na destoxificação celular (Jacob *et al.* 2012). Eles são capazes de activar a via do Keap1/Nrf2 (Kensler *et al.* 2007; Dinkova-Kostova e Wang 2011), um mecanismo chave implicado na defesa contra espécies reactivas e na inflamação, resultando num aumento da expressão de enzimas de fase II, como é o caso da HO-1 (Sorrenti *et al.* 2007). Em regra, o seu mecanismo de acção envolve a modificação de resíduos de cisteína da Keap1, permitindo a dissociação do Nrf2 e a sua translocação para o núcleo, onde activa genes localizados nos AREs (Chen *et al.* 2000), ou através da activação de proteínas MAPK (ERK, JNK e p38) que estão envolvidas na estabilização do Nrf2 (Masella *et al.* 2005).

Os polifenóis exercem ainda a sua actividade anti-inflamatória modulando a activação do NF- κ B e intervindo em múltiplas etapas do processo inflamatório (Rahman, Biswas *et al.* 2006). Muitos dos mediadores relacionados com a activação do NF- κ B encontram-se em menores concentrações no plasma de adultos saudáveis após suplementação com antocianinas, quando comparados com grupos controlo, sugerindo a interferência destas nesta via (Kelley *et al.* 2006; Karlsen *et al.* 2007). Por exemplo, a ingestão de vinho tinto levou à inibição da produção de factores inflamatórios em modelos experimentais (Loke *et al.* 2010) e também em humanos (Blanco-Colio *et al.* 2000; Magrone e Jirillo 2010).

Os efeitos anti-inflamatórios exercidos pelas antocianinas quer *in vitro* quer *in vivo*, parecem ser devidos à inibição da fosforilação do I κ B α , bloqueando assim a activação do NF- κ B e a consequente expressão de mediadores chave do processo inflamatório, tais como a IL-6, IL-8, MCP-1, iNOS e COX-2 (Rahman, Biswas *et al.* 2006; Wang, Xia *et al.* 2008; Xia *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2010; Domitrovic 2011). Merece realce o facto de a inibição da COX-2 pela cianidina *in vitro* ter sido mais eficaz do que a de fármacos anti-inflamatórios como a aspirina, o ibuprofeno e o naproxeno (Wang *et al.* 1999; Seeram *et al.* 2003). As antocianinas inibem ainda a produção de moléculas de adesão pelas células endoteliais, em concreto, o factor de cresci-

mento vascular endotelial (VEGF), a molécula de adesão intracelular (MAI-1) e ainda o factor de adesão plaquetar (Dell’Agli *et al.* 2004; Speciale *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011).

Os dados que acabaram de ser apresentados resumem somente algumas das razões que justificam o potencial terapêutico atribuído aos polifenóis no controlo de muitas patologias cuja génese é inflamatória, nomeadamente as doenças do foro cardiovascular. De facto, os potenciais alvos do tratamento com estes compostos naturais são inúmeros, para além das referidas DCV, passando pelas doenças neurodegenerativas, respiratórias, oftalmológicas e neoplásicas, para citar apenas as principais.

As antocianinas, tal como os restantes polifenóis, demonstraram interferir com múltiplas vias sinalizadoras, tendo vindo a impôr-se, progressivamente, como candidatos farmacológicos promissores. No entanto, muitos dos efeitos benéficos provêm de estudos *in vitro* ou em animais de laboratório, sendo que a transposição para o Homem nem sempre é fácil, nem linear. Todavia, os estudos laboratoriais são indicativos e sugestivos da actividade farmacológica específica dos polifenóis, justificando o aprofundar da investigação.

Concluindo, são imprescindíveis mais ensaios clínicos para validar a aplicação humana destes compostos naturais, particularmente no que concerne à sua relativamente reduzida estabilidade e biodisponibilidade.

6. Objectivos gerais do trabalho

O conhecimento do metabolismo, absorção e biodisponibilidade das antocianinas no contexto da prevenção das DCV tem sofrido um importante incremento nos últimos anos. Contudo, muito trabalho permanece por fazer por forma a retirar conclusões consistentes e definitivas acerca do seu potencial protector. Embora muitos estudos demonstrem o potencial das antocianinas em influenciar muitos biomarcadores das DCV, as evidências epidemiológicas, embora promissoras, permanecem insuficientes. Estes flavonóides parecem ter um efeito claro na função endotelial e na redução dos níveis de marcadores pró-inflamatórios, embora os seus efeitos mais notórios sejam observados em estudos *in vitro* e, por isso, carecem de ser confirmados *in vivo*, ainda que em muitos casos os resultados sejam já comparáveis.

Neste contexto, os objectivos gerais do trabalho foram:

- 1) Avaliar a capacidade de várias antocianinas, nomeadamente, a cianidina-3-glucósido (Cy3glc), a delfinidina-3-glucósido (Dp3glc), a malvidina-3-glucósido (Mv3glc) e a pelargonidina-3-glucósido (Pg3glc), com acentuada prevalência alimentar,

na prevenção da citotoxicidade e da morte celular apoptótica mediada pelo peroxinitrito em células endoteliais da aorta bovina, averiguando quais os mecanismos celulares e moleculares condicionantes dessa protecção, incidindo nos acontecimentos aquém e além dos eventos na mitocôndria (Capítulo 2).

2) Explorar os efeitos da Mv3glc, no mesmo modelo celular, em vias particulares de sinalização reconhecidamente implicadas no processo aterogénico. A escolha desta antocianina teve em conta a sua prevalência alimentar, as suas características estruturais particulares e a escassez de trabalhos com a mesma, quando comparada com as demais antocianinas. Em concreto, pretendeu-se avaliar o seu papel na biodisponibilidade do $\cdot\text{NO}$ dependente da eNOS, assim como na inibição da activação do NF- κ B induzida pelo peroxinitrito, através da avaliação da produção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, a expressão da COX-2 e da iNOS, para além da biossíntese de $\cdot\text{NO}$ derivado desta última enzima, em células endoteliais activadas pelo peroxinitrito. Pretendeu-se ainda avaliar o papel da Mv3glc nos mecanismos moleculares de activação do NF- κ B (Capítulo 3).

3) Confirmar a transposição de alguns dos resultados obtidos utilizando células endoteliais microvasculares humanas (HMEC) como modelo e explorar nestas, outras vias de acção da Mv3glc como agente de protecção endotelial. Concretamente, para além da avaliação da sua capacidade na inibição da activação do NF- κ B mediada pelo peroxinitrito, procurámos investigar o seu papel modulador na actividade do proteassoma e na produção de HO-1, decorrente da activação do factor de transcrição Nrf2, induzidos pelo peroxinitrito (Capítulo 4).

7. Referências Bibliográficas

- Acquaviva, R., Russo, A., Galvano, F., Galvano, G., Barcellona, M.L., Li Volti, G., *et al.* (2003). “Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D -glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants.” Cell Biol Toxicol 19(4): 243-252.
- Adachi, T., Weisbrod, R.M., Pimentel, D.R., Ying, J., Sharov, V.S., Schoneich, C., *et al.* (2004). “S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide.” Nat Med 10(11): 1200-1207.
- Aiyer, H.S., Kichambare, S.e Gupta, R.C. (2008). “Prevention of oxidative DNA damage by bioactive berry components.” Nutr Cancer 60 Suppl 1: 36-42.
- Akishima, Y., Akasaka, Y., Ishikawa, Y., Lijun, Z., Kiguchi, H., Ito, K., *et al.* (2005). “Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development.” Mod Pathol 18(3): 365-373.
- Alp, N.J.e Channon, K.M. (2004). “Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(3): 413-420.
- Alvarez, B.e Radi, R. (2003). “Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins.” Amino Acids 25(3-4): 295-311.
- Anderson, T.J., Meredith, I.T., Yeung, A.C., Frei, B., Selwyn, A.P.e Ganz, P. (1995). “The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion.” N Engl J Med 332(8): 488-493.
- Andlauer, W., Stumpf, C., Frank, K.e Furst, P. (2003). “Absorption and metabolism of anthocyanin cyanidin-3-glucoside in the isolated rat small intestine is not influenced by ethanol.” Eur J Nutr 42(4): 217-223.
- Ando, J.e Kamiya, A. (1993). “Blood flow and vascular endothelial cell function.” Front Med Biol Eng 5(4): 245-264.
- Ando, J.e Yamamoto, K. (2009). “Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress.” Circ J 73(11): 1983-1992.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R.M.e Joseph, J.A. (2005). “Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory.” Nutr Neurosci 8(2): 111-120.
- Antonsson, B. (2001). “Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family “killer-proteins” and their victim the mitochondrion.” Cell Tissue Res 306(3): 347-361.
- Antonsson, B. (2004). “Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways.” Mol Cell Biochem 256-257(1-2): 141-155.
- Arteel, G.E., Briviba, K.e Sies, H. (1999). “Protection against peroxynitrite.” FEBS Lett 445(2-3): 226-230.

- Ashkenazi, A.e Dixit, V.M. (1999). “Apoptosis control by death and decoy receptors.” Curr Opin Cell Biol 11(2): 255-260.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., *et al.* (2004). “Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation.” Clin Nutr 23(3): 423-433.
- Azzini, E., Vitaglione, P., Intorre, F., Napolitano, A., Durazzo, A., Foddai, M.S., *et al.* (2010). “Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects.” Br J Nutr 104(8): 1165-1173.
- Balanescu, S., Calmac, L., Constantinescu, D., Marinescu, M., Onut, R.e Dorobantu, M. (2010). “Systemic inflammation and early atheroma formation: are they related?” Maedica (Buchar) 5(4): 292-301.
- Bar-Shai, M.e Reznick, A.Z. (2006). “Peroxynitrite induces an alternative NF-kappaB activation pathway in L8 rat myoblasts.” Antioxid Redox Signal 8(3-4): 639-652.
- Barbouti, A., Amorgianiotis, C., Kolettas, E., Kanavaros, P.e Galaris, D. (2007). “Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner.” Free Radic Biol Med 43(10): 1377-1387.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C.e Peter, M.E. (2003). “The CD95 type I/type II model.” Semin Immunol 15(3): 185-193.
- Basu, A., Rhone, M.e Lyons, T.J. (2010). “Berries: emerging impact on cardiovascular health.” Nutr Rev 68(3): 168-177.
- Basu, A.K.e Marnett, L.J. (1983). “Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen.” Carcinogenesis 4(3): 331-333.
- Bazzano, L.A., Serdula, M.K.e Liu, S. (2003). “Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease.” Curr Atheroscler Rep 5(6): 492-499.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A.e Freeman, B.A. (1990). “Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.” Proc Natl Acad Sci U S A 87(4): 1620-1624.
- Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H.e Crow, J.P. (1994). “Oxidative chemistry of peroxynitrite.” Methods Enzymol 233: 229-240.
- Beckman, J.S.e Koppenol, W.H. (1996). “Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.” Am J Physiol 271(5 Pt 1): C1424-1437.
- Behrendt, D.e Ganz, P. (2002). “Endothelial function. From vascular biology to clinical applications.” Am J Cardiol 90(10C): 40L-48L.
- Beltran-Debon, R., Alonso-Villaverde, C., Aragones, G., Rodriguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., *et al.* (2010). “The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans.” Phytomedicine 17(3-4): 186-191.
- Beraud, C., Henzel, W.J.e Baeuerle, P.A. (1999). “Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation.” Proc Natl Acad Sci U S A 96(2): 429-434.

- Berlett, B.S.e Stadtman, E.R. (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem 272(33): 20313-20316.
- Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., *et al.* (1995). "Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics." Circulation 91(9): 2488-2496.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Glud, L.L., Simonetti, R.G.e Glud, C. (2012). "Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases." Cochrane Database Syst Rev 3: CD007176.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R.G.e Glud, C. (2008). "Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements." Aliment Pharmacol Ther 28(6): 689-703.
- Blanco-Colio, L.M., Valderrama, M., Alvarez-Sala, L.A., Bustos, C., Ortego, M., Hernandez-Presa, M.A., *et al.* (2000). "Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia." Circulation 102(9): 1020-1026.
- Bombeli, T., Mueller, M.e Haeberli, A. (1997). "Anticoagulant properties of the vascular endothelium." Thromb Haemost 77(3): 408-423.
- Boos, C.J., Lip, G.Y.e Blann, A.D. (2006). "Circulating endothelial cells in cardiovascular disease." J Am Coll Cardiol 48(8): 1538-1547.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W.e Crozier, A. (2010). "Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries." J Agric Food Chem 58(7): 3901-3909.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C.e Saran, M. (1990). "Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies." Methods Enzymol 186: 343-355.
- Borutaite, V.e Brown, G.C. (2001). "Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide." FEBS Lett 500(3): 114-118.
- Borutaite, V., Budriunaite, A.e Brown, G.C. (2000). "Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols." Biochim Biophys Acta 1459(2-3): 405-412.
- Botti, H., Batthyany, C., Trostchansky, A., Radi, R., Freeman, B.A.e Rubbo, H. (2004). "Peroxynitrite-mediated alpha-tocopherol oxidation in low-density lipoprotein: a mechanistic approach." Free Radic Biol Med 36(2): 152-162.
- Botti, H., Trostchansky, A., Batthyany, C.e Rubbo, H. (2005). "Reactivity of peroxynitrite and nitric oxide with LDL." IUBMB Life 57(6): 407-412.
- Boulanger, C.M., Tanner, F.C., Bea, M.L., Hahn, A.W., Werner, A.e Luscher, T.F. (1992). "Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium." Circ Res 70(6): 1191-1197.

- Boveris, A., Cadenas, E.e Stoppani, A.O. (1976). "Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide." Biochem J 156(2): 435-444.
- Boveris, A., Oshino, N.e Chance, B. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." Biochem J 128(3): 617-630.
- Brevetti, G., Schiano, V.e Chiariello, M. (2008). "Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease?" Atherosclerosis 197(1): 1-11.
- Brigelius-Flohe, R.e Flohe, L. (2011). "Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors." Antioxid Redox Signal 15(8): 2335-2381.
- Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A.C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., *et al.* (1999). "Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death." J Immunol 162(6): 3356-3366.
- Brito, P.M., Mariano, A., Almeida, L.M.e Dinis, T.C. (2006). "Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione." Chem Biol Interact 164(3): 157-166.
- Brouillard, R., Chassaing, S.e Fougousse, A. (2003). "Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?" Phytochemistry 64(7): 1179-1186.
- Brovkovich, V., Patton, S., Brovkovich, S., Kiechle, F., Huk, I.e Malinski, T. (1997). "In situ measurement of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite during endotoxemia." J Physiol Pharmacol 48(4): 633-644.
- Burgering, B.M.e Coffey, P.J. (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." Nature 376(6541): 599-602.
- Buttery, L.D., Springall, D.R., Chester, A.H., Evans, T.J., Standfield, E.N., Parums, D.V., *et al.* (1996). "Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite." Lab Invest 75(1): 77-85.
- Cadenas, S., Barja, G., Poulsen, H.E.e Loft, S. (1997). "Oxidative DNA damage estimated by oxo8dG in the liver of guinea-pigs supplemented with graded dietary doses of ascorbic acid and alpha-tocopherol." Carcinogenesis 18(12): 2373-2377.
- Cai, H.e Harrison, D.G. (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res 87(10): 840-844.
- Calcerrada, P., Peluffo, G.e Radi, R. (2011). "Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications." Curr Pharm Des 17(35): 3905-3932.
- Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C.e Kroemer, G. (2004). "Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all." Cell Death Differ 11(6): 591-595.
- Carkeet, C., Clevidence, B.A.e Novotny, J.A. (2008). "Anthocyanin excretion by humans increases linearly with increasing strawberry dose." J Nutr 138(5): 897-902.

- Casino, P.R., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Hoeg, J.M.e Panza, J.A. (1994). “Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients.” J Am Coll Cardiol 23(4): 844-850.
- Cassidy, A., O’Reilly, E.J., Kay, C., Sampson, L., Franz, M., Forman, J.P., *et al.* (2011). “Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults.” Am J Clin Nutr 93(2): 338-347.
- Chauhan, S.D., Nilsson, H., Ahluwalia, A.e Hobbs, A.J. (2003). “Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor.” Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 1426-1431.
- Chauhan, S.D., Seggara, G., Vo, P.A., Macallister, R.J., Hobbs, A.J.e Ahluwalia, A. (2003). “Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice.” FASEB J 17(6): 773-775.
- Chen, C., Yu, R., Owuor, E.D.e Kong, A.N. (2000). “Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death.” Arch Pharm Res 23(6): 605-612.
- Chen, C.Y., Yi, L., Jin, X., Mi, M.T., Zhang, T., Ling, W.H., *et al.* (2010). “Delphinidin attenuates stress injury induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells.” Chem Biol Interact 183(1): 105-112.
- Chen, C.Y., Yi, L., Jin, X., Zhang, T., Fu, Y.J., Zhu, J.D., *et al.* (2011). “Inhibitory effect of delphinidin on monocyte-endothelial cell adhesion induced by oxidized low-density lipoprotein via ROS/p38MAPK/NF-kappaB pathway.” Cell Biochem Biophys 61(2): 337-348.
- Chen, Q.e Lesnefsky, E.J. (2006). “Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain.” Free Radic Biol Med 40(6): 976-982.
- Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T.e Green, D.R. (2008). “Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins.” Proc Natl Acad Sci U S A 105(51): 20327-20332.
- Chisolm, G.M.e Steinberg, D. (2000). “The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview.” Free Radic Biol Med 28(12): 1815-1826.
- Choi, J.S., Chung, H.Y., Kang, S.S., Jung, M.J., Kim, J.W., No, J.K., *et al.* (2002). “The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite.” Phytother Res 16(3): 232-235.
- Chong, M.F., Macdonald, R.e Lovegrove, J.A. (2010). “Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies.” Br J Nutr 104 Suppl 3: S28-39.
- Chun, O.K., Chung, S.J., Claycombe, K.J.e Song, W.O. (2008). “Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults.” J Nutr 138(4): 753-760.
- Chun, O.K., Chung, S.J.e Song, W.O. (2007). “Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults.” J Nutr 137(5): 1244-1252.

- Clapp, B.R., Hingorani, A.D., Kharbanda, R.K., Mohamed-Ali, V., Stephens, J.W., Vallance, P., *et al.* (2004). “Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress.” Cardiovasc Res 64(1): 172-178.
- Clifford, M.N. (2004). “Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health.” Planta Med 70(12): 1103-1114.
- Collins, P., Chappell, S.P., Griffith, T.M., Lewis, M.J.e Henderson, A.H. (1986). “Differences in basal endothelium-derived relaxing factor activity in different artery types.” J Cardiovasc Pharmacol 8(6): 1158-1162.
- Cook-Mills, J.M.e Deem, T.L. (2005). “Active participation of endothelial cells in inflammation.” J Leukoc Biol 77(4): 487-495.
- Corretti, M.C., Anderson, T.J., Benjamin, E.J., Celermajer, D., Charbonneau, F., Creager, M.A., *et al.* (2002). “Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force.” J Am Coll Cardiol 39(2): 257-265.
- Corson, M.A., James, N.L., Latta, S.E., Nerem, R.M., Berk, B.C.e Harrison, D.G. (1996). “Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress.” Circ Res 79(5): 984-991.
- Corti, R., Hutter, R., Badimon, J.J.e Fuster, V. (2004). “Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis.” J Thromb Thrombolysis 17(1): 35-44.
- Crane, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., *et al.* (1998). “Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.” Science 279(5359): 2121-2126.
- Crow, J.P.e Beckman, J.S. (1995). “Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo.” Adv Pharmacol 34: 17-43.
- Crozier, A., Jaganath, I.B.e Clifford, M.N. (2009). “Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health.” Nat Prod Rep 26(8): 1001-1043.
- Cui, J., Juhasz, B., Tosaki, A., Maulik, N.e Das, D.K. (2002). “Cardioprotection with grapes.” J Cardiovasc Pharmacol 40(5): 762-769.
- Curtis, P.J., Kroon, P.A., Hollands, W.J., Walls, R., Jenkins, G., Kay, C.D., *et al.* (2009). “Cardiovascular disease risk biomarkers and liver and kidney function are not altered in postmenopausal women after ingesting an elderberry extract rich in anthocyanins for 12 weeks.” J Nutr 139(12): 2266-2271.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., *et al.* (1990). “Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.” Proc Natl Acad Sci U S A 87(13): 5134-5138.
- Darley-Usmar, V.M., Hogg, N., O’Leary, V.J., Wilson, M.T.e Moncada, S. (1992). “The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein.” Free Radic Res Commun 17(1): 9-20.

- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N., *et al.* (2000). “Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis.” FEBS Lett 476(3): 118-123.
- Davidson, M.H., Maki, K.C., Dicklin, M.R., Feinstein, S.B., Witchger, M., Bell, M., *et al.* (2009). “Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease.” Am J Cardiol 104(7): 936-942.
- Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., *et al.* (2000). “Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase.” FEBS Lett 468(2-3): 166-170.
- de Boer, O.J., van der Wal, A.C.e Becker, A.E. (2000). “Atherosclerosis, inflammation, and infection.” J Pathol 190(3): 237-243.
- de Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A.e Garcia-Viguera, C. (2010). “Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence.” Int J Mol Sci 11(4): 1679-1703.
- Degenhardt, K., Sundararajan, R., Lindsten, T., Thompson, C.e White, E. (2002). “Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria.” J Biol Chem 277(16): 14127-14134.
- Del Rio, D., Borges, G.e Crozier, A. (2010). “Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects.” Br J Nutr 104 Suppl 3: S67-90.
- Dell’Agli, M., Busciala, A.e Bosisio, E. (2004). “Vascular effects of wine polyphenols.” Cardiovasc Res 63(4): 593-602.
- Denicola, A., Freeman, B.A., Trujillo, M.e Radi, R. (1996). “Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations.” Arch Biochem Biophys 333(1): 49-58.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R.e Zeiher, A.M. (1999). “Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.” Nature 399(6736): 601-605.
- Dinis, T.C., Santosa, C.L.e Almeida, L.M. (2002). “The apoprotein is the preferential target for peroxynitrite-induced LDL damage protection by dietary phenolic acids.” Free Radic Res 36(5): 531-543.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., *et al.* (2002). “Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants.” Proc Natl Acad Sci U S A 99(18): 11908-11913.
- Dinkova-Kostova, A.T.e Wang, X.J. (2011). “Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols.” Chem Biol Interact 192(1-2): 101-106.
- Domitrovic, R. (2011). “The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins.” Curr Med Chem 18(29): 4454-4469.
- Dong, C., Wilson, J.E., Winters, G.L.e McManus, B.M. (1996). “Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy.” Lab Invest 74(5): 921-931.

- Dreger, H., Westphal, K., Wilck, N., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K., *et al.* (2010). “Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2.” Cardiovasc Res 85(2): 395-403.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. e Wang, X. (2000). “Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.” Cell 102(1): 33-42.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E. e Kuwana, T. (2011). “BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak.” J Biol Chem 286(1): 491-501.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., *et al.* (1997). “Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt.” Science 275(5300): 661-665.
- Duvall, W.L. (2005). “Endothelial dysfunction and antioxidants.” Mt Sinai J Med 72(2): 71-80.
- Edirisinghe, I., Banaszewski, K., Cappozzo, J., McCarthy, D. e Burton-Freeman, B.M. (2011). “Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells.” J Agric Food Chem 59(16): 8616-8624.
- Egashira, K., Hirooka, Y., Kuga, T., Mohri, M. e Takeshita, A. (1996). “Effects of L-arginine supplementation on endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms.” Circulation 94(2): 130-134.
- Eggler, A.L., Gay, K.A. e Mesecar, A.D. (2008). “Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2.” Mol Nutr Food Res 52 Suppl 1: S84-94.
- El Mohsen, M.A., Marks, J., Kuhnle, G., Moore, K., Debnam, E., Kaila Srani, S., *et al.* (2006). “Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats.” Br J Nutr 95(1): 51-58.
- Ellingsen, I., Hjerkin, E.M., Seljeflot, I., Arnesen, H. e Tonstad, S. (2008). “Consumption of fruit and berries is inversely associated with carotid atherosclerosis in elderly men.” Br J Nutr 99(3): 674-681.
- Epand, R.F., Martinou, J.C., Montessuit, S., Epand, R.M. e Yip, C.M. (2002). “Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax.” Biochem Biophys Res Commun 298(5): 744-749.
- Erlund, I., Koli, R., Alfthan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P., *et al.* (2008). “Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol.” Am J Clin Nutr 87(2): 323-331.
- Es-Safi, N.E., Cheynier, V. e Moutounet, M. (2002). “Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes.” J Agric Food Chem 50(20): 5586-5595.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. e Martinou, J.C. (2000). “Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.” Mol Cell Biol 20(3): 929-935.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. e Jurgens, G. (1992). “The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.” Free Radic Biol Med 13(4): 341-390.
- Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O. e Koller, E. (1987). “Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes.” J Lipid Res 28(5): 495-509.

- Falchi, M., Bertelli, A., Lo Scalzo, R., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., *et al.* (2006). “Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes.” J Agric Food Chem 54(18): 6613-6622.
- Falk, E.e Fernandez-Ortiz, A. (1995). “Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications.” Am J Cardiol 75(6): 3B-11B.
- Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M.P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J.L., *et al.* (2003). “Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans.” J Nutr 133(5): 1296-1301.
- Ferrer-Sueta, G.e Radi, R. (2009). “Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals.” ACS Chem Biol 4(3): 161-177.
- Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L.e Coffey, R.G. (1993). “Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products.” Am J Physiol 265(2 Pt 2): H774-778.
- Forester, S.C.e Waterhouse, A.L. (2010). “Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells.” J Agric Food Chem 58(9): 5320-5327.
- Forstermann, U. (2010). “Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease.” Pflugers Arch 459(6): 923-939.
- Forstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., *et al.* (1994). “Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.” Hypertension 23(6 Pt 2): 1121-1131.
- Frank, T., Netzel, M., Strass, G., Bitsch, R.e Bitsch, I. (2003). “Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice.” Can J Physiol Pharmacol 81(5): 423-435.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C.e Toker, A. (1997). “Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate.” Science 275(5300): 665-668.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., *et al.* (1995). “The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase.” Cell 81(5): 727-736.
- Fridovich, I. (1995). “Superoxide radical and superoxide dismutases.” Annu Rev Biochem 64: 97-112.
- Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R.N.e Walsh, K. (2000). “Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart.” Circulation 101(6): 660-667.
- Fujio, Y.e Walsh, K. (1999). “Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner.” J Biol Chem 274(23): 16349-16354.
- Fukumoto, L.R.e Mazza, G. (2000). “Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds.” J Agric Food Chem 48(8): 3597-3604.
- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., *et al.* (1999). “Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.” Nature 399(6736): 597-601.

- Furchgott, R.F. (1983). "Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle." Circ Res 53(5): 557-573.
- Furchgott, R.F. (1999). "Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide." Biosci Rep 19(4): 235-251.
- Galle, J., Mulsch, A., Busse, R.e Bassenge, E. (1991). "Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of endothelium-derived relaxing factor." Arterioscler Thromb 11(1): 198-203.
- Gally, J.A., Montague, P.R., Reeke, G.N., Jr.e Edelman, G.M. (1990). "The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A 87(9): 3547-3551.
- Garcia-Alonso, M., Minihane, A.M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C.e de Pascual-Teresa, S. (2009). "Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma." J Nutr Biochem 20(7): 521-529.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D.F., Liu, J.e Sessa, W.C. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1." J Biol Chem 271(44): 27237-27240.
- Gee, J.M., DuPont, M.S., Rhodes, M.J.e Johnson, I.T. (1998). "Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway." Free Radic Biol Med 25(1): 19-25.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., *et al.* (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." J Biol Chem 273(46): 30336-30343.
- Germolec, D.R., Frawley, R.P.e Evans, E. (2010). "Markers of inflammation." Methods Mol Biol 598: 53-73.
- Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S.e Sigler, P.B. (1995). "Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site." Nature 373(6512): 303-310.
- Ghosh, S.e Hayden, M.S. (2008). "New regulators of NF-kappaB in inflammation." Nat Rev Immunol 8(11): 837-848.
- Giles, T.D., Sander, G.E., Nossaman, B.D.e Kadowitz, P.J. (2012). "Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins." J Clin Hypertens (Greenwich) 14(4): 198-205.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Dong, C., Seo, D.M.e Velazquez, O.C. (2012). "Atherosclerosis, inflammation, genetics, and stem cells: 2012 update." Curr Atheroscler Rep 14(3): 201-210.
- Goldstein, J.L.e Brown, M.S. (1977). "Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis." Metabolism 26(11): 1257-1275.

- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. e 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 U S A 76(1): 333-337.
- Goldstein, S. e Merenyi, G. (2008). "The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity." Methods Enzymol 436: 49-61.
- Gong, L., Pitari, G.M., Schulz, S. e Waldman, S.A. (2004). "Nitric oxide signaling: systems integration of oxygen balance in defense of cell integrity." Curr Opin Hematol 11(1): 7-14.
- Gonzalez-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W. e Crozier, A. (2010). "Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy." J Agric Food Chem 58(7): 3933-3939.
- Gonzalez-Barrio, R., Edwards, C.A. e Crozier, A. (2011). "Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies." Drug Metab Dispos 39(9): 1680-1688.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Libman, I., Lerner, H.T., Huang, D., Leontowicz, H., *et al.* (2006). "Red grapefruit positively influences serum triglyceride level in patients suffering from coronary atherosclerosis: studies in vitro and in humans." J Agric Food Chem 54(5): 1887-1892.
- Goumas, G., Tentolouris, C., Tousoulis, D., Stefanadis, C. e Toutouzias, P. (2001). "Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases." Atherosclerosis 154(2): 255-267.
- Gow, A.J., Duran, D., Malcolm, S. e Ischiropoulos, H. (1996). "Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation." FEBS Lett 385(1-2): 63-66.
- Gozzelino, R., Jeney, V. e Soares, M.P. (2010). "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1." Annu Rev Pharmacol Toxicol 50: 323-354.
- Grassi, D., Desideri, G. e Ferri, C. (2010). "Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis." Nutrients 2(8): 889-902.
- Green, D. e Kroemer, G. (1998). "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?" Trends Cell Biol 8(7): 267-271.
- Griendling, K.K. e FitzGerald, G.A. (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies." Circulation 108(17): 2034-2040.
- Griendling, K.K., Sorescu, D. e Ushio-Fukai, M. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res 86(5): 494-501.
- Griscavage, J.M., Hobbs, A.J. e Ignarro, L.J. (1995). "Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds." Adv Pharmacol 34: 215-234.
- Grivennikova, V.G. e Vinogradov, A.D. (2006). "Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I." Biochim Biophys Acta 1757(5-6): 553-561.
- Gross, P.L. e Aird, W.C. (2000). "The endothelium and thrombosis." Semin Thromb Hemost 26(5): 463-478.
- Grune, T., Klotz, L.O., Gieche, J., Rudeck, M. e Sies, H. (2001). "Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite." Free Radic Biol Med 30(11): 1243-1253.

- Gunaydin, H.e Houk, K.N. (2009). “Mechanisms of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine.” Chem Res Toxicol 22(5): 894-898.
- Hacker, H.e Karin, M. (2006). “Regulation and function of IKK and IKK-related kinases.” Sci STKE 2006(357): re13.
- Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E.e Bast, A. (1997). “Peroxynitrite scavenging by flavonoids.” Biochem Biophys Res Commun 236(3): 591-593.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J.e Aruoma, O.I. (1995). “The characterization of antioxidants.” Food Chem Toxicol 33(7): 601-617.
- Halliwell, B.e Aruoma, O.I. (1991). “DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems.” FEBS Lett 281(1-2): 9-19.
- Halliwell, B.e Cross, C.E. (1994). “Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress.” Environ Health Perspect 102 Suppl 10: 5-12.
- Hamdulay, S.S., Wang, B., Birdsey, G.M., Ali, F., Dumont, O., Evans, P.C., *et al.* (2010). “Celecoxib activates PI-3K/Akt and mitochondrial redox signaling to enhance heme oxygenase-1-mediated anti-inflammatory activity in vascular endothelium.” Free Radic Biol Med 48(8): 1013-1023.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S.e Fukui, S. (1994). “The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids.” Free Radic Biol Med 16(6): 845-850.
- Hansson, G.K. (2005). “Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.” N Engl J Med 352(16): 1685-1695.
- Hansson, G.K., Jonasson, L., Lojstved, B., Stemme, S., Kocher, O.e Gabbiani, G. (1988). “Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques.” Atherosclerosis 72(2-3): 135-141.
- Harlan, J.M.e Callahan, K.S. (1984). “Role of hydrogen peroxide in the neutrophil-mediated release of prostacyclin from cultured endothelial cells.” J Clin Invest 74(2): 442-448.
- Harrison, D.G.e Cai, H. (2003). “Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production.” Cardiol Clin 21(3): 289-302.
- Hayashi, S., Takamiya, R., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Tojo, S.J., Tamatani, T., *et al.* (1999). “Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme.” Circ Res 85(8): 663-671.
- He, J., Wallace, T.C., Keatley, K.E., Failla, M.L.e Giusti, M.M. (2009). “Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat.” J Agric Food Chem 57(8): 3141-3148.
- Heijnen, C.G., Haenen, G.R., Vekemans, J.A.e Bast, A. (2001). “Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship.” Environ Toxicol Pharmacol 10(4): 199-206.
- Heinecke, J.W. (1998). “Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis.” Atherosclerosis 141(1): 1-15.

- Heldin, C.H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." Cell 80(2): 213-223.
- Hengartner, M.O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature 407(6805): 770-776.
- Hessler, J.R., Morel, D.W., Lewis, L.J.e Chisolm, G.M. (1983). "Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity." Arteriosclerosis 3(3): 215-222.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M.e Kihara, Y. (2009). "Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases." Circ J 73(3): 411-418.
- Higgins, J.P. (2003). "Can angiotensin-converting enzyme inhibitors reverse atherosclerosis?" South Med J 96(6): 569-579.
- High, K.P. (1999). "Atherosclerosis and infection due to Chlamydia pneumoniae or cytomegalovirus: weighing the evidence." Clin Infect Dis 28(4): 746-749.
- Hoekstra, K.A., Godin, D.V.e Cheng, K.M. (2004). "Protective role of heme oxygenase in the blood vessel wall during atherogenesis." Biochem Cell Biol 82(3): 351-359.
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., *et al.* (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." Cell 97(7): 889-901.
- Hogg, N., Kalyanaraman, B., Joseph, J., Struck, A.e Parthasarathy, S. (1993). "Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis." FEBS Lett 334(2): 170-174.
- Hollman, P.C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., *et al.* (2011). "The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established." J Nutr 141(5): 989S-1009S.
- Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J.e Katan, M.B. (1995). "Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers." Am J Clin Nutr 62(6): 1276-1282.
- Hong, S.J., Dawson, T.M.e Dawson, V.L. (2004). "Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling." Trends Pharmacol Sci 25(5): 259-264.
- Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P.A., Cohn, J.S., Rimm, E.B., *et al.* (2012). "Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials." Am J Clin Nutr 95(3): 740-751.
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., *et al.* (2008). "Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials." Am J Clin Nutr 88(1): 38-50.
- Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E.e Karl, I.E. (2002). "Endothelial cell apoptosis in sepsis." Crit Care Med 30(5 Suppl): S225-228.
- Huang, P.L.e Lo, E.H. (1998). "Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals." Prog Brain Res 118: 13-25.

- Huang, X., Masselli, A., Frisch, S.M., Hunton, I.C., Jiang, Y.e Wang, J.Y. (2007). “Blockade of tumor necrosis factor-induced Bid cleavage by caspase-resistant Rb.” J Biol Chem 282(40): 29401-29413.
- Hughes, G., Murphy, M.P.e Ledgerwood, E.C. (2005). “Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants.” Biochem J 389(Pt 1): 83-89.
- Huie, R.E.e Padmaja, S. (1993). “The reaction of no with superoxide.” Free Radic Res Commun 18(4): 195-199.
- Hulsmans, M., Van Dooren, E.e Holvoet, P. (2012). “Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis.” Curr Atheroscler Rep 14(3): 264-276.
- Hunter, T. (1995). “Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling.” Cell 80(2): 225-236.
- Igarashi, K.e Sun, J. (2006). “The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation.” Antioxid Redox Signal 8(1-2): 107-118.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E.e Chaudhuri, G. (1987). “Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.” Proc Natl Acad Sci U S A 84(24): 9265-9269.
- Imbert, V., Rupec, R.A., Livolsi, A., Pahl, H.L., Traenckner, E.B., Mueller-Dieckmann, C., *et al.* (1996). “Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha.” Cell 86(5): 787-798.
- Inoue, T., Matsuoka, H., Higashi, Y., Ueda, S., Sata, M., Shimada, K.E., *et al.* (2008). “Flow-mediated vasodilation as a diagnostic modality for vascular failure.” Hypertens Res 31(12): 2105-2113.
- Ischiropoulos, H. (1998). “Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species.” Arch Biochem Biophys 356(1): 1-11.
- Isner, J.M., Kearney, M., Bortman, S.e Passeri, J. (1995). “Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis.” Circulation 91(11): 2703-2711.
- Itoh, K., Tong, K.I.e Yamamoto, M. (2004). “Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles.” Free Radic Biol Med 36(10): 1208-1213.
- Jacob, J.K., Tiwari, K., Correa-Betanzo, J., Misran, A., Chandrasekaran, R.e Paliyath, G. (2012). “Biochemical basis for functional ingredient design from fruits.” Annu Rev Food Sci Technol 3: 79-104.
- Jaiswal, A.K. (2004). “Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression.” Free Radic Biol Med 36(10): 1199-1207.
- Janssen-Heininger, Y.M., Persinger, R.L., Korn, S.H., Pantano, C., McElhinney, B., Reynaert, N.L., *et al.* (2002). “Reactive nitrogen species and cell signaling: implications for death or survival of lung epithelium.” Am J Respir Crit Care Med 166(12 Pt 2): S9-S16.
- Jarasch, E.D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H.W., Keenan, T.W.e Franke, W.W. (1981). “Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium.” Cell 25(1): 67-82.

- Jessup, W. (1996). "Oxidized lipoproteins and nitric oxide." Curr Opin Lipidol 7(5): 274-280.
- Jobin, C.e Sartor, R.B. (2000). "The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection." Am J Physiol Cell Physiol 278(3): C451-462.
- Jones, D.P. (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxid Redox Signal 8(9-10): 1865-1879.
- Jourd'heuil, D., Kang, D.e Grisham, M.B. (1997). "Interactions between superoxide and nitric oxide: implications in DNA damage and mutagenesis." Front Biosci 2: d189-196.
- Kahkonen, M.P.e Heinonen, M. (2003). "Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons." J Agric Food Chem 51(3): 628-633.
- Kalt, W., Blumberg, J.B., McDonald, J.E., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Fillmore, S.A., Graf, B.A., *et al.* (2008). "Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs." J Agric Food Chem 56(3): 705-712.
- Kalt, W., Hanneken, A., Milbury, P.e Tremblay, F. (2010). "Recent research on polyphenolics in vision and eye health." J Agric Food Chem 58(7): 4001-4007.
- Kanai, A.J., Pearce, L.L., Clemens, P.R., Birder, L.A., VanBibber, M.M., Choi, S.Y., *et al.* (2001). "Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection." Proc Natl Acad Sci U S A 98(24): 14126-14131.
- Kang, K.W., Choi, S.H.e Kim, S.G. (2002). "Peroxyntirite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction." Nitric Oxide 7(4): 244-253.
- Kang, P.M., Yue, P.e Izumo, S. (2002). "New insights into the role of apoptosis in cardiovascular disease." Circ J 66(1): 1-9.
- Kanner, J., Gorelik, S., Roman, S.e Kohen, R. (2012). "Protection by Polyphenols of Postprandial Human Plasma and Low-Density Lipoprotein Modification: The Stomach as a Bioreactor." J Agric Food Chem.
- Kao, E.S., Tseng, T.H., Lee, H.J., Chan, K.C.e Wang, C.J. (2009). "Anthocyanin extracted from Hibiscus attenuate oxidized LDL-mediated foam cell formation involving regulation of CD36 gene." Chem Biol Interact 179(2-3): 212-218.
- Kapeller, R.e Cantley, L.C. (1994). "Phosphatidylinositol 3-kinase." Bioessays 16(8): 565-576.
- Karin, M.e Ben-Neriah, Y. (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol 18: 621-663.
- Karlsen, A., Retterstol, L., Laake, P., Paur, I., Bohn, S.K., Sandvik, L., *et al.* (2007). "Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults." J Nutr 137(8): 1951-1954.
- Kaspar, K.L., Park, J.S., Brown, C.R., Mathison, B.D., Navarre, D.A.e Chew, B.P. (2011). "Pigmented potato consumption alters oxidative stress and inflammatory damage in men." J Nutr 141(1): 108-111.

- Kawai, Y., Nishikawa, T., Shiba, Y., Saito, S., Murota, K., Shibata, N., *et al.* (2008). “Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids.” J Biol Chem 283(14): 9424-9434.
- Kawai, Y., Tanaka, H., Murota, K., Naito, M. e Terao, J. (2008). “(-)-Epicatechin gallate accumulates in foamy macrophages in human atherosclerotic aorta: implication in the anti-atherosclerotic actions of tea catechins.” Biochem Biophys Res Commun 374(3): 527-532.
- Kawamura, K., Ishikawa, K., Wada, Y., Kimura, S., Matsumoto, H., Kohro, T., *et al.* (2005). “Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(1): 155-160.
- Kawashima, S. e Yokoyama, M. (2004). “Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(6): 998-1005.
- Kay, C.D., Kroon, P.A. e Cassidy, A. (2009). “The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products.” Mol Nutr Food Res 53 Suppl 1: S92-101.
- Kay, C.D., Mazza, G.J. e Holub, B.J. (2005). “Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men.” J Nutr 135(11): 2582-2588.
- Kelekar, A. e Thompson, C.B. (1998). “Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis.” Trends Cell Biol 8(8): 324-330.
- Kelley, D.S., Rasooly, R., Jacob, R.A., Kader, A.A. e Mackey, B.E. (2006). “Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women.” J Nutr 136(4): 981-986.
- Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., *et al.* (1997). “The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal.” Genes Dev 11(6): 701-713.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N. e Biswal, S. (2007). “Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway.” Annu Rev Pharmacol Toxicol 47: 89-116.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. e Currie, A.R. (1972). “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.” Br J Cancer 26(4): 239-257.
- Khan, N.Q., Lees, D.M., Douthwaite, J.A., Carrier, M.J. e Corder, R. (2002). “Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells.” Clin Sci (Lond) 103 Suppl 48: 72S-75S.
- Kim, H.P., Ryter, S.W. e Choi, A.M. (2006). “CO as a cellular signaling molecule.” Annu Rev Pharmacol Toxicol 46: 411-449.
- Kita, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Murayama, T., Sano, H., *et al.* (2001). “Role of oxidized LDL in atherosclerosis.” Ann N Y Acad Sci 947: 199-205; discussion 205-196.
- Klotz, L.O., Schroeder, P. e Sies, H. (2002). “Peroxy-nitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways.” Free Radic Biol Med 33(6): 737-743.

- Klotz, L.O. e Sies, H. (2003). “Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids.” Toxicol Lett 140-141: 125-132.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. e Newmeyer, D.D. (1997). “The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.” Science 275(5303): 1132-1136.
- Kobayashi, M. e Yamamoto, M. (2006). “Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species.” Adv Enzyme Regul 46: 113-140.
- Kockx, M.M. e Herman, A.G. (2000). “Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?” Cardio-vasc Res 45(3): 736-746.
- Konczak, I. e Zhang, W. (2004). “Anthocyanins-More Than Nature’s Colours.” J Biomed Biotechnol 2004(5): 239-240.
- Kong, S.K., Yim, M.B., Stadtman, E.R. e Chock, P.B. (1996). “Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide.” Proc Natl Acad Sci U S A 93(8): 3377-3382.
- Koppenol, W.H. (1998). “The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite.” Free Radic Biol Med 25(4-5): 385-391.
- Koshiyama, H., Honjo, S., Hamamoto, Y., Ikeda, H. e Wada, Y. (2006). “Drugs share antidiabetic and antiatherosclerotic actions through “the common soil”.” Med Hypotheses 66(3): 473-475.
- Krasilnikov, M.A. (2000). “Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation.” Biochemistry (Mosc) 65(1): 59-67.
- Kuwana, T. e Newmeyer, D.D. (2003). “Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis.” Curr Opin Cell Biol 15(6): 691-699.
- Lacza, Z., Kozlov, A.V., Pankotai, E., Csordas, A., Wolf, G., Redl, H., *et al.* (2006). “Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway.” Free Radic Res 40(4): 369-378.
- Lah, J.J. e Frishman, W.H. (2000). “Adrenomedullin: a vasoactive and natriuretic peptide with therapeutic potential.” Heart Dis 2(3): 259-265.
- Lamas, S., Michel, T., Collins, T., Brenner, B.M. e Marsden, P.A. (1992). “Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells.” J Clin Invest 90(3): 879-887.
- Lampe, J.W. e Chang, J.L. (2007). “Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition.” Semin Cancer Biol 17(5): 347-353.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R. e Kanner, J. (1999). “PH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants.” J Agric Food Chem 47(1): 67-70.
- Laranjinha, J.A., Almeida, L.M. e Madeira, V.M. (1994). “Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation.” Biochem Pharmacol 48(3): 487-494.

- Le Brazidec, H. (2007). "Lipoproteins and protection of the arterial wall against infection: the "response to the threat of infection" hypothesis." Atherosclerosis 195(1): e21-31.
- LeBlanc, H.N.e Ashkenazi, A. (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." Cell Death Differ 10(1): 66-75.
- Lee, K.W., Lip, G.Y., Tayebjee, M., Foster, W.e Blann, A.D. (2005). "Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes." Blood 105(2): 526-532.
- Lee, R., Margaritis, M., Channon, K.M.e Antoniades, C. (2012). "Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations." Curr Med Chem 19(16): 2504-2520.
- Leeuwenburgh, C., Hardy, M.M., Hazen, S.L., Wagner, P., Oh-ishi, S., Steinbrecher, U.P., *et al.* (1997). "Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima." J Biol Chem 272(3): 1433-1436.
- Leifert, W.R.e Abeywardena, M.Y. (2008). "Cardioprotective actions of grape polyphenols." Nutr Res 28(11): 729-737.
- Leikert, J.F., Rathel, T.R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A.M.e Dirsch, V.M. (2002). "Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells." Circulation 106(13): 1614-1617.
- Lernbecher, T., Muller, U.e Wirth, T. (1993). "Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation." Nature 365(6448): 767-770.
- Levonen, A.L., Inkala, M., Heikura, T., Jauhiainen, S., Jyrkkanen, H.K., Kansanen, E., *et al.* (2007). "Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(4): 741-747.
- Levrard, S., Pesse, B., Feihl, F., Waeber, B., Pacher, P., Rolli, J., *et al.* (2005). "Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF- κ B activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines." J Biol Chem 280(41): 34878-34887.
- Lewis, M.S., Whatley, R.E., Cain, P., McIntyre, T.M., Prescott, S.M.e Zimmerman, G.A. (1988). "Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion." J Clin Invest 82(6): 2045-2055.
- Li, H.e Poulos, T.L. (2005). "Structure-function studies on nitric oxide synthases." J Inorg Biochem 99(1): 293-305.
- Li, J., Ichikawa, T., Janicki, J.S.e Cui, T. (2009). "Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease." Expert Opin Ther Targets 13(7): 785-794.
- Li, J.e Yuan, J. (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." Oncogene 27(48): 6194-6206.
- Li, M.H., Cha, Y.N.e Surh, Y.J. (2006). "Peroxynitrite induces HO-1 expression via PI3K/Akt-dependent activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells." Free Radic Biol Med 41(7): 1079-1091.

- Li, Q., Guo, Y., Ou, Q., Cui, C., Wu, W.J., Tan, W., *et al.* (2009). “Gene transfer of inducible nitric oxide synthase affords cardioprotection by upregulating heme oxygenase-1 via a nuclear factor- κ B-dependent pathway.” Circulation 120(13): 1222-1230.
- Li, R., Ren, M., Luo, M., Chen, N., Zhang, Z., Luo, B., *et al.* (2012). “Monomeric C-reactive protein alters fibrin clot properties on endothelial cells.” Thromb Res 129(5): e251-256.
- Li, W., Khor, T.O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W.S., Yu, S., *et al.* (2008). “Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis.” Biochem Pharmacol 76(11): 1485-1489.
- Libby, P. (2001). “Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes.” Circulation 104(3): 365-372.
- Libby, P. & Theroux, P. (2005). “Pathophysiology of coronary artery disease.” Circulation 111(25): 3481-3488.
- Liu, G.H., Qu, J. & Shen, X. (2008). “NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK.” Biochim Biophys Acta 1783(5): 713-727.
- Liu, L.K., Lee, H.J., Shih, Y.W., Chyau, C.C. & Wang, C.J. (2008). “Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL.” J Food Sci 73(6): H113-121.
- Lizasoain, I., Moro, M.A., Knowles, R.G., Darley-Usmar, V. & Moncada, S. (1996). “Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose.” Biochem J 314 (Pt 3): 877-880.
- Lock, K., Pomerleau, J., Caser, L., Altmann, D.R. & McKee, M. (2005). “The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet.” Bull World Health Organ 83(2): 100-108.
- Loke, W.M., Proudfoot, J.M., Hodgson, J.M., McKinley, A.J., Hime, N., Magat, M., *et al.* (2010). “Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(4): 749-757.
- Lopez-Lopez, G., Moreno, L., Cogolludo, A., Galisteo, M., Ibarra, M., Duarte, J., *et al.* (2004). “Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle.” Mol Pharmacol 65(4): 851-859.
- Lotito, S.B. & Frei, B. (2006). “Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?” Free Radic Biol Med 41(12): 1727-1746.
- Ludmer, P.L., Selwyn, A.P., Shook, T.L., Wayne, R.R., Mudge, G.H., Alexander, R.W., *et al.* (1986). “Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.” N Engl J Med 315(17): 1046-1051.

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. e Wang, X. (1998). “Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.” Cell 94(4): 481-490.
- Luoma, J.S., Stralin, P., Marklund, S.L., Hiltunen, T.P., Sarkioja, T. e Yla-Herttuala, S. (1998). “Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 18(2): 157-167.
- Lusis, A.J. (2000). “Atherosclerosis.” Nature 407(6801): 233-241.
- Ma, X.L., Lopez, B.L., Liu, G.L., Christopher, T.A., Gao, F., Guo, Y., *et al.* (1997). “Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury.” Circ Res 80(6): 894-901.
- MacMillan-Crow, L.A., Greendorfer, J.S., Vickers, S.M. e Thompson, J.A. (2000). “Tyrosine nitration of c-SRC tyrosine kinase in human pancreatic ductal adenocarcinoma.” Arch Biochem Biophys 377(2): 350-356.
- Maestro, A., Terdoslavich, M., Vanzo, A., Kuku, A., Tramer, F., Nicolin, V., *et al.* (2010). “Expression of bilirubin translocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter.” Cardiovasc Res 85(1): 175-183.
- Magrone, T. e Jirillo, E. (2010). “Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness.” Proc Nutr Soc 69(3): 279-285.
- Maines, M.D. (2005). “The heme oxygenase system: update 2005.” Antioxid Redox Signal 7(11-12): 1761-1766.
- Makin, A.J., Blann, A.D., Chung, N.A., Silverman, S.H. e Lip, G.Y. (2004). “Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor.” Eur Heart J 25(5): 371-376.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. e Remesy, C. (2005). “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.” Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 230S-242S.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., *et al.* (1996). “Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis.” J Exp Med 184(3): 1155-1160.
- Marletta, M.A., Hurshman, A.R. e Rusche, K.M. (1998). “Catalysis by nitric oxide synthase.” Curr Opin Chem Biol 2(5): 656-663.
- Marte, B.M. e Downward, J. (1997). “PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond.” Trends Biochem Sci 22(9): 355-358.
- Martin, D., Rojo, A.I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., *et al.* (2004). “Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol.” J Biol Chem 279(10): 8919-8929.

- Martin, S., Andriambelason, E., Takeda, K.e Andriantsitohaina, R. (2002). “Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production.” Br J Pharmacol 135(6): 1579-1587.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C.e Giovannini, C. (2005). “Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes.” J Nutr Biochem 16(10): 577-586.
- Matata, B.M.e Galinanes, M. (2002). “Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity.” J Biol Chem 277(3): 2330-2335.
- Mates, J.M. (2000). “Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.” Toxicology 153(1-3): 83-104.
- Matsumoto, H., Ito, K., Yonekura, K., Tsuda, T., Ichianagi, T., Hirayama, M., *et al.* (2007). “Enhanced absorption of anthocyanins after oral administration of phytic acid in rats and humans.” J Agric Food Chem 55(6): 2489-2496.
- Mattart, L., Calay, D., Simon, D., Roebroek, L., Caesens-Koenig, L., Van Steenbrugge, M., *et al.* (2012). “The peroxynitrite donor 3-morpholinopyridone activates Nrf2 and the UPR leading to a cytoprotective response in endothelial cells.” Cell Signal 24(1): 199-213.
- Mauray, A., Felgines, C., Morand, C., Mazur, A., Scalbert, A.e Milenkovic, D. (2012). “Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice.” Nutr Metab Cardiovasc Dis 22(1): 72-80.
- Mazza, G. (1995). “Anthocyanins in grapes and grape products.” Crit Rev Food Sci Nutr 35(4): 341-371.
- Mazza, G.J. (2007). “Anthocyanins and heart health.” Ann Ist Super Sanita 43(4): 369-374.
- McGhie, T.K., Ainge, G.D., Barnett, L.E., Cooney, J.M.e Jensen, D.J. (2003). “Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats.” J Agric Food Chem 51(16): 4539-4548.
- McGhie, T.K.e Walton, M.C. (2007). “The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding.” Mol Nutr Food Res 51(6): 702-713.
- McMurray, H.F., Parthasarathy, S.e Steinberg, D. (1993). “Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes.” J Clin Invest 92(2): 1004-1008.
- McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., *et al.* (2003). “Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress.” Am J Physiol Heart Circ Physiol 285(6): H2290-2297.
- Merenyi, G., Lind, J., Goldstein, S.e Czapski, G. (1998). “Peroxynitrous acid homolyzes into *OH and *NO2 radicals.” Chem Res Toxicol 11(7): 712-713.
- Mertens-Talcott, S.U., Rios, J., Jilma-Stohlrawetz, P., Pacheco-Palencia, L.A., Meibohm, B., Talcott, S.T., *et al.* (2008). “Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption

- of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers.” J Agric Food Chem 56(17): 7796-7802.
- Messmer, U.K., Briner, V.A.e Pfeilschifter, J. (1999). “Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells.” Kidney Int 55(6): 2322-2337.
- Mihm, M.J., Jing, L.e Bauer, J.A. (2000). “Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage.” J Cardiovasc Pharmacol 36(2): 182-187.
- Miller, Y.I., Felikman, Y.e Shaklai, N. (1996). “Hemoglobin induced apolipoprotein B crosslinking in low-density lipoprotein peroxidation.” Arch Biochem Biophys 326(2): 252-260.
- Min, K.J., Lee, J.T., Joe, E.H.e Kwon, T.K. (2011). “An IkappaBalpha phosphorylation inhibitor induces heme oxygenase-1(HO-1) expression through the activation of reactive oxygen species (ROS)-Nrf2-ARE signaling and ROS-PI3K/Akt signaling in an NF-kappaB-independent mechanism.” Cell Signal 23(9): 1505-1513.
- Mink, P.J., Scrafford, C.G., Barraja, L.M., Harnack, L., Hong, C.P., Nettleton, J.A., *et al.* (2007). “Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women.” Am J Clin Nutr 85(3): 895-909.
- Minor, R.L., Jr., Myers, P.R., Guerra, R., Jr., Bates, J.N.e Harrison, D.G. (1990). “Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta.” J Clin Invest 86(6): 2109-2116.
- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H.e Jennings, K.R. (2002). “Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity.” Free Radic Res 36(11): 1199-1208.
- Miramar, M.D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L.M., Haouzi, D., Brothers, G., *et al.* (2001). “NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor.” J Biol Chem 276(19): 16391-16398.
- Modun, D., Music, I., Vukovic, J., Brizic, I., Katalinic, V., Obad, A., *et al.* (2008). “The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols.” Atherosclerosis 197(1): 250-256.
- Moilanen, E.e Vapaatalo, H. (1995). “Nitric oxide in inflammation and immune response.” Ann Med 27(3): 359-367.
- Moncada, S.e Higgs, A. (1993). “The L-arginine-nitric oxide pathway.” N Engl J Med 329(27): 2002-2012.
- Mondoro, T.H., Shafer, B.C.e Vostal, J.G. (1997). “Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets.” Free Radic Biol Med 22(6): 1055-1063.
- Monteiro, H.P. (2002). “Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events?” Free Radic Biol Med 33(6): 765-773.
- Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Goodwin, D.A., Read, N.G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., *et al.* (1994). “Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets.” Proc Natl Acad Sci U S A 91(14): 6702-6706.

- Morrison, K.M., Atkinson, S.A., Yusuf, S., Bourgeois, J., McDonald, S., McQueen, M.J., *et al.* (2009). “The Family Atherosclerosis Monitoring In earLY life (FAMILY) study: rationale, design, and baseline data of a study examining the early determinants of atherosclerosis.” Am Heart J 158(4): 533-539.
- Motterlini, R., Mann, B.E.e Foresti, R. (2005). “Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules.” Expert Opin Investig Drugs 14(11): 1305-1318.
- Mullen, W., Edwards, C.A., Serafini, M.e Crozier, A. (2008). “Bioavailability of pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream.” J Agric Food Chem 56(3): 713-719.
- Mursu, J., Nurmi, T., Tuomainen, T.P., Ruusunen, A., Salonen, J.T.e Voutilainen, S. (2007). “The intake of flavonoids and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study.” Br J Nutr 98(4): 814-818.
- Nam, N.H. (2006). “Naturally occurring NF-kappaB inhibitors.” Mini Rev Med Chem 6(8): 945-951.
- Napoli, C., Balestrieri, M.L., Sica, V., Lerman, L.O., Crimi, E., De Rosa, G., *et al.* (2008). “Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis.” Heart Vessels 23(2): 124-133.
- Naruszewicz, M., Laniewska, I., Millo, B.e Dluzniewski, M. (2007). “Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI).” Atherosclerosis 194(2): e179-184.
- Nathan, C.F.e Hibbs, J.B., Jr. (1991). “Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity.” Curr Opin Immunol 3(1): 65-70.
- Navab, M., Fogelman, A.M., Berliner, J.A., Territo, M.C., Demer, L.L., Frank, J.S., *et al.* (1995). “Pathogenesis of atherosclerosis.” Am J Cardiol 76(9): 18C-23C.
- Nicholson, D.W. (1999). “Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.” Cell Death Differ 6(11): 1028-1042.
- Nicholson, S.K., Tucker, G.A.e Brameld, J.M. (2008). “Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells.” Proc Nutr Soc 67(1): 42-47.
- Nielsen, I.L., Dragsted, L.O., Ravn-Haren, G., Freese, R.e Rasmussen, S.E. (2003). “Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.” J Agric Food Chem 51(9): 2813-2820.
- Niture, S.K., Kaspar, J.W., Shen, J.e Jaiswal, A.K. (2010). “Nrf2 signaling and cell survival.” Toxicol Appl Pharmacol 244(1): 37-42.
- O’Leary, K.A., Day, A.J., Needs, P.W., Mellon, F.A., O’Brien, N.M.e Williamson, G. (2003). “Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism.” Biochem Pharmacol 65(3): 479-491.

- Ogawa, K., Sakakibara, H., Iwata, R., Ishii, T., Sato, T., Goda, T., *et al.* (2008). “Anthocyanin composition and antioxidant activity of the Crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries.” J Agric Food Chem 56(12): 4457-4462.
- Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., *et al.* (2001). “Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1.” EMBO J 20(11): 2835-2843.
- Ohara, Y., Peterson, T.E.e Harrison, D.G. (1993). “Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production.” J Clin Invest 91(6): 2546-2551.
- Ohnishi, R., Ito, H., Kasajima, N., Kaneda, M., Kariyama, R., Kumon, H., *et al.* (2006). “Urinary excretion of anthocyanins in humans after cranberry juice ingestion.” Biosci Biotechnol Biochem 70(7): 1681-1687.
- Okado-Matsumoto, A.e Fridovich, I. (2001). “Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria.” J Biol Chem 276(42): 38388-38393.
- Olshansky, S.J.e Ault, A.B. (1986). “The fourth stage of the epidemiologic transition: the age of delayed degenerative diseases.” Milbank Q 64(3): 355-391.
- OMS (2009). Resolution WHA62.14. Reducing health inequities through action on the social determinants of health. . geneva.
- OMS, Ed. (2010). Global Atlas in CVD prevention and Control.
- Opie, L.H.e Lecour, S. (2007). “The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules.” Eur Heart J 28(14): 1683-1693.
- Osiecki, H. (2004). “The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients.” Altern Med Rev 9(1): 32-53.
- Packer, M.A., Scarlett, J.L., Martin, S.W.e Murphy, M.P. (1997). “Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite.” Biochem Soc Trans 25(3): 909-914.
- Pagano, P.J., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P.M., Tauber, A.I.e Cohen, R.A. (1995). “An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta.” Am J Physiol 268(6 Pt 2): H2274-2280.
- Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R.e Immenschuh, S. (2010). “Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential.” Biochem Pharmacol 80(12): 1895-1903.
- Pais, A.C.F. (2007). Contributo das antocianinas para as actividades antioxidante e vaso-relaxante de vinhos tintos varietais Portugueses. Faculdade de Farmácia. Coimbra, Coimbra.
- Paixao, J., Dinis, T.C.e Almeida, L.M. (2011). “Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an in vitro approach.” Apoptosis 16(10): 976-989.
- Paixao, J., Dinis, T.C.e Almeida, L.M. (2012). “Protective role of malvidin-3-glucoside on peroxynitrite-induced damage in endothelial cells by counteracting reactive species formation and apoptotic mitochondrial pathway.” Oxid Med Cell Longev 2012: 428538.

- Palmer, R.M., Ferrige, A.G.e Moncada, S. (1987). “Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.” Nature 327(6122): 524-526.
- Pannala, A.S., Rice-Evans, C., Sampson, J.e Singh, S. (1998). “Interaction of peroxynitrite with carotenoids and tocopherols within low density lipoprotein.” FEBS Lett 423(3): 297-301.
- Pannala, A.S., Rice-Evans, C.A., Halliwell, B.e Singh, S. (1997). “Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols.” Biochem Biophys Res Commun 232(1): 164-168.
- Panza, J.A., Garcia, C.E., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A.e Cannon, R.O., 3rd (1995). “Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway.” Circulation 91(6): 1732-1738.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A.e Mattivi, F. (2003). “The stomach as a site for anthocyanins absorption from food.” FEBS Lett 544(1-3): 210-213.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A.e Mattivi, F. (2005). “Fast access of some grape pigments to the brain.” J Agric Food Chem 53(18): 7029-7034.
- Pavlovic, R.e Santaniello, E. (2007). “Peroxynitrite and nitrosoperoxycarbonate, a tightly connected oxidizing-nitrating couple in the reactive nitrogen-oxygen species family: new perspectives for protection from radical-promoted injury by flavonoids.” J Pharm Pharmacol 59(12): 1687-1695.
- Pearce, L.L., Epperly, M.W., Greenberger, J.S., Pitt, B.R.e Peterson, J. (2001). “Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide.” Nitric Oxide 5(2): 128-136.
- Pearson, J.D. (1999). “Endothelial cell function and thrombosis.” Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 12(3): 329-341.
- Peng, H.B., Spiecker, M.e Liao, J.K. (1998). “Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation.” J Immunol 161(4): 1970-1976.
- Perez-Jimenez, J.e Saura-Calixto, F. (2008). “Grape products and cardiovascular disease risk factors.” Nutr Res Rev 21(2): 158-173.
- Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S.e Sautebin, L. (2006). “Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract.” Nitric Oxide 15(1): 30-39.
- Perkins, N.D. (2007). “Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function.” Nat Rev Mol Cell Biol 8(1): 49-62.
- Perron, N.R.e Brumaghim, J.L. (2009). “A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding.” Cell Biochem Biophys 53(2): 75-100.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T.e Fesik, S.W. (2004). “Structural biology of the Bcl-2 family of proteins.” Biochim Biophys Acta 1644(2-3): 83-94.
- Piantadosi, C.A., Carraway, M.S., Babiker, A.e Suliman, H.B. (2008). “Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1.” Circ Res 103(11): 1232-1240.

- Pietta, P.G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." J Nat Prod 63(7): 1035-1042.
- Poderoso, J.J. (2009). "The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide." Arch Biochem Biophys 484(2): 214-220.
- Podrez, E.A., Abu-Soud, H.M.e Hazen, S.L. (2000). "Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis." Free Radic Biol Med 28(12): 1717-1725.
- Pollard, S.E., Kuhnle, G.G., Vauzour, D., Vafeiadou, K., Tzounis, X., Whiteman, M., *et al.* (2006). "The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite." Biochem Biophys Res Commun 350(4): 960-968.
- Pomerantz, J.L.e Baltimore, D. (2002). "Two pathways to NF-kappaB." Mol Cell 10(4): 693-695.
- Previtali, E., Bucciarelli, P., Passamonti, S.M.e Martinelli, I. (2011). "Risk factors for venous and arterial thrombosis." Blood Transfus 9(2): 120-138.
- Prior, R.L. (2003). "Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage." Am J Clin Nutr 78(3 Suppl): 570S-578S.
- Prior, R.L.e Wu, X. (2006). "Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities." Free Radic Res 40(10): 1014-1028.
- Pryor, W.A.e Squadrito, G.L. (1995). "The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide." Am J Physiol 268(5 Pt 1): L699-722.
- Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., *et al.* (2009). "Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects." Am J Clin Nutr 90(3): 485-492.
- Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G.e Steinberg, D. (1987). "Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 84(9): 2995-2998.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M.e Freeman, B.A. (1991). "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." Arch Biochem Biophys 288(2): 481-487.
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C.e Castro, L. (2002). "Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria." Free Radic Biol Med 33(11): 1451-1464.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M.e Cayota, A. (2001). "Unraveling peroxynitrite formation in biological systems." Free Radic Biol Med 30(5): 463-488.
- Radomski, M.W.e Salas, E. (1995). "Nitric oxide--biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis." Atherosclerosis 118 Suppl: S69-80.
- Rahman, I., Biswas, S.K.e Kirkham, P.A. (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols." Biochem Pharmacol 72(11): 1439-1452.

- Rahman, M.M., Ichiyanagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y. e Konishi, T. (2006). “Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism.” Free Radic Res 40(9): 993-1002.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., *et al.* (1990). “Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins.” Nature 344(6263): 254-257.
- Ramachandran, A., Levonen, A.L., Brookes, P.S., Ceaser, E., Shiva, S., Barone, M.C., *et al.* (2002). “Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction.” Free Radic Biol Med 33(11): 1465-1474.
- Ramsey, S.A., Gold, E.S. e Aderem, A. (2010). “A systems biology approach to understanding atherosclerosis.” EMBO Mol Med 2(3): 79-89.
- Rapoport, R.M. e Murad, F. (1983). “Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP.” Circ Res 52(3): 352-357.
- Rassaf, T., Kleinbongard, P. e Kelm, M. (2006). “The L-arginine nitric oxide pathway: avenue for a multiple-level approach to assess vascular function.” Biol Chem 387(10-11): 1347-1349.
- Ray, P.D., Huang, B.W. e Tsuji, Y. (2012). “Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling.” Cell Signal 24(5): 981-990.
- Reiner, Z., Catapano, A.L., De Backer, G., Graham, I., Taskinen, M.R., Wiklund, O., *et al.* (2011). “ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS).” Eur Heart J 32(14): 1769-1818.
- Renaud, S. e de Lorgeril, M. (1992). “Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.” Lancet 339(8808): 1523-1526.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. e Paganga, G. (1996). “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.” Free Radic Biol Med 20(7): 933-956.
- Richard, V., Tanner, F.C., Tschudi, M. e Luscher, T.F. (1990). “Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries.” Am J Physiol 259(5 Pt 2): H1433-1439.
- Ridker, P.M., Buring, J.E., Cook, N.R. e Rifai, N. (2003). “C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women.” Circulation 107(3): 391-397.
- Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P. e Hennekens, C.H. (1997). “Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men.” N Engl J Med 336(14): 973-979.
- Riedl, S.J. e Salvesen, G.S. (2007). “The apoptosome: signalling platform of cell death.” Nat Rev Mol Cell Biol 8(5): 405-413.
- Rimm, E. e Colditz, G. (1993). “Smoking, alcohol, and plasma levels of carotenes and vitamin E.” Ann N Y Acad Sci 686: 323-333; discussion 333-324.

- Rissanen, T.H., Voutilainen, S., Virtanen, J.K., Venho, B., Vanharanta, M., Mursu, J., *et al.* (2003). “Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study.” J Nutr 133(1): 199-204.
- Romero, N., Denicola, A., Souza, J.M.e Radi, R. (1999). “Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide.” Arch Biochem Biophys 368(1): 23-30.
- Ronson, R.S., Nakamura, M.e Vinten-Johansen, J. (1999). “The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite.” Cardiovasc Res 44(1): 47-59.
- Ross, R. (1993). “The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.” Nature 362(6423): 801-809.
- Ross, R. (1999). “Atherosclerosis--an inflammatory disease.” N Engl J Med 340(2): 115-126.
- Ross, R.e Glomset, J.A. (1976). “The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts).” N Engl J Med 295(7): 369-377.
- Rossetto, M., Vanzani, P., Lunelli, M., Scarpa, M., Mattivi, F.e Rigo, A. (2007). “Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates.” Free Radic Res 41(7): 854-859.
- Rothwell, J.A., Day, A.J.e Morgan, M.R. (2005). “Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids.” J Agric Food Chem 53(11): 4355-4360.
- Rubbo, H.e O’Donnell, V. (2005). “Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights.” Toxicology 208(2): 305-317.
- Rubbo, H., Trostchansky, A.e O’Donnell, V.B. (2009). “Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences.” Arch Biochem Biophys 484(2): 167-172.
- Rumpold, H., Wolf, D., Koeck, R.e Gunsilius, E. (2004). “Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis?” J Cell Mol Med 8(4): 509-518.
- Ryter, S.W., Alam, J.e Choi, A.M. (2006). “Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications.” Physiol Rev 86(2): 583-650.
- Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X., *et al.* (2007). “Mechanisms of cell death in oxidative stress.” Antioxid Redox Signal 9(1): 49-89.
- Saini, V., Bhatnagar, M.K.e Bhattacharjee, J. (2011). “Association of endothelial dysfunction with endothelin, nitric oxide and eNOS Glu298Asp gene polymorphism in coronary artery disease.” Dis Markers 31(4): 215-222.
- Salgo, M.G., Squadrito, G.L.e Pryor, W.A. (1995). “Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes.” Biochem Biophys Res Commun 215(3): 1111-1118.
- Salvesen, G.S.e Abrams, J.M. (2004). “Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies.” Oncogene 23(16): 2774-2784.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C.e Masella, R. (2007). “Polyphenols, intracellular signalling and inflammation.” Ann Ist Super Sanita 43(4): 394-405.

- Santos, M.R.e Mira, L. (2004). "Protection by flavonoids against the peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine." Free Radic Res 38(9): 1011-1018.
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., *et al.* (1997). "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein." Nature 386(6620): 73-77.
- Scarlett, J.L., Packer, M.A., Porteous, C.M.e Murphy, M.P. (1996). "Alterations to glutathione and nicotinamide nucleotides during the mitochondrial permeability transition induced by peroxynitrite." Biochem Pharmacol 52(7): 1047-1055.
- Schewe, T. (2002). "15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme." Biol Chem 383(3-4): 365-374.
- Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., *et al.* (2005). "Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A 102(34): 12005-12010.
- Schmitz, H.P., Jockel, J., Block, C.e Heinisch, J.J. (2001). "Domain shuffling as a tool for investigation of protein function: substitution of the cysteine-rich region of Raf kinase and PKC eta for that of yeast Pkc1p." J Mol Biol 311(1): 1-7.
- Scholtes, V.P., de Vries, J.P., Catanzariti, L.M., de Kleijn, D.P., Moll, F.L., de Borst, G.J., *et al.* (2011). "Biobanking in atherosclerotic disease, opportunities and pitfalls." Curr Cardiol Rev 7(1): 9-14.
- Schreck, R., Rieber, P.e Baeuerle, P.A. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." EMBO J 10(8): 2247-2258.
- Schulz, E., Anter, E.e Keaney, J.F., Jr. (2004). "Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function." Curr Med Chem 11(9): 1093-1104.
- Schulze, P.C.e Lee, R.T. (2005). "Oxidative stress and atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep 7(3): 242-248.
- Schweizer, M.e Richter, C. (1996). "Peroxynitrite stimulates the pyridine nucleotide-linked Ca²⁺ release from intact rat liver mitochondria." Biochemistry 35(14): 4524-4528.
- Searle, J., Kerr, J.F.e Bishop, C.J. (1982). "Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance." Pathol Annu 17 Pt 2: 229-259.
- Seeram, N.P., Bourquin, L.D.e Nair, M.G. (2001). "Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities." J Agric Food Chem 49(10): 4924-4929.
- Seeram, N.P., Zhang, Y.e Nair, M.G. (2003). "Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins." Nutr Cancer 46(1): 101-106.
- Sen, C.K., Khanna, S., Reznick, A.Z., Roy, S.e Packer, L. (1997). "Glutathione regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B activation in skeletal muscle-derived L6 cells." Biochem Biophys Res Commun 237(3): 645-649.
- Serhan, C., Anderson, P., Goodman, E., Dunham, P.e Weissmann, G. (1981). "Phosphatidate and oxidized fatty acids are calcium ionophores. Studies employing arsenazo III in liposomes." J Biol Chem 256(6): 2736-2741.

- Serrano, C.V., Jr., Santos, E.S., Mangione, J.A., Scheinberg, M., Souza, J.S., Martinez, E.E., *et al.* (2007). “Enhanced inflammatory response following coronary stent implantation in stable angina patients.” Int J Cardiol 118(1): 69-75.
- Sharpe, J.C., Arnoult, D.e Youle, R.J. (2004). “Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members.” Biochim Biophys Acta 1644(2-3): 107-113.
- Shiozaki, E.N.e Shi, Y. (2004). “Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology.” Trends Biochem Sci 29(9): 486-494.
- Siasos, G., Tousoulis, D., Oikonomou, E., Zaromitidou, M., Stefanadis, C.e Papavassiliou, A.G. (2011). “Inflammatory markers in hyperlipidemia: from experimental models to clinical practice.” Curr Pharm Des 17(37): 4132-4146.
- Sies, H. (1997). “Oxidative stress: oxidants and antioxidants.” Exp Physiol 82(2): 291-295.
- Sies, H. (2010). “Polyphenols and health: update and perspectives.” Arch Biochem Biophys 501(1): 2-5.
- Siflinger-Birnboim, A., Lum, H., Del Vecchio, P.J.e Malik, A.B. (1996). “Involvement of Ca²⁺ in the H₂O₂-induced increase in endothelial permeability.” Am J Physiol 270(6 Pt 1): L973-978.
- Silva, M.M., Santos, M.R., Caroco, G., Rocha, R., Justino, G.e Mira, L. (2002). “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination.” Free Radic Res 36(11): 1219-1227.
- Simon, A.R., Rai, U., Fanburg, B.L.e Cochran, B.H. (1998). “Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species.” Am J Physiol 275(6 Pt 1): C1640-1652.
- Skulachev, V.P. (2006). “Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis.” Apoptosis 11(4): 473-485.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., *et al.* (1999). “Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner.” J Cell Biol 144(2): 281-292.
- Slevin, M.e Krupinski, J. (2009). “A role for monomeric C-reactive protein in regulation of angiogenesis, endothelial cell inflammation and thrombus formation in cardiovascular/cerebrovascular disease?” Histol Histopathol 24(11): 1473-1478.
- Smith, C., Mitchinson, M.J., Aruoma, O.I.e Halliwell, B. (1992). “Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions.” Biochem J 286 (Pt 3): 901-905.
- Soares, M.P., Seldon, M.P., Gregoire, I.P., Vassilevskaia, T., Berberat, P.O., Yu, J., *et al.* (2004). “Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation.” J Immunol 172(6): 3553-3563.
- Solovey, A., Gui, L., Ramakrishnan, S., Steinberg, M.H.e Hebbel, R.P. (1999). “Sickle cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells.” Blood 93(11): 3824-3830.

- Sorrenti, V., Mazza, F., Campisi, A., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Vanella, L., *et al.* (2007). “Heme oxygenase induction by cyanidin-3-O-beta-glucoside in cultured human endothelial cells.” Mol Nutr Food Res 51(5): 580-586.
- Speciale, A., Canali, R., Chirafisi, J., Saija, A., Virgili, F. e Cimino, F. (2010). “Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF-alpha-induced endothelial dysfunction: involvement of nuclear factor-kappaB signaling.” J Agric Food Chem 58(22): 12048-12054.
- Spragg, R.G., Hinshaw, D.B., Hyslop, P.A., Schraufstatter, I.U. e Cochrane, C.G. (1985). “Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D1 cells after oxidant injury.” J Clin Invest 76(4): 1471-1476.
- Squadrito, G.L. e Pryor, W.A. (1995). “The formation of peroxyxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide.” Chem Biol Interact 96(2): 203-206.
- Stalmach, A., Edwards, C.A., Wightman, J.D. e Crozier, A. (2011). “Identification of (poly)phenolic compounds in concord grape juice and their metabolites in human plasma and urine after juice consumption.” J Agric Food Chem 59(17): 9512-9522.
- Stamler, J.S., Jia, L., Eu, J.P., McMahon, T.J., Demchenko, I.T., Bonaventura, J., *et al.* (1997). “Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient.” Science 276(5321): 2034-2037.
- Stancu, C.S., Toma, L. e Sima, A.V. (2012). “Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis.” Cell Tissue Res.
- Stefanec, T. (2000). “Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease?” Chest 117(3): 841-854.
- Steinberg, D. (1997). “A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis.” Atherosclerosis 131 Suppl: S5-7.
- Steinberg, D. (2005). “Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin.” Mol Nutr Food Res 49(11): 995-998.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. e Witztum, J.L. (1989). “Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.” N Engl J Med 320(14): 915-924.
- Steinberg, D. e Witztum, J.L. (2010). “Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(12): 2311-2316.
- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L. e Steinberg, D. (1984). “Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids.” Proc Natl Acad Sci U S A 81(12): 3883-3887.
- Stemme, S., Faber, B., Holm, J., Wiklund, O., Witztum, J.L. e Hansson, G.K. (1995). “T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein.” Proc Natl Acad Sci U S A 92(9): 3893-3897.

- Stern, M.P. (1995). "Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis." Diabetes 44(4): 369-374.
- Stevenson, D.E.e Hurst, R.D. (2007). "Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more?" Cell Mol Life Sci 64(22): 2900-2916.
- Stocker, R.e Keaney, J.F., Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev 84(4): 1381-1478.
- Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., *et al.* (2004). "Vascular protection by dietary polyphenols." Eur J Pharmacol 500(1-3): 299-313.
- Stokes, K.Y., Clanton, E.C., Russell, J.M., Ross, C.R.e Granger, D.N. (2001). "NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion." Circ Res 88(5): 499-505.
- Stoll, G.e Bendszus, M. (2006). "Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization." Stroke 37(7): 1923-1932.
- Stroes, E., Hijmering, M., van Zandvoort, M., Wever, R., Rabelink, T.J.e van Faassen, E.E. (1998). "Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase." FEBS Lett 438(3): 161-164.
- Stuehr, D.J. (1997). "Structure-function aspects in the nitric oxide synthases." Annu Rev Pharmacol Toxicol 37: 339-359.
- Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Salvayre, R.e Negre-Salvayre, A. (1997). "HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(10): 2158-2166.
- Sumner, M.D., Elliott-Eller, M., Weidner, G., Daubenmier, J.J., Chew, M.H., Marlin, R., *et al.* (2005). "Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease." Am J Cardiol 96(6): 810-814.
- Sun, S.C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res 21(1): 71-85.
- Surh, Y.J., Kundu, J.K.e Na, H.K. (2008). "Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals." Planta Med 74(13): 1526-1539.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., *et al.* (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature 397(6718): 441-446.
- Suzuki, Y., Takahashi-Niki, K., Akagi, T., Hashikawa, T.e Takahashi, R. (2004). "Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways." Cell Death Differ 11(2): 208-216.
- Szabo, C. (2003). "Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity." Toxicol Lett 140-141: 105-112.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H.e Radi, R. (2007). "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics." Nat Rev Drug Discov 6(8): 662-680.

- Szabolcs, M., Michler, R.E., Yang, X., Aji, W., Roy, D., Athan, E., *et al.* (1996). “Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase.” Circulation 94(7): 1665-1673.
- Szmitko, P.E., Fedak, P.W., Weisel, R.D., Stewart, D.J., Kutryk, M.J.e Verma, S. (2003). “Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart.” Circulation 107(24): 3093-3100.
- Takahashi, Y., Zhu, H.e Yoshimoto, T. (2005). “Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis.” Antioxid Redox Signal 7(3-4): 425-431.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.L., *et al.* (2005). “Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain.” J Agric Food Chem 53(10): 3902-3908.
- Tanner, F.C., Noll, G., Boulanger, C.M.e Luscher, T.F. (1991). “Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide.” Circulation 83(6): 2012-2020.
- Tenhunen, R., Marver, H.S.e Schmid, R. (1968). “The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase.” Proc Natl Acad Sci U S A 61(2): 748-755.
- Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H.G., Liu, J., Lee, R.M., *et al.* (2004). “Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID.” J Biol Chem 279(29): 30081-30091.
- Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D.P., Steward, W.P., *et al.* (2009). “Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs?” Cancer Chemother Pharmacol 64(1): 201-211.
- Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guerin, M.e Torreilles, J. (1999). “Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite.” Brain Res Brain Res Rev 30(2): 153-163.
- Toufektsian, M.C., de Lorgeril, M., Nagy, N., Salen, P., Donati, M.B., Giordano, L., *et al.* (2008). “Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury.” J Nutr 138(4): 747-752.
- Trostchansky, A., Batthyany, C., Botti, H., Radi, R., Denicola, A.e Rubbo, H. (2001). “Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide.” Arch Biochem Biophys 395(2): 225-232.
- Tsuda, T. (2012). “Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies.” Mol Nutr Food Res 56(1): 159-170.
- Tsujimoto, Y.e Shimizu, S. (2007). “Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death.” Apoptosis 12(5): 835-840.
- Umansky, V., Hehner, S.P., Dumont, A., Hofmann, T.G., Schirmmacher, V., Droge, W., *et al.* (1998). “Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism.” Eur J Immunol 28(8): 2276-2282.

- Uppu, R.M., Nossaman, B.D., Greco, A.J., Fokin, A., Murthy, S.N., Fonseca, V.A., *et al.* (2007). “Cardiovascular effects of peroxynitrite.” Clin Exp Pharmacol Physiol 34(9): 933-937.
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S.I., Ma, Y., Fujimoto, M., *et al.* (2002). “Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis.” Circ Res 91(12): 1160-1167.
- Vallet, B.e Wiel, E. (2001). “Endothelial cell dysfunction and coagulation.” Crit Care Med 29(7 Suppl): S36-41.
- van Acker, F.A., Schouten, O., Haenen, G.R., van der Vijgh, W.J.e Bast, A. (2000). “Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant.” FEBS Lett 473(2): 145-148.
- van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Halliwell, B.e Cross, C.E. (1997). “Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity.” J Biol Chem 272(12): 7617-7625.
- van der Wal, A.C., Das, P.K., Bentz van de Berg, D., van der Loos, C.M.e Becker, A.E. (1989). “Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response.” Lab Invest 61(2): 166-170.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., *et al.* (2001). “Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation.” Cell Death Differ 8(12): 1136-1142.
- van Mierlo, L.A., Zock, P.L., van der Knaap, H.C.e Draijer, R. (2010). “Grape polyphenols do not affect vascular function in healthy men.” J Nutr 140(10): 1769-1773.
- van Velden, D.P., Mansvelt, E.P.e Troup, G.J. (2002). “Red wines good, white wines bad?” Redox Rep 7(5): 315-316.
- Vane, J.R.e Botting, R.M. (1992). “Secretory functions of the vascular endothelium.” J Physiol Pharmacol 43(3): 195-207.
- Vanhoutte, P.M. (2009). “Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis.” Circ J 73(4): 595-601.
- Verhagen, A.M., Coulson, E.J.e Vaux, D.L. (2001). “Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs.” Genome Biol 2(7): REVIEWS3009.
- Verhagen, A.M.e Vaux, D.L. (2002). “Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac.” Apoptosis 7(2): 163-166.
- Vieira, H.L., Belzacq, A.S., Haouzi, D., Bernassola, F., Cohen, I., Jacotot, E., *et al.* (2001). “The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal.” Oncogene 20(32): 4305-4316.
- Vieira, O., Escargueil-Blanc, I., Meilhac, O., Basile, J.P., Laranjinha, J., Almeida, L., *et al.* (1998). “Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL.” Br J Pharmacol 123(3): 565-573.

- Virag, L., Marmer, D.J.e Szabo, C. (1998). “Crucial role of apopain in the peroxynitrite-induced apoptotic DNA fragmentation.” Free Radic Biol Med 25(9): 1075-1082.
- Virag, L.e Szabo, C. (2000). “BCL-2 protects peroxynitrite-treated thymocytes from poly(ADP-ribose) synthase (PARS)-independent apoptotic but not from PARS-mediated necrotic cell death.” Free Radic Biol Med 29(8): 704-713.
- Vita, J.A. (2005). “Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function.” Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 292S-297S.
- Vita, J.A.e Keaney, J.F., Jr. (2002). “Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?” Circulation 106(6): 640-642.
- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., *et al.* (2007). “Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides.” J Nutr 137(9): 2043-2048.
- Wagener, F.A., Volk, H.D., Willis, D., Abraham, N.G., Soares, M.P., Adema, G.J., *et al.* (2003). “Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation.” Pharmacol Rev 55(3): 551-571.
- Wallace, T.C. (2011). “Anthocyanins in cardiovascular disease.” Adv Nutr 2(1): 1-7.
- Wallerath, T., Li, H., Godtel-Ambrust, U., Schwarz, P.M.e Forstermann, U. (2005). “A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase.” Nitric Oxide 12(2): 97-104.
- Wallerath, T., Poleo, D., Li, H.e Forstermann, U. (2003). “Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects.” J Am Coll Cardiol 41(3): 471-478.
- Walton, M.C., McGhie, T.K., Reynolds, G.W.e Hendriks, W.H. (2006). “The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption in vitro.” J Agric Food Chem 54(13): 4913-4920.
- Wang, D., Zou, T., Yang, Y., Yan, X.e Ling, W. (2011). “Cyanidin-3-O-beta-glucoside with the aid of its metabolite protocatechuic acid, reduces monocyte infiltration in apolipoprotein E-deficient mice.” Biochem Pharmacol 82(7): 713-719.
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I., *et al.* (1999). “Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries.” J Nat Prod 62(2): 294-296.
- Wang, L.S.e Stoner, G.D. (2008). “Anthocyanins and their role in cancer prevention.” Cancer Lett 269(2): 281-290.
- Wang, Q., Xia, M., Liu, C., Guo, H., Ye, Q., Hu, Y., *et al.* (2008). “Cyanidin-3-O-beta-glucoside inhibits iNOS and COX-2 expression by inducing liver X receptor alpha activation in THP-1 macrophages.” Life Sci 83(5-6): 176-184.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Liu, Y.e Xia, M. (2012). “Supplementation with cyanidin-3-O-beta-glucoside protects against hypercholesterolemia-mediated endothelial dysfunction and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.” J Nutr 142(6): 1033-1037.

- Weidinger, F.F., McLenachan, J.M., Cybulsky, M.I., Gordon, J.B., Rennke, H.G., Hollenberg, N.K., *et al.* (1990). “Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery.” Circulation 81(5): 1667-1679.
- Weissberg, P.L., Grainger, D.J., Shanahan, C.M.e Metcalfe, J.C. (1993). “Approaches to the development of selective inhibitors of vascular smooth muscle cell proliferation.” Cardiovasc Res 27(7): 1191-1198.
- Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., *et al.* (2005). “Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes.” N Engl J Med 353(10): 999-1007.
- Wever, R., Stroes, E.e Rabelink, T.J. (1998). “Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction?” Atherosclerosis 137 Suppl: S51-60.
- Weyrich, A.S., Ma, X.L., Buerke, M., Murohara, T., Armstead, V.E., Lefler, A.M., *et al.* (1994). “Physiological concentrations of nitric oxide do not elicit an acute negative inotropic effect in unstimulated cardiac muscle.” Circ Res 75(4): 692-700.
- Whicher, J., Biasucci, L.e Rifai, N. (1999). “Inflammation, the acute phase response and atherosclerosis.” Clin Chem Lab Med 37(5): 495-503.
- White, C.R., Brock, T.A., Chang, L.Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., *et al.* (1994). “Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis.” Proc Natl Acad Sci U S A 91(3): 1044-1048.
- Wiczowski, W., Romaszko, E.e Piskula, M.K. (2010). “Bioavailability of Cyanidin Glycosides from Natural Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Juice with Dietary-Relevant Dose of Anthocyanins in Humans.” J Agric Food Chem.
- Willerson, J.T. (2002). “Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques.” Prog Cardiovasc Dis 44(6): 469-478.
- Williams, R.J.e Spencer, J.P. (2012). “Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease.” Free Radic Biol Med 52(1): 35-45.
- Williams, S.B., Cusco, J.A., Roddy, M.A., Johnstone, M.T.e Creager, M.A. (1996). “Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.” J Am Coll Cardiol 27(3): 567-574.
- Williamson, G., Sies, H., Heber, D., Keen, C.L., Macdonald, I.A., Actis-Goretta, L., *et al.* (2009). “Functional foods for health promotion: state-of-the-science on dietary flavonoids. Extended abstracts from the 12th Annual Conference on Functional Foods for Health Promotion, April 2009.” Nutr Rev 67(12): 736-743.
- Wright, J.S., Johnson, E.R.e DiLabio, G.A. (2001). “Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants.” J Am Chem Soc 123(6): 1173-1183.
- Wu, B.J., Midwinter, R.G., Cassano, C., Beck, K., Wang, Y., Changsiri, D., *et al.* (2009). “Heme oxygenase-1 increases endothelial progenitor cells.” Arterioscler Thromb Vasc Biol 29(10): 1537-1542.

- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. e Prior, R.L. (2006). “Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption.” J Agric Food Chem 54(11): 4069-4075.
- Wu, X., Pittman, H.E., 3rd, McKay, S. e Prior, R.L. (2005). “Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs.” J Nutr 135(10): 2417-2424.
- Wymann, M.P. e Pirola, L. (1998). “Structure and function of phosphoinositide 3-kinases.” Biochim Biophys Acta 1436(1-2): 127-150.
- Xia, M., Ling, W., Zhu, H., Ma, J., Wang, Q., Hou, M., *et al.* (2009). “Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation.” Atherosclerosis 202(1): 41-47.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. e Sun, S.C. (2001). “NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100.” Mol Cell 7(2): 401-409.
- Xu, J.W., Ikeda, K. e Yamori, Y. (2004). “Cyanidin-3-glucoside regulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase.” FEBS Lett 574(1-3): 176-180.
- Yamamoto, K. e Ando, J. (2011). “New molecular mechanisms for cardiovascular disease: blood flow sensing mechanism in vascular endothelial cells.” J Pharmacol Sci 116(4): 323-331.
- Yang, M., Koo, S.I., Song, W.O. e Chun, O.K. (2011). “Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review.” Curr Med Chem 18(2): 291-300.
- Yang, Y., Shi, Z., Reheman, A., Jin, J.W., Li, C., Wang, Y., *et al.* (2012). “Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases.” PLoS One 7(5): e37323.
- Yi, L., Chen, C.Y., Jin, X., Mi, M.T., Yu, B., Chang, H., *et al.* (2010). “Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity.” FEBS Lett 584(3): 583-590.
- Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., *et al.* (1989). “Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man.” J Clin Invest 84(4): 1086-1095.
- Zalba, G., Fortuno, A., San Jose, G., Moreno, M.U., Beloqui, O. e Diez, J. (2007). “Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease.” Cerebrovasc Dis 24 Suppl 1: 24-29.
- Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., *et al.* (2007). “Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1.” Mol Cell Biol 27(19): 6962-6971.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. e Korsmeyer, S.J. (1996). “Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L).” Cell 87(4): 619-628.
- Zhang, A.Y., Yi, F., Jin, S., Xia, M., Chen, Q.Z., Gulbins, E., *et al.* (2007). “Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells.” Antioxid Redox Signal 9(7): 817-828.

- Zhang, A.Y., Yi, F., Zhang, G., Gulbins, E. e Li, P.L. (2006). “Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells.” Hypertension 47(1): 74-80.
- Zhang, D.D. (2006). “Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway.” Drug Metab Rev 38(4): 769-789.
- Zhang, J., Ohta, T., Maruyama, A., Hosoya, T., Nishikawa, K., Maher, J.M., *et al.* (2006). “BRG1 interacts with Nrf2 to selectively mediate HO-1 induction in response to oxidative stress.” Mol Cell Biol 26(21): 7942-7952.
- Zhang, Y., Lian, F., Zhu, Y., Xia, M., Wang, Q., Ling, W., *et al.* (2010). “Cyanidin-3-O-beta-glucoside inhibits LPS-induced expression of inflammatory mediators through decreasing IkappaBalpha phosphorylation in THP-1 cells.” Inflamm Res 59(9): 723-730.
- Zhu, H., Jia, Z., Misra, B.R., Zhang, L., Cao, Z., Yamamoto, M., *et al.* (2008). “Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress.” Cardio-vasc Toxicol 8(2): 71-85.
- Zhuang, S. e Simon, G. (2000). “Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells.” Am J Physiol Cell Physiol 279(2): C341-351.
- Zibera, L., Lunder, M., Moze, S., Vanzo, A., Tramer, F., Passamonti, S., *et al.* (2010). “Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity.” Cardiovasc Toxicol 10(4): 283-294.
- Zibera, L., Tramer, F., Moze, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F. e Passamonti, S. (2012). “Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium.” Free Radic Biol Med 52(9): 1750-1759.
- Ziegler, D. (2005). “Type 2 diabetes as an inflammatory cardiovascular disorder.” Curr Mol Med 5(3): 309-322.
- Zuchi, C., Ambrosio, G., Luscher, T.F. e Landmesser, U. (2010). “Nutraceuticals in cardiovascular prevention: lessons from studies on endothelial function.” Cardiovasc Ther 28(4): 187-201.
- Zundel, W. e Giaccia, A. (1998). “Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress.” Genes Dev 12(13): 1941-1946.
- Zwaka, T.P., Hombach, V. e Torzewski, J. (2001). “C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis.” Circulation 103(9): 1194-1197.

Capítulo 2

**As antocianinas protegem as células endoteliais da morte apoptótica induzida
pelo peroxinitrito**

1. Introdução

As doenças cardiovasculares, como já se referiu, são consideradas uma causa *major* de morbidade e mortalidade mundiais (Mathers e Loncar 2006). A patologia subjacente é a aterosclerose, uma doença multifactorial, na qual a disfunção endotelial parece desempenhar um papel crítico na iniciação e progressão do processo aterogénico (Lusis 2000). O endotélio vascular é uma barreira que regula múltiplas funções, incluindo o tónus vascular, a inflamação, a agregação plaquetar e a trombose, podendo ser afectadas por qualquer situação lesiva ou de *stress* das células endoteliais (Higashi *et al.* 2009; Tousoulis *et al.* 2010). As investigações ao longo das últimas décadas revolucionaram o nosso entendimento acerca da patogénese da aterosclerose e o peroxinitrito passou a ser considerado um interveniente inquestionável como potente agente oxidante e nitrante endógeno de diversas biomoléculas. Este composto resulta da reacção entre o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Koppenol 1998), ambos produzidos pelas células do sistema imune e também pelas vasculares (Ischiropoulos *et al.* 1992; Carreras *et al.* 1994; Cai e Harrison 2000) através de enzimas celulares específicas, tais como a NADPH e as xantina oxidases, produtoras de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e as óxido nítrico sintases (NOS). Esta reacção tem uma das maiores constantes de velocidade conhecidas para reacções com o $\cdot\text{NO}$, justificando a toxicidade do peroxinitrito em determinadas concentrações (Pacher *et al.* 2007).

Assim, o peroxinitrito pode alcançar elevadas concentrações em lesões ateroscleróticas, uma vez que estas ocorrem principalmente em áreas com perturbação do fluxo sanguíneo, onde se observa, em simultâneo, um aumento da produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e uma diminuição da biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$ (Cooke 2003). O seu envolvimento na aterosclerose foi sugerido dada a sua capacidade em oxidar as LDL e de promover uma extensa nitração dos resíduos de tirosina proteicos, como observado em lesões ateroscleróticas humanas (Darley-Usmar *et al.* 1992; Dinis *et al.* 2002; Peluffo e Radi 2007), contribuindo para a produção de estrias gordas e consequente formação da placa ateromatosa. Para além disso, ele pode participar na patogénese da lesão aterosclerótica por mecanismos adicionais, despoletando um desequilíbrio na reactividade vascular e o comprometimento de processos celulares críticos, precipitando as células a apoptose ou necrose (Pacher *et al.* 2007; Brito *et al.* 2008). Pelas razões apontadas, é crucial neutralizar os efeitos lesivos do peroxinitrito, pelo que diferentes estudos demonstraram até à data uma elevada capacidade *scavenger* desta espécie reactiva pelas antocianinas (Rahman *et al.* 2006).

As antocianinas fazem parte do grande grupo dos flavonóides amplamente distribuído em vegetais, frutos e no vinho tinto. Estes compostos têm sido objecto de considerável atenção dada a sua elevada ingestão na dieta humana associada a uma ampla variedade de potenciais efeitos benéficos para a saúde (Prior e Wu 2006). A sua biodisponibilidade tem sido alvo de

grande controvérsia, mas estudos recentes indicam que, apesar da sua limitada absorção, estes polifenóis glicosilados são absorvidos, logo após a ingestão, na sua forma nativa no estômago e intestino delgado, surgindo rapidamente na corrente sanguínea (Manach *et al.* 2005; McGhie e Walton 2007). Aliás, as baixas concentrações detectadas no plasma, na gama de valores entre os nM e μ M, são alcançadas através do consumo regular de antocianinas (Passamonti *et al.* 2003; Manach *et al.* 2005). Entre os seus efeitos benéficos, salientam-se as suas propriedades antiaterogénicas, evidenciadas quer em trabalhos experimentais (Xia *et al.* 2006; Mauray *et al.* 2010), quer em estudos epidemiológicos (McCune *et al.* 2011).

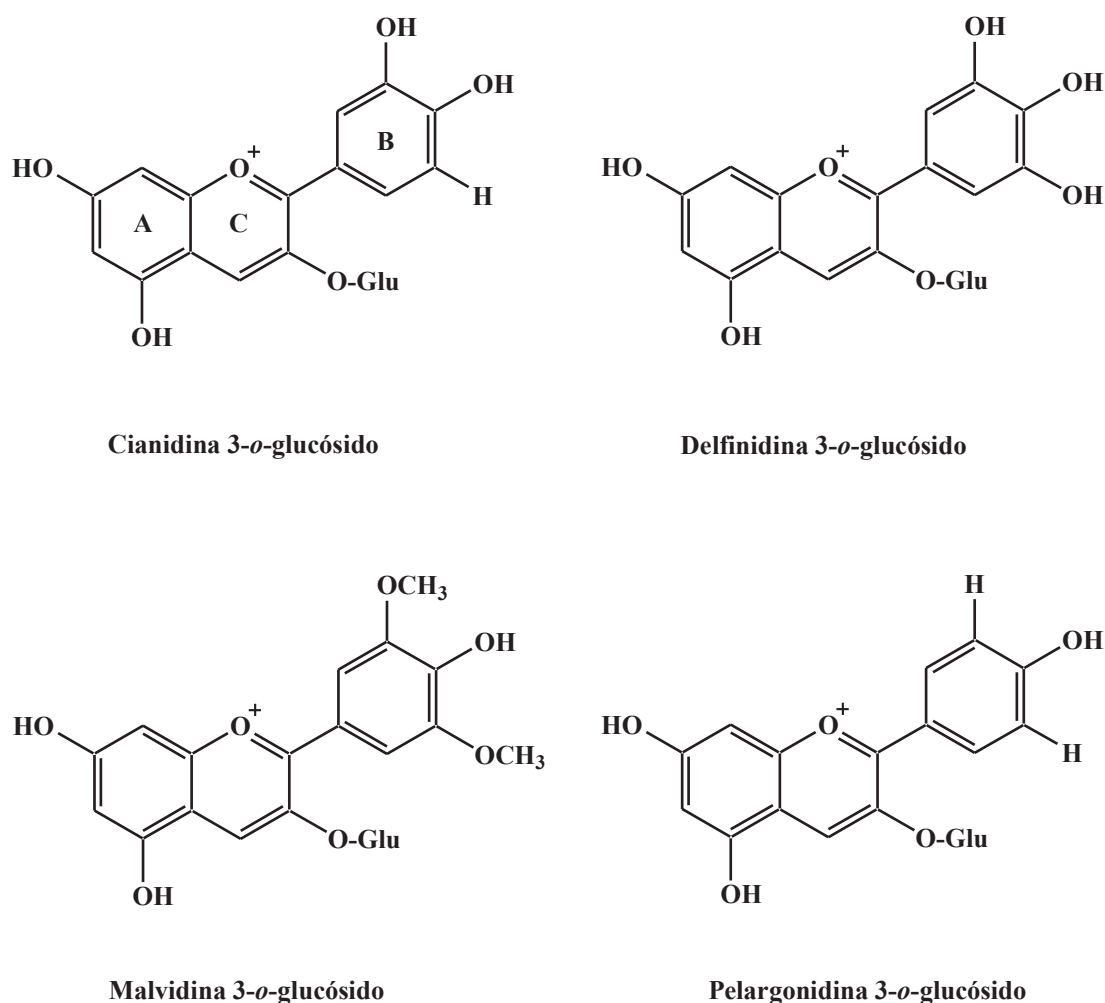


Figura 1. Estrutura química das antocianinas.

De facto, várias abordagens epidemiológicas, principalmente na última década, permitiram constatar que dietas ricas em frutos e vegetais se associavam a uma diminuição de doenças cardiovasculares (CVD) (Rissanen *et al.* 2003; Nothlings *et al.* 2008), estando as antocianinas favoravelmente implicadas nestes resultados (de Pascual-Teresa *et al.* 2010; McCune *et al.* 2011).

Embora a actividade biológica destes produtos naturais esteja intimamente relacionada com as suas propriedades antioxidantes, múltiplos estudos recentes têm apontado para outros mecanismos de acção para além dessa actividade neutralizadora de espécies reactivas, nomeadamente por interferência com importantes cascatas de sinalização celular e de regulação da expressão de genes (Mauray *et al.* 2010; McCune *et al.* 2011).

Evidências crescentes dão consistência ao papel protector das antocianinas ao nível vascular (Ghosh e Scheepens 2009; Grassi *et al.* 2009; He e Giusti 2010; McCune *et al.* 2011; Wallace 2011). Contudo, os mecanismos envolvidos não estão completamente clarificados. Recentemente, estudos efectuados no nosso laboratório demonstraram que o peroxinitrito desencadeia a apoptose em células endoteliais da aorta bovina, por depleção do GSH intracelular (Brito *et al.* 2006). Assim, neste trabalho, perspectivámos continuar a explorar as vias bioquímicas subjacentes à apoptose induzida pelo peroxinitrito em células endoteliais e, simultaneamente, avaliar a potencial protecção a esse nível proporcionada por quatro antocianinas com diferentes padrões de substituição no anel B, a cianidina-3-glucósido (Cy3glc), delphinidina-3-glucósido (Dp3glc), a malvidina-3-glucósido (Mv3glc) e a pelargonidina-3-glucósido (Pg3glc) (Figura 1). Desta forma, tentámos investigar novos mecanismos de citoprotecção contra a lesão endotelial desencadeada pelo peroxinitrito, que fossem para além da sua já conhecida actividade antioxidante *in vitro*, avaliando igualmente a contribuição dos diferentes padrões de substituição no anel B destes flavonóides para essa protecção. Assim, para além da actividade antioxidante das antocianinas em células sujeitas à agressão pelo peroxinitrito, avaliámos a sua potencialidade para proteger essas células da morte celular apoptótica, incidindo nos acontecimentos aquém e além dos eventos na mitocôndria. Os nossos resultados demonstram que todas as antocianinas testadas impedem o dano celular infligido pelo peroxinitrito, não só interrompendo a via de morte mitocondrial como também inibindo a translocação nuclear da Bax que ocorre em consequência do processo apoptótico e que foi demonstrada agora, pela primeira vez, em células endoteliais. Estes resultados indicam mecanismos adicionais através dos quais as antocianinas podem exercer protecção vascular no contexto da prevenção da aterosclerose.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

As antocianinas (cloreto de cianidina 3-*o*- β -glucósido, cloreto de delphinidina 3-*o*- β -glucósido, cloreto de malvidina 3-*o*- β -glucósido e cloreto de pelargonidina 3-*o*- β -glucósido)

purificadas a partir de produtos naturais foram adquiridas à Extrasynthèse (Genay, França). Todas apresentam um grau de pureza superior a 97%, segundo avaliação por HPLC, tendo sido utilizadas a partir de soluções em DMSO (5mM), armazenadas a -80°C, sob atmosfera de azoto. A concentração final de solvente nunca excedeu 1% do volume.

Os outros reagentes laboratoriais, nomeadamente a dihidrorodamina 123 (DHR123), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5-difeniltetrazólio (MTT), colagenase, gelatina, Hoechst 33258, substratos das caspase-3 (Ac-DEVD-AMC), caspase-8 (Ac-IETD-AMC), e caspase-9 (Ac-LEDH-AFC), diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA) e estreptomicina/penicilina, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co.

Para a cultura celular, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle medium*), tripsina 0,25%, soro fetal bovino (SFB) e tampão fosfato salino (PBS) pH 7.4, foram obtidos da Gibco-Invitrogen.

Os anticorpos monoclonais primários específicos produzidos em rato contra a Bax e os anticorpos secundários contra anticorpos de rato e coelho foram adquiridos à Abcam; os anticorpos primários monoclonais produzidos em rato contra a Bcl-2 e contra a lamina A e o anticorpo policlonal produzido em coelho contra a pAkt foram adquiridos à Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); o anticorpo monoclonal produzido em rato contra a β -actina foi obtido da Sigma-Aldrich Co.

2.2. Cultura primária de células endoteliais da aorta bovina

As células endoteliais da aorta bovina (BAEC) foram isoladas da aorta torácica por tratamento com colagenase (2 mg/mL). Resumidamente, secções de aorta foram cortadas e seladas com pinças-tesouras que, após lavagem com PBS, foram tratadas com colagenase por períodos de tempo entre os 3 e os 10 min e mantidas a 37°C. Após esse tempo, as células destacadas foram recuperadas para um tubo com meio de cultura, centrifugadas a 200 g durante 5 min e semeadas em caixas de 6 poços, previamente revestidas com gelatina de origem bovina 0,2%. As células foram posteriormente cultivadas em frascos de cultura T-75, revestidos com gelatina a 0,2%, em DMEM suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, a 37°C em incubadora com atmosfera humidificada e 5% de CO₂. As células endoteliais foram identificadas pela sua morfologia *cobblestone* típica, sub-cultivadas à confluência e utilizadas entre a quarta e a décima passagem. Previamente aos ensaios, as células com uma confluência aproximada de 80% foram privadas de SFB durante, pelo menos, 6 horas.

2.3. Síntese do peroxinitrito

O peroxinitrito foi sintetizado num reactor *quenched flow* como previamente descrito (Brito et al. 2006). Sucintamente, uma solução aquosa de NaNO_2 0,6 M foi rapidamente misturada com igual volume de H_2O_2 0,7 M em HCl 0,6 M e imediatamente *quenched* com o mesmo volume de NaOH 1,5 M. A solução assim obtida foi congelada a -20°C durante aproximadamente 24 h. A essa temperatura, o peroxinitrito, em resultado de um processo de congelamento fraccionado da solução, concentra-se numa camada superior de cor amarela intensa. Esta camada foi cuidadosamente removida e passada através de uma pequena coluna de MnO_2 a fim de remover o H_2O_2 residual de acordo com Uppo e coladoradores (Uppu *et al.* 1996). O peroxinitrito foi então armazenado em alíquotas a -80°C sob atmosfera de azoto. Imediatamente antes de cada utilização, o peroxinitrito após diluição em NaOH 1 M, foi quantificado espectrofotometricamente, com base na sua absorvidade molar a 302 nm ($\epsilon_{302}=1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.4. Tratamento das células com peroxinitrito

Nas experiências com peroxinitrito, as células foram previamente lavadas e equilibradas com PBS com cálcio e magnésio, pH 7.4, durante 5 minutos. Em seguida, o peroxinitrito, diluído em NaOH 10 mM recentemente preparado, foi adicionado às células numa dose única de 500 μM , contra a parede lateral do poço de cultura seguido de rápida agitação, por forma a uniformizar a exposição celular ao peroxinitrito antes da sua decomposição. Importa referir que, nesta fase as BAEC se encontram em PBS por forma a evitar reacções secundárias entre o peroxinitrito e os componentes do meio de cultura. Após 10 minutos de incubação, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS, adicionadas de DMEM sem SFB e assim mantidas durante os períodos de tempo necessários para os ensaios. Não se observaram alterações de pH durante o período de tempo de ensaio com o peroxinitrito, que nunca excedeu a duração de 6h. Volumes iguais de NaOH 10 mM (controlo do solvente) ou de peroxinitrito decomposto (em PBS ou NaOH, durante a noite) foram utilizados como controlos.

Nas experiências com as antocianinas, as células foram pré-incubadas com estes compostos durante 14 h, sendo invariavelmente removidas antes de submetidas à agressão, acabada de descrever, com o peroxinitrito.

2.5. Internalização das antocianinas pelas células endoteliais

As concentrações intracelulares das antocianinas foram determinadas por HPLC utilizando um Beckman System Gold equipado com detector 168-*diode array* (HPLC-DAD). Após

o período de incubação de 14 h com 25 μ M de antocianinas, as células foram colocadas em gelo e lavadas três vezes com PBS frio. Então, as células foram raspadas para uma mistura de H₂O/MeOH/HCl (84/14/1, v/v) e submetidas a 5 ciclos de congelação/aquecimento (N₂ líquido/37°C). Após centrifugação, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -20°C. A concentração de proteína foi determinada com reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, EUA), baseada no método de Bradford. Ensaios controlo, na ausência de células foram preparados nas mesmas condições.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Lichrocart C18 de fase reversa (150 x 4 mm ID, dimensão de partícula de 5 μ m, da Merck) associada com uma coluna de guarda, Lichrosphere Si60 (4 x 45 mm, Merck).

Alíquotas (20 μ L) de extracto foram manualmente injectadas no sistema de HPLC. A separação das antocianinas foi conseguida recorrendo a um programa de gradiente binário. Utilizou-se uma fase móvel constituída por uma mistura de acetato de sódio 25 mM em água (A), e acetato de sódio 25 mM em metanol (B), ajustadas a pH 2 com ácido tricloroacético. O gradiente consistiu em 35% de B, 5 min, 50% de B, 10 min, 60% de B, 10 min e finalmente, 30% de B, 10 min, mantido até à injeção seguinte. Estes compostos foram identificados e quantificados com base na comparação cromatográfica com padrões.

2.6. Avaliação da morfologia nuclear

As células submetidas ao protocolo descrito no ponto anterior foram fixadas com paraformaldeído a 4% (p/v) durante 10 min à temperatura ambiente e subsequentemente coradas com Hoechst 33258 (5 μ g/mL) durante 10 min, à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, procedeu-se à montagem com lamela em PBS:glicerol (3:1, v/v), antes da observação em microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 40, Oberkochen, Alemanha), com recurso a um filtro DAPI da Zeiss. As alterações morfológicas foram avaliadas em, pelo menos, nove campos diferentes (400x) por amostra, perfazendo entre 80-100 células por campo. Os núcleos marcados foram considerados apoptóticos de acordo com a condensação da cromatina e fragmentação nuclear. O número de células apoptóticas foi expresso como percentagem em função do total de células contadas.

2.7. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2,5-difeniltetrazólio (MTT) a formazana, levada a cabo pelas desidrogenases celulares em células metabolicamente activas (Denizot e Lang 1986). Após incubação com as diferentes concentrações de antocianinas (12.5, 25, 50 e 100 μ M), durante 14 h, as células semeadas em caixas de 6 poços (0.5 x

10^6 células/poço), foram lavadas com PBS e incubadas com MTT (0.5mg/mL) em meio de cultura sem SFB, durante 1h, na incubadora, nas condições já descritas. Em seguida, o meio foi removido e os cristais de formazana formados foram dissolvidos em DMSO (300 μ L/poço). A extensão da redução do MTT a formazana foi quantificada através da determinação da absorvência a 550 nm num leitor de placas (Synergy HT). Os resultados foram expressos como percentagem das células controlo.

2.8. Avaliação da actividade antioxidante das antocianinas

2.8.1. Ensaio da oxidação da dihidrorodamina

A actividade *scavenger* do peroxinitrito por parte das antocianinas foi determinada através do ensaio da oxidação da dihidrorodamina 123 (DHR 123), medindo a diminuição de fluorescência devida à inibição da oxidação da DHR 123 a rodamina 123, de acordo com a descrição de Kooy *et al.* (Kooy *et al.* 1994) com alterações mínimas. As antocianinas (solução stock de 5 mM) e a DHR 123 (solução stock 5.78 mM) foram dissolvidas em DMSO e armazenadas a -80°C em atmosfera de azoto. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente em tampão fosfato salino pH 7.4 (Na_2HPO_4 50 mM, KCl 5 mM, NaCl 90 mM e DTPA 100 μ M). Resumidamente, alíquotas de DHR 123 foram adicionadas, numa concentração de 25 μ M, a cada antocianina (2-10 μ M) em tampão fosfato salino com DTPA 100 μ M a 37°C . Após a adição de peroxinitrito (1.2 μ M em NaOH 0.1 M), a intensidade de fluorescência da DHR 123 oxidada foi medida num espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B, com comprimentos de onda de excitação e de emissão de 500 e 536 nm (fendas de excitação e de emissão de 2.5 e 3), respectivamente. Todos os ensaios foram efectuados a 37°C numa cuvete termostaticada e com agitação. O ensaio controlo (DHR 123 mais ONOO^-) corresponde ao máximo de oxidação da DHR 123 (100%). Na presença das antocianinas, a intensidade de fluorescência medida foi expressa em percentagem relativamente ao controlo. O peroxinitrito decomposto em tampão salino não interferiu com a oxidação da DHR 123. A quercetina foi utilizada como composto de referência.

2.8.2. Ensaio de oxidação das LDL

2.8.2.1. Isolamento das LDL

As lipoproteínas de baixa densidade humanas foram isoladas a partir de plasma fresco por ultracentrifugação em gradiente de densidade e armazenadas a -80°C em atmosfera de

azoto, como anteriormente descrito (Vieira *et al.* 1996). Sucintamente, o plasma foi obtido por centrifugação das amostras de sangue a 2500 g, 15 min, 15°C. Em seguida, o plasma adicionado de EDTA 1 mM foi ultracentrifugado numa ultracentrífuga Beckman L80, equipada com um rotor de ângulo fixo 70.1 Ti, a 65 000 rpm, durante 3 h a 15°C, e a fracção de LDL recolhida por sucção. Para minimizar a oxidação das LDL durante o processo de isolamento todos os tampões utilizados foram saturados com azoto. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.* 1951) com albumina bovina sérica como padrão. As alíquotas de LDL foram armazenadas a -80°C sob atmosfera de azoto.

2.8.2.2. Oxidação das LDL avaliada pela formação de dienos conjugados

A oxidação das LDL foi promovida por radicais peroxilo gerados a uma velocidade constante pela decomposição térmica do composto azo-iniciador, AAPH. A cinética da peroxidação lipídica, foi seguida pela formação de dienos conjugados, determinados espectrofotometricamente num espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 6 UV/Vis (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., EUA), através da monitorização contínua da absorvência a 234 nm. As partículas de LDL (45 µg de proteína) foram adicionadas a 2 mL de tampão (Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 110 mM, DTPA 100 µM, pH 7.4) contendo AAPH 5 mM, numa cuvete termostatizada a 37°C com dispositivo magnético de agitação, sendo a absorvência monitorizada durante 180 min na presença ou ausência das antocianinas (2 µM), adicionadas ao tampão imediatamente antes da adição das LDL. Os resultados foram expressos em termos de *lag phase* inicial do processo de oxidação, devida à presença da antocianina em estudo. Assim, a *lag phase* foi utilizada para avaliar a actividade antioxidante das antocianinas, directamente relacionada com a resistência das LDL à oxidação e foi determinada traçando uma tangente à fase de propagação da curva e extrapolando esta linha através do eixo horizontal. Os resultados foram expressos em percentagem do aumento da *lag phase* comparativamente ao controlo.

2.8.3. Determinação das espécies reactivas intracelulares

A produção intracelular de espécies reactivas foi avaliada recorrendo ao diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA), uma sonda não fluorescente que consegue permeiar as membranas celulares e pode ser oxidada por espécies reactivas, originando o composto

fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), tal como foi previamente descrito (Halliwell e Whiteman 2004; Whiteman *et al.* 2004).

De forma sucinta, as células semeadas em caixas de 24 poços (1×10^5 células/poço), foram previamente incubadas com ou sem cada uma das antocianinas ($25 \mu\text{M}$) e posteriormente submetidas à agressão com o peroxinitrito, de acordo com o protocolo do ponto 2.4. Vinte minutos antes do final de cada tempo de incubação, as células foram incubadas com DCFHDA $2 \mu\text{M}$, preparada em DMEM sem soro e ao abrigo da luz. Após este procedimento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas neste tampão durante a sua observação num microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 40). A determinação das intensidades de fluorescência foi efectuada num leitor de placas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc, EUA) (comprimentos de onda de excitação, 485 nm e de emissão, 530 nm). Os resultados foram expressos como percentagem das células tratadas com peroxinitrito sem pré-incubação com antocianinas.

2.8.4. Avaliação da formação de grupos carbonilo

Os processos oxidativos celulares promovidos pelo peroxinitrito foram também avaliados em termos de formação de grupos carbonilo. As células tratadas foram lisadas em tampão HBS pH 7.5, suplementado com 1% de mistura de inibidores de proteases e fosfatases. Após 5 ciclos de congelamento/fusão (N_2 líquido/ 37°C), os lisados foram centrifugados a $15000g$ durante 20 min a 4°C e os sobrenadantes (extractos totais) foram recolhidos e armazenados a -20°C . A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford, utilizando reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, EUA).

O conteúdo em carbonilos foi determinado em duplicado usando um ensaio colorimétrico tradicional (Levine *et al.* 1994). Sucintamente, $800 \mu\text{g}$ de proteína foram incubadas com $500 \mu\text{L}$ de 2,4-dinitrofenilhidrazina a 0.2% (DNPH) em HCl 2 N, durante 1h ao abrigo da luz, sendo os ensaios controlo preparados somente com HCl 2N. As amostras e os ensaios controlo foram sujeitos a precipitação pela adição de volumes iguais de ácido tricloroacético a 20%, seguida de centrifugação a $10\ 000 g$ durante 5 min, a 4°C . Após rejeição dos sobrenadantes, os *pellets* foram submetidos a três lavagens de 10 min com etanol:acetato de etilo (1:1, v/v), e agitando em vórtex cada 3 min, durante todo o processo. As amostras foram depois centrifugadas a $10000 g$, 3 min, 4°C . Os *pellets* assim obtidos foram ressuspensos em 0.5 mL de guanidina-HCl 6 M, e o conteúdo em carbonilos foi determinado medindo a absorvência das hidrazonas formadas a 370 nm. Os resultados foram calculados em $\mu\text{moles carbonilo/mg}$ proteína usando um coeficiente de extinção molar de $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressos em percen-

tagem do controlo, isto é, das células incubadas em condições similares sem peroxinitrito e sem antocianina.

2.9. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) é um indicador indiscutível de apoptose e foi avaliada utilizando a sonda fluorescente iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1). Trata-se de uma sonda catiónica lipofílica que se acumula na mitocôndria de modo dependente do potencial, o que é evidenciado por uma alteração na emissão de fluorescência do verde (525 nm) para o vermelho (590 nm) (Reers *et al.* 1991).

As células semeadas em caixas de 24 poços foram pré-incubadas com as antocianinas e tratadas com o peroxinitrito tal como se descreveu em 2.4. Nos tempos indicados, os sobrenadantes foram removidos e as células foram incubadas com JC-1 (2 $\mu\text{g/mL}$) a 37°C, durante 20 min. Após esta marcação fluorescente, as células foram lavadas com PBS e visualizadas num microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 40 com um filtro FITC. Os quocientes entre as intensidades de fluorescência vermelha/verde foram igualmente calculados com base nas intensidades de fluorescência dos agregados J, acumulados na mitocôndria (excitação 550 nm; emissão 600 nm), e os monómeros que permaneceram no citoplasma (excitação 485 nm; emissão 535 nm). As intensidades de fluorescência foram medidas num leitor de placas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc, EUA).

2.10. Determinação da Bax nuclear por imunocitoquímica

Após incubação das células nas condições genéricas já especificadas, elas foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% (p/v) durante 10 min à temperatura ambiente. Seguiu-se o bloqueio e a permeabilização com PBS contendo 0,1% de saponina e 5% de SFB durante 30 min, e a incubação com um anticorpo monoclonal produzido em rato contra a Bax (1:100), durante 2 h à temperatura ambiente. As células foram depois lavadas três vezes com PBS e incubadas, durante 2 h, com o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor-488 (1:1000) (Molecular Probes, EUA). Os núcleos foram marcados com Hoechst 33258. As células foram novamente lavadas, colocadas sob lamela com Moviol e observadas num microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 40) utilizando um filtro DAPI e FITC (Zeiss). O processamento de imagem foi efectuado com o programa de análise Image J (NIH). Todas as imagens de fluorescência são representativas de pelo menos três experiências independentes.

2.11. Determinação da actividade das caspases

Após a pré-incubação das células com as antocianinas e o tratamento com peroxinitrito, o meio foi removido, as células lavadas duas vezes com PBS, raspadas sobre gelo, em tampão de lise [ácido etilenodiaminotetracético sódico (Na-EDTA) 1 mM, Na-EGTA 1 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2 mM, HEPES 25 mM (pH 7.5) suplementado com CHAPS 0.1% (p/v), PMSF 100 mM, DTT 2 mM e mistura de inibidores de proteases 1:100 (v/v)] e mantidas neste tampão em gelo, durante 20 min. Após 5 ciclos de congelamento/fusão (azoto líquido/37°C), as células assim lisadas foram centrifugadas a 14 000 g durante 10 min a 4°C, e os sobrenadantes recolhidos foram armazenados a -80°C. Para determinar a actividade das caspases, alíquotas de lisados contendo 25 µg de proteína foram adicionadas a um tampão de reacção (HEPES 25 mM, pH 7.5 suplementado com CHAPS 0.1% (p/v), DTT 5 mM e PMSF 100 mM). As reacções enzimáticas foram iniciadas pela adição do adequado substrato fluorogénico (100 µM) contendo locais específicos de hidrólise, nomeadamente DEVD para a caspase-3, IETD para a caspase-8 e LEDH para a caspase-9, ligados a um fluorocromo, em concreto ao AMC para a caspase-3 e -8, ou ao AFC para a caspase-9. Após incubação durante 150 min a 37°C, a libertação do AMC ou AFC a 380/460 nm ou 400/505 nm (excitação/emissão), respectivamente, foi determinada por medições de fluorescência num leitor de placas Synergy HT. As actividades das caspases foram expressas como percentagem do valor nas culturas celulares sujeitas ao insulto com o peroxinitrito.

2.12. Determinações por Western Blot

A expressão proteica foi avaliada por Western blot. Os extractos celulares foram lisados numa solução contendo 300 µl de Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM, Nonidet P-40 0.5% (v/v) e mistura de inibidores de proteases a 1%, pH 7.5, durante 10 min, em gelo. Os lisados foram centrifugados a 5000 g durante 5 min a 4°C e os sobrenadantes (extractos citoplasmáticos) foram recolhidos e armazenados a -20°C. O *pellet* foi dissolvido em 40 µL de uma solução contendo Hepes 20 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM, NaCl 300 mM, glicerol a 20% e mistura de inibidores de proteases a 1%, pH 7.5, mantido 20 min em gelo e posteriormente centrifugado a 16 000 g, durante 20 min a 4°C, obtendo-se assim os extractos nucleares. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, utilizando reagentes da Bio-Rad.

As proteínas (30 µg), reduzidas e desnaturadas, foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida de 10% (v/v), na presença de SDS (SDS/PAGE) (intensidade de corrente constante de

20 mA por gel) e transferidas para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Amersham Biosciences), durante 2 h a 200 mA. Para evitar ligações inespecíficas, as membranas foram bloqueadas durante 1h em leite magro a 5% (p/v) em tampão TBS suplementado com Tween 20 a 0,1% (v/v) (TBS-T: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, v/v). Após esse período de tempo, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra a Bax (2 h, temperatura ambiente), Bcl-2 (2 h, temperatura ambiente) ou pAkt (durante a noite a 4°C). Após intensa lavagem com TBS-T, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com a fosfatase alcalina (1 h, temperatura ambiente). Os complexos imunoreactivos foram detectados por quimiofluorescência, após tratamento com ECF (*enhanced chemifluorescent reagent*) (Amersham Biosciences), num sistema de imagem Typhoon 9000 (Amersham Biosciences). A β -actina ou a lamina A foram usadas como controlos internos para as proteínas citoplasmáticas e nucleares, respectivamente. As bandas foram analisadas e quantificadas utilizando o *software* ImageQuant TM da Amersham Biosciences.

2.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm SEM do número de experiências indicado nas legendas das respectivas figuras. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *one-way analysis of variance*, seguida do teste de Dunnet, Bonferroni ou Tukey, conforme apropriado. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. As antocianinas protegem as células endoteliais da apoptose desencadeada pelo peroxinitrito

Os efeitos protectores das antocianinas em estudo contra a morte das células endoteliais mediada pelo peroxinitrito, foram avaliados em BAEC pré-incubadas com diferentes concentrações destes compostos (12.5 e 25 μ M) e tratadas posteriormente com peroxinitrito, de acordo com o que está descrito nos “Materiais e Métodos”. Tal como se observa na Figura 2A, 6 h após o tratamento celular com peroxinitrito 500 μ M autêntico, verifica-se cerca de 30% de morte apoptótica, de acordo com as alterações morfológicas visualizadas através da marcação com a sonda nuclear Hoechst, concretamente, condensação e fragmentação nuclear, enquanto que nas células não tratadas não se detectam quaisquer alterações (< 2%). No entanto, a pré-incubação das células com 12.5 ou 25 μ M de antocianinas reduziu de forma significativa a extensão da apoptose mediada pelo

peroxinitrito. Na mesma figura, observa-se que, embora estes flavonóides, para ambas as concentrações, evitem consideravelmente a morte apoptótica, os valores mais elevados de protecção foram obtidos para a Pg3glc e Cy3glc 25 μM com cerca de 80 e 70%, respectivamente. Para as restantes condições experimentais, as antocianinas, de uma forma dependente da dose, também reverteram o processo apoptótico, alcançando percentagens superiores a 50%.

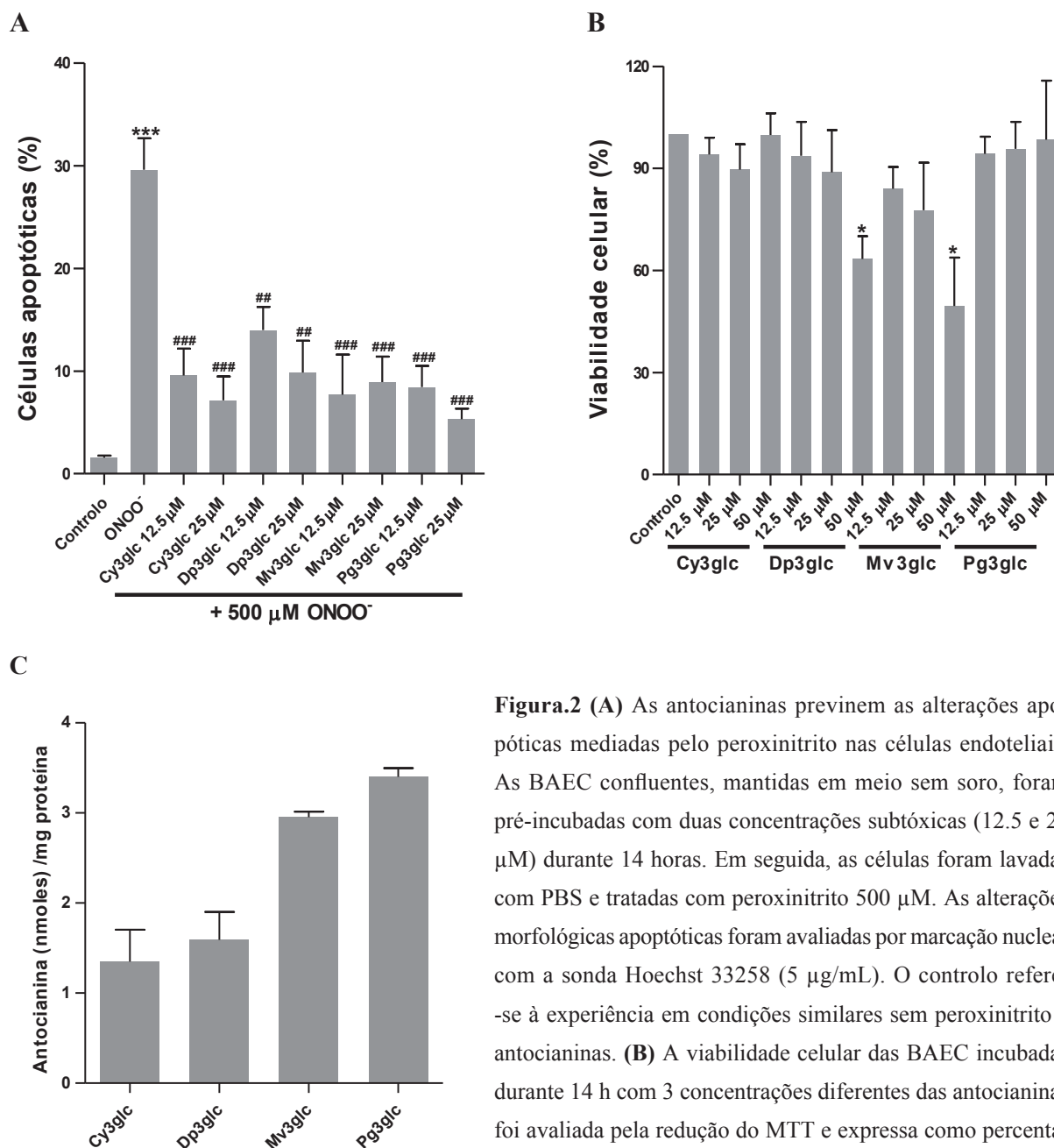


Figura.2 (A) As antocianinas previnem as alterações apoptóticas mediadas pelo peroxinitrito nas células endoteliais. As BAEC confluentes, mantidas em meio sem soro, foram pré-incubadas com duas concentrações subtóxicas (12.5 e 25 μM) durante 14 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e tratadas com peroxinitrito 500 μM . As alterações morfológicas apoptóticas foram avaliadas por marcação nuclear com a sonda Hoechst 33258 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O controlo refere-se à experiência em condições similares sem peroxinitrito e antocianinas. (B) A viabilidade celular das BAEC incubadas durante 14 h com 3 concentrações diferentes das antocianinas foi avaliada pela redução do MTT e expressa como percentagem das células controlo. Os resultados representam o valor

médio \pm SEM de pelo menos 5 ensaios independentes, cada um em duplicado. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs controlo, i.e. ensaio com células, sem antocianinas nem peroxinitrito; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs ONOO⁻, ensaio com células adicionadas de peroxinitrito, sem antocianinas (C) Quantidade de antocianinas internalizada pelas células endoteliais, após incubação com a concentração máxima utilizada (25 μM), obtida por HPLC, de acordo com o descrito em “Materiais e Métodos”.

Importa salientar que, durante o período de agressão com o peroxinitrito e posteriormente, as antocianinas não se encontram presentes no meio. Para além disso, é de referir que, durante o tempo de experiência, mesmo na concentração mais alta utilizada, nenhuma antocianina interferiu com a viabilidade celular das BAEC, de acordo com o teste de MTT (Figura 2B).

As antocianinas, para a mesma concentração, internalizam nas células endoteliais em concentrações muito díspares (Figura 2C) indicando que a análise da capacidade protectora destes compostos poderá ser influenciada, não apenas pelas suas características químicas, mas também pelo seu *uptake* intracelular.

3.2. As antocianinas apresentam elevada capacidade *scavenger* de espécies reactivas

3.2.1. Capacidade *scavenger* do peroxinitrito

Devido à sua estrutura química particular, as antocianinas são altamente reactivas perante radicais livres e outras espécies reactivas, mas o seu papel como antioxidantes fisiológicos tem sido questionado dada a sua instabilidade a pH neutro. Assim, por forma a esclarecer e correlacionar a protecção proporcionada pelas antocianinas, perante o dano endotelial induzido pelo peroxinitrito com a sua actividade antioxidante, elucidando quais as características estruturais requeridas para essa protecção, avaliou-se a sua capacidade *scavenger* do peroxinitrito e de radicais peroxilo resultantes do AAPH, em termos de inibição da oxidação da dihidrorodamina (DHR) e das LDL, respectivamente.

Como se verifica na Figura 3, as antocianinas em concentrações muito baixas (2-10 μM), diminuíram consideravelmente a percentagem de oxidação da DHR 123 mediada pelo peroxinitrito, demonstrando uma elevada capacidade destes compostos naturais em neutralizar este potente oxidante, de uma forma dependente da concentração. A Dp3glc e a Cy3glc apresentaram os menores valores de IC_{50} , 2.25 e 2.43 μM , respectivamente, seguindo-se a Mv3glc (IC_{50} 2.9 μM) e a Pg3glc com o valor mais elevado, 4.36 μM , evidenciando a relevância do grupo catecol e do número de substituintes hidroxilo no anel B. A utilização de bicarbonato neste ensaio não alterou, de forma significativa, os valores de IC_{50} (resultados não apresentados).

A quercetina, usada como composto de referência, apresentou o menor IC_{50} , confirmando o seu elevado efeito *scavenger* do peroxinitrito.

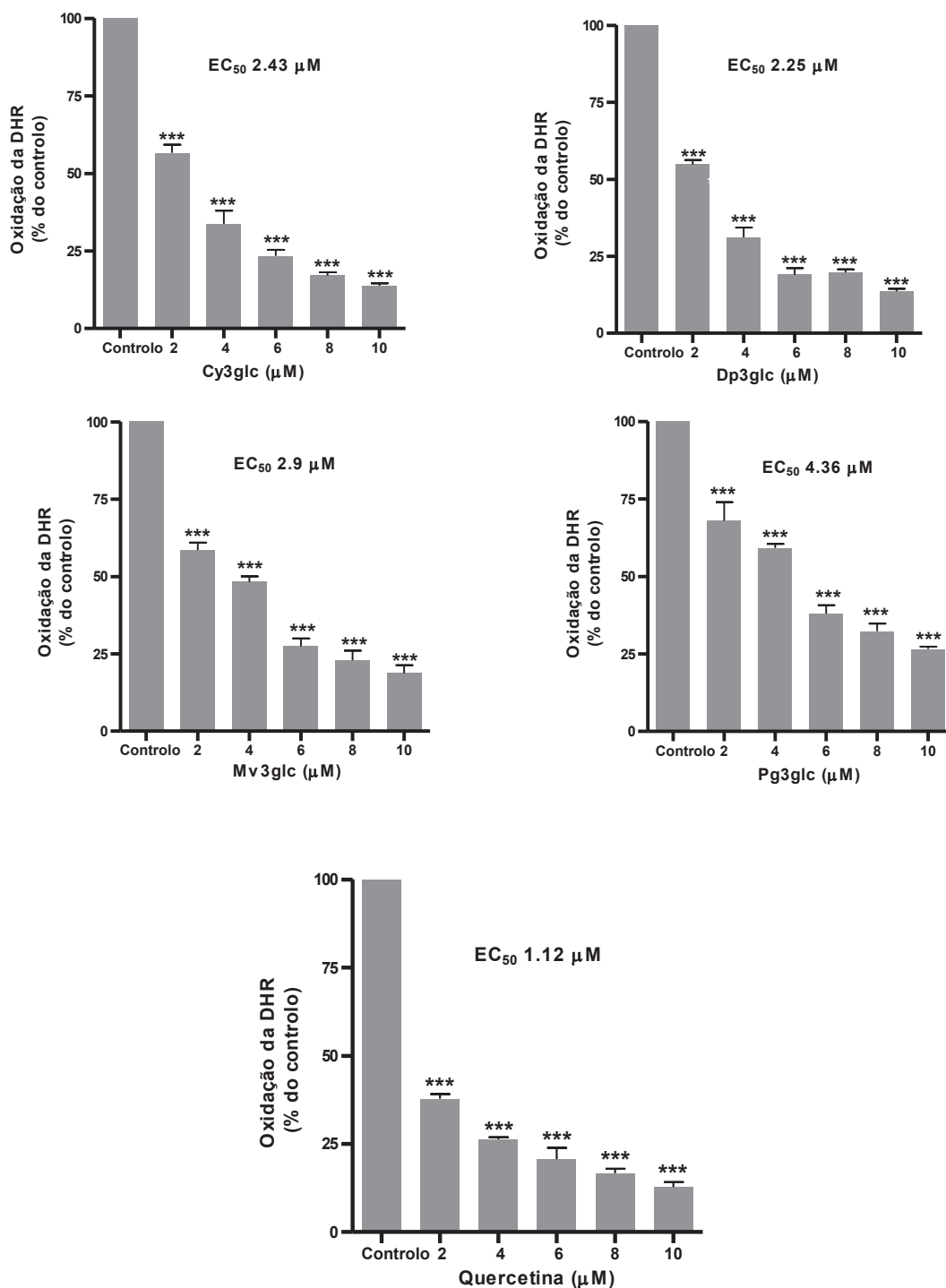


Figura 3. As antocianinas inibem eficazmente a oxidação da DHR 123 induzida pelo peroxinitrito. Sucintamente, DHR 123 25 μM foi adicionada às antocianinas em estudo ou à quercetina, usada como composto de referência, a 37°C. Após a adição de peroxinitrito 2 μM a fluorescência foi imediatamente determinada, de acordo com o descrito em “Materiais e Métodos”. Estas determinações de fluorescência foram expressas em percentagem em relação à fluorescência do controlo (reação na ausência de antocianinas ou quercetina). Os resultados representam o valor médio \pm SEM de pelo menos 5 experiências independentes *** $P < 0.001$ vs controlo.

3.2.2. Diminuição da oxidação das LDL mediada por radicais peróxido

A formação de dienos conjugados na componente lipídica das LDL proporciona informação acerca da susceptibilidade destas lipoproteínas à degradação por dano oxidativo mediado por radicais livres e outras espécies oxidantes. De facto, no nosso modelo experimental, um prolongamento do período de inibição inicial da formação de dienos conjugados (*lag phase*), significa uma resistência aumentada das LDL à agressão oxidante. O tempo que decorre até à formação de dienos conjugados em LDL submetidas à oxidação mediada pelo AAPH (controlo) apresentou um característico período de inibição inicial de cerca de 35 min, o qual foi significativamente prolongado na presença de concentrações muito reduzidas de antocianinas (Figura 4). De facto, na presença de apenas 2 μM dos referidos compostos, a *lag phase* apresentou uma duração de cerca de 80 e de 65 min para a Cy3glc e Mv3glc, respectivamente, valores que duplicam os do controlo, evidenciando, uma elevada capacidade *scavenger* dos radicais peróxido gerados pelo AAPH por parte destes flavonóides. Importa esclarecer que o recurso ao AAPH constitui uma estratégia reconhecidamente utilizada e validada como indutor da peroxidação lipídica, justificando a sua utilização isolada neste ensaio.

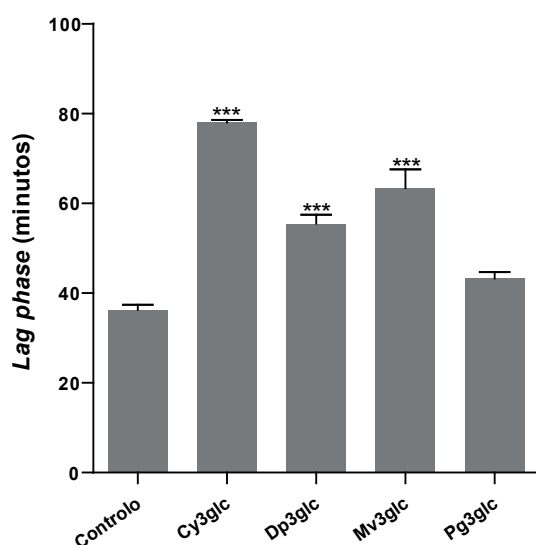


Figura 4. As antocianinas, em reduzidas concentrações (2 μM) protegem eficazmente as LDL contra os danos oxidativos mediados pelo AAPH, aumentando de forma significativa o período inicial de inibição da formação de dienos conjugados, evidenciando a sua elevada capacidade *scavenger* de radicais peróxido. Os resultados representam o valor médio \pm SEM de pelo menos 4 experiências independentes; *** $P < 0.001$ vs controlo.

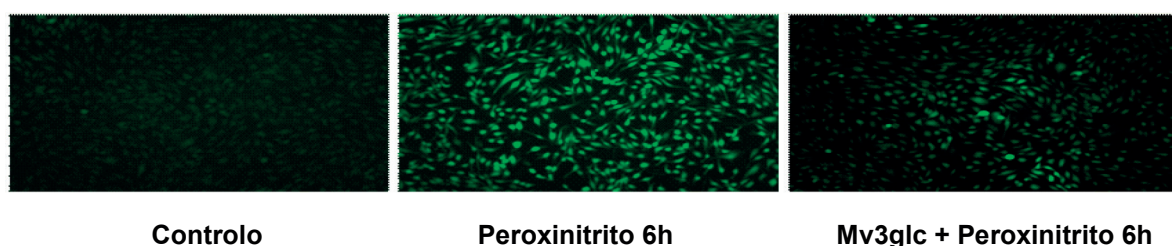
3.3 As antocianinas inibem a formação de espécies reactivas e de grupos carbonilo em células endoteliais submetidas à agressão pelo peroxinitrito

É um facto estabelecido que um aumento na produção celular de espécies reactivas oxidantes pode ser avaliado pela intensidade de fluorescência da diclorofluoresceína (DCF), como resultado da oxidação da molécula polar não fluorescente, diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA). Este composto é passivamente acumulado nas células e, nessas circunstâncias, as esterases intracelulares clivam o grupo diacetato originando DCFH, que se distribui no citosol e pode ser oxidada a DCF por uma série de espécies reactivas (Murrant e Reid 2001). A extensão da

oxidação é indicada por um aumento na fluorescência da DCF, o que constitui um índice da formação celular de compostos reactivos oxidantes.

Uma análise cinética da produção de espécies reactivas oxidantes que se seguiu à agressão com o peroxinitrito, revelou um aumento do *stress* oxidativo intracelular logo às 3 h após o insulto oxidante, continuando a aumentar até às 6 h, como indicado pelo aumento da fluorescência da DCF (Figura 5, *inset*). Para todos os tempos testados, esta fluorescência foi atenuada nas células pré-incubadas com as antocianinas antes da agressão com o peroxinitrito, como se exemplifica na figura 5, para as 6 h de incubação após a adição de peroxinitrito. A Cy3glc e a Dp3glc apresentaram a maior capacidade antioxidante, reduzindo a intensidade de fluorescência em cerca de 30%. Como era expectável, a Pg3glc, monofenólica, demonstrou ser a menos eficaz, neste aspecto, com uma redução de cerca de 16%, seguindo-se a Mv3glc com aproximadamente 20%.

A



B

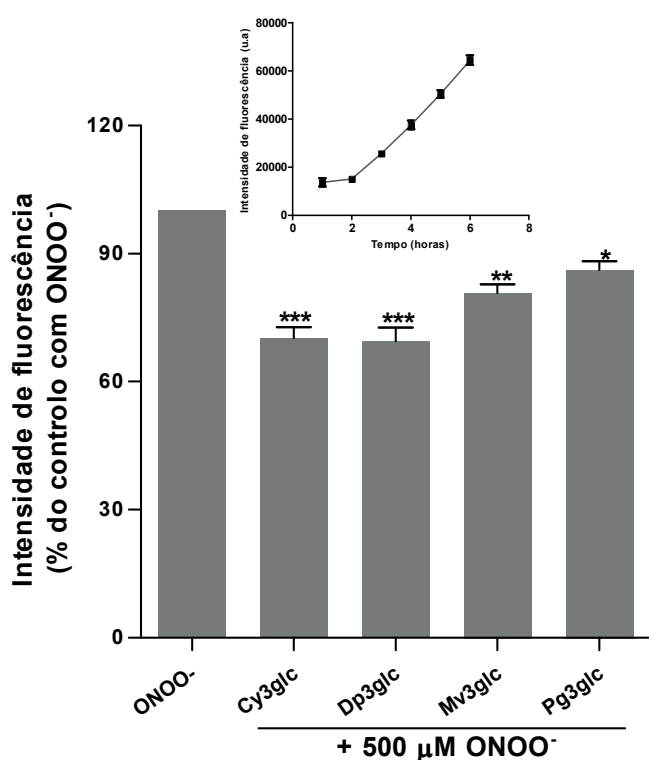


Figura 5. As antocianinas diminuem a produção de espécies reactivas induzida pelo peroxinitrito, em células endoteliais. As BAEC, pré-incubadas com antocianinas 25 μ M, foram posteriormente submetidas à agressão com peroxinitrito, o qual foi cuidadosamente removido após 10 min de incubação, tal como descrito nos “Materiais e Métodos”. Às 6 h de incubação, a produção de espécies reactivas foi aferida através da fluorescência devida à presença de DCF. (A) Imagens das células endoteliais, na ausência e presença de Mv3glc 25 μ M, exemplificativas do comportamento de todas as antocianinas estudadas, obtidas por microscopia de fluorescência (400x). (B) Os resultados foram expressos em termos de intensidade de fluorescência de DCF, como percentagem de células controlo tratadas com peroxinitrito, sem antocianinas. O gráfico em *inset* representa a cinética da produção de espécies

reactivas que se segue ao insulto com peroxinitrito. Os resultados representam o valor médio \pm SEM de pelo menos três experiências independentes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs controlo.

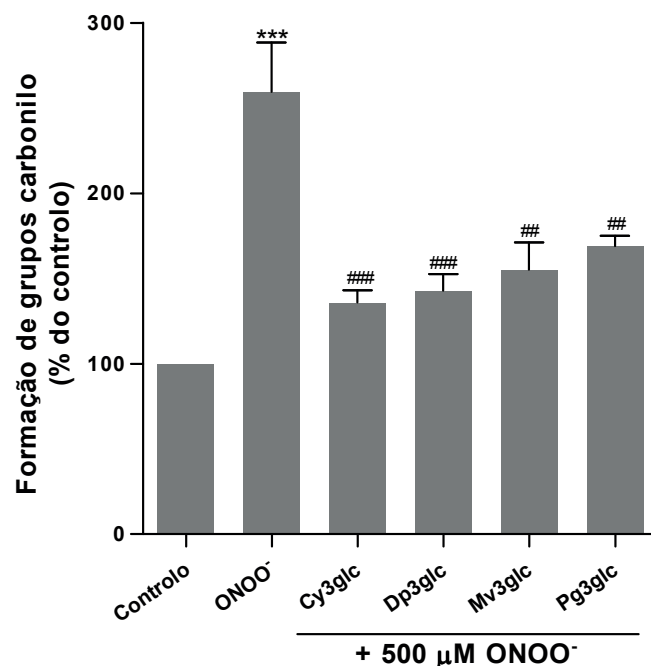


Figura 6. As antocianinas diminuem a formação de grupos carbonilo induzida pelo peroxinitrito, em células endoteliais. A formação de grupos carbonilo foi avaliada em extractos celulares totais, tal como referido nos “Materiais e Métodos”. Os resultados representam o valor médio \pm SEM de pelo menos três experiências independentes *** $P < 0.001$; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs ONOO⁻.

Por outro lado, a formação de grupos carbonilo proteicos nas células endoteliais tratadas com peroxinitrito, foi igualmente avaliada. Trata-se de um reconhecido indicador da oxidação de proteínas, útil para estimar a extensão do dano oxidativo desencadeado pelo peroxinitrito às proteínas (Shacter 2000). Nas células endoteliais submetidas ao peroxinitrito, observou-se um aumento de cerca de 150% na formação de grupos carbonilo, conforme resultados do ensaio com a DNPH (Figura 6) (Levine *et al.* 1990). Quando pré-incubadas com as antocianinas, verificou-se uma redução significativa da formação destes produtos de oxidação com valores que oscilam sempre em torno dos 100% relativamente às células tratadas com peroxinitrito.

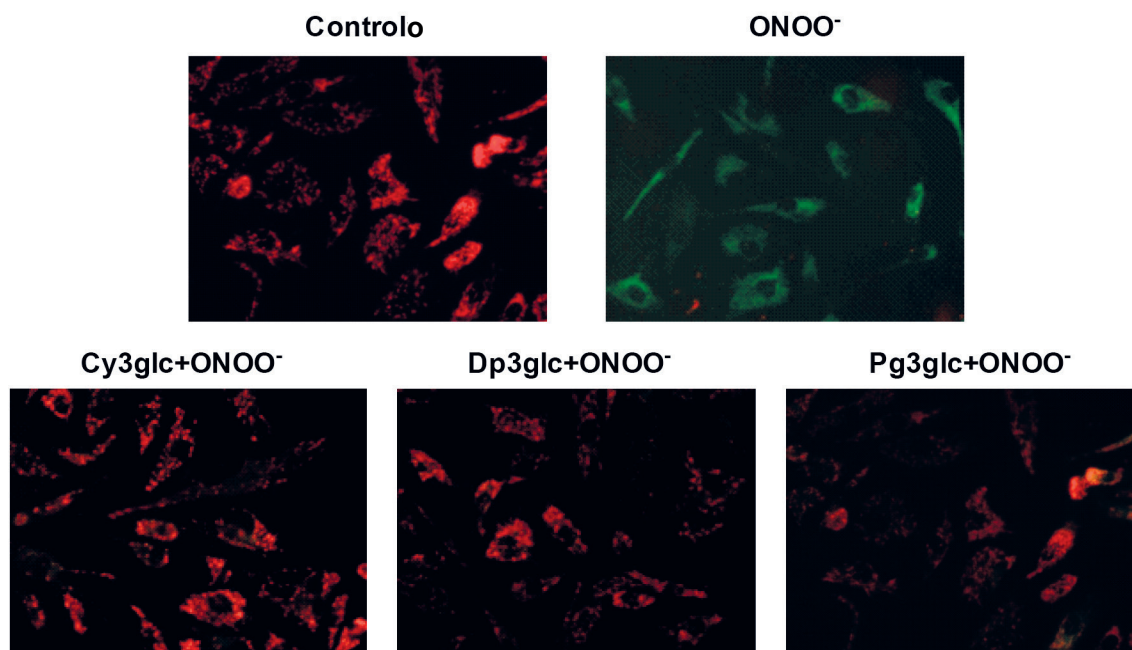
Embora as capacidades de protecção da formação dos grupos carbonilo evidenciadas pelas quatro antocianinas sejam mais expressivas que as da formação das espécies reactivas (Figura 5), os perfis de protecção são relativamente semelhantes, com as maiores actividades expressas pela Cy3glc e Dp3glc e a menor pela Pg3glc.

3.4. As antocianinas previnem a dissipação do potencial de membrana mitocondrial provocado pelo peroxinitrito

Por forma a determinar se a inibição da perda de integridade mitocondrial contribui para os efeitos antiapoptóticos das antocianinas, foram monitorizadas as alterações no potencial de membra-

na mitocondrial com a sonda fluorescente JC-1 após a adição do peroxinitrito. Nas células viáveis que apresentam elevado potencial de membrana mitocondrial, a JC-1 monomérica acumula-se na mitocôndria, agrega e emite uma fluorescência vermelha, enquanto que nas células em processo de apoptose se verifica o colapso do potencial de membrana mitocondrial e a JC-1 não consegue aí acumular-se permanecendo no citoplasma numa forma monomérica com fluorescência verde (Figura 7A).

A



B

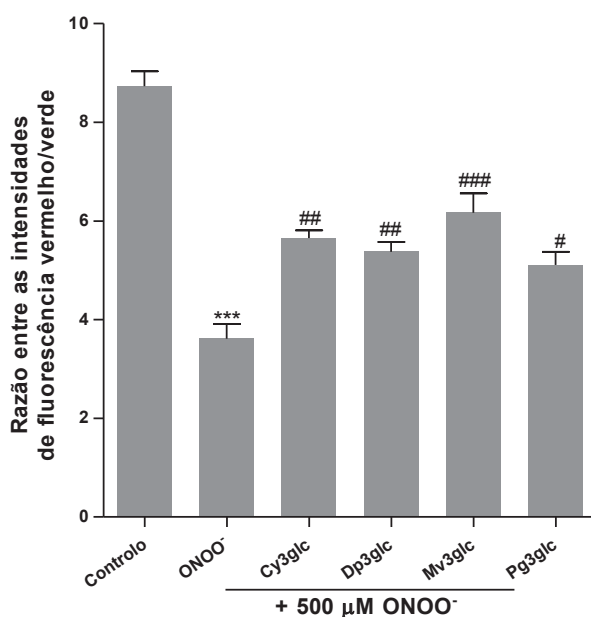


Figura 7. Recuperação do potencial de membrana mitocondrial na presença das antocianinas. As BAEC pré-incubadas ou não com antocianinas 25 μM foram tratadas com peroxinitrito durante 6 h, como referido nos “Materiais e Métodos”. Vinte minutos antes do final de cada tempo de incubação, a sonda JC-1 (concentração final de 2 μg/mL) foi adicionada ao meio e incubada durante 20 min, 37°C, ao abrigo da luz. Após este tempo, o meio foi substituído por DMEM fresco sem soro e as células são visualizadas imediatamente num microscópio de fluorescência (400x), como evidenciado pelas imagens representativas (A). As intensidades de fluorescência dos monómeros (verde) e dos agregados J (vermelhos), das mesmas culturas de células, foram também avaliadas num leitor de placas (B). A despolarização mitocondrial está indicada por uma diminuição da razão entre as intensidades de fluorescência, a qual representa a proporção de células viáveis e apoptóticas. Os resultados representam o valor médio ± SEM de, pelo menos, quatro experiências independentes, em duplicado. *** $P < 0.001$ vs controlo; # $P < 0.5$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs ONOO⁻.

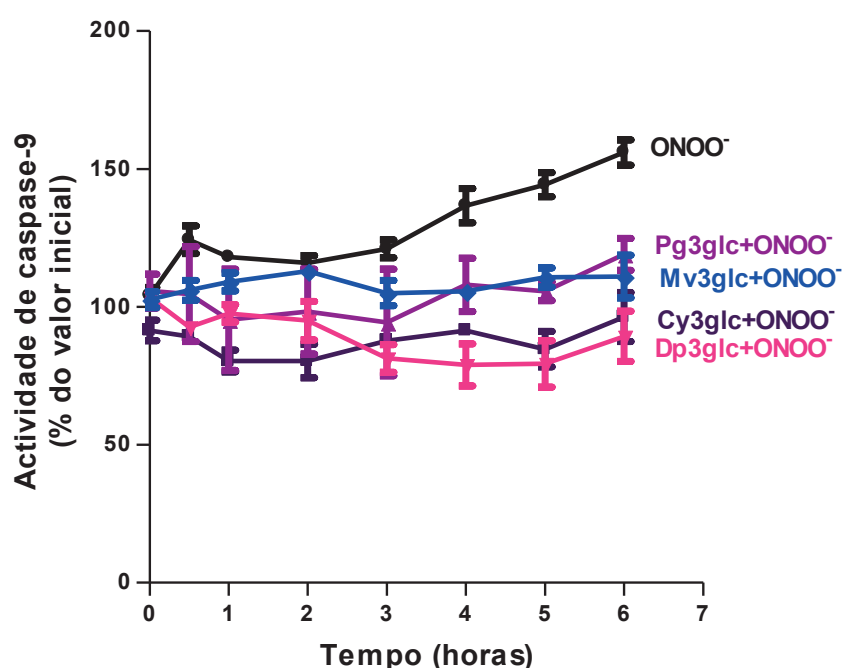
zação mitocondrial está indicada por uma diminuição da razão entre as intensidades de fluorescência, a qual representa a proporção de células viáveis e apoptóticas. Os resultados representam o valor médio ± SEM de, pelo menos, quatro experiências independentes, em duplicado. *** $P < 0.001$ vs controlo; # $P < 0.5$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs ONOO⁻.

Quando as BAEC são expostas ao peroxinitrito, observou-se uma acentuada diminuição na população celular capaz de emitir fluorescência vermelha acompanhada por um aumento da emissão de fluorescência verde (Figura 7), o que se traduziu numa diminuição da razão entre as intensidades de fluorescência vermelha/verde em cerca de 60% relativa ao controlo sem peroxinitrito (Figura 7B). O pré-tratamento com antocianinas 25 μ M permitiu um aumento desta razão em cerca de 30% relativo ao controlo com peroxinitrito, para qualquer uma delas. Estes resultados indicam que a perda do potencial de membrana mitocondrial mediada pelo peroxinitrito é significativamente prevenida em células pré-tratadas com qualquer uma das antocianinas estudadas.

3.5. As antocianinas inibem a activação das caspases-3 e -9, induzida pelo peroxinitrito

É um facto conhecido que a perda do potencial de membrana mitocondrial pode estar relacionada com a activação sequencial de caspases-9 e -3. Efectivamente, verifica-se que a morte celular mediada pelo peroxinitrito implica a activação destas caspases, não interferindo com a caspase-8. Como se demonstra na Figura 8, 6 h após a agressão com o peroxinitrito, as antocianinas em estudo foram capazes de impedir a activação das caspases-9 e -3 (Figura 8 A e B); a Dp3glc foi a mais eficaz, impedindo quase por completo a activação de ambas as caspases, seguida pela Cy3glc e Mv3glc que praticamente impediram o efeito do peroxinitrito na actividade de caspase-9 e induziram uma diminuição significativa de actividades de 72 e 60%, na actividade de caspase-3, respectivamente. Para o mesmo tempo de incubação (6 h), a Pg3glc permitiu uma redução de cerca de 70 e 50% nas actividades de caspases-9 e -3, respectivamente.

A



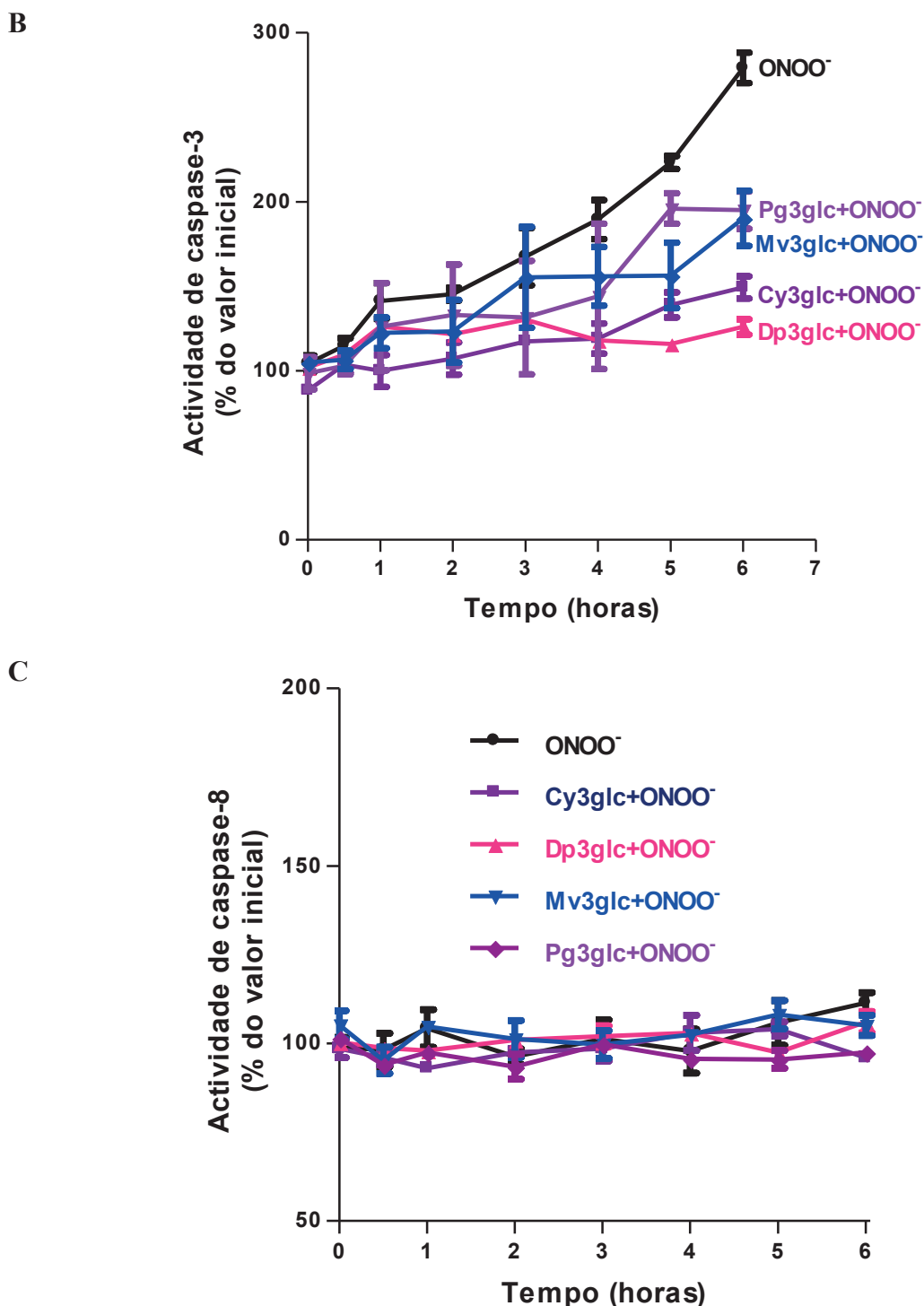


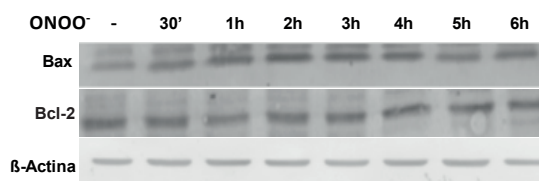
Figura 8. As antocianinas inibem a activação de caspases-3 e -9, mediada pelo peroxinitrito, nas células endoteliais. As BAEC foram tratadas com peroxinitrito 500 μ M após pré-incubação de 14 h com as antocianinas (25 μ M), tal como descrito nos “Materiais e Métodos”. Os gráficos representam a cinética das actividades de caspases-9 (A), caspase-3 (B) e caspase-8 (C), na presença das quatro antocianinas estudadas. O tratamento com peroxinitrito (ONOO⁻) induziu a activação de caspases-9 e -3, um processo inibido pelas antocianinas. Este oxidante não activou a caspase-8. Os resultados representam o valor médio \pm SEM de pelo menos cinco experiências independentes. Para a caspase-3: *** $P < 0.001$ [(Cy3glc + ONOO⁻) e (Dp3glc + ONOO⁻) vs ONOO⁻], * $P < 0.05$ [(Pg3glc + ONOO⁻) e (Mv3glc + ONOO⁻) vs ONOO⁻]. Para a caspase-9: * $P < 0.05$ [(Ac + ONOO⁻) vs ONOO⁻].

Estes resultados confirmam que a apoptose desencadeada pelo peroxinitrito, nas nossas condições experimentais, segue a via apoptótica mitocondrial ou intrínseca, uma vez que interfere com as caspases efectora (caspase-3) e iniciadora (caspase-9) desta via, não interferindo com a via dos receptores de morte ou extrínseca, já que não se observou qualquer alteração de relevo nos níveis de caspase-8 (Figura 3 C). Todas as antocianinas, uma vez mais, conseguiram impedir o processo apoptótico, inibindo activação desta cascata de morte que envolve as caspases mencionadas.

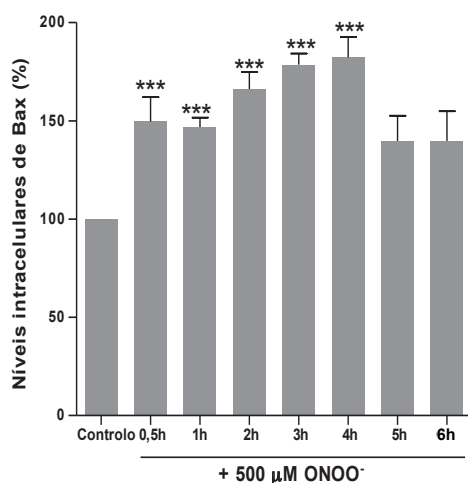
3.6. As antocianinas diminuem os níveis citoplasmáticos de Bax e impedem a sua translocação para o núcleo em células endoteliais agredidas pelo peroxinitrito

A família de proteínas Bcl-2 desempenha um papel de crucial importância na apoptose pela via mitocondrial (Gross *et al.* 1999; Circu e Aw 2010).

A



B



C

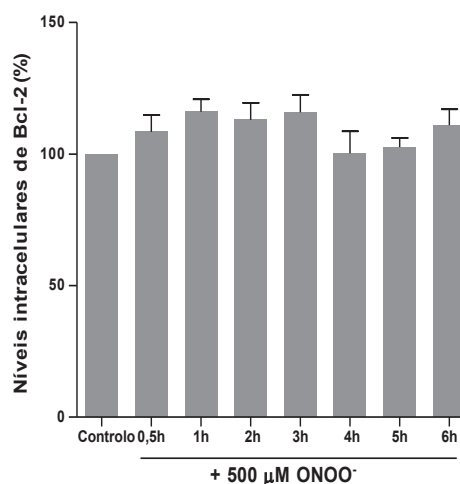
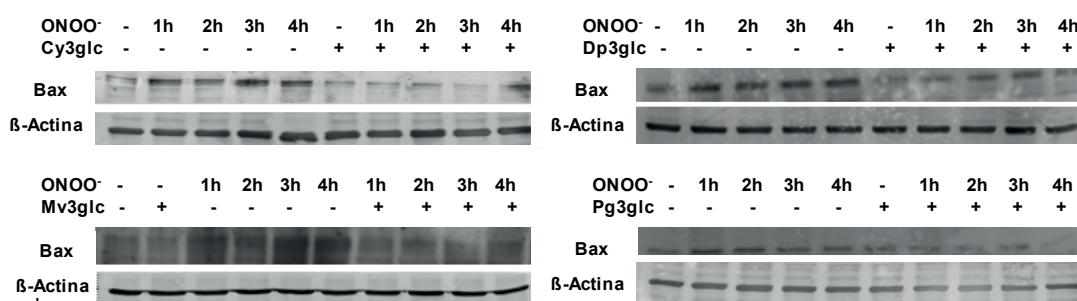


Figura 9. O peroxinitrito aumenta os níveis intracelulares de Bax sem afectar os níveis intracelulares de Bcl-2. As BAEC foram tratadas com peroxinitrito 500 μ M durante 10 min. Após a remoção deste oxidante e aos tempos indicados, os extractos celulares citoplasmáticos foram analisados por *immunoblot* com anticorpos específicos contra a Bax e a Bcl-2. Para além dos *blots* representativos (**A**), apresentam-se as análises densitométricas, quer para a Bax (**B**) quer para a Bcl-2 (**C**), de pelo menos cinco experiências, normalizadas para a β -actina endógena e expressas como valor médio \pm SEM. *** $P < 0.001$ vs controlo.

A Figura 9 (A e B) mostra que a expressão da proteína pró-apoptótica Bax sofreu um considerável aumento após o tratamento das células com peroxinitrito, alcançando valores uma vez e meia superiores aos do controlo, para a primeira hora e cerca de duas vezes superiores para a terceira e quarta horas de incubação, sem alterar as concentrações de Bcl-2 (Figura 9 A e C). Tais aumentos de Bax foram significativamente reduzidos nas células pré-incubadas com as antocianinas em cerca de 60, 40 e 50%, para a Cy3glc (Figura 10A), Dp3glc (Figura 10B) e Pg3glc (Figura 10C), respectivamente, ao final da primeira hora após os 10 min de agressão com o peroxinitrito. A Mv3glc (Figura 10D), foi capaz de desencadear um decréscimo mais sustentado que o das restantes antocianinas, particularmente na terceira e quarta horas de incubação, com valores de cerca de 70%.

A



B

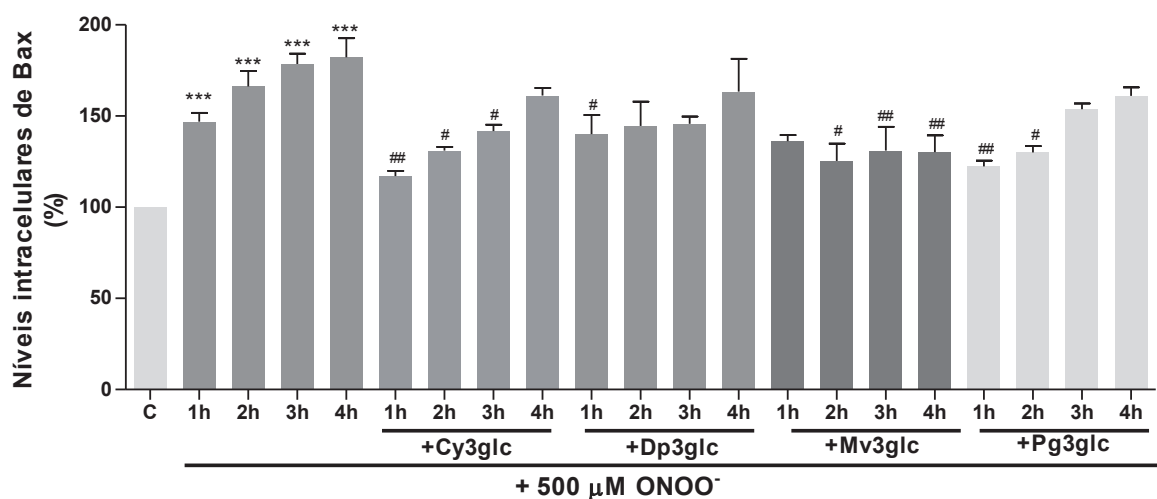
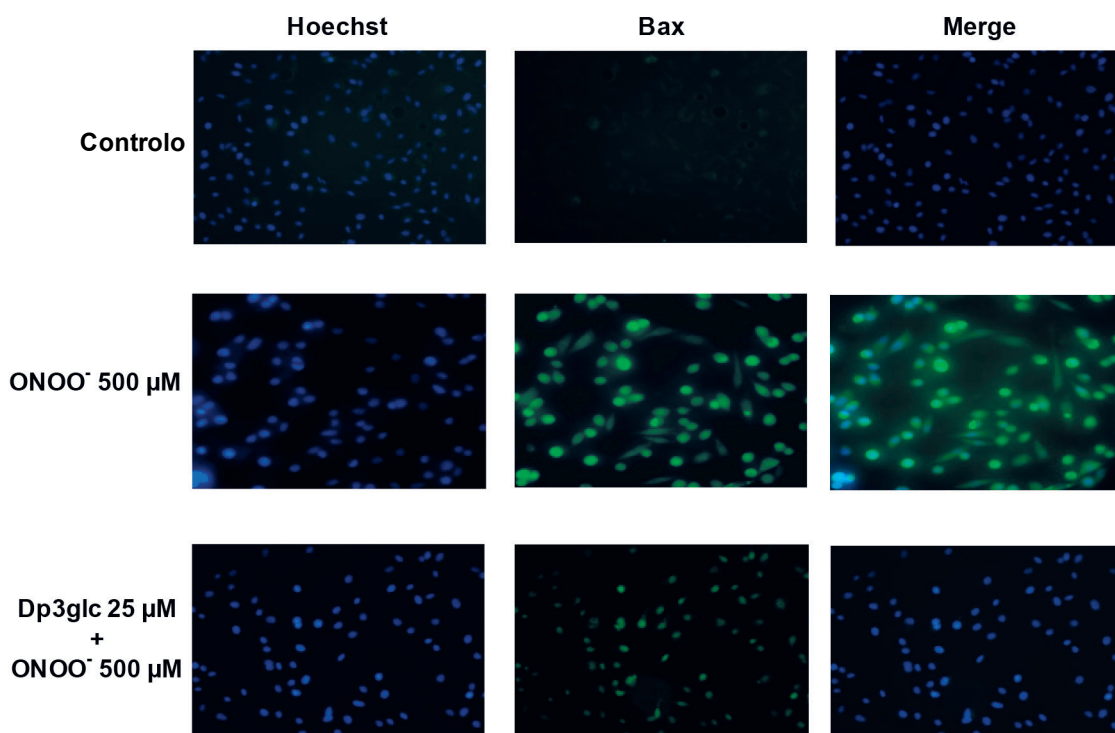


Figura 10. As antocianinas reduzem o aumento nos níveis citoplasmáticos de Bax, induzidos pelo peroxinitrito, nas células endoteliais. As BAEC foram tratadas com peroxinitrito 500 μ M após pré-incubação de 14 h com as antocianinas (25 μ M), tal como descrito nos “Materiais e Métodos”, e mantidas durante pelo menos 6 h em meio privado de soro, a 37°C. Os extractos proteicos citoplasmáticos foram então analisados por *immunoblot* com um anticorpo específico contra a Bax. A figura mostra *blots* representativos, seguidos pelas respectivas quantificações por densitometria de pelo menos três experiências independentes, para cada uma das quatro antocianinas estudadas, em concreto Cy3glc (A), Dp3glc (B), Pg3glc (C) e Mv3glc (D). Os resultados foram normalizados para a β -actina endógena e expressos como valor médio \pm SEM. *** P < 0.001 vs controlo; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs ONOO⁻.

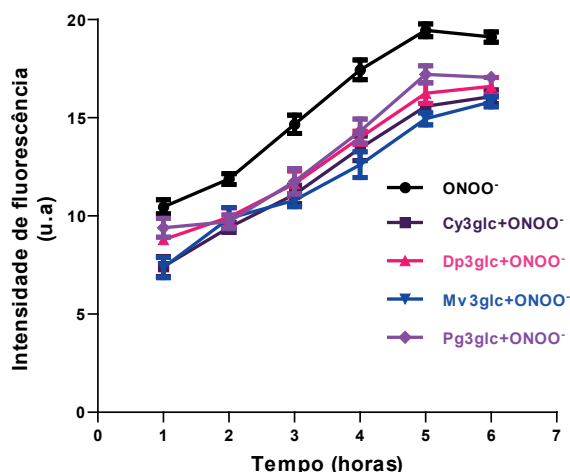
Na sequência do processo apoptótico induzido pelo peroxinitrito nas células endoteliais, a translocação nuclear da Bax foi evidenciada por imunocitoquímica e *immunoblot*, verificando-se também os efeitos protectores das antocianinas a este nível (Figura 11). A Figura 11A mostra imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência, de células marcadas tanto para a Bax (imunofluorescência) como para o núcleo (Hoechst 33258), previamente tratadas com Dp3glc 25 μ M, apresentada como uma antocianina típica, seguido do insulto com peroxinitrito. A maior intensidade de fluorescência verde nas células tratadas com peroxinitrito apenas, quando comparada com o controlo, constitui um indicador dos níveis mais elevados de Bax no núcleo. Similarmente à Dp3glc, todas as outras antocianinas testadas diminuíram claramente esta fluorescência nuclear, indiciando a sua capacidade em impedirem a translocação nuclear da Bax (Figura 11 B).

A translocação nuclear da Bax e a sua inibição pelas antocianinas foram confirmadas por *immunoblot*, conforme demonstrado no gráfico da Figura 11D, para a Dp3glc, como exemplo. O aumento da Bax nuclear foi detectado logo após a primeira hora que se seguiu à agressão com o peroxinitrito, sendo mais evidente após as 4 h, facto que coincide com a normalização dos níveis citoplasmáticos de Bax, como está patente na Figura 9. A Dp3glc, à semelhança das restantes antocianinas, originou uma diminuição, em cerca de 70%, da Bax nuclear às 6 h após a agressão.

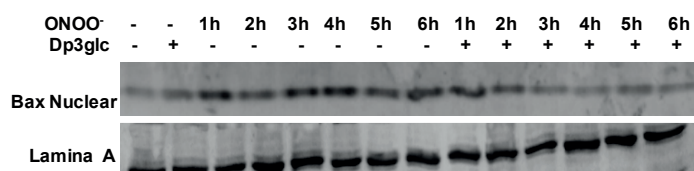
A



B



C



D

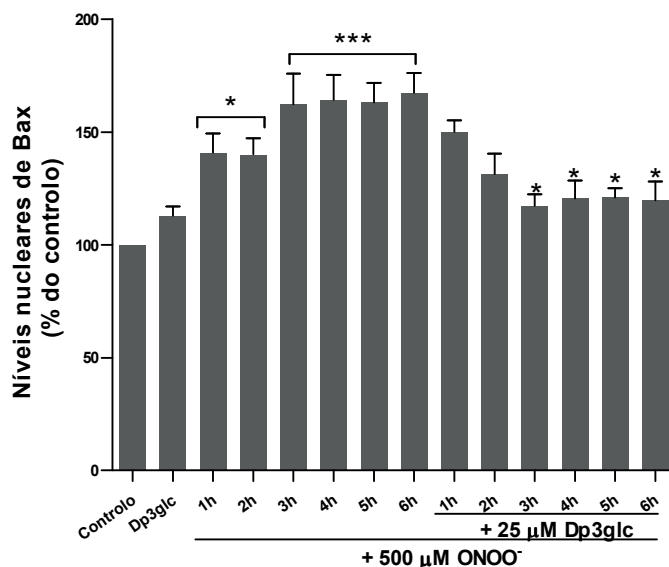
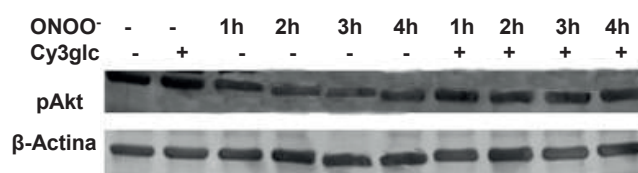


Figura 11. As antocianinas inibem a translocação da Bax para o núcleo observada na sequência da indução do processo apoptótico pelo peroxinitrito, nas células endoteliais. As BAEC foram tratadas com peroxinitrito 500 μM após pré-incubação com as antocianinas (25 μM), tal como descrito nos “Materiais e Métodos”, e mantidas, pelo menos, 6 h em meio privado de soro, a 37°C, tendo sido determinada a localização da Bax por imunocitoquímica (A) e confirmada por *immunoblot* dos extractos proteicos nucleares (C). Em (A) apresentam-se imagens representativas de microscopia de fluorescência obtidas à sexta hora de incubação, nas condições indicadas, após marcação por imunofluorescência da proteína Bax e dos núcleos com Hoechst 33258 (400x). Em (B) apresenta-se graficamente a cinética das intensidades de fluorescência correspondentes à translocação nuclear da Bax, de acordo com o programa de análise de imagem Image J. Em (C, D), os extractos proteicos nucleares recolhidos nas condições descritas nos “Materiais e Métodos” foram analisados por *immunoblot* com um anticorpo específico contra a Bax, conforme demonstrado para a Dp3glc, seguidos pelas respectivas quantificações por densitometria de pelo menos três experiências independentes. Os resultados foram normalizados para a lamina A endógena e expressos como valor médio \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs controlo; # $P < 0.05$ vs ONOO⁻, para o mesmo tempo de incubação.

3.7. As antocianinas impedem a inativação da via PI3K/Akt mediada pelo peroxinitrito

Existem várias evidências que a via da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K)/Akt desempenha um papel crítico na inibição da apoptose impedindo, por exemplo, a translocação da Bax para a mitocôndria, como se demonstrou em células PC12 sujeitas ao peroxinitrito (Shacka *et al.* 2006). De facto, tal como se observa nessas células, constatámos, no nosso modelo experimental de células endoteliais, que o peroxinitrito inibia a fosforilação do Akt, conduzindo à inativação desta via de sobrevivência celular. Nas células tratadas com o peroxinitrito, o fosfo-Akt (pAkt) citoplasmático diminuiu, chegando ao valor mais baixo entre a 3-4 h, quando comparado com o das células controlo, sem tratamento (Figura 12).

A



B

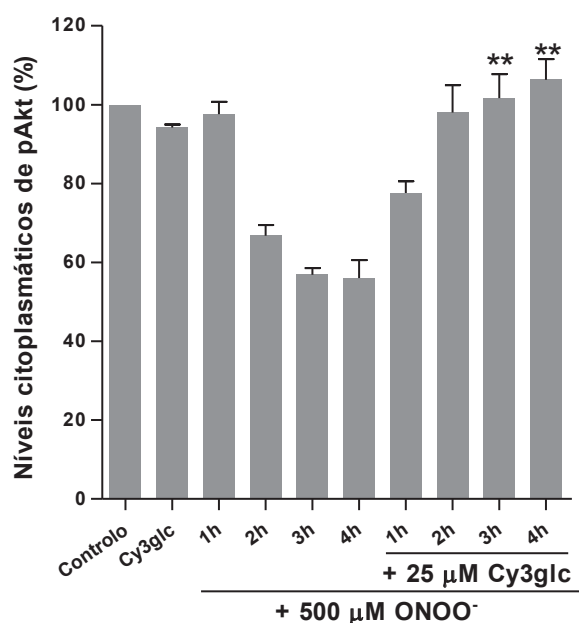


Figura 12. As antocianinas previnem o decréscimo dos níveis citoplasmáticos de pAkt induzidos pelo peroxinitrito, conforme exemplificado para a Cy3glc. Os extractos proteicos citoplasmáticos foram obtidos de células endoteliais incubadas com Cy3glc 25 μM e posteriormente tratadas ou não com peroxinitrito durante 10 min como descrito nos “Materiais e Métodos” e mantidas pelo menos 6 h em meio privado de soro, a 37°C. Estes extractos proteicos são então analisados por *immunoblot* com um anticorpo específico contra a pAkt. A figura mostra um *blot* representativo (A) bem como a respectiva análise densitométrica (B) de, pelo menos, três experiências independentes. Os resultados foram normalizados para a β-actina endógena e expressos como valor médio ± SEM. ***P* < 0.01 (Cy3glc+ONOO⁻) vs ONOO⁻, para o mesmo tempo de incubação.

Todas as antocianinas testadas impediram a desfosforilação do Akt mediada pelo peroxinitrito, alcançando os valores mais expressivos para a 3-4 h, conforme exemplificado para a Cy3glc (Figura 12).

4. Discussão

Diversos estudos, particularmente na última década, realçam a importância das antocianinas como agentes antiateroscleróticos (Xia *et al.* 2006; McCune *et al.* 2011). Neste contexto, os efeitos protectores destes flavonóides contra a activação endotelial em resposta a diversos factores, tais como as LDLox e o *stress* oxidativo, têm constituído um foco de investigação (Youdim *et al.* 2000; Yi *et al.* 2010).

O peroxinitrito tem sido apontado como um relevante factor iniciador, despoletando a morte de células endoteliais através de uma via apoptótica (Brito *et al.* 2008). Embora a capacidade dos flavonóides, incluindo as antocianinas, em neutralizarem esta espécie reactiva *in vitro* seja conhecida, muito devido à sua capacidade em doar electrões e em constituir um substrato para a nitração (Pannala *et al.* 1998; Tsuda *et al.* 1999; Ichiyanagi *et al.* 2004), os mecanismos moleculares subjacentes à protecção proporcionada por estes flavonóides contra a morte celular mediada pelo peroxinitrito, não estão totalmente elucidadas bem como as características moleculares das antocianinas exigidas para essa protecção.

Assim, neste trabalho, acrescentámos novos conhecimentos acerca dos mecanismos citoprotectores das antocianinas nas células endoteliais sob a agressão do peroxinitrito. De referir que as actividades celulares destes compostos têm, de alguma forma, sido questionadas, principalmente devido às concentrações fisiológicas detectadas. No entanto, estudos de biodisponibilidade demonstraram a absorção de antocianinas intactas e o seu rápido aparecimento no plasma sanguíneo e em vários tecidos, na sequência do consumo normal destes compostos (Mazza *et al.* 2002; McGhie *et al.* 2007) e, assim, os seus efeitos cumulativos potenciais não deverão ser negligenciados (Kawai *et al.* 2008). Por outro lado, foi já demonstrada a incorporação das antocianinas na membrana plasmática e no citosol de células endoteliais, protegendo-as ao actuarem como *scavengers* de várias espécies oxidantes (Youdim *et al.* 2000).

Todas as antocianinas testadas, em concentrações sub-tóxicas (12.5 e 25 μM), protegeram fortemente as BAEC da morte celular induzida pelo peroxinitrito (Figura 2), tendo a Pg3glc apresentado a maior protecção. Estes efeitos não se correlacionam directamente com a sua capacidade *scavenger* do peroxinitrito (Figura 3). Na realidade, os diferentes padrões de hidroxilação no anel B parecem modelar a capacidade de neutralização do peroxinitrito, uma

vez que a Dp3glc evidenciou a maior actividade a este nível, seguida de perto pela Cy3glc, e depois pela Mv3glc, apresentando a Pg3glc a menor actividade. A maior actividade da Dp3glc e Cy3glc é muito provavelmente devida à estrutura *o*-dihidroxi (catecólica) no anel B, que é reconhecida como capaz de conferir um elevado grau de estabilidade aos radicais fenoxilo flavonólicos que se formam (Bors *et al.* 1990) e à presença de um grupo hidroxilo na posição -3 (Santos e Mira 2004). A presença dos substituintes metoxilo no anel B da Mv3glc, devido ao seu carácter nucleofílico contribuirá, certamente, para o aumento da estabilidade do radical fenoxilo formado e, conseqüentemente, para a sua maior actividade antioxidante quando comparada com a Pg3glc (Satué-García *et al.* 1997). Como já havia sido reportado (Youdim *et al.* 2000), confirmámos a incorporação das antocianinas em estudo nas células endoteliais. A Pg3glc apresentou o valor mais elevado de internalização celular, o que poderá justificar o seu significativo efeito citoprotector, demonstrado no ensaio de morte apoptótica (Figura 2A), sugerindo que o seu menor impedimento estérico, devido ao único hidroxilo no anel B possa facilitar a sua entrada na célula, alcançando concentrações eficazes provavelmente de forma mais célere que as outras antocianinas. Assim, as concentrações das antocianinas atingidas nas células poderão também influenciar os efeitos observados na morte celular.

Nas células endoteliais, a presença de antocianinas impede a formação de espécies reactivas mediada pelo peroxinitrito, de acordo com os resultados do ensaio com a DCFHDA (Figura 5). Um aspecto que justifica ressalva, reside no facto de que, o peroxinitrito autêntico foi adicionado às células e, após os 10 min de incubação, este oxidante foi removido por cuidadosa lavagem com PBS; assim, as espécies reactivas observadas foram produzidas como resultado deste insulto primário. Todas as antocianinas foram capazes de proteger de forma significativa, as células endoteliais contra o dano oxidativo intracelular, segundo um perfil de protecção similar ao constatado nos ensaios de oxidação da DHR 123 e da formação de grupos carbonilo, ou seja, a Dp3glc e a Cy3glc apresentaram actividades mais elevadas que a Mv3glc e a Pg3glc, na neutralização das espécies reactivas formadas, salientando, uma vez mais, a importância da substituição do anel B. Concretamente, ainda que o grupo catecol da Cy3glc e da Dp3glc lhes confira uma supremacia protectora, os dois grupos metoxilo da Mv3glc também são potencialmente relevantes, como acima referido. Este comportamento benéfico da Mv3glc, mas também da Pg3glc, poderá encontrar justificação na sua considerável captação por parte das células endoteliais, compensando a ausência dos dois grupos *o*-hidroxilo no anel B.

Assim, a protecção proporcionada por todas estas antocianinas nas células endoteliais pode ser, pelo menos em parte, mediada pela sua capacidade em neutralizar espécies reactivas produzidas durante a agressão celular. Estas espécies podem reagir com componentes celulares tais como lípidos, gerando um largo espectro de produtos como, por exemplo, o 4-hidroxinonenal

(4-HNE), considerado desde longa data, como um segundo mensageiro tóxico do dano oxidativo celular (Zmijewski *et al.* 2005). Neste contexto, a capacidade *scavenger* de radicais por parte das várias antocianinas foi ainda testada num outro modelo experimental, concretamente em LDL oxidadas por radicais peróxido gerados pela decomposição térmica do composto azo-iniciador, AAPH. Também aqui se repetiu, uma vez mais, o padrão de protecção já descrito, com a Cy3glc e a Dp3glc a proporcionarem o maior período sem formação de dienos conjugados.

Desta forma, as espécies reactivas podem ser directa ou indirectamente mediadoras de cascatas de sinalização intracelulares as quais, entre outras potenciais acções, podem induzir o colapso do potencial de membrana mitocondrial e despoletar uma série de eventos associados à mitocôndria, incluindo a apoptose (Radi *et al.* 2002).

Embora vários autores sugiram que a apoptose desencadeada pelo peroxinitrito possa resultar de um efeito directo na mitocôndria, outros estudos revelam que tal poderá ocorrer em consequência de uma consideravelmente mais complexa cascata de eventos (Shacka *et al.* 2006). De acordo com investigações prévias do nosso laboratório, para além de outros, o peroxinitrito, para baixas concentrações, induz apoptose através da via mitocondrial, enquanto que para concentrações mais elevadas, origina, predominantemente, necrose (Brito *et al.* 2008).

O trabalho actual confirma que peroxinitrito 500 μM induz a apoptose em BAEC, promovendo diversas vias a jusante e a montante da mitocôndria. Embora esta concentração pareça, à partida, relativamente alta, a concentração final de exposição global das células a esta espécie reactiva é muito inferior a 500 μM , considerando que o seu tempo de meia vida é inferior a 1s, a 37°C, pH 7.4 (Zhu *et al.* 1992). De notar, também, que, as taxas de produção de peroxinitrito *in vivo* em compartimentos específicos têm sido estimadas em cerca de 50-100 μM por minuto (Szabo *et al.* 2007), valores relativamente elevados.

Por forma a verificar se as propriedades antiapoptóticas destas antocianinas estavam relacionados com a inibição da ruptura da via mitocondrial testámos os seus efeitos nos acontecimentos na mitocôndria despoletados pelo peroxinitrito. Quando as BAEC são expostas a este oxidante, verificou-se uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, avaliada pelo aumento da emissão de fluorescência verde devido à presença de JC-1 no citosol (Figura 7). Este acontecimento poderá ser uma consequência da permeabilização da membrana mitocondrial externa, o que impede a acumulação daquela sonda na mitocôndria. O pré-tratamento das células com as antocianinas testadas, impediu a perda deste gradiente electroquímico, como evidenciado pela emissão de fluorescência vermelha. Estes resultados são relevantes considerando o papel crucial da mitocôndria na regulação da morte celular, sugerindo que a acção antiapoptótica destes flavonóides poderá ocorrer por interferência na via mitocondrial de morte desencadeada pelo peroxinitrito.

Diferentes padrões de morte celular devidos ao peroxinitrito têm sido descritos, dependendo do tipo de célula e da concentração do oxidante, determinando um mecanismo dependente ou independente das caspases (Szabo 2003; Whiteman *et al.* 2004; Shacka *et al.* 2006). Os nossos resultados demonstram que a morte devida ao peroxinitrito ocorre através da via mitocondrial, uma vez que se observa a activação das caspases iniciadora (caspase-9) e efectora (caspase-3) dessa via, não parecendo interferir com a via dos receptores de morte, já que não se observaram alterações nos níveis da caspase-8. As antocianinas estudadas provaram a sua eficácia na prevenção da activação das caspases-9 e -3, envolvidas na via de morte mitocondrial desencadeada pelo peroxinitrito (Figura 8), afastando as células do seu destino apoptótico. Os resultados obtidos mostraram que estas antocianinas são capazes de interferir com a cascata de sinalização intracelular conducente à apoptose, muito provavelmente por inibirem a perda de integridade da membrana mitocondrial, através da interferência no equilíbrio entre factores pró- e antiapoptóticos da família Bcl-2, conduzindo à permeabilização da membrana mitocondrial externa e activação da via apoptótica intrínseca.

Efectivamente, verificou-se que o peroxinitrito induziu a permeabilização da membrana mitocondrial através do aumento dos níveis intracelulares de Bax, sem afectar os da Bcl-2 (Figura 9) levando assim à ruptura do equilíbrio intracelular entre proteínas pró- e antiapoptóticas. A Bax, é uma proteína pró-apoptótica normalmente encontrada no citoplasma formando um heterodímero com membros antiapoptóticos da mesma família Bcl-2. Após um estímulo apoptótico, a Bax transloca para a mitocôndria onde forma oligómeros implicados na permeabilidade da membrana mitocondrial (Sharpe *et al.* 2004), facilitando a libertação de proteínas intermembranares mitocondriais, intervenientes no processo de morte por apoptose. Os resultados aqui apresentados indicam que a pré-incubação das células com as antocianinas conduziu a uma diminuição significativa nos níveis intracelulares de Bax, mais marcadamente nas primeiras 2 h, sugerindo que a acção protectora das antocianinas poderá preceder a despolarização da membrana mitocondrial e a activação das caspases.

Para além da activação da Bax e da sua translocação para a mitocôndria, existem evidências que a Bax também pode sofrer translocação para o núcleo, como parte do processo apoptótico (Zhuang e Simon 2000; Huang *et al.* 2006). Neste trabalho, observámos por imunocitoquímica e por *immunoblot* que, durante o processo apoptótico induzido pelo peroxinitrito, a translocação nuclear da Bax ocorreu e que as antocianinas foram capazes de prevenir significativamente este acontecimento (Figura 11). Curiosamente, embora a translocação nuclear da Bax se tenha verificado logo à primeira hora após a agressão com o peroxinitrito, os níveis mais expressivos desta proteína observaram-se a partir das 4 h, logo após o declínio dos níveis de Bax no citosol (Figura 9). De realçar que as células com maior fluorescência verde no núcleo devida à translocação

nuclear foram também aquelas que apresentaram características apoptóticas nos seus núcleos. Embora o significado preciso deste evento permaneça indeterminado, fica patente que todas as antocianinas testadas reduziram de forma considerável e similar esta translocação o que poderá significar que se trata de um mecanismo de protecção adicional destes compostos naturais.

Os nossos ensaios mostraram ainda que as antocianinas estudadas interferem com a via de sinalização do PI3K/Akt, ao impedirem a desfosforilação do Akt promovida pelo peroxinitrito, contrariando assim os efeitos deste oxidante na inibição desta via. Existem diversas evidências acumuladas acerca das implicações, quer do PI3K quer do Akt, na prevenção da apoptose (Tsuruta *et al.* 2002; Shacka *et al.* 2006; Shi *et al.* 2010). Recentemente, a inactivação deste processo foi considerada importante na indução da apoptose pelo peroxinitrito em células PC12 (Shacka *et al.* 2006), não estando directamente realacionada com um efeito directo no sistema enzimático. De facto, é reconhecido que a actividade da PI3K/Akt é essencial para reter a Bax no citoplasma, impedindo a sua translocação para a mitocôndria (Tsuruta *et al.* 2002; Shacka *et al.* 2006). Os nossos resultados indicam que todas as antocianinas testadas previniram de forma similar a desfosforilação do Akt induzida pelo peroxinitrito, demonstrando um outro mecanismo de acção. Salieta-se ainda que a diminuição dos níveis de fosforilação do Akt induzida pelo peroxinitrito, alcançou o seu valor máximo entre 3-4 h, na mesma altura em que se observaram as maiores concentrações de Bax citoplasmática, sugerindo uma potencial ligação entre os eventos desencadeados pelo peroxinitrito, aquém e além da mitocôndria.

Concluindo, este estudo expande os nossos conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares subjacentes à citoprotecção vascular das antocianinas dietéticas. Estes flavonóides, com diferentes estruturas químicas, apesar da sua controversa capacidade antioxidante *in vivo*, são capazes de contrariar os efeitos apoptóticos provocados pelo peroxinitrito nas células endoteliais, através da inibição de diversas cascatas de sinalização celular que passam pela mitocôndria, suportando mecanisticamente os seus efeitos benéficos para a saúde no contexto da prevenção da disfunção endotelial e, conseqüentemente, da aterosclerose.

5. Referências bibliográficas

- Bors, W., Heller, W., Michel, C. e Saran, M. (1990). "Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies." Methods Enzymol **186**: 343-355.
- Brito, P.M., Mariano, A., Almeida, L.M. e Dinis, T.C. (2006). "Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione." Chem Biol Interact **164**(3): 157-166.
- Brito, P.M., Simoes, N.F., Almeida, L.M. e Dinis, T.C. (2008). "Resveratrol disrupts peroxynitrite-triggered mitochondrial apoptotic pathway: a role for Bcl-2." Apoptosis **13**(8): 1043-1053.
- Cai, H. e Harrison, D.G. (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-844.
- Carreras, M.C., Pargament, G.A., Catz, S.D., Poderoso, J.J. e Boveris, A. (1994). "Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils." FEBS Lett **341**(1): 65-68.
- Circu, M.L. e Aw, T.Y. (2010). "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis." Free Radic Biol Med **48**(6): 749-762.
- Cooke, J.P. (2003). "Flow, NO, and atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 768-770.
- Darley-Usmar, V.M., Hogg, N., O'Leary, V.J., Wilson, M.T. e Moncada, S. (1992). "The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein." Free Radic Res Commun **17**(1): 9-20.
- de Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A. e Garcia-Viguera, C. (2010). "Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence." Int J Mol Sci **11**(4): 1679-1703.
- Denizot, F. e Lang, R. (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." J Immunol Methods **89**(2): 271-277.
- Dinis, T.C., Santosa, C.L. e Almeida, L.M. (2002). "The apoprotein is the preferential target for peroxynitrite-induced LDL damage protection by dietary phenolic acids." Free Radic Res **36**(5): 531-543.
- Ghosh, D. e Scheepens, A. (2009). "Vascular action of polyphenols." Mol Nutr Food Res **53**(3): 322-331.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A. e Ferri, C. (2009). "Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection." Curr Pharm Des **15**(10): 1072-1084.
- Gross, A., McDonnell, J.M. e Korsmeyer, S.J. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-1911.
- Halliwell, B. e Whiteman, M. (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-255.
- He, J. e Giusti, M.M. (2010). "Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties." Annual Review of Food Science and Technology **1**(1): 163-187.

- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. e Kihara, Y. (2009). "Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases." Circ J **73**(3): 411-418.
- Huang, Y.T., Huang, D.M., Chueh, S.C., Teng, C.M. e Guh, J.H. (2006). "Alisol B acetate, a triterpene from *Alismatis rhizoma*, induces Bax nuclear translocation and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells." Cancer Lett **231**(2): 270-278.
- Ichiyanagi, T., Rahman, M.M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., *et al.* (2004). "Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucoside in rats." Biofactors **21**(1-4): 411-413.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. e Beckman, J.S. (1992). "Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide." Arch Biochem Biophys **298**(2): 446-451.
- Kawai, Y., Tanaka, H., Murota, K., Naito, M. e Terao, J. (2008). "(-)-Epicatechin gallate accumulates in foamy macrophages in human atherosclerotic aorta: implication in the anti-atherosclerotic actions of tea catechins." Biochem Biophys Res Commun **374**(3): 527-532.
- Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H. e Beckman, J.S. (1994). "Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123." Free Radic Biol Med **16**(2): 149-156.
- Koppenol, W.H. (1998). "The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite." Free Radic Biol Med **25**(4-5): 385-391.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., *et al.* (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-478.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. e Shacter, E. (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **233**: 346-357.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lusis, A.J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. e Remesy, C. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 230S-242S.
- Mathers, C.D. e Loncar, D. (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." PLoS Med **3**(11): e442.
- Mauray, A., Felgines, C., Morand, C., Mazur, A., Scalbert, A. e Milenkovic, D. (2010). "Nutrigenomic analysis of the protective effects of bilberry anthocyanin-rich extract in apo E-deficient mice." Genes Nutr **5**(4): 343-353.
- Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T. e Holub, B.J. (2002). "Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects." J Agric Food Chem **50**(26): 7731-7737.
- McCune, L.M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N.R. e Thomson, C.A. (2011). "Cherries and health: a review." Crit Rev Food Sci Nutr **51**(1): 1-12.
- McGhie, T.K. e Walton, M.C. (2007). "The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding." Mol Nutr Food Res **51**(6): 702-713.

- Murrant, C.L.e Reid, M.B. (2001). "Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle." Microsc Res Tech **55**(4): 236-248.
- Nothlings, U., Schulze, M.B., Weikert, C., Boeing, H., van der Schouw, Y.T., Bamia, C., *et al.* (2008). "Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population." J Nutr **138**(4): 775-781.
- Pacher, P., Beckman, J.S.e Liaudet, L. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Pannala, A.S., Rice-Evans, C., Sampson, J.e Singh, S. (1998). "Interaction of peroxynitrite with carotenoids and tocopherols within low density lipoprotein." FEBS Lett **423**(3): 297-301.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A.e Mattivi, F. (2003). "The stomach as a site for anthocyanins absorption from food." FEBS Lett **544**(1-3): 210-213.
- Peluffo, G.e Radi, R. (2007). "Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology." Cardiovasc Res **75**(2): 291-302.
- Prior, R.L.e Wu, X. (2006). "Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities." Free Radic Res **40**(10): 1014-1028.
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C.e Castro, L. (2002). "Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria." Free Radic Biol Med **33**(11): 1451-1464.
- Rahman, M.M., Ichiyangi, T., Komiyama, T., Hatano, Y.e Konishi, T. (2006). "Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism." Free Radic Res **40**(9): 993-1002.
- Reers, M., Smith, T.W.e Chen, L.B. (1991). "J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential." Biochemistry **30**(18): 4480-4486.
- Rissanen, T.H., Voutilainen, S., Virtanen, J.K., Venho, B., Vanharanta, M., Mursu, J., *et al.* (2003). "Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study." J Nutr **133**(1): 199-204.
- Santos, M.R.e Mira, L. (2004). "Protection by flavonoids against the peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine." Free Radic Res **38**(9): 1011-1018.
- Satué-Gracia, M.T., Heinonen M., Frankel E.N. (1997). "Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems". J Agric Food Chem **45**(9): 3362-3367.
- Shacka, J.J., Sahawneh, M.A., Gonzalez, J.D., Ye, Y.Z., D'Alessandro, T.L.e Estevez, A.G. (2006). "Two distinct signaling pathways regulate peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells." Cell Death Differ **13**(9): 1506-1514.
- Shacter, E. (2000). "Quantification and significance of protein oxidation in biological samples." Drug Metab Rev **32**(3-4): 307-326.
- Sharpe, J.C., Arnoult, D.e Youle, R.J. (2004). "Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members." Biochim Biophys Acta **1644**(2-3): 107-113.

- Shi, C., Wu, F., Yew, D.T., Xu, J.e Zhu, Y. (2010). "Bilobalide prevents apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway in SH-SY5Y cells." Apoptosis **15**(6): 715-727.
- Szabo, C. (2003). "Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity." Toxicol Lett **140-141**: 105-112.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H.e Radi, R. (2007). "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics." Nat Rev Drug Discov **6**(8): 662-680.
- Tousoulis, D., Koutsogiannis, M., Papageorgiou, N., Siasos, G., Antoniadis, C., Tsiamis, E., *et al.* (2010). "Endothelial dysfunction: potential clinical implications." Minerva Med **101**(4): 271-284.
- Tsuda, T., Horio, F.e Osawa, T. (1999). "Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats." FEBS Lett **449**(2-3): 179-182.
- Tsuruta, F., Masuyama, N.e Gotoh, Y. (2002). "The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria." J Biol Chem **277**(16): 14040-14047.
- Uppu, R.M., Squadrito, G.L., Cueto, R.e Pryor, W.A. (1996). "Selecting the most appropriate synthesis of peroxynitrite." Methods Enzymol **269**: 285-296.
- Vieira, O.V., Laranjinha, J.A., Madeira, V.M.e Almeida, L.M. (1996). "Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants." J Lipid Res **37**(12): 2715-2721.
- Wallace, T. (2011). "Anthocyanins in cardiovascular disease." Adv Nutr **2**: 1-7.
- Whiteman, M., Armstrong, J.S., Cheung, N.S., Siau, J.L., Rose, P., Schantz, J.T., *et al.* (2004). "Peroxy-nitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains." FASEB J **18**(12): 1395-1397.
- Xia, X., Ling, W., Ma, J., Xia, M., Hou, M., Wang, Q., *et al.* (2006). "An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice." J Nutr **136**(8): 2220-2225.
- Yi, L., Chen, C.Y., Jin, X., Mi, M.T., Yu, B., Chang, H., *et al.* (2010). "Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity." FEBS Lett **584**(3): 583-590.
- Youdim, K.A., Martin, A.e Joseph, J.A. (2000). "Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress." Free Radic Biol Med **29**(1): 51-60.
- Zhu, L., Gunn, C.e Beckman, J.S. (1992). "Bactericidal activity of peroxynitrite." Arch Biochem Biophys **298**(2): 452-457.
- Zhuang, S.e Simon, G. (2000). "Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells." Am J Physiol Cell Physiol **279**(2): C341-351.
- Zmijewski, J.W., Landar, A., Watanabe, N., Dickinson, D.A., Noguchi, N.e Darley-Usmar, V.M. (2005). "Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1385-1389.

Capítulo 3

A malvidina-3-glucósido protege as células endoteliais da agressão mediada pelo peroxinitrito estimulando a NO sintase endotelial e inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios dependentes do NF- κ B

1. Introdução

A disfunção endotelial desempenha um papel central na aterogénese (Heitzer *et al.* 2001; Cooke 2003), uma vez que o endotélio assegura o equilíbrio entre a vasodilatação e a vasoconstrição, a inibição e a estimulação da proliferação e da migração das células musculares lisas, a trombogénese e a fibrinólise. Quando este equilíbrio é perturbado, ocorre a disfunção endotelial, causando dano à parede arterial. A principal característica da disfunção endotelial reside na diminuição da vasodilatação dependente do endotélio, a qual é mediada pelo óxido nítrico. Uma deficiência na produção ou bioactividade do $\cdot\text{NO}$ tem sido considerada como um mecanismo *major* da disfunção endotelial, contribuindo para o desenvolvimento do processo aterosclerótico (Davignon e Ganz 2004).

Como abordado na Introdução geral, o óxido nítrico é formado nas células endoteliais a partir da L-arginina e do oxigénio através da acção enzimática da NO sintase endotelial (eNOS) (Davignon *et al.* 2004; Pacher *et al.* 2007), uma enzima constitutiva que é regulada ao nível transcrricional e pós-transcrricional. A estabilidade do mRNA da eNOS pode ser alterada por diferentes compostos e estímulos, nomeadamente, TNF- α , estrogénios, insulina e mesmo o próprio $\cdot\text{NO}$ (Li *et al.* 2002; Searles 2006). Por outro lado, evidências crescentes sugerem que o *stress* oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose promovendo a disfunção endotelial, a inflamação e a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (Heitzer *et al.* 2001).

De facto, muitas células que constituem o tecido vascular geram espécies reactivas de oxigénio (ROS) que desempenham um papel quer fisiológico, quer patológico na homeostase vascular. Níveis relativamente reduzidos de ROS actuam fisiologicamente como sinalizadores, modulando a proliferação, a apoptose e a expressão génica através da activação de factores de transcrição, tais como o factor nuclear- κB (NF- κB) (Irani 2000; Janssen-Heininger *et al.* 2008). O aumento da produção de ROS, como o anião superóxido, tem sido relacionado com a perturbação da função endotelial em modelos experimentais de aterosclerose (Victor *et al.* 2009). O anião superóxido, produzido essencialmente por NADPH oxidases, xantina oxidase, mitocôndria e NOS desacoplada, pode interagir com o $\cdot\text{NO}$ na parede vascular originando o poderoso agente oxidante e nitrante peroxinitrito, o qual, por sua vez reduz, a biodisponibilidade do $\cdot\text{NO}$ e causa *stress* nitroxidativo (Cai e Harrison 2000; Turko e Murad 2002). A 3-nitrotirosina, um produto da nitração de proteínas resultante da acção do peroxinitrito, foi identificada em numerosas patologias e em diversos compartimentos do sistema cardiovascular (Turko *et al.* 2002; Peluffo e Radi 2007). Para além disso, o peroxinitrito é um modelador de vias de sinalização celulares, nomeadamente a via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K/Akt) e a do NF- κB (Pacher *et al.* 2007; Liaudet *et al.* 2009). A activação do factor de transcrição pró-inflamatório NF- κB tem sido as-

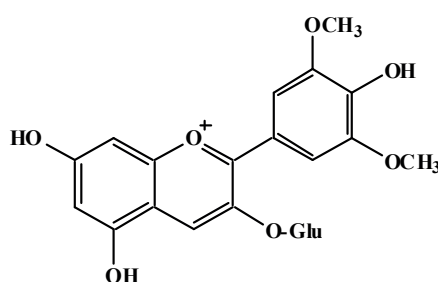
sociada à disfunção endotelial e à inflamação vascular, desempenhando um papel importante na patogénese da aterosclerose (Collins e Cybulsky 2001; de Winther *et al.* 2005). Neste contexto, potenciais intervenções terapêuticas com o objectivo de aumentar a biodisponibilidade do NO ou regular a expressão de genes pró-inflamatórios, poderão constituir estratégias promissoras ao melhorarem a função endotelial.

Os polifenóis são componentes naturais de frutos e vegetais e constituem actualmente um foco de interesse nutricional e terapêutico. Vários estudos epidemiológicos e clínicos têm sido desenvolvidos com o propósito de consolidar os benefícios para a saúde cardiovascular, decorrentes do consumo de polifenóis na dieta (Mann *et al.* 2007; Schewe *et al.* 2008). As antocianinas são polifenóis amplamente distribuídos em frutos, vegetais e vinho tinto, reconhecidos pelas suas importantes propriedades antioxidantes. Investigações recentes, contudo, indicam outros mecanismos de acção incluindo a modelação de vias de sinalização celular cruciais e de regulação génica (Tsoyi *et al.* 2008; Wang e Stoner 2008; Paixao *et al.* 2011). Tem sido descrita uma associação inversa entre o consumo de alimentos ricos em antocianinas e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Wallace 2011). Embora os mecanismos de acção destes polifenóis tenham sido essencialmente relacionados com a sua capacidade de reduzir o *stress* oxidativo e a inflamação no sistema vascular, o destino e modo de actuação das antocianinas tornou-se mais complexo do que era inicialmente expectável. Na realidade, as antocianinas possuem propriedades únicas: em soluções aquosas existem em diversas formas moleculares que se encontram em equilíbrio dinâmico e cuja composição depende do pH, temperatura e estrutura química da antocianina. Este último aspecto reveste-se de particular importância durante a sua passagem pelo tracto gastrointestinal onde elas são expostas a diferentes valores de pH, condicionando a sua absorção, metabolismo e bioactividade (Prior e Wu 2006).

É merecedor de destaque o facto de, não obstante toda a controvérsia acerca da sua biodisponibilidade, existirem evidências de que as antocianinas intactas são rapidamente absorvidas no estômago e intestino, surgindo na corrente sanguínea na sua forma nativa, ao contrário de outros flavonóides, para além de aparecerem como derivados metilados, glucoronizados e/ou sulfatados (McGhie e Walton 2007).

Recentemente demonstrámos que algumas antocianinas comuns, concretamente a Cy-, a Dp-, a Pg- e a Mv3glc, para além da sua elevada capacidade antioxidante, são ainda capazes de inibir os efeitos apoptóticos induzidos pelo peroxinitrito em células endoteliais intervindo ao nível da via mitocondrial de apoptose e impedindo a translocação nuclear da Bax (Paixao *et al.* 2011; 2012). Neste trabalho procurámos estudar os efeitos da Mv3glc (Figura 1), uma das antocianinas mais abundantes na natureza, em vias de sinalização reconhecidamente implicadas no processo

aterogénico. Em concreto, avaliámos a capacidade da Mv3glc em aumentar a biodisponibilidade do $\cdot\text{NO}$ assim como em inibir a activação do NF- κB induzida pelo peroxinitrito. Este estudo indica que esta antocianina aumenta a biosíntese de $\cdot\text{NO}$ dependente da eNOS através da fosforilação da Akt. Para além disso é capaz de suprimir a produção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, a expressão de COX-2 e a biosíntese de $\cdot\text{NO}$ derivado da iNOS, em células endoteliais activadas pelo peroxinitrito, muito provavelmente através da inibição da activação do factor de transcrição nuclear- κB .



Malvidina 3-*o*-glucósido

Figura 1. Estrutura química da Mv3glc.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

A malvidina-3-*o*-glucósido foi adquirida à Extrasynthese (Genay, França), com um grau de pureza superior a 97%, segundo avaliação por HPLC, tendo sido utilizada a partir de soluções em DMSO (5mM), armazenadas a -80°C , sob atmosfera de azoto. A concentração final de solvente nos ensaios realizados nunca excedeu 1% do volume. Para a cultura de células, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle medium*), a tripsina 0,25%, o soro fetal bovino e o tampão fosfato salino (PBS, *phosphate-buffered saline*) pH 7.4, foram obtidos da Gibco-Invitrogen. A NG-Nitro-*L*-arginina (*L*-NNA) foi adquirida à Tocris Bioscience.

Os outros reagentes laboratoriais, nomeadamente a mistura de inibidores de proteases, inibidores de fosfatases e estreptomomicina/penicilina, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA).

O anticorpo monoclonal primário específico produzido em coelho contra a fosfo-Akt (pAkt) proveio da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) e os anticorpos monoclonais primários produzidos em rato contra a fosfo-eNOS (peNOS) e iNOS foram adquiridos à

Abcam (Cambridge, Reino Unido); o anticorpo primário monoclonal produzido em rato contra a COX-2 foi comprado à Millipore e o anticorpo policlonal produzido em coelho contra o I κ B α foi adquirido à Cell Signalling Technology, Inc; o anticorpo policlonal produzido em coelho contra a 3-nitrotirosina proveio da Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY); o anticorpo monoclonal produzido em rato contra a β -actina bem como os anticorpos secundários contra anticorpo de rato e coelho foram obtidos da Sigma-Aldrich Co (St.Louis, MO, EUA).

2.2. Cultura celular

As células endoteliais da aorta bovina foram obtidas da aorta torácica de acordo com o procedimento previamente descrito no Capítulo 2 e posteriormente sub-cultivadas à confluência e utilizadas entre a quarta e a décima passagem. Previamente aos ensaios, as células com uma confluência aproximada de 80% foram privadas de soro durante pelo menos 6 horas.

Nos ensaios, as células foram tratadas utilizando peroxinitrito autêntico, i.e, sintetizado por nós, tal como descrito em “Materiais e Métodos”, Capítulo 2. Nas experiências com Mv3glc, as células foram pré-incubadas com 25 μ M deste composto durante 14 h. No final deste período de tempo, o meio de incubação foi removido e as células foram submetidas à agressão com peroxinitrito tal como descrito no referido Capítulo. A incorporação da Mv3glc pelas células endoteliais foi igualmente verificada. Na realidade, após o período de 14 horas de pré-incubação, a análise da Mv3glc nos extractos celulares por HPLC, conforme descrito por Youdim *et al.* (Youdim *et al.* 2000), indicou um valor médio de 3 nmoles de antocianina/mg de proteína. Assim, no presente trabalho, foram sempre utilizadas as 14 h de pré-incubação e os 25 μ M de Mv3glc. Nestes ensaios, nem a Mv3glc nem qualquer produto da sua reacção com componentes do meio de cultura, estiveram presentes durante e após o tempo de incubação com o peroxinitrito. Para além disso, durante os referidos períodos de tempo, incluindo o da pré-incubação com a antocianina, o meio utilizado não continha qualquer percentagem de soro.

2.3. Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de \cdot NO pelas BAEC foi indirectamente avaliada através da medida da quantidade de nitrito acumulada nos sobrenadantes das culturas celulares submetidas ou não a tratamento, de acordo com a reacção de Griess (Granger *et al.* 1996). Sucintamente, no final de

cada tempo de incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e misturados com volumes iguais (100 μ L) de dihidroclorato de naftiletlenodiamida a 0,1% em água e 100 μ L sulfanilamida a 1% em H_2PO_4 a 5%. A absorvência foi medida a 550 nm e a concentração de nitrito foi calculada utilizando uma curva padrão de nitrito de sódio em meio de cultura.

2.4. Análise por Western Blot

Para obter os extractos citoplasmáticos as células foram removidas de caixas de cultura de 60 mm e lisadas numa solução contendo 300 μ L de Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM, Nonidet P-40 a 0.5%, PMSF 1 mM, $NaVO_4$ 1 mM, β -glicerofosfato 10 mM, NaF 5 mM e mistura de inibidores de proteases a 1% (v/v), pH 7.5, durante 10 min em gelo. Os lisados foram centrifugados a 5000 g durante 5 min, a 4°C e os sobrenadantes recuperados e armazenados a -20°C. Para obter os extractos celulares totais as células foram removidas directamente para tampão de lise contendo Hepes 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glicerol a 10% (v/v), desoxicolato de sódio a 0.5% (w/v), Triton X-100 a 1% (v/v), PMSF 1 mM, mistura de inibidores de proteases a 1% (v/v), mantidas durante 20 min em gelo e centrifugadas a 16 000 g durante 20 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram então recuperados e armazenados a -20°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, utilizando reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA).

Aliquotas de cada amostra, equivalentes a 30 μ g proteína, foram analisadas por electroforese em gel de poli-acrilamida a 10% (v/v), na presença de SDS (SDS/PAGE) (intensidade de corrente constante de 20 mA por gel) e transferidas para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Amersham Biosciences, Reino Unido), durante 2 h a 200 mA. Para evitar ligações inespecíficas, as membranas foram bloqueadas durante 1h com leite magro a 5% em tampão salino suplementado com Tween 20 a 0,1% (v/v) (TBS-T: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 a 0.1%). Após esse período de tempo, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra a pAkt, peNOS, 3-nitrotirosina, iNOS ou COX-2 (durante a noite a 4°C). Após intensa lavagem com solução TBS-T, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com a fosfatase alcalina (1h, temperatura ambiente). Os complexos imunoreactivos foram detectados por quimiofluorescência, após tratamento com ECF (*enhanced chemifluorescent reagent*) (Amersham Biosciences, Reino Unido), num sistema de imagem Typhoon 9000 (Amersham Biosciences, Reino Unido). A β -actina foi usada como controlo interno para as proteínas citoplasmáticas. As bandas foram analisadas e quantificadas utilizando o *software* ImageQuant TM da Amersham Biosciences.

2.5. RT-PCR em tempo real

Para a análise em tempo real da expressão da iNOS e eNOS recorreu-se à reacção de polimerização em cadeia (PCR), precedida da reacção com a transcriptase reversa (RT-PCR). Para tal, o RNA total foi extraído das células utilizando um *kit* de extracção de RNA (Axygen Biosciences) e quantificado espectrofotometricamente utilizando um espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc), através das absorvências a 260 e 280 nm. A sua qualidade e integridade foram avaliadas por electroforese utilizando o sistema automatizado de electroforese em gel, Experion (Bio-Rad). A razão das absorvências a 260 e 280 nm situava-se entre 1.8-2.0 para todas as condições. Um µg do RNA total foi subsquentemente usado para sintetizar o correspondente DNA complementar (cDNA) utilizando o *kit* de síntese de cDNA iScript™ (Bio-Rad). Seguidamente, para a amplificação deste DNA recorreu-se ao *kit* iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), procedendo de acordo com as indicações do fabricante. Partiu-se de 2 µL de cDNA diluído a 1% e as condições de amplificação incluíram um período inicial de desnaturação a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos, cada um com três etapas: desnaturação a 95°C durante 30 s, ligação aos nucleótidos (*primer annealing ou* hibridização) a 58°C, durante 30 s e extensão a 72°C, 2 min, seguido de 10 min adicionais a 72°C. A especificidade de cada produto de PCR foi confirmada pela análise da curva de *melting*. Os oligonucleótidos (*primers*) foram desenhados recorrendo ao Beacon Designer 7 *software* (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) e usados numa concentração final de 200 nM. Para os genes em estudo utilizaram-se as seguintes sequências de oligonucleótidos: iNOS-*sense*-CTT GGA GAC AGA GTG GAAC, *antisense*-TAC AGA GTG GCG TGA CAG; eNOS-*sense*-TCT ACC GCT GTC CTG TTG, *antisense*-ACT GTA GGC TCT GGA ATA CC e para os genes de controlo interno as sequências foram: β-actina-*sense* GTC CAC CTT CCA GCA GAT GT, *antisense*-CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT; GAPDH-*sense*-GGG TCA TCA TCT CTG CAC CT, *antisense*-GGT CAT AAG TCC CTC CAC GA; CD31-*sense*-CTG GAG TCT TCA GCC ACA CA, *antisense*-TAT AAC CCG CTG TCC CAC TC.

A análise dos resultados foi efectuada recorrendo ao *software* de análise para PCR em tempo real, GenEx (MultiD Analyses), utilizando os valores de Ct (*cycle threshold*) de medições em duplicado para calcular a expressão dos genes alvo, com normalização para os referidos controlos internos.

2.6. Imunoprecipitação

O ensaio de imunoprecipitação para identificação do IκBα nitrado foi levado a cabo recorrendo ao uso de esferas de Sefarose (*A-Sepharose beads* CL-4B) adquiridas à Amersham

Biosciences. Resumidamente, e após incubação de 500 µg de proteína celular total, obtida tal como descrito em “Análise por Western blot” com o anticorpo contra IκBα, durante a noite a 4°C, adicionaram-se as esferas revestidas e incubou-se durante mais 3 h a 4°C. Após esta incubação, centrifugou-se (2 min, 2000 g) para remoção das esferas de Sefarose, e efectuaram-se três lavagens da proteína com tampão de lise (ponto 2.4 “Análise por Western blot”). As proteínas imunoprecipitadas foram então submetidas a 95°C durante 5 min em tampão desnaturante, separadas por SDS/PAGE, transferidas para membrana de PVDF e finalmente incubadas com o anticorpo primário contra a 3-nitrotirosina, durante a noite, a 4°C. A IκBα foi utilizada como controlo interno.

2.7. Determinação dos níveis de IL-6

As células com ou sem incubação prévia com Mv3glc foram submetidas à agressão com peroxinitrito tal como descrito no Capítulo 2. O meio de cultura no qual foram efectuadas as referidas incubações foi recolhido, a cada um dos tempos especificados, e armazenado a -20°C previamente à quantificação da citocina por ELISA e de acordo com as recomendações do fabricante (ThermoScientific). Os níveis de IL-6 foram calculados a partir de uma curva padrão (10-10000 pg/mL) com padrão de IL-6 de origem bovina.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± SEM do número de experiências indicado nas legendas das respectivas figuras. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *one-way analysis of variance*, seguida do teste de Dunnet, Bonferroni ou Tukey, conforme apropriado. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. A Mv3glc potencia a libertação de óxido nítrico em células endoteliais, particularmente quando submetidas à agressão com peroxinitrito

Para avaliar o mecanismo pelo qual a Mv3glc protege as células endoteliais da agressão desencadeada pelo peroxinitrito, investigámos a influência desta antocianina na produção de óxido

nítrico pelas células endoteliais. Na figura 2 está representada graficamente a produção de óxido nítrico pelas células quando estimuladas ou não com peroxinitrito e com ou sem pré-incubação com Mv3glc, determinada indirectamente pela análise do nitrito presente no sobrenadante das culturas celulares.

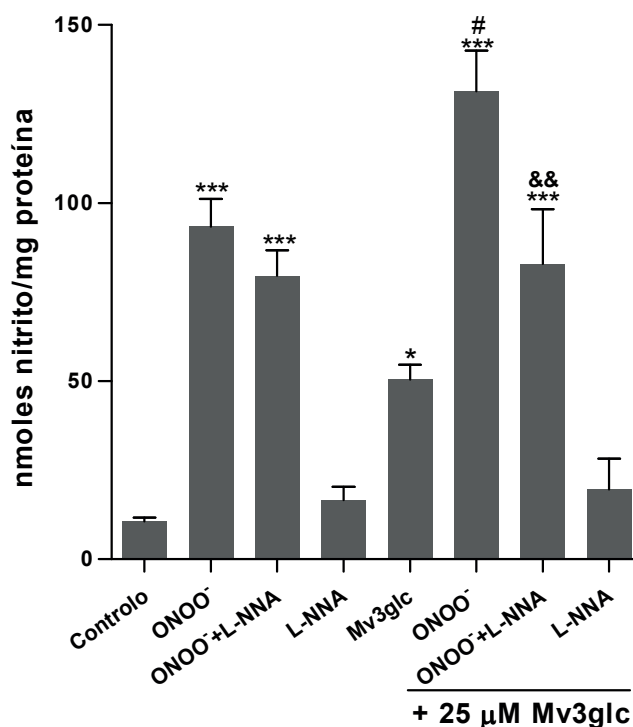


Figura 2. Produção de $\cdot\text{NO}$ em BAEC, avaliada pela medição da concentração de nitrito no meio de cultura através da reacção de Griess, 6 h após a agressão com peroxinitrito, na presença ou ausência de Mv3glc 25 μM . Quando indicado, 1 mM de L-NNA foi adicionado logo após a adição de ONOO⁻. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ vs controlo, # $P < 0.05$ [(Mv3glc+ONOO⁻) vs (ONOO⁻)] e && $P < 0.01$ [(Mv3glc+ONOO⁻+L-NNA) vs (Mv3glc+ONOO⁻)].

Os dados da Figura 2 evidenciam que, 6 h após a estimulação das células com ONOO⁻, a formação celular de nitrito alcançou níveis nove vezes superiores aos do controlo (células não estimuladas) e que nas células pré-incubadas com Mv3glc este aumento foi muito mais significativo (cerca de treze vezes). Para determinar a origem desta produção de $\cdot\text{NO}$, as células foram também incubadas com L-NNA, um inibidor selectivo da eNOS. Nestas condições, observámos uma diminuição não significativa na formação de nitrito em células apenas estimuladas com peroxinitrito, sugerindo que a produção de $\cdot\text{NO}$ ocorreu por uma via independente da eNOS. Contudo, o pré-tratamento das células com Mv3glc antes da agressão com peroxinitrito na pre-

sença de L-NNA, levou a uma diminuição na formação de nitrito em cerca de 40%, relativamente ao controlo obtido em condições similares mas sem L-NNA, sugerindo agora uma considerável contribuição da actividade da eNOS para os níveis de $\cdot\text{NO}$ produzido pelas células. Curiosamente, a Mv3glc *per se* aumentou de forma significativa a formação de nitrito, mas quando se adicionou o inibidor da eNOS, não se constatou o referido aumento, sugerindo, uma vez mais, o envolvimento da eNOS na produção de $\cdot\text{NO}$ na presença da Mv3glc.

3.2. A Mv3glc induz a fosforilação da Akt e da eNOS e diminui a expressão da iNOS na presença de peroxinitrito

É um facto conhecido que, em resposta a diferentes tipos de estímulos, a eNOS é fosforilada pela Akt. Anteriormente, demonstrámos que o peroxinitrito inibe a fosforilação da Akt em células endoteliais, um efeito contrariado pelas antocianinas, cianidina-, delphinidina- e pelargonidina-3-glucósido (Paixao *et al.* 2011). Agora, e tal como demonstrado na Figura 3 A e B, a Mv3glc comporta-se de forma similar, prevenindo a desfosforilação da pAkt induzida pelo peroxinitrito e aumentando o seu grau de fosforilação, alcançando o seu efeito mais expressivo às 4 h de incubação (80% superior ao controlo). Paralelamente, a Mv3glc aumentou também a fosforilação da eNOS de uma forma dependente do tempo (Figura 3 A e C), sugerindo a eNOS como fonte principal de produção de $\cdot\text{NO}$ em células endoteliais, quando previamente incubadas com Mv3glc e também quando a esta pré-incubação se seguiu a agressão com peroxinitrito (Figura 2).

Por outro lado, a Mv3glc isoladamente, não afectou de forma significativa os níveis intracelulares de iNOS, mas possibilitou uma redução apreciável do aumento dos níveis intracelulares de iNOS induzido pelo peroxinitrito (Figura 3 D e E), reforçando os resultados obtidos relativos à produção de $\cdot\text{NO}$ (Figura 2). De salientar que, os níveis residuais de iNOS nas células controlo (Figura 3 D e E) constituem uma situação comum em células de culturas primárias reconhecidamente mais sensíveis à privação de soro e à tripsinização, despoletando uma resposta a estas condições agressivas. Um raciocínio análogo pode fazer-se a propósito do aparente aumento de iNOS nas células pré-incubadas com Mv3glc, acrescentando que este aumento nunca foi, em nenhum dos ensaios realizados, significativo, quando comparado com o controlo. Em contraste, nas células estimuladas com o $\text{ONOO}\cdot$ verificaram-se aumentos significativos na iNOS relativamente ao controlo.

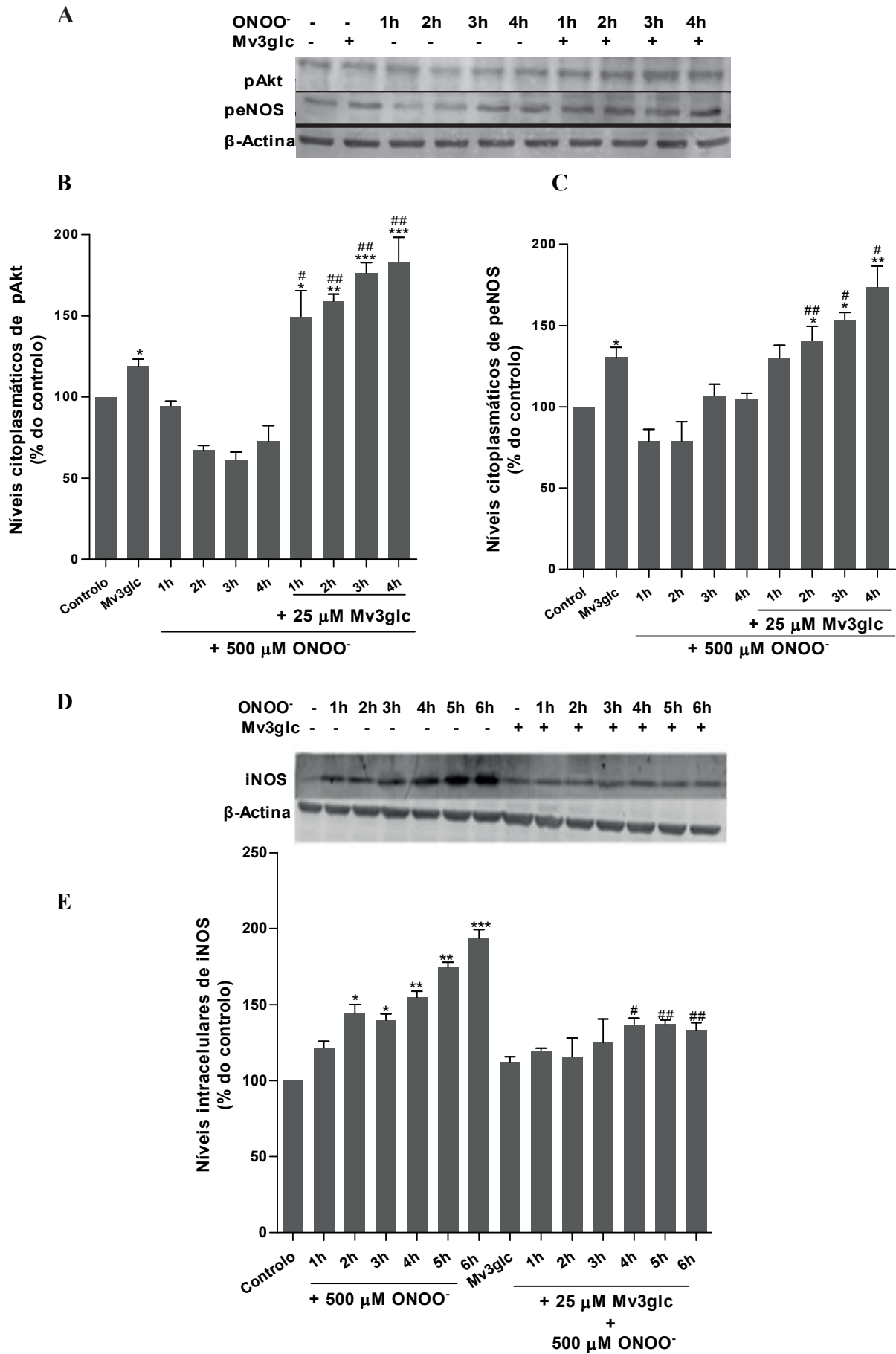


Figura 3. A Mv3glc aumenta eficazmente os níveis citoplasmáticos das formas fosforiladas da Akt (pAkt) (**B**) e da eNOS (peNOS) (**C**) e diminui a expressão da proteína iNOS (**E**) após a agressão do peroxinitrito às células endoteliais. As proteínas citoplasmáticas totais foram extraídas de células incubadas com Mv3glc 25 μ M posteriormente tratadas ou não com peroxinitrito durante 10 min, conforme descrito em “Materiais e Métodos”, e mantidas durante os períodos de tempo indicados em meio sem soro e a 37°C. Estes extractos proteicos foram então analisados por *immunoblot* com anticorpos específicos contra pAkt, peNOS e iNOS. Apresentam-se *blots* representativos (**A, D**) e as respectivas análises densitométricas de três experiências independentes (**B, C, E**) normalizadas para a β -actina endógena e expressas como valores médios \pm SEM da percentagem do controlo, obtido na ausência de peroxinitrito. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ vs Controlo; # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ vs ONOO \cdot para o mesmo tempo de incubação.

3.3. A Mv3glc aumenta a expressão da eNOS e diminui a expressão da iNOS desencadeadas pelo peroxinitrito alterando os níveis de RNA mensageiro

Para elucidar os efeitos da Mv3glc e do peroxinitrito ao nível transcricional, avaliámos os níveis de mRNA da iNOS e eNOS por PCR em tempo real (Figura 4). Os resultados obtidos demonstram que, a Mv3glc 25 μ M aumentou os níveis de mRNA da eNOS, um efeito observado em células incubadas com esta antocianina isoladamente ou posteriormente estimuladas com peroxinitrito. Em contraste, em BAEC pré-incubadas com a Mv3glc antes da adição de peroxinitrito, constatou-se uma diminuição dos níveis de mRNA da iNOS. Efectivamente, o peroxinitrito, por si só, aumentou os níveis de mRNA para a iNOS (três vezes e meia os valores do controlo) não afectando de forma significativa os valores de mRNA da eNOS. Já a Mv3glc conseguiu duplicar os valores de mRNA eNOS do controlo e ainda aumentá-los mais (quatro vezes o controlo) em células posteriormente agredidas com peroxinitrito. Para além disso, em células pré-incubadas com Mv3glc verificou-se um decréscimo significativo nos níveis de mRNA da iNOS em células estimuladas com peroxinitrito, reduzindo em cerca de 40% o aumento observado 4 h após a adição de peroxinitrito.

Os resultados obtidos evidenciam um duplo efeito da Mv3glc na produção de óxido nítrico, ou seja, aumento ou diminuição, consoante se verifica activação da expressão da eNOS ou diminuição da expressão da iNOS, respectivamente.

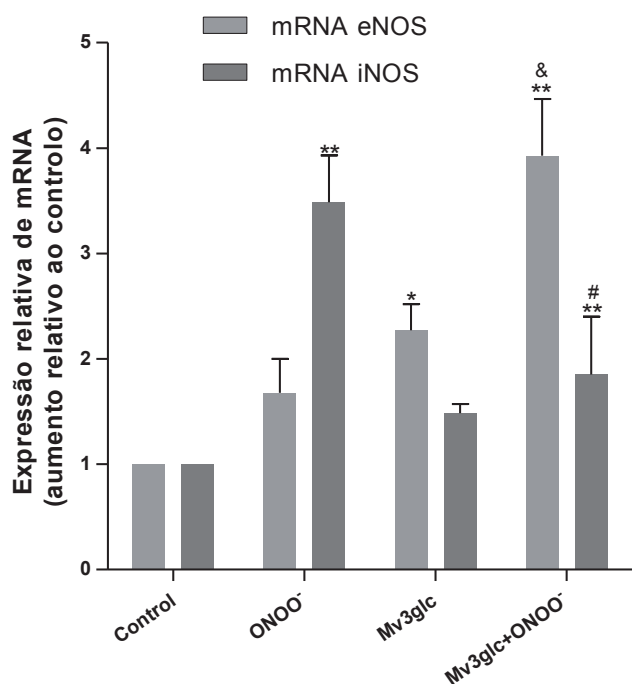


Figura.4 Efeito da Mv3glc no mRNA da eNOS e da iNOS em BAEC, quer isoladamente quer 4 h após a agressão com ONOO⁻, de acordo com os resultados de PCR em tempo real. Os resultados apresentados constituem valores médios \pm SEM de cinco experiências diferentes. *P<0.05 e **P<0.01 vs controlo; #P<0.05 vs ONOO⁻; &P<0.05 vs Mv3glc.

3.4. A Mv3glc impede a activação do NF- κ B, mediada pelo peroxinitrito, prevenindo a nitração do I κ B

Para avaliar se a via do NF- κ B poderia ser activada pelo peroxinitrito em BAEC, nas nossas condições experimentais, as células foram expostas a peroxinitrito autêntico 500 μ M durante 10 minutos. Verificou-se que este oxidante induziu uma activação transitória do NF- κ B, evidenciada pela degradação de cerca de 50% dos valores de I κ B α relativos ao controlo, 1 h após a agressão com peroxinitrito (Figura 5 A e B). No entanto, em células pré-incubadas com Mv3glc 25 μ M não se verificou qualquer degradação, sugerindo que esta concentração de antocianina neutralizou por completo o efeito do peroxinitrito. Para esclarecer os mecanismos subjacentes a este processo degradativo mediado pelo ONOO⁻, os extractos citoplasmáticos foram analisados por Western Blot para a fosfo-I κ B α (pI κ B α) e para a nitrotirosina. Não se detectou qualquer I κ B α fosforilada (resultados não apresentados) mas, pelo contrário, constatou-se uma nitração massiva dos resíduos de tirosina proteicos, nitração esta, marcadamente abolida pelo pré-tratamento com Mv3glc (Figura 5 C). Quando se procedeu à imunoprecipitação com anti-I κ B α e posterior *immunoblot* para a nitrotirosina, detectou-se uma acentuada nitração da banda correspondente ao I κ B α , conforme exemplificado para um extracto obtido 1 h após a agressão com ONOO⁻ (Figura 5 D). Uma vez mais, nas células pré-incubadas com Mv3glc não se observou nem a degradação, nem a nitração do I κ B α (Figura 5 D) evidenciando a considerável protecção proporcionada pela Mv3glc perante a activação do NF- κ B protagonizada pelo ONOO⁻. Na verdade, os resultados obtidos até agora mostravam um aumento da expressão da iNOS (Figuras 3 E e 4), o que poderia indicar activação do NF- κ B. No entanto, decidimos explorar também a expressão da COX-2 e da IL-6, com a finalidade de confirmar esta hipótese.

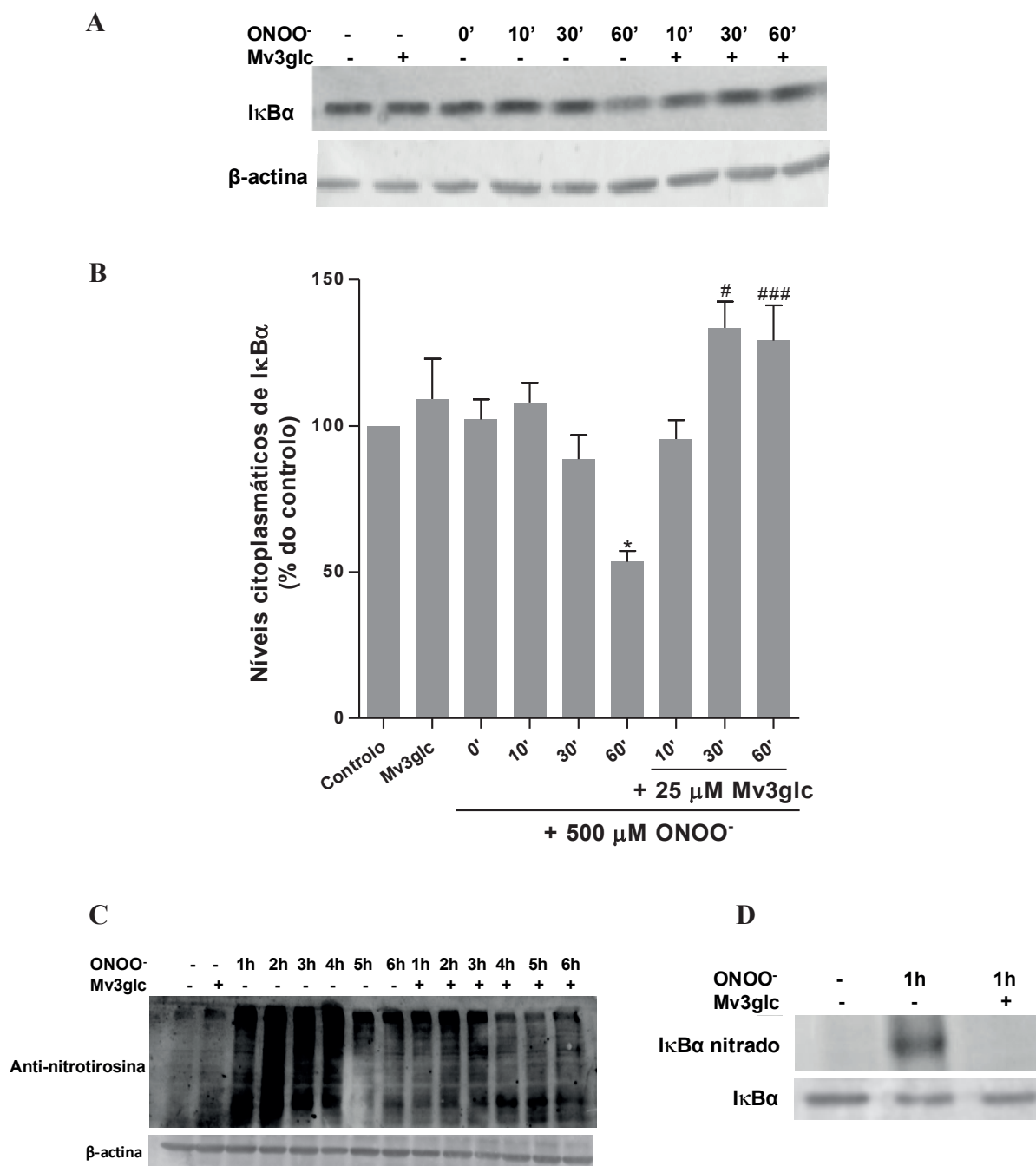


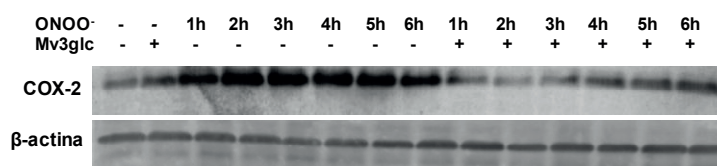
Figura 5. (A,B) A Mv3glc previne a degradação do IκBα mediada pelo peroxinitrito em células endoteliais. BAEC confluentes, mantidas sem soro, foram pré-incubadas com Mv3glc 25 μM e posteriormente agredidas com ONOO⁻ 500 μM durante 10 min, tal como descrito em “Materiais e Métodos”. Os extractos proteicos citoplasmáticos foram então analisados por *immunoblot* com um anticorpo específico contra o IκBα. São apresentados *blots* representativos (A) e quantificações por densitometria de três ensaios independentes (B). Os resultados apresentados foram normalizados para a β-actina endógena e expressos como valores médios ± SEM da percentagem do controlo ou de ONOO⁻. **P* < 0.05 vs controlo, #*P* < 0.05, ###*P* < 0.001 vs ONOO⁻ para o mesmo tempo de incubação. (C,D) A Mv3glc conseguiu também inibir de forma eficaz a nitração dos resíduos de tirosina proteicos, induzida pelo peroxinitrito. Os extractos proteicos foram analisados por *immunoblot* com um anticorpo específico contra a nitrotirosina (C). A imunoprecipitação do IκBα foi efectuada com extractos recolhidos 1 h após a adição de peroxinitrito (D).

3.5. A Mv3glc reduz os níveis de COX-2 e a produção de IL-6 induzidas pelo peroxinitrito

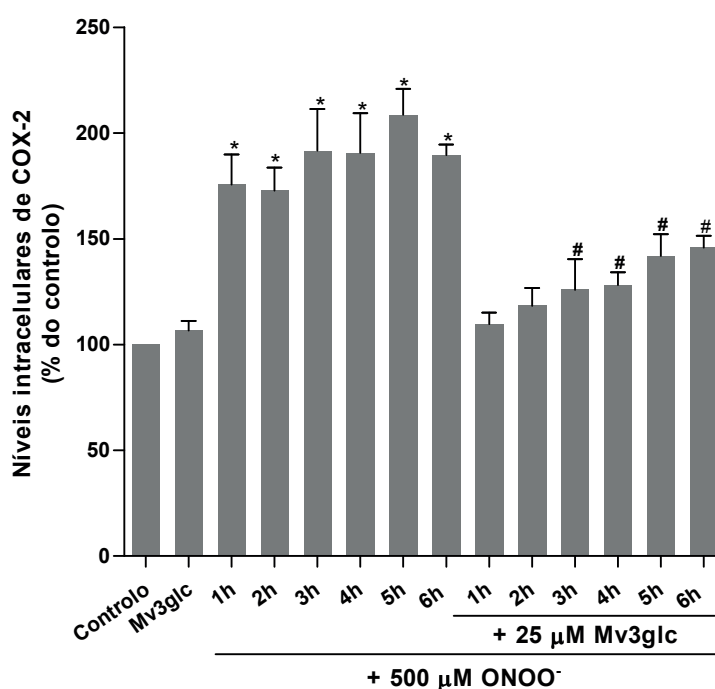
Atendendo a que, classicamente a activação do NF- κ B passa pela fosforilação do I κ B α , tal como referido na Introdução geral, e que os resultados por nós obtidos não revelaram essa reacção mas sim a nitração daquela molécula inibidora, impunha-se confirmar se o peroxinitrito era ou não capaz de activar o NF- κ B. De facto, o peroxinitrito foi capaz de aumentar significativamente a expressão da COX-2, alcançando valores cerca de duas vezes superiores aos do controlo, como evidenciado na figura 6 A e B, logo após a 1 h e até às 6 h de estimulação das células. Estes efeitos foram eficazmente suprimidos pela Mv3glc. Concomitantemente, em células estimuladas com o peroxinitrito, ocorreu uma considerável libertação de IL-6, dependente do tempo, que foi apreciavelmente reduzida pelo pré-tratamento com Mv3glc (Figura 6 C).

Merece destaque o facto destas acções inibitórias da Mv3glc não serem decorrentes da sua toxicidade já que as concentrações usadas não afectaram a viabilidade celular, conforme se demonstra pelo teste de viabilidade celular apresentado na Figura 2B do capítulo 2.

A



B



C

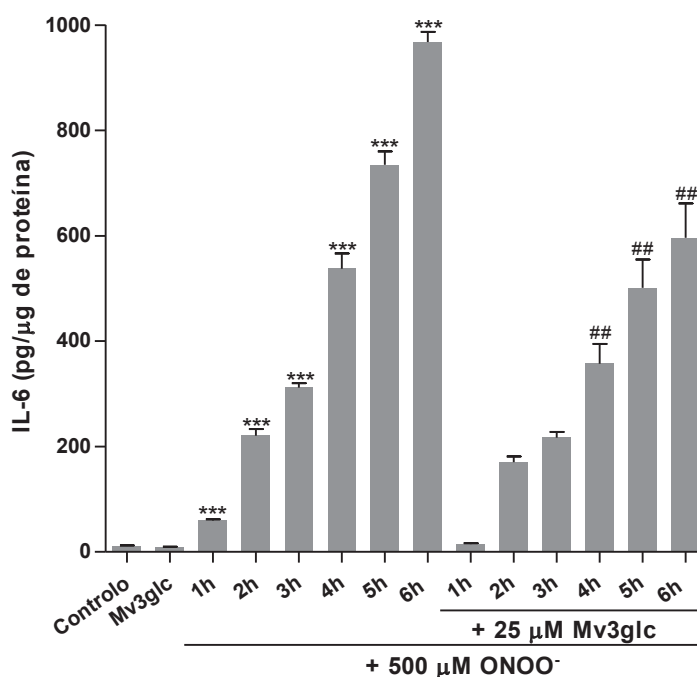


Figura 6. A Mv3glc reduz de forma significativa o aumento dos níveis de COX-2 e IL-6 induzidos pelo peroxinitrito em BAEC. Os extractos proteicos totais e os sobrenadantes das culturas de células pré-incubadas com Mv3glc 25 μM com ou sem posterior tratamento com peroxinitrito e mantidas, durante os tempos indicados, em meio sem soro a 37°C, conforme referido em “Materiais e Métodos”, foram recolhidos e analisados por *immunoblot* com um anticorpo específico contra a COX-2 (A,B), ou por ELISA para a IL-6, respectivamente (C). Apresenta-se um *blot* representativo normalizado para a β -actina endógena (A) bem como a produção de IL-6 (C), evidenciando o considerável efeito inibidor da Mv3glc. Os resultados apresentados são expressos como valores médios \pm SEM. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ vs Controlo e # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ vs ONOO⁻ para o mesmo tempo de incubação.

4. Discussão

O presente estudo demonstrou que a Mv3glc, uma antocianina típica, aumentou a produção do $\cdot\text{NO}$ derivado da eNOS e protegeu as células endoteliais da inflamação mediada pelo peroxinitrito. O óxido nítrico em mamíferos, é sintetizado por três óxido nítrico sintases distintas, concretamente a neuronal (nNOS), a indutível (iNOS) e a endotelial (eNOS), com diferentes actividades biológicas. O $\cdot\text{NO}$ derivado da eNOS desempenha um papel fisiológico na regulação do tónus vascular e pressão sanguínea, enquanto a sobreprodução de $\cdot\text{NO}$ resultante da actividade da NOS indutível parece ser um mediador ubíquo da inflamação vascular, incluindo o processo aterosclerótico (Hattori *et al.* 2004).

Concretamente, demonstrámos que a Mv3glc aumenta a fosforilação da eNOS e a sua expressão em BAEC, efeitos estes que podem justificar o aumento na produção de $\cdot\text{NO}$ mediado

por esta antocianina. De facto, nos nossos resultados a Mv3glc apresentou um efeito significativo na fosforilação da eNOS através da activação da Akt, um mecanismo já evidenciado para outros polifenóis, nomeadamente a Cy3glc (Xu *et al.* 2004), contribuindo desta forma para a bioactividade da eNOS e conseqüentemente para a homeostase cardiovascular. Este efeito foi significativamente exacerbado quando as células endoteliais foram submetidas à agressão com peroxinitrito, após a pré-incubação com a antocianina. A fosforilação da Akt foi paralela à da eNOS, conduzindo a um aumento dos níveis de $\cdot\text{NO}$.

Para indagar mais aprofundadamente quais os mecanismos celulares envolvidos na produção de $\cdot\text{NO}$ induzida pela Mv3glc, investigámos os níveis de RNA mensageiro da iNOS e eNOS. Nas células pré-tratadas com Mv3glc, os níveis de mRNA para a eNOS aumentaram de forma significativa, sendo esse aumento muito mais expressivo quando as células foram posteriormente submetidas ao peroxinitrito, sugerindo que a Mv3glc potencia os mecanismos intrínsecos de defesa celular, modelando directamente a eNOS. Na realidade, considera-se que o $\cdot\text{NO}$ derivado do endotélio sintetizado pela eNOS está criticamente envolvido na regulação de múltiplas propriedades protectoras do endotélio funcional (Schmitt e Dirsch 2009). A elucidação do mecanismo subjacente ao aumento do mRNA da eNOS encontra-se fora do âmbito do presente trabalho; contudo, com base em estudos com polifenóis realizados por outros autores, podemos especular que a Mv3glc possa actuar tanto ao nível transcricional como pós-transcricional (Wallerath *et al.* 2003; Xu *et al.* 2004). Efeitos opostos obtiveram-se para o mRNA da iNOS já que a Mv3glc *per se*, não aumentou a expressão da iNOS, mas foi capaz de reduzir de forma significativa os seus níveis em células sob a agressão do peroxinitrito, indicando que a produção de $\cdot\text{NO}$ observada nesta situação resultou, maioritariamente, da activação da iNOS. Se, tal como sugerido por Laroux *et al.* (2001), o $\cdot\text{NO}$ produzido na reacção catalisada pela eNOS é benéfico e aquele resultante da iNOS é deletério, a Mv3glc parece ser duplamente eficaz no controlo dos níveis de $\cdot\text{NO}$. Considerando que, nas células endoteliais, a indução da iNOS requer, geralmente, a activação do NF- κ B (Cooke e Davidge 2002), testámos os efeitos da Mv3glc na activação deste factor de transcrição induzida pelo peroxinitrito.

O NF- κ B é um factor de transcrição normalmente mantido no citoplasma, numa forma inactiva, ligado a proteínas inibitórias, as I κ Bs, e que desempenha um papel crucial na resposta inflamatória, regulando a expressão de diversos mediadores *major* pró-inflamatórios (Hattori *et al.* 2004). É um facto conhecido que o peroxinitrito é um modelador de várias vias de sinalização celular e, embora alguns estudos tenham descrito a sua potencial acção como estímulo inflamatório, os resultados são contraditórios (Hattori *et al.* 2004; Levrant *et al.* 2005). Os nossos resultados demonstram, pela primeira vez em células endoteliais, um efeito directo do peroxinitrito na degradação do I κ B α , aumentando assim a expressão e produção de mediadores inflamatórios

dependentes do NF- κ B, nomeadamente a COX-2, a iNOS e a IL-6. A pré-incubação das células com Mv3glc 25 μ M durante 14 h, conduziu a um significativo decréscimo na activação do NF- κ B devida à exposição das células ao peroxinitrito, conforme demonstrado pela inibição da degradação do inibidor citoplasmático, I κ B α . Embora se encontre descrito que a activação do NF- κ B ocorre maioritariamente através da fosforilação das moléculas inibidoras, as I κ Bs, nas nossas condições de ensaio, não se observou qualquer fosforilação mas, em alternativa, verificou-se uma significativa nitração do I κ B α . A nitração da tirosina livre ou de resíduos de tirosina com formação de nitrotirosina, é uma reacção bem conhecida do peroxinitrito *in vitro* (Radi 2004). Sabe-se também que a nitração de proteínas pode afectar a sua estrutura e função, tendo sido descritos tanto ganhos como perdas de função. Para além disso, a nitração de um resíduo de tirosina pode prevenir a fosforilação ou, estimulá-la, permitindo, dessa forma, a activação da proteína (Turko *et al.* 2002). Os nossos resultados respeitantes à nitração do I κ B α estão de acordo com outros reportados em monócitos e reforçam a ideia de que as moléculas de I κ B contendo resíduos de tirosina nitrados constituem elas próprias alvos para a degradação por proteases, conduzindo à activação do NF- κ B (Matata e Galinanes 2002). A Mv3glc provou a sua eficácia neste processo ao reduzir drasticamente a nitração das proteínas, em particular a do I κ B α . Este efeito poderá ser, em parte, explicado pelas propriedades antioxidantes demonstradas por esta antocianina, em particular a sua capacidade de captação do peroxinitrito, como se demonstrou recentemente (Paixao *et al.* 2012). De igual forma, outros autores, demonstraram a inibição da activação do NF- κ B mediada pelo peroxinitrito, por antioxidantes como a *N*-acetilcisteína e a epigalocatequina-3-galato, reforçando a relevância dos antioxidantes em processos onde a neutralização de espécies reactivas é crucial (Bar-Shai e Reznick 2006). Adicionalmente, este estudo demonstrou que a Mv3glc não só diminuiu a expressão da iNOS, mas também reduziu os níveis de COX-2 e IL-6, intervenientes fundamentais no processo inflamatório regulados pelo NF- κ B e que se revestem de particular importância no contexto da aterogénese. De realçar que a Mv3glc foi, não só eficaz na redução dos níveis de iNOS, COX-2 e IL-6, como este efeito se manteve até 6 h após a agressão com o peroxinitrito.

Em conclusão, estes resultados expandem os nossos conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na citoprotecção vascular proporcionada pelas antocianinas, nomeadamente pela Mv3glc. Todavia, a relevância deste estudo na transposição para o cenário *in vivo*, carece de confirmação, particularmente no que respeita às concentrações de antocianina alcançáveis fisiologicamente. Nunca é demais reforçar que devido às condicionantes relativas à sensibilidade e duração temporal dos estudos *in vitro*, por vezes, os efeitos só são mensuráveis recorrendo a concentrações aparentemente elevadas. Contudo, *in vivo*, a administração continuada ou a ingestão regular de doses moderadas de antocianinas poderá permitir um efeito cumulativo

destes flavonóides, facto já demonstrado experimentalmente em animais (Kalt *et al.* 2008), pelo que as concentrações plasmáticas poderão não traduzir os seus níveis tecidulares; assim, o recurso a doses reduzidas de antocianinas, através de uma exposição mais duradoura das células, pode possibilitar a obtenção de efeitos sistémicos benéficos. Durante muito tempo considerou-se que estes compostos tinham biodisponibilidades irrelevantes, com valores inferiores a 1% das quantidades ingeridas a alcançarem o plasma (Manach *et al.* 2005). No entanto, alguns estudos recentes alertaram para a hipótese de que a biodisponibilidade destes compostos naturais pode estar subestimada devido ao facto da esmagadora maioria dos estudos utilizar métodos de detecção baseados na conversão completa, por acidificação, de todas as formas químicas conhecidas para as antocianinas, num catião flavílio corado. Contudo, é possível que algumas dessas formas que existem a pH neutro, pelo facto de se poderem ligar a biomoléculas, em particular, a proteínas, não sejam convertidas na forma de catião flavílio, permanecendo, assim, indetectadas (Manach *et al.* 2005; McGhie *et al.* 2007; Wallace 2011).

Em suma, os resultados aqui reportados, embora não possam ser linearmente transpostos para uma situação *in vivo*, acrescentam importantes esclarecimentos ao conhecimento dos mecanismos moleculares através dos quais a Mv3glc pode interferir com cascatas de sinalização cruciais no contexto da prevenção da disfunção endotelial. Por outro lado, tem-se verificado um interesse crescente na veiculação destes compostos no sentido de aumentar a sua biodisponibilidade o que conduziu a um renovado interesse na clarificação dos mecanismos celulares em que podem estar envolvidos (Oehme *et al.* 2011; Oidtmann *et al.* 2012).

Assim, os resultados deste estudo demonstraram que, em células endoteliais, esta antocianina estimula a transcrição de mRNA da eNOS aumentando a produção de NO catalisada por esta enzima. Em células sob agressão pelo peroxinitrito, a Mv3glc inibe vários estímulos pró-inflamatórios, nomeadamente a iNOS, COX-2 e IL-6, através da supressão da activação do NF-κB. No conjunto, o nosso trabalho indica que a Mv3glc poderá ser uma molécula promissora para o desenvolvimento de alimentos funcionais ou nutracêuticos capazes de melhorar a função endotelial e assim prevenir a progressão da doença aterosclerótica.

5. Referências bibliográficas

- Bar-Shai, M.e Reznick, A.Z. (2006). "Reactive nitrogen species induce nuclear factor-kappaB-mediated protein degradation in skeletal muscle cells." Free Radic Biol Med **40**(12): 2112-2125.
- Cai, H.e Harrison, D.G. (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-844.
- Collins, T.e Cybulsky, M.I. (2001). "NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?" J Clin Invest **107**(3): 255-264.
- Cooke, C.L.e Davidge, S.T. (2002). "Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C395-402.
- Cooke, J.P. (2003). "Flow, NO, and atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 768-770.
- Davignon, J.e Ganz, P. (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.
- de Winther, M.P., Kanters, E., Kraal, G.e Hofker, M.H. (2005). "Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 904-914.
- Granger, D.L., Taintor, R.R., Boockvar, K.S.e Hibbs, J.B., Jr. (1996). "Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction." Methods Enzymol **268**: 142-151.
- Hattori, Y., Kasai, K.e Gross, S.S. (2004). "NO suppresses while peroxynitrite sustains NF-kappaB: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO." Cardiovasc Res **63**(1): 31-40.
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T.e Munzel, T. (2001). "Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease." Circulation **104**(22): 2673-2678.
- Irani, K. (2000). "Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling." Circ Res **87**(3): 179-183.
- Janssen-Heininger, Y.M., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., *et al.* (2008). "Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises." Free Radic Biol Med **45**(1): 1-17.
- Kalt, W., Blumberg, J.B., McDonald, J.E., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Fillmore, S.A., Graf, B.A., *et al.* (2008). "Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs." J Agric Food Chem **56**(3): 705-712.
- Laroux, F.S., Pavlick, K.P., Hines, I.N., Kawachi, S., Harada, H., Bharwani, S., *et al.* (2001). "Role of nitric oxide in inflammation." Acta Physiol Scand **173**(1): 113-118.
- Levrard, S., Pesse, B., Feihl, F., Waeber, B., Pacher, P., Rolli, J., *et al.* (2005). "Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF- κ B activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines." J Biol Chem **280**(41): 34878-34887.

- Li, H., Wallerath, T.e Forstermann, U. (2002). “Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase.” Nitric Oxide **7**(2): 132-147.
- Liaudet, L., Vassalli, G.e Pacher, P. (2009). “Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways.” Front Biosci **14**: 4809-4814.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A.e Remesy, C. (2005). “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.” Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 230S-242S.
- Mann, G.E., Rowlands, D.J., Li, F.Y., de Winter, P.e Siow, R.C. (2007). “Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression.” Cardiovasc Res **75**(2): 261-274.
- Matata, B.M.e Galinanes, M. (2002). “Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity.” J Biol Chem **277**(3): 2330-2335.
- McGhie, T.K.e Walton, M.C. (2007). “The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding.” Mol Nutr Food Res **51**(6): 702-713.
- Oehme, A., Valotis, A., Krammer, G., Zimmermann, I.e Schreier, P. (2011). “Preparation and characterization of shellac-coated anthocyanin pectin beads as dietary colonic delivery system.” Mol Nutr Food Res **55** Suppl 1: S75-85.
- Oidtmann, J., Schantz, M., Mader, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., *et al.* (2012). “Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems.” J Agric Food Chem **60**(3): 844-851.
- Pacher, P., Beckman, J.S.e Liaudet, L. (2007). “Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.” Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Paixao, J., Dinis, T.C.e Almeida, L.M. (2011). “Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an in vitro approach.” Apoptosis **16**(10): 976-989.
- Paixao, J., Dinis, T.C.e Almeida, L.M. (2012). “Protective role of malvidin-3-glucoside on peroxynitrite-induced damage in endothelial cells by counteracting reactive species formation and apoptotic mitochondrial pathway.” Oxid Med Cell Longev **2012**: 428538.
- Peluffo, G.e Radi, R. (2007). “Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology.” Cardiovasc Res **75**(2): 291-302.
- Prior, R.L.e Wu, X. (2006). “Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities.” Free Radic Res **40**(10): 1014-1028.
- Radi, R. (2004). “Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration.” Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-4008.
- Schewe, T., Steffen, Y.e Sies, H. (2008). “How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper.” Arch Biochem Biophys **476**(2): 102-106.

- Schmitt, C.A.e Dirsch, V.M. (2009). “Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products.” Nitric Oxide **21**(2): 77-91.
- Searles, C.D. (2006). “Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression.” Am J Physiol Cell Physiol **291**(5): C803-816.
- Tsoyi, K., Park, H.B., Kim, Y.M., Chung, J.I., Shin, S.C., Lee, W.S., *et al.* (2008). “Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression and PGE2 production through regulation of the nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.” J Agric Food Chem **56**(19): 8969-8974.
- Turko, I.V.e Murad, F. (2002). “Protein nitration in cardiovascular diseases.” Pharmacol Rev **54**(4): 619-634.
- Victor, V.M., Rocha, M., Sola, E., Banuls, C., Garcia-Malpartida, K.e Hernandez-Mijares, A. (2009). “Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis.” Curr Pharm Des **15**(26): 2988-3002.
- Wallace, T.C. (2011). “Anthocyanins in cardiovascular disease.” Adv Nutr **2**(1): 1-7.
- Wallerath, T., Poleo, D., Li, H.e Forstermann, U. (2003). “Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects.” J Am Coll Cardiol **41**(3): 471-478.
- Wang, L.S.e Stoner, G.D. (2008). “Anthocyanins and their role in cancer prevention.” Cancer Lett **269**(2): 281-290.
- Xu, J.W., Ikeda, K.e Yamori, Y. (2004). “Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment.” Hypertension **44**(2): 217-222.
- Youdim, K.A., Martin, A.e Joseph, J.A. (2000). “Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress.” Free Radic Biol Med **29**(1): 51-60.

Capítulo 4

A malvidina 3-glucósido interfere com os factores de transcrição NF- κ B e Nrf2 em células endoteliais humanas contribuindo para o equilíbrio entre mediadores pró- e anti-inflamatórios

1. Introdução

Na última década, temos assistido a um notável incremento no conhecimento científico sobre o papel benéfico das antocianinas, ao nível de diversas patologias relacionadas com o *stress* oxidativo, incluindo a aterosclerose (Wang e Stoner 2008; Wallace 2011), uma doença multifactorial na qual a disfunção endotelial e a inflamação desempenham um papel crítico (Lusis 2000; Tousoulis *et al.* 2011).

Tal como anteriormente referido, o peroxinitrito tem sido reconhecido como um importante interveniente na aterogénese, conseguindo alcançar elevadas concentrações no endotélio vascular sujeito ao *shear stress* e nos vasos ateroscleróticos, contribuindo para a produção das estrias gordas e a conseqüente formação das placas ateroscleróticas, por diferentes mecanismos, em particular, através da perturbação da reactividade vascular e de processos celulares críticos que conduzem à apoptose ou necrose e à exacerbação do estado inflamatório vascular (Pacher *et al.* 2007; Paixao *et al.* 2011).

Diversos investigadores demonstraram que a maior parte dos genes sobre-expressos numa situação de inflamação, como são exemplo aqueles que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias, são predominantemente controlados pelo factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Blackwell *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2006). De facto, nas células endoteliais, o NF- κ B está envolvido na regulação transcricional e pós-transcricional de vários mediadores inflamatórios relevantes no contexto do desenvolvimento do processo aterogénico, nomeadamente a iNOS e a COX-2, entre muitos outros (Denk *et al.* 2001; Cooke e Davidge 2002). O inibidor do NF- κ B, o I κ B α , impede a activação deste factor de transcrição, enquanto que o proteassoma permite essa activação ao degradar o I κ B α (Rajkumar *et al.* 2005; Milano *et al.* 2007). O proteassoma é um complexo multicatalítico, responsável pela eliminação de proteínas celulares alteradas ou dispensáveis após respectiva ubiquitinação e cuja actividade é afectada por oxidantes, incluindo o peroxinitrito (Grune *et al.* 1998; Cascio *et al.* 2001; Grune *et al.* 2001)

São diversas as evidências que sugerem que a via ubiquitina-proteassoma é capaz não só de modelar a actividade das óxido nítrico sintases, enzimas chave na manutenção da homeostase vascular, como também de interagir com mediadores vasoactivos envolvidos na regulação de funções endoteliais e influenciar as respostas ao *stress* na vasculatura, contribuindo desta forma para a regulação da função endotelial (Stangl e Stangl 2010). Para além do mencionado, é ainda atribuída a esta via a responsabilidade pelo “controlo de qualidade” das proteínas, controlo do ciclo celular, regulação de factores de transcrição, da expressão génica, diferenciação celular e resposta imune (Jesenberger e Jentsch 2002; Goldberg 2003; Muratani e Tansey 2003). Contudo,

a sua crescente importância no contexto da aterosclerose levanta a questão da via ubiquitina-proteassoma poder estar ou não implicada na fase inicial de dano vascular, ou seja, no processo de disfunção endotelial (Marfella *et al.* 2007). O aumento dos níveis de antioxidantes endógenos, como a heme oxigenase-1 (HO-1), glutatíon-S-transferases e glutatíon, devido à inibição do proteassoma e a consequente activação do *nuclear erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) já foram demonstrados em diferentes tipos de células (Yamamoto *et al.* 2007; Sahni *et al.* 2008; Dreger *et al.* 2009).

Os mecanismos endógenos de defesa contra o *stress* oxidativo resultante da produção aumentada de espécies reactivas ou da depleção de antioxidantes, consistem essencialmente no incremento dos níveis de enzimas celulares, como a glutatíon peroxidase e de enzimas de destoxificação de fase II. Os genes que codificam estas proteínas são controlados pelo Nrf2. Em resposta ao insulto oxidativo, este factor é translocado para o núcleo a partir do citosol, onde se liga sequencialmente a elementos de resposta antioxidante, localizados na região promotora de muitos genes antioxidantes e de fase II, tais como a γ -glutamylcisteína sintase (γ GCS), NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e HO-1 (Prester *et al.* 1995; Lee e Surh 2005), originando uma resposta de citoprotecção que se caracteriza pela estimulação da produção das substâncias acima referidas e consequente diminuição da sensibilidade ao dano oxidativo (Jaiswal 2004).

A HO-1 é uma importante enzima antioxidante que desempenha um papel fundamental na citoprotecção. Trata-se da enzima limitante da degradação do grupo heme, gerando quantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro livre. Evidências acumuladas sugerem que a HO-1 indutível e os seus produtos de reacção funcionam como moléculas adaptativas ao insulto oxidativo (Morita 2005). Embora os mecanismos subjacentes à actividade anti-inflamatória da HO-1 não se conheçam em detalhe, a citoprotecção parece dever-se à sua capacidade em neutralizar o grupo heme livre, pró-oxidante, degradando-o a biliverdina que é subsequentemente convertida em bilirrubina, ambas detentoras de propriedades antioxidantes (Paine *et al.* 2010). No entanto, é a produção simultânea de CO que tem merecido particular atenção, uma vez que esta molécula, em determinadas condições, exhibe propriedades antiapoptóticas e anti-inflamatórias, actuando no meio vascular como um importante vasodilatador, quando a biodisponibilidade do NO é limitada (Araujo *et al.* 2012).

Pelo que ficou exposto, qualquer agente capaz de modelar estes genes será benéfico na fisiopatologia da aterosclerose, na qual os danos oxidativo e inflamatório, directos ou indirectos, que podem decorrer da acção do peroxinitrito, estão na génese e progressão da doença. Assim, o impedimento dos efeitos deletérios do peroxinitrito é vital para a integridade endotelial, sendo

que as antocianinas já demonstraram, em diversos estudos, a sua elevada capacidade *scavenger* desta espécie reactiva (Serraino *et al.* 2003; Rahman *et al.* 2006; Paixao *et al.* 2011; 2012a e b).

Estudos epidemiológicos, já referenciados em capítulos anteriores, evidenciaram que dietas ricas em vegetais e frutos estão associadas a uma diminuição do risco cardiovascular, sendo as antocianinas contribuintes fundamentais para esta realidade, com um consumo estimado em cerca de nove vezes superior ao dos restantes flavonóides da dieta (Chong *et al.* 2010; Mulvihill e Huff 2010). Não obstante a controvérsia acerca da disponibilidade fisiológica destes polifenóis, as antocianinas têm sido consideradas como moléculas bioactivas promissoras, em particular, para integrarem alimentos funcionais e nutracêuticos no contexto da prevenção da aterosclerose (He e Giusti 2010). Entre as antocianinas consumidas, a malvidina-3-glucósido (Mv3glc) é das mais prevalentes, em particular, no vinho tinto (Mazza 1995) e também em frutos vermelhos como as framboesas, morangos e groselhas (Zamora-Ros *et al.* 2011).

Nos capítulos anteriores foram explorados mecanismos citoprotectores para a Mv3glc em células endoteliais da aorta bovina (BAEC) sujeitas à acção do peroxinitrito, tendo-se evidenciado que as suas acções celulares vão muito para além da sua actividade antioxidante. O papel desta antocianina na modulação da via apoptótica mitocondrial (Paixão *et al.* 2012a) e em vias de sinalização implicadas no processo aterogénico (Paixão *et al.* 2012b), foi recentemente reportado.

No estudo que agora se apresenta foi delineado como objectivo principal não só confirmar a transposição de alguns destes resultados, obtidos em células de origem bovina, para células endoteliais humanas, mas essencialmente explorar outras vias de actuação da Mv3glc como agente de protecção endotelial. Em concreto, avaliámos a capacidade da Mv3glc em inibir a activação do NF- κ B induzida pelo peroxinitrito, em termos da supressão da produção de importantes mediadores do processo inflamatório, como a COX-2 e a iNOS. Investigámos ainda o papel da Mv3glc na activação do proteossoma induzida pelo peroxinitrito. Por outro lado, apurámos o efeito modulador desta antocianina na produção da enzima protectora HO-1 decorrente da activação do factor de transcrição Nrf2.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

O cloreto de malvidina-3-*o*-glucósido foi adquirido à Extrasynthese (Genay, França), com um grau de pureza superior a 97%, segundo avaliação por HPLC, tendo sido utilizada a partir de soluções em DMSO (5mM), armazenadas a -80°C, sob atmosfera de azoto. A concen-

tração final de solvente nunca excedeu 1% do volume. Para a cultura de células, o meio MCDB 131, tripsina 0,25%, soro fetal bovino e tampão fosfato salino (PBS) pH 7.4, foram obtidos da Gibco-Invitrogen.

Os outros reagentes laboratoriais, nomeadamente a mistura de inibidores de proteases, inibidores das fosfatases e estreptomicina/penicilina, o factor de crescimento epidérmico (*EGF*) e a hidrocortisona, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co (St.Louis, MO, EUA).

O anticorpo monoclonal primário específico produzido em rato contra a lamina A proveio da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) e os anticorpos monoclonais primários produzidos em rato contra a fosfo-eNOS (peNOS), heme oxigenase-1 e iNOS foram adquiridos à Abcam (Cambridge, Reino Unido); o anticorpo primário monoclonal produzido em rato contra a COX-2 foi comprado à Millipore e o anticorpo policlonal produzido em coelho contra o $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ foi adquirido à Cell Signalling Technology, Inc; o anticorpo monoclonal produzido em rato contra a β -actina bem como os anticorpos secundários contra anticorpo de rato e coelho foram obtidos da Sigma-Aldrich Co (St.Louis, MO, EUA).

2.2. Cultura celular e tratamento das células com peroxinitrito

As células endoteliais microvasculares humanas da derme (HMEC) (ATCC, EUA) foram cultivadas em frascos de cultura T-75, em meio MCDB 131, suplementado com soro fetal bovino a 10%, EGF 10 ng/ml, hidrocortisona 1 μ g/ml, numa incubadora com atmosfera humidificada e com 5% CO_2 . Para a maioria dos ensaios, as células foram semeadas em caixas de cultura de 60 mm (1-2x10⁶ células/caixa), mantidas até uma confluência aproximada de 80% e privadas de soro fetal bovino (SFB) durante, pelo menos, 6 horas.

Nos ensaios, as células foram tratadas utilizando peroxinitrito autêntico, i.e, sintetizado por nós, tal como descrito em “Materiais e Métodos”, Capítulo 2. Nas experiências com Mv3glc, as células foram pré-incubadas com este composto (25 μ M), durante 14 h. No final deste período de tempo, o meio de incubação foi removido e as células adicionadas de PBS, foram submetidas à agressão com peroxinitrito, tal como descrito no Capítulo 2. Após 10 minutos de incubação, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS, adicionadas de MCDB 131, sem SFB, e assim mantidas durante os períodos de tempo necessários para os ensaios. Não se observaram alterações de pH durante o período de tempo de ensaio com o peroxinitrito, que nunca excedeu as 6 h de duração. Volumes iguais de NaOH 10 mM (controlo do solvente) ou de peroxinitrito decomposto (em PBS ou NaOH, durante a noite) foram utilizados como controlos.

Importa referir que, nestes ensaios, nem a Mv3glc nem qualquer produto potencialmente formado pela sua interacção com componentes do meio de cultura, estiveram presentes durante e após o tempo de incubação com o peroxinitrito. Para além disso, durante os referidos períodos de tempo, incluindo o da pré-incubação com a antocianina, o meio utilizado não continha qualquer percentagem de soro.

2.3. Avaliação da viabilidade e morfologia celulares

A viabilidade celular foi avaliada através da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2,5-difeniltetrazólio (MTT) a formazana, e a morfologia nuclear das células foi analisada por microscopia de fluorescência, com recurso ao marcador de DNA Hoechst 33258, tal como descrito no Capítulo 2.

2.4. Análise por Western Blot

Para obter os extractos nucleares, as células recuperadas de caixas de cultura de 60 mm, foram lisadas numa solução contendo 300 μ L de Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, Nonidet P-40 a 0.5%, PMSF 1 mM, NaVO₄ 1 mM, β -glicerofosfato 10 mM, NaF 5 mM e mistura de inibidores de proteases a 1% (v/v), pH 7.5, durante 10 min em gelo. Os lisados foram centrifugados a 5000 g durante 5 min, a 4°C, correspondendo o sobrenadante ao extracto citoplasmático. O *pellet* assim obtido foi dissolvido em 40 μ L de uma solução contendo Hepes 20 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM, NaCl 300 mM, glicerol a 20% (v/v) e mistura de inibidores de proteases a 1% (v/v), pH 7.5, mantido 20 min em gelo e posteriormente centrifugado a 16 000 g, durante 20 min a 4°C; recolheram-se os sobrenadantes, obtendo-se assim os extractos nucleares. Para obter os extractos celulares totais, as células foram raspadas num tampão de lise, tal como indicado no Capítulo 3.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, utilizando o *kit* de reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA).

Alíquotas de cada amostra (30 μ g proteína) foram analisadas por electroforese em gel de poliacrilamida de 10% (v/v), na presença de SDS (SDS/PAGE) (intensidade de corrente constante de 20 mA por gel) e transferidas para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Amersham Biosciences, Reino Unido), durante 2 h a 200 mA, tal como descrito no Capítulo 2. Após o tratamento com leite magro, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra o I κ B α , a HO-1, a iNOS ou a COX-2 (durante a noite a 4°C). Após intensa lavagem com a solução tampão TBS-T, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com a fosfatase alcalina (1h, temperatura ambiente). Os complexos

imunorreactivos foram detectados por quimiofluorescência, após tratamento com ECF (*enhanced chemifluorescent reagent*) (Amersham Biosciences, Reino Unido), num sistema de imagem Typhoon 9000 (Amersham Biosciences, Reino Unido). A β -actina foi usada como controlo interno para as proteínas totais e a lamina A para as nucleares. As bandas foram analisadas e quantificadas utilizando o *software* ImageQuant TM da Amersham Biosciences.

2.5. Actividade do proteassoma

A actividade do proteassoma (complexo 26S) foi determinada de acordo com o descrito por vários autores (Coux *et al.* 1996; Thomas *et al.* 2007). Sumariamente, as células foram lavadas com o tampão I (Tris 50 mM, pH 7.4, DTT 2 mM; $MgCl_2$ 5 mM, ATP 2 mM) e posteriormente homogeneizadas com o tampão I adicionado de sacarose na concentração de 250 mM. Após centrifugação do extracto celular recolhido a 10 000 g, a 4°C, 20 μ g do sobrenadante foram diluídos com o tampão I até perfazer 900 μ l. Adicionou-se o substrato fluorogénico do proteassoma, SucLLVY-AMC (*chymotrypsin-like*), numa concentração final de 80 μ M. A actividade proteolítica foi medida através da monitorização da libertação do grupo fluorescente 7-amido-4-metilcumarina (excitação 380 nm; emissão 460 nm).

2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm SEM do número de experiências indicado nas legendas das respectivas figuras. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *one-way analysis of variance*, seguida do teste de Dunnet, Bonferroni ou Tukey, conforme apropriado. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. A Mv3glc protege as células endoteliais HMEC contra a apoptose mediada pelo peroxinitrito

De acordo com trabalhos prévios (Brito *et al.* 2008; Paixao *et al.* 2011; 2012a,b), o peroxinitrito, nas condições experimentais utilizadas, e à semelhança do descrito em células endoteliais de origem bovina (BAEC), induziu a morte apoptótica na linha de células endoteliais humanas utilizada como modelo (HMEC), um processo que foi significativamente reduzido quando estas células foram previamente incubadas com Mv3glc (Figura 1A).

De facto, tal como está evidenciado nessa figura, a agressão das células com peroxinitrito, após 6 h de incubação, conduziu a uma percentagem de morte celular por apoptose de cerca de 40%, de acordo com a visualização, por microscopia de fluorescência, da condensação ou fragmentação nucleares com recurso à marcação do DNA com Hoechst 33258; estes indicadores de apoptose não foram detectados nas células controlo (apenas cerca de 3%).

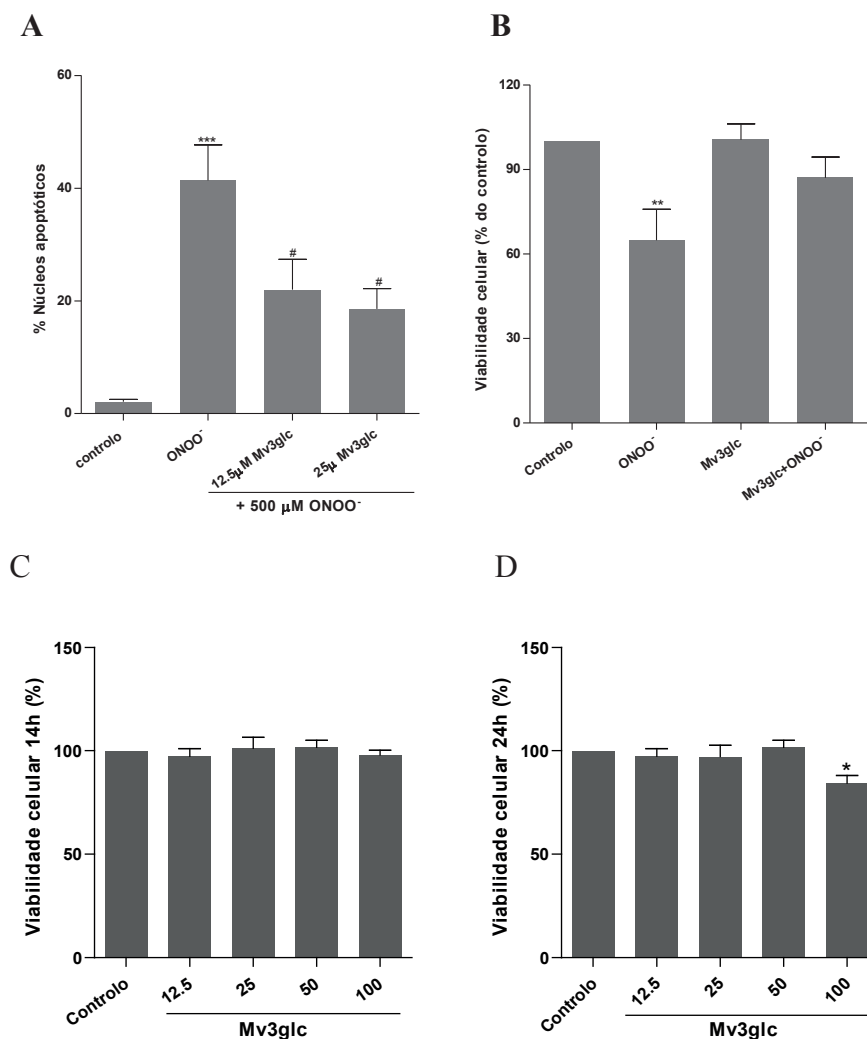


Figura 1. Efeitos da Mv3glc na apoptose mediada pelo peroxinitrito (**A**) e na viabilidade celular (**B, C, D**) em HMEC. (**A**) A Mv3glc previne as alterações apoptóticas induzidas pelo peroxinitrito nas HMEC. Estas células confluentes, mantidas em meio sem soro, foram pré-incubadas com duas concentrações subtóxicas de Mv3glc (12.5 e 25 μM) durante 14 horas. Em seguida, as células foram lavadas e tratadas com peroxinitrito, tal como descrito em “Materiais e Métodos”. As alterações morfológicas apoptóticas foram avaliadas por marcação nuclear com a sonda Hoechst 33258 (5 μg/mL) ao fim de 6 h após a adição do oxidante. O controlo refere-se à experiência em condições similares sem peroxinitrito nem antocianina. (**B**) Viabilidade celular das HMEC pré-incubadas durante 14 h com Mv3glc 25 μM com e sem tratamento com peroxinitrito. Viabilidade celular das HMEC incubadas durante 14 h (**C**) e 24 h (**D**) com quatro concentrações diferentes da antocianina, na ausência de peroxinitrito, avaliada pela redução do MTT e expressa como percentagem das células controlo, i.e, células incubadas sem peroxinitrito nem Mv3glc. Os resultados representam o valor médio ±SEM de pelo menos seis ensaios independentes, cada um em duplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs controlo; # $P < 0.05$ vs ONOO⁻.

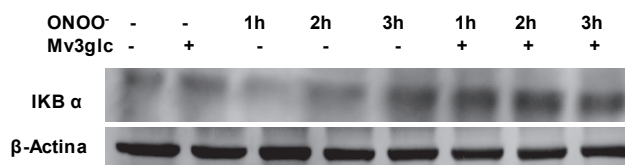
Uma redução de cerca de 60% e de 70% de células apoptóticas foi observada nas células pré-incubadas, respectivamente, com Mv3glc a 12,5 μM e 25 μM , antes da adição do peroxinitrito, um resultado semelhante ao obtido para esta antocianina no modelo de células endoteliais bovinas (Capítulo 2, figura 2A). Na concentração mais elevada utilizada (25 μM), a Mv3glc preveniu a diminuição da viabilidade celular em células tratadas com peroxinitrito, não interferindo, por si só, com a viabilidade das células endoteliais (Figura 1B), mesmo para tempos mais longos de pré-incubação e com concentrações muito mais elevadas da antocianina (Figura 1 C e D), de acordo com os resultados do teste do MTT; somente quando o período de incubação foi prolongado para 24 h e apenas na concentração de 100 μM se observou alguma toxicidade celular, o que denota a boa tolerância destas células para este flavonóide. De realçar que a antocianina não se encontra presente no meio de cultura durante a agressão com peroxinitrito, nem posteriormente.

3.2. A Mv3glc impede a activação do NF- κ B mediada pelo peroxinitrito

De modo a avaliar se a via do NF- κ B poderia ser activada pelo peroxinitrito em HMEC, nas nossas condições experimentais, as células são expostas a peroxinitrito autêntico, 500 μM , durante 10 minutos.

Verifica-se que este oxidante induziu uma activação transitória do NF- κ B, evidenciada pelo decréscimo, em cerca de 70%, dos valores de I κ B α relativos ao controlo, 1h após a agressão com peroxinitrito (Fig.2 A e B). No entanto, nas células pré-incubadas com Mv3glc 25 μM não se verificou qualquer degradação, sugerindo que esta concentração de antocianina neutralizou por completo o efeito deletério do peroxinitrito. Tal como se verificou aquando dos ensaios com células endoteliais de origem bovina (Capítulo 3), não se detectou qualquer fosforilação do I κ B α (resultados não apresentados), pelo que se admite que a nitração possa, também aqui, ser responsável pela inactivação deste inibidor endógeno do NF- κ B.

A



B

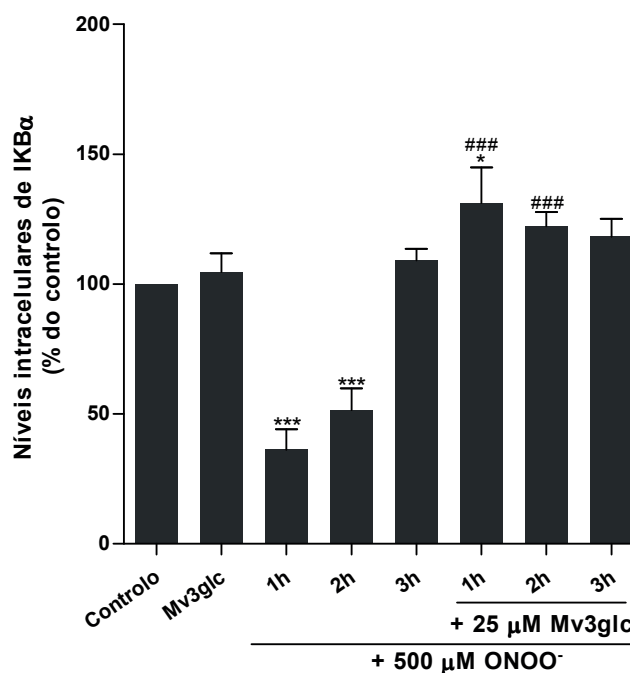


Figura 2. A Mv3glc previne a degradação do IκBα mediada pelo peroxinitrito em células endoteliais HMEC. Estas células confluentes, mantidas em meio sem soro, foram pré-incubadas com Mv3glc 25 μM e posteriormente agredidas com ONOO⁻ 500 μM, durante 10 min, tal como descrito em “Materiais e Métodos”. Os extractos proteicos citoplasmáticos foram então analisados por *immunoblot* com um anticorpo específico contra o IκBα. São apresentados *blots* representativos (A) e as respectivas quantificações por densitometria de três ensaios independentes (B). Os resultados apresentados foram normalizados para a β-actina endógena e expressos como valores médios ± SEM da percentagem do controlo (sem Mv3glc e sem ONOO⁻) ou de ONOO⁻. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs controlo, ### $P < 0.001$ vs ONOO⁻ para o mesmo tempo de incubação.

3.3. A Mv3glc impede a activação do NF-κB e a produção de iNOS e COX-2 mediadas pelo peroxinitrito

A translocação nuclear do factor de transcrição NF-κB é responsável pela activação de vários genes implicados na resposta inflamatória das células endoteliais, de que são exemplo a iNOS e a COX-2. Conforme se demonstra na Figura 3 o peroxinitrito foi capaz de aumentar significativamente os níveis de iNOS intracelular, aumentando de igual forma a expressão da

COX-2, entre a 1 h e as 6 h após a adição de peroxinitrito, alcançando valores cerca de duas vezes superiores aos valores do controlo. Estes efeitos foram eficazmente inibidos pela Mv3glc, particularmente para os dois últimos tempos avaliados (5 e 6 h).

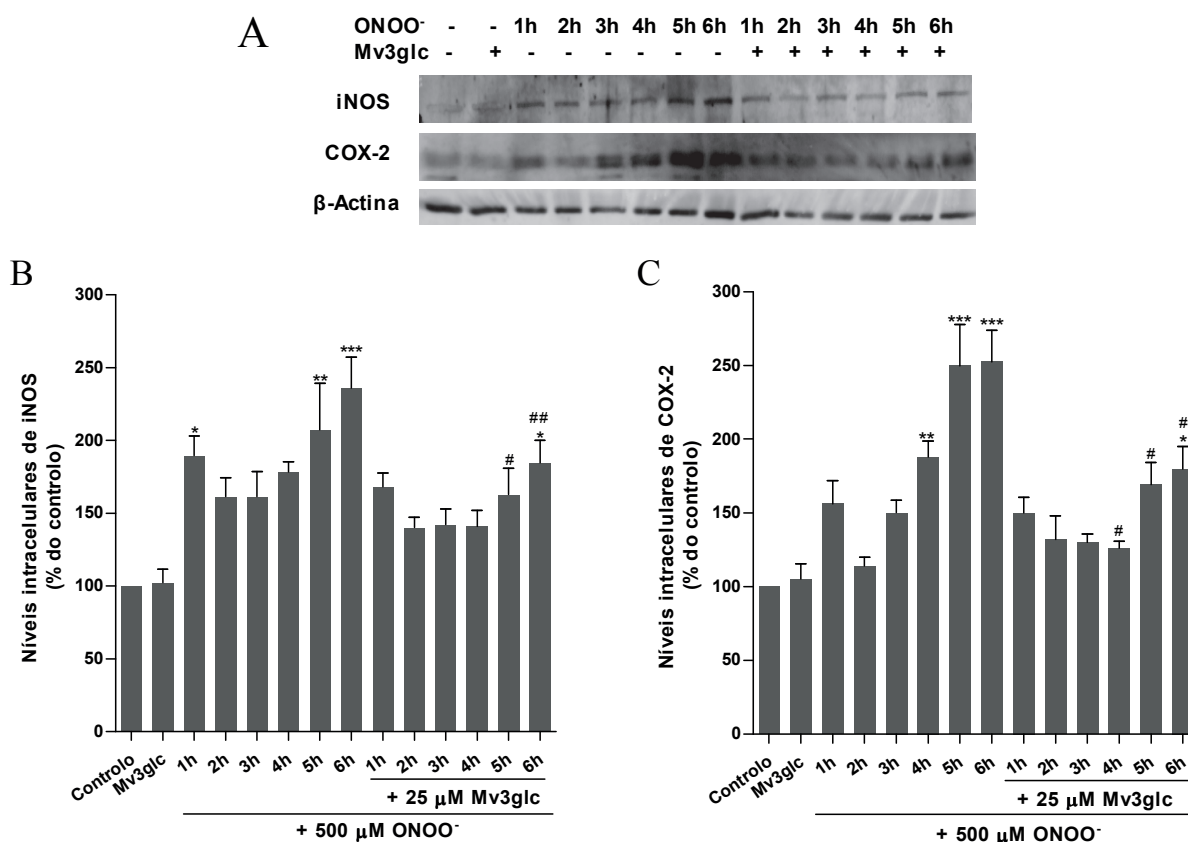


Figura 3. A Mv3glc reduz de forma significativa o aumento dos níveis de COX-2 e iNOS induzidos pelo peroxinitrito em HMEC. Os extractos proteicos totais das culturas de células pré-incubadas com Mv3glc 25 μM com ou sem posterior tratamento com peroxinitrito e mantidas, durante os tempos indicados, em meio sem soro a 37°C, conforme referido em “Materiais e Métodos”, foram recolhidos e analisados por *immunoblot* com anticorpos específicos contra a COX-2 e a iNOS. Apresentam-se *blots* representativos (A) normalizados para a β-actina endógena e as quantificações densitométricas de três ensaios independentes para a iNOS (B) e para a COX-2 (C). Os resultados apresentados foram expressos como valores médios ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ vs controlo; # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ vs ONOO⁻ para o mesmo tempo de incubação.

3.4. A Mv3glc impede o aumento da actividade do proteassoma protagonizado pelo peroxinitrito

A via do proteassoma é uma via crucial de eliminação das proteínas danificadas impedindo a sua acumulação celular. A actividade do proteassoma foi avaliada pela determinação da actividade “like” de quimiotripsina, uma das mais importantes funções enzimáticas proteassómica. Esta função do complexo proteassómico 26S foi avaliada nas HMEC tratadas com pero-

xinitrito com e sem incubação prévia com Mv3glc. O tratamento das HMEC com peroxinitrito 500 μM , originou um aumento significativo da actividade proteassómica logo após a primeira hora a seguir à agressão com o oxidante, sendo mais expressiva para $t = 6$ e $t = 12$ h (1.5 a 2 vezes o controlo) (Figura 4). Esta activação foi inibida em cerca de 25%, pela pré-incubação das células com Mv3glc, para os últimos tempos considerados. A actividade do proteassoma foi significativamente diminuída, para todas as condições, na presença do inibidor MG132 (10 μM), adicionado em simultâneo com o substrato fluorogénico (resultados não apresentados).

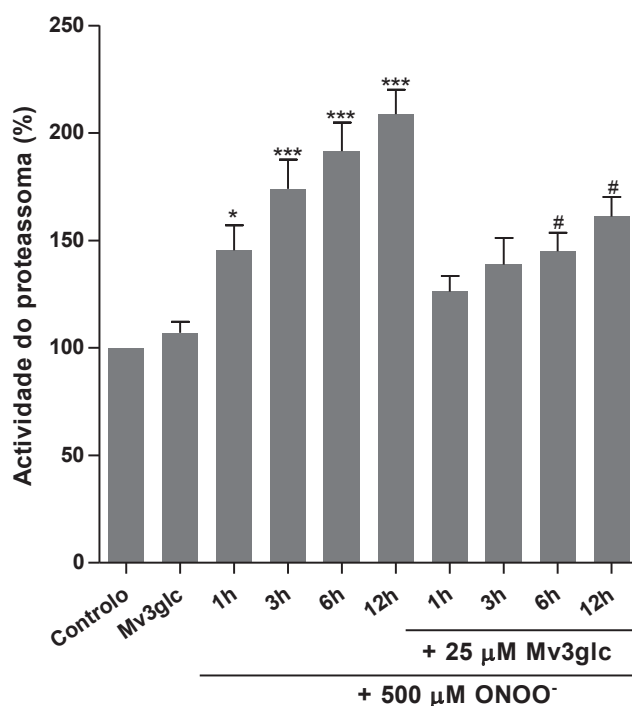


Figura 4. A Mv3glc reduz de forma significativa o aumento da actividade do proteassoma induzida pelo peroxinitrito em HMEC. Ao sobrenadante do extracto celular obtido por centrifugação, conforme descrito em “Materiais e Métodos”, adicionou-se o substrato fluorogénico do proteassoma, SucLLVY-AMC (*chymotrypsin-like*), numa concentração final de 80 μM . A actividade proteolítica foi medida através da monitorização da libertação do grupo fluorescente 7-amido-4-metilcumarina. Os resultados apresentados foram expressos como valores médios \pm SEM, de quatro experiências independentes. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ vs controlo e # $P < 0.05$ vs ONOO⁻ para o mesmo tempo de incubação.

3.5. A Mv3glc prolonga a activação do Nrf2 desencadeada pelo peroxinitrito provocando o aumento da expressão da HO-1

Por forma a avaliar se o factor de transcrição nuclear Nrf2 estaria ou não implicado na protecção celular devida à Mv3glc, procedeu-se à análise deste factor, por Western Blot, nos extractos nucleares de HMEC obtidos a partir de células tratadas com peroxinitrito, com ou sem

pré-incubação com Mv3glc (Figura 5). Como se pode constatar, a pré-incubação com Mv3glc 25 μ M permitiu que o aumento da translocação nuclear do Nrf2, ainda que não significativa, verificado nas células sujeitas apenas ao peroxinitrito nas três primeiras horas de incubação após adição do oxidante, fosse significativamente prolongado no tempo, situação não verificada nas condições não protegidas pela antocianina, onde se observou um acentuado decréscimo de cerca de 50% dos níveis nucleares basais de Nrf2. Em concreto, o pré-tratamento das HMEC com Mv3glc permitiu aumentos de Nrf2 nuclear até cerca de uma vez e meia, em relação às células não tratadas com a antocianina, 5-6 h após adição do peroxinitrito.

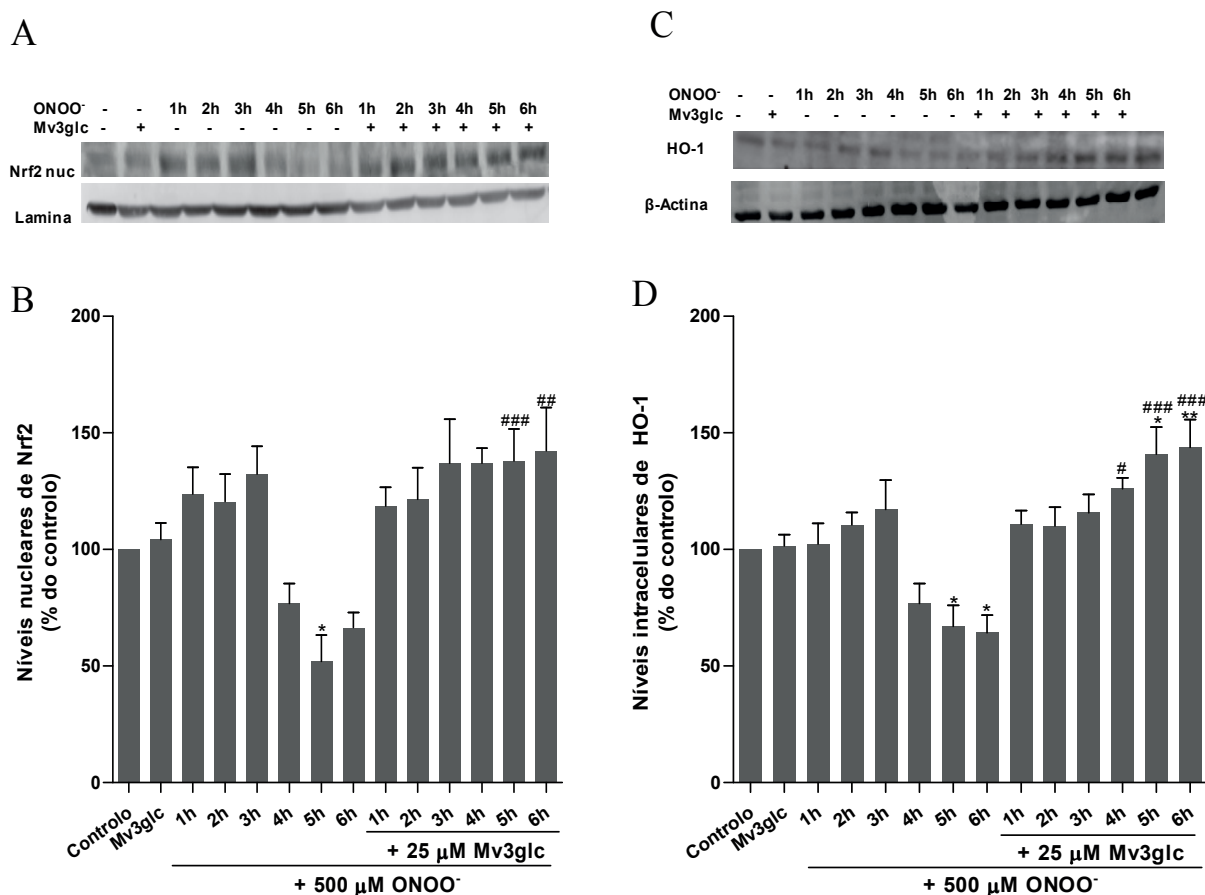


Figura 5. A Mv3glc aumenta e prolonga de forma significativa a translocação do factor de transcrição Nrf2 para o núcleo (A e B), induzida pelo peroxinitrito em HMEC e a consequente produção de HO-1 (C e D). Os extractos nucleares e totais obtidos conforme descrito em “Materiais e Métodos” foram analisados por *immunoblot* com anticorpos específicos contra o Nrf2 (A) e HO-1 (C), respectivamente, seguidos pelas quantificações por densitometria de, pelo menos, três experiências independentes (B,D). Os resultados foram normalizados para a β -actina, no caso dos extractos totais e para a lamina A endógena para os extractos nucleares, e expressos como valor médio \pm SEM. * $P < 0.05$ vs controlo; ## $P < 0.01$ e ### $P < 0.001$ vs ONOO⁻, para o mesmo tempo de incubação.

Com base nos resultados anteriores, investigou-se o envolvimento da translocação do Nrf2 potenciada pela Mv3glc no aumento dos níveis da HO-1, uma das enzimas anti-inflamatórias

que podem resultar da activação do Nrf2. Assim, os resultados obtidos indicam que a incubação das células com Mv3glc permitiu recuperar o decréscimo nos níveis de HO-1 resultantes da agressão com peroxinitrito (Figura 5 C, D). Esta recuperação torna-se particularmente evidente para a 5 e 6 h após a adição do agente oxidante, observando-se uma duplicação dos valores obtidos na ausência do tratamento prévio com a antocianina.

4. Discussão

Embora os mecanismos exactos, através dos quais as antocianinas exercem as suas actividades protectoras no contexto da prevenção da aterosclerose permaneçam por esclarecer na totalidade, tem sido demonstrado que elas inibem diferentes vias pró-aterogénicas, nomeadamente, aumentando a resistência das LDL à peroxidação, modulando a agregação plaquetar e promovendo o relaxamento vascular mediado pelo óxido nítrico (Grassi *et al.* 2009; Chong *et al.* 2010).

No que concerne ao processo aterogénico, como atrás referido, o peroxinitrito é um potente oxidante fisiopatológico e um interveniente crucial no desenvolvimento da aterogénese. A capacidade das várias antocianinas em neutralizar o peroxinitrito *in vitro* é um facto sobejamente conhecido, principalmente devido às suas propriedades electroadoras e por constituírem substratos alternativos à nitração (Pannala *et al.* 1999). Contudo, o seu papel como potenciais mediadores celulares críticos com interferência em vias de sinalização e regulação génica tem constituído uma importante área de estudo (Marzocchella *et al.* 2011; Mauray *et al.* 2012).

Neste contexto, e dando sequência aos nossos estudos anteriores com células endoteliais de origem bovina descritos nos capítulos 2 e 3 desta tese (Paixao *et al.* 2011; 2012a e b), procurámos, nesta etapa, consolidar a avaliação dos mecanismos citoprotectores devidos à Mv3glc em células endoteliais de origem humana submetidas à agressão com peroxinitrito. Especificamente, demonstrámos que a Mv3glc, quando previamente incubada com as células endoteliais, foi capaz de as proteger da morte apoptótica devida ao peroxinitrito, corroborando o que já tinha sido detectado para as BAEC (Paixao *et al.* 2012b). Atendendo ao grau de protecção similar observado para a Mv3glc nas células endoteliais humanas e antecipando a forte probabilidade dos mecanismos de apoptose/protecção aqui envolvidos serem sobreponíveis aos anteriormente observados, optou-se por direccionar o estudo para o contexto inflamatório que também caracteriza a agressão pelo peroxinitrito, avaliando a capacidade da antocianina em contrapor este efeito.

O presente estudo perspectivou avaliar até que ponto as propriedades citoprotectoras da Mv3glc contra a agressão celular devida ao peroxinitrito, são mediadas por vias dependentes do

NF- κ B, tendo para isso, analisado a interferência da antocianina na degradação do seu inibidor citoplasmático I κ B α e na produção de mediadores inflamatórios resultantes da activação deste factor de transcrição, nomeadamente a COX-2 e a iNOS. De facto, observa-se que a produção destes mediadores da inflamação, resultante da degradação do I κ B α citoplasmático, foi estimulada pelo tratamento celular com peroxinitrito, situação inibida de forma significativa pela pré-incubação das células com Mv3glc. São várias as propriedades reconhecidas ao NF- κ B, como já foi anteriormente discutido no capítulo introdutório desta tese, destacando-se a activação da transcrição de moléculas de adesão, factores de crescimento e moléculas inflamatórias. O inibidor do NF- κ B, o I κ B α previne a sua activação enquanto que o proteassoma aumenta essa activação, por exemplo, através da degradação do I κ B α (Rajkumar *et al.* 2005; Milano *et al.* 2007).

São diversos os trabalhos que sugerem que a actividade do proteassoma é passível de ser modificada por vários mediadores e processos envolvidos na disfunção endotelial, como por exemplo, o *stress* oxidativo e o peroxinitrito (Lalu *et al.* 2012; Liu *et al.* 2012). O *stress* oxidativo está implicado em inúmeras patologias, nomeadamente as inflamatórias, de que é exemplo a aterosclerose. A oxidação de proteínas e enzimas leva à alteração das suas funções, podendo estas modificações constituir um factor chave para a progressão do processo patológico. Ao formarem aductos com as proteínas, os oxidantes modificam a sua estrutura e propriedades funcionais (Ducrocq *et al.* 1999; Stadtman 2006). Por seu lado, o peroxinitrito é capaz de nitrar resíduos de tirosina formando um produto estável, a 3-nitrotirosina, para além de interagir com outros aminoácidos como a cisteína, triptofano e metionina (Ischiropoulos e al-Mehdi 1995; Alvarez *et al.* 1996; Alvarez e Radi 2003).

Contudo, embora a sensibilidade do proteassoma ao peroxinitrito não esteja completamente esclarecida, sabe-se que ela é tecido-específica e depende dos níveis relativos de proteassoma intracelular e da concentração daquele oxidante (Amici *et al.* 2003). Está descrito que o peroxinitrito aumenta a acessibilidade dos substratos respectivos aos locais activos do proteassoma, incrementando assim a sua actividade. Esta hipótese é suportada por estudos recentes que descrevem que o peroxinitrito induz alterações proteossómicas distintas de outros oxidantes (Amici *et al.* 2003; Osna *et al.* 2004). Em condições moderadas de dano oxidativo, o proteassoma parece ser activado por concentrações relativamente reduzidas de peroxinitrito, estimulando assim a degradação proteica. Pelo contrário, em ambientes oxidativos mais severos, as elevadas quantidades de peroxinitrito podem suprimir a actividade do proteassoma, permitindo a acumulação intracelular de proteínas alteradas (Osna *et al.* 2004). Resumindo, o peroxinitrito parece intervir em dois níveis distintos, isto é, por um lado através da estimulação da nitração dos resíduos de tirosina do I κ B α (Capítulo 3) e, por outro, pelo aumento da degradação desta molécula inibidora ao incrementar a actividade do proteassoma, ambos culminando com a activação do NF- κ B e produção de moléculas inflamatórias (Liu *et al.* 2012). A Mv3glc intervém

nestes dois mecanismos, impedindo não só a degradação do I κ B α , mas também a activação do proteassoma devidas ao peroxinitrito. Importa considerar, tal como se observa na Figura 4, que a Mv3glc não inibiu totalmente o acréscimo de actividade proteassómica despoletado pelo peroxinitrito. Por esta razão, e tendo em conta que a pré-incubação com a antocianina aumenta a sobrevivência celular na presença de peroxinitrito, poderá especular-se que os mecanismos de depuração celulares, nomeadamente das proteínas afectadas por este oxidante, serão de algum modo preservados pela antocianina, permitindo à célula poupar o I κ B α , um dos principais substratos do proteassoma (Magnani *et al.* 2000). Apesar dos efeitos pró-apoptóticos resultantes de uma acentuada diminuição da actividade do proteassoma, a sua inibição mais ligeira tem demonstrado mediar respostas celulares benéficas, na ausência de toxicidade (Meiners *et al.* 2008). Estes efeitos protectores decorrem, maioritariamente, da supressão da activação do NF- κ B (Pye *et al.* 2003; Williams *et al.* 2006). Estão ainda descritas melhorias ao nível da circulação sanguínea e da função endotelial, devido a um balanço positivo entre vasodilatadores e vasoconstritores (Meiners *et al.* 2006). Concretamente, verifica-se uma diminuição das concentrações de endotelina-1 (ET-1) e um aumento da expressão e actividade da eNOS, um regulador chave na homeostase vascular, com efeitos protectores no processo aterosclerótico (Stangl *et al.* 2004; Meiners *et al.* 2006) e cuja actividade é significativamente aumentada na presença de Mv3glc, conforme ficou patente no Capítulo 3.

Um regulador chave das defesas celulares contra o insulto oxidativo ou devido a xenobióticos é o factor de transcrição Nrf2, o qual, após translocação, forma heterodímeros com pequenas proteínas Maf nucleares, com posterior ligação a elementos de resposta antioxidante/electrófila (ARE/EpRE) na região promotora de genes que codificam várias enzimas antioxidantes e de desintoxicação de fase II, de entre as quais se destaca a HO-1. A proteína repressora do Nrf2, o Keap1, parece ser um importante sensor citoplasmático de *stress* oxidativo, em virtude da sua abundância em resíduos de cisteína (Baird e Dinkova-Kostova 2011). A alteração da interacção Nrf2/Keap1, permitindo ao Nrf2 translocar para o núcleo, pode ser desencadeada por numerosos estímulos, incluindo os polifenóis, que são reconhecidos como importantes indutores da HO-1, uma proteína redox-indutível que proporciona protecção contra várias formas de agressão (Balogun *et al.* 2003; Hwang *et al.* 2011) e que desempenha um papel chave na protecção cardiovascular (Siow *et al.* 1999; Ryter *et al.* 2006). Dos ensaios efectuados pode concluir-se que, embora a Mv3glc, *per se*, não altere, de modo significativo, os níveis de HO-1, provavelmente decorrente do extenso período de incubação, a sua influência é notoriamente observada aquando da agressão celular com peroxinitrito, não só impedindo a depleção dos níveis de HO-1 induzida por este oxidante mas, essencialmente, aumentando de modo significativo os teores desta enzima protectora, em particular, para os últimos tempos de incubação avaliados (Figura 5). Estes efeitos da Mv3glc estão concor-

dantes com aqueles observados para os níveis de Nrf2 nucleares, confirmando a interdependência entre este factor e a expressão de HO-1, nas nossas condições experimentais.

Concluindo, o conjunto de resultados que aqui se apresentam permitiram, por um lado, reforçar o papel citoprotector das antocianinas, concretamente da Mv3glc, no contexto da inflamação vascular subjacente à aterogénese, ao confirmar o comportamento desta antocianina num modelo de células endoteliais de origem humana. Para além disso, elucidou acerca dos mecanismos subjacentes à inibição não tóxica do proteassoma, induzindo uma resposta de defesa nas células endoteliais vasculares. Nestas condições de ensaio, confirmou-se, não só a inibição da activação do NF- κ B, como também a presença de níveis exacerbados de Nrf2 nuclear e consequente aumento da expressão de HO-1, associado a um claro incremento da viabilidade celular, quando comparado com as células submetidas ao peroxinitrito e não tratadas com Mv3glc. Portanto, a intervenção endotelial favorável da Mv3glc contra a agressão do peroxinitrito poder-se-á atribuir à acção concertada na modulação da actividade do proteassoma, interligada ao efeito no equilíbrio entre os factores de transcrição NF- κ B/Nrf2. Uma vez que a patogénese da aterosclerose envolve múltiplos eventos, incluindo a disfunção endotelial, os aumentos do *stress* oxidativo e da inflamação, o potencial antiaterogénico da Mv3glc a todos estes níveis e as suas vias de actuação celular são indubitavelmente, merecedoras de mais aprofundada investigação, objectivando o desenvolvimento de estratégias dietéticas ou terapêuticas capazes de impedir ou retardar a progressão do processo aterosclerótico.

5. Referências bibliográficas

- Alvarez, B.e Radi, R. (2003). "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins." Amino Acids 25(3-4): 295-311.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B.A.e Radi, R. (1996). "Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration." Chem Res Toxicol 9(2): 390-396.
- Amici, M., Lupidi, G., Angeletti, M., Fioretti, E.e Eleuteri, A.M. (2003). "Peroxynitrite-induced oxidation and its effects on isolated proteasomal systems." Free Radic Biol Med 34(8): 987-996.
- Araujo, J.A., Zhang, M.e Yin, F. (2012). "Heme Oxygenase-1, Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis." Front Pharmacol 3: 119.
- Baird, L.e Dinkova-Kostova, A.T. (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway." Arch Toxicol 85(4): 241-272.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., *et al.* (2003). "Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element." Biochem J 371(Pt 3): 887-895.
- Blackwell, T.S., Yull, F.E., Chen, C.L., Venkatakrisnan, A., Blackwell, T.R., Hicks, D.J., *et al.* (2000). "Multiorgan nuclear factor kappa B activation in a transgenic mouse model of systemic inflammation." Am J Respir Crit Care Med 162(3 Pt 1): 1095-1101.
- Brito, P.M., Mariano, A., Almeida, L.M.e Dinis, T.C. (2006). "Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione." Chem Biol Interact 164(3): 157-166.
- Brito, P.M., Simoes, N.F., Almeida, L.M.e Dinis, T.C. (2008). "Resveratrol disrupts peroxynitrite-triggered mitochondrial apoptotic pathway: a role for Bcl-2." Apoptosis 13(8): 1043-1053.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L.e Goldberg, A.L. (2001). "26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide." EMBO J 20(10): 2357-2366.
- Chong, M.F., Macdonald, R.e Lovegrove, J.A. (2010). "Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies." Br J Nutr 104 Suppl 3: S28-39.
- Cooke, C.L.e Davidge, S.T. (2002). "Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol 282(2): C395-402.
- Coux, O., Tanaka, K.e Goldberg, A.L. (1996). "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes." Annu Rev Biochem 65: 801-847.
- Denk, A., Goebeler, M., Schmid, S., Berberich, I., Ritz, O., Lindemann, D., *et al.* (2001). "Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells." J Biol Chem 276(30): 28451-28458.
- Dreger, H., Westphal, K., Weller, A., Baumann, G., Stangl, V., Meiners, S., *et al.* (2009). "Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection." Cardiovasc Res 83(2): 354-361.

- Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B. e Ohshima, H. (1999). "Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent." Cell Mol Life Sci 55(8-9): 1068-1077.
- Goldberg, A.L. (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." Nature 426(6968): 895-899.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A. e Ferri, C. (2009). "Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection." Curr Pharm Des 15(10): 1072-1084.
- Grune, T., Blasig, I.E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R. e Davies, K.J. (1998). "Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome." J Biol Chem 273(18): 10857-10862.
- Grune, T., Klotz, L.O., Gieche, J., Rudeck, M. e Sies, H. (2001). "Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite." Free Radic Biol Med 30(11): 1243-1253.
- He, J. e Giusti, M.M. (2010). "Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties." Annu Rev Food Sci Technol 1: 163-187.
- Hwang, Y.P., Choi, J.H., Yun, H.J., Han, E.H., Kim, H.G., Kim, J.Y., *et al.* (2011). "Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression." Food Chem Toxicol 49(1): 93-99.
- Ischiropoulos, H. e al-Mehdi, A.B. (1995). "Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications." FEBS Lett 364(3): 279-282.
- Jaiswal, A.K. (2004). "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression." Free Radic Biol Med 36(10): 1199-1207.
- Jessenberger, V. e Jentsch, S. (2002). "Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol 3(2): 112-121.
- Lalu, M.M., Xu, H., Sankaralingam, S. e Davidge, S.T. (2012). "Proteasome inhibition decreases inflammation in human endothelial cells exposed to lipopolysaccharide." J Cardiovasc Pharmacol. DOI 10.1097/FJC.0bo13e3182657eec.
- Lee, J.S. e Surh, Y.J. (2005). "Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention." Cancer Lett 224(2): 171-184.
- Liu, H., Yu, S., Xu, W. e Xu, J. (2012). "Enhancement of 26S Proteasome Functionality Connects Oxidative Stress and Vascular Endothelial Inflammatory Response in Diabetes Mellitus." Arterioscler Thromb Vasc Biol. DOI 10.1161/ATVBAHA.112.253385.
- Lusis, A.J. (2000). "Atherosclerosis." Nature 407(6801): 233-241.
- Magnani, M., Crinelli, R., Bianchi, M. e Antonelli, A. (2000). "The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB)." Curr Drug Targets 1(4): 387-399.

- Marfella, R., M, D.A., Di Filippo, C., Siniscalchi, M., Sasso, F.C., Ferraraccio, F., *et al.* (2007). "The possible role of the ubiquitin proteasome system in the development of atherosclerosis in diabetes." Cardiovasc Diabetol 6: 35.
- Marzocchella, L., Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Tresoldi, I., Modesti, A., *et al.* (2011). "Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents." Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 5(3): 200-220.
- Mauray, A., Felgines, C., Morand, C., Mazur, A., Scalbert, A.e Milenkovic, D. (2012). "Billberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice." Nutr Metab Cardiovasc Dis 22(1): 72-80.
- Mazza, G. (1995). "Anthocyanins in grapes and grape products." Crit Rev Food Sci Nutr 35(4): 341-371.
- McGhie, T.K.e Walton, M.C. (2007). "The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding." Mol Nutr Food Res 51(6): 702-713.
- Meiners, S., Ludwig, A., Lorenz, M., Dreger, H., Baumann, G., Stangl, V., *et al.* (2006). "Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells." Free Radic Biol Med 40(12): 2232-2241.
- Meiners, S., Ludwig, A., Stangl, V.e Stangl, K. (2008). "Proteasome inhibitors: poisons and remedies." Med Res Rev 28(2): 309-327.
- Milano, A., Iaffaioli, R.V.e Caponigro, F. (2007). "The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours?" Eur J Cancer 43(7): 1125-1133.
- Morita, T. (2005). "Heme oxygenase and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(9): 1786-1795.
- Mulvihill, E.E.e Huff, M.W. (2010). "Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health." Can J Cardiol 26 Suppl A: 17A-21A.
- Muratani, M.e Tansey, W.P. (2003). "How the ubiquitin-proteasome system controls transcription." Nat Rev Mol Cell Biol 4(3): 192-201.
- Osna, N.A., Haorah, J., Krutik, V.M.e Donohue, T.M., Jr. (2004). "Peroxynitrite alters the catalytic activity of rodent liver proteasome in vitro and in vivo." Hepatology 40(3): 574-582.
- Pacher, P., Beckman, J.S.e Liaudet, L. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev 87(1): 315-424.
- Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R.e Immenschuh, S. (2010). "Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential." Biochem Pharmacol 80(12): 1895-1903.
- Paixao, J., Dinis, T.C.e Almeida, L.M. (2011). "Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an in vitro approach." Apoptosis 16(10): 976-989.
- Paixao, J., Dinis, T.C.e Almeida, L.M. (2012a). "Protective role of malvidin-3-glucoside on peroxynitrite-induced damage in endothelial cells by counteracting reactive species formation and apoptotic mitochondrial pathway." Oxid Med Cell Longev 2012: 428538.

- Paixao, J., Dinis, T.C.e Almeida, L.M. (2012b). “Malvidin-3-glucoside protects endothelial cells up-regulating endothelial NO synthase and inhibiting peroxynitrite-induced NF-kB activation.” *Chem Biol Interact* 199(3): 192-200.
- Pannala, A.S., Singh, S.e Rice-Evans, C. (1999). “Flavonoids as peroxynitrite scavengers in vitro.” *Oxidants and Antioxidants, Pt A* 299: 207-235.
- Prestera, T., Talalay, P., Alam, J., Ahn, Y.I., Lee, P.J.e Choi, A.M. (1995). “Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE).” *Mol Med* 1(7): 827-837.
- Pye, J., Ardeshirpour, F., McCain, A., Bellinger, D.A., Merricks, E., Adams, J., *et al.* (2003). “Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury.” *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(3): H919-926.
- Rahman, M.M., Ichiyonagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y.e Konishi, T. (2006). “Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism.” *Free Radic Res* 40(9): 993-1002.
- Rajkumar, S.V., Richardson, P.G., Hideshima, T.e Anderson, K.C. (2005). “Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer.” *J Clin Oncol* 23(3): 630-639.
- Ryter, S.W., Alam, J.e Choi, A.M. (2006). “Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications.” *Physiol Rev* 86(2): 583-650.
- Sahni, S.K., Rydkina, E.e Sahni, A. (2008). “The proteasome inhibitor MG132 induces nuclear translocation of erythroid transcription factor Nrf2 and cyclooxygenase-2 expression in human vascular endothelial cells.” *Thromb Res* 122(6): 820-825.
- Serraino, I., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L., Mazzon, E., Dugo, G., *et al.* (2003). “Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure.” *Life Sci* 73(9): 1097-1114.
- Sharma, C., Kaur, J., Shishodia, S., Aggarwal, B.B.e Ralhan, R. (2006). “Curcumin down regulates smokeless tobacco-induced NF-kappaB activation and COX-2 expression in human oral premalignant and cancer cells.” *Toxicology* 228(1): 1-15.
- Siow, R.C., Sato, H.e Mann, G.E. (1999). “Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide?” *Cardiovasc Res* 41(2): 385-394.
- Stadtman, E.R. (2006). “Protein oxidation and aging.” *Free Radic Res* 40(12): 1250-1258.
- Stangl, K.e Stangl, V. (2010). “The ubiquitin-proteasome pathway and endothelial (dys)function.” *Cardiovasc Res* 85(2): 281-290.
- Stangl, V., Lorenz, M., Meiners, S., Ludwig, A., Bartsch, C., Moobed, M., *et al.* (2004). “Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway.” *FASEB J* 18(2): 272-279.

- Szabo, C. (2003). "Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity." Toxicol Lett 140-141: 105-112.
- Thomas, S., Kotamraju, S., Zielonka, J., Harder, D.R.e Kalyanaraman, B. (2007). "Hydrogen peroxide induces nitric oxide and proteasome activity in endothelial cells: a bell-shaped signaling response." Free Radic Biol Med 42(7): 1049-1061.
- Tousoulis, D., Kampoli, A.M., Papageorgiou, N., Androulakis, E., Antoniadis, C., Toutouzas, K., *et al.* (2011). "Pathophysiology of atherosclerosis: the role of inflammation." Curr Pharm Des 17(37): 4089-4110.
- Tsuda, T. (2012). "Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies." Mol Nutr Food Res 56(1): 159-170.
- Uppu, R.M., Squadrito, G.L., Cueto, R.e Pryor, W.A. (1996). "Selecting the most appropriate synthesis of peroxynitrite." Methods Enzymol 269: 285-296.
- Wallace, T.C. (2011). "Anthocyanins in cardiovascular disease." Adv Nutr 2(1): 1-7.
- Wang, L.S.e Stoner, G.D. (2008). "Anthocyanins and their role in cancer prevention." Cancer Lett 269(2): 281-290.
- Williams, A.J., Dave, J.R.e Tortella, F.C. (2006). "Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration." Neurochem Int 49(2): 106-112.
- Yamamoto, N., Sawada, H., Izumi, Y., Kume, T., Katsuki, H., Shimohama, S., *et al.* (2007). "Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease." J Biol Chem 282(7): 4364-4372.
- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Lujan-Barroso, L., Slimani, N., Romieu, I., Touillaud, M., *et al.* (2011). "Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study." Br J Nutr 106(7): 1090-1099.

Capítulo 5

Conclusões gerais

Hoje em dia assistimos ao acumular de evidências que apontam as antocianinas e outros polifenóis, como moléculas bioactivas propiciadoras de protecção contra inúmeros processos patológicos relacionados com o *stress* oxidativo, incluindo a aterosclerose. Tal facto é suportado por resultados *in vitro*, em animais de experiência e também, ainda que de forma limitada, em ensaios clínicos em humanos. Os efeitos benéficos destes produtos bioactivos parecem ser mediados por uma plétora de vias bioquímicas e mecanismos de sinalização que actuam de forma quer independente quer sinérgica, ainda que muitos destes processos permaneçam por esclarecer na sua totalidade. A natureza pleiotrópica dos benefícios descritos para estes polifenóis parece sugerir a modulação de múltiplos mecanismos e poderá contribuir para explicar a sua eficácia fisiológica.

O estudo do endotélio é um ramo relativamente recente da ciência cardiovascular. O seu desenvolvimento levou a que seja hoje considerado um “órgão” em virtude da sua complexidade de funções. De facto, o endotélio vascular regula o complexo meio vascular, actuando como uma barreira e facilitando as interacções entre o plasma e o vaso, daí lhe ser atribuído um papel central na aterogénese. Na origem e progressão deste processo patológico está o insulto oxidativo conducente à disfunção endotelial, sendo que o peroxinitrito é considerado como um interveniente chave como potente agente oxidante e nitrante endógeno de várias biomoléculas. O peroxinitrito, resultando da reacção entre o óxido nítrico e o anião superóxido, ambos produzidos por dois dos principais tipos de células envolvidos na aterosclerose, as células endoteliais e as do sistema imune, pode alcançar elevadas concentrações no endotélio vascular sujeito ao *shear stress* e nos vasos ateroscleróticos, onde parece contribuir para a formação das estrias gordas e da placa de ateroma ao promover, entre outras acções, a oxidação das LDL e a extensa nitração de resíduos proteicos. O envolvimento desta molécula tóxica na aterogénese ocorre também por outras vias, ao condicionar, particularmente, alterações na reactividade vascular ao perturbar processos celulares críticos que conduzem as células à morte apoptótica ou necrótica. Assim, contrariar os seus efeitos deletérios é vital para a integridade endotelial, sendo que as antocianinas têm vindo a demonstrar, em diversos estudos, a sua potencialidade como *scavengers* desta molécula.

No início deste trabalho, esclarecemos as vias bioquímicas subjacentes à indução do processo apoptótico mediado pelo peroxinitrito, em células endoteliais, explorando os mecanismos citoprotectores responsáveis pela acção benéfica de quatro das mais prevalentes antocianinas encontradas no regime alimentar humano, nomeadamente a Cy-, Dp-, Mv-, e Pg3glc. Demonstrámos que, para além da sua elevada capacidade antioxidante, estas antocianinas são ainda capazes de inibir os efeitos apoptóticos induzidos pelo peroxinitrito em células endoteliais intervindo ao nível da via apoptótica mitocondrial e impedindo a translocação nuclear da Bax,

este último facto demonstrado pela primeira vez em células endoteliais (Paixao *et al.* 2011; Paixao *et al.* 2012). Apesar de serem necessárias investigações adicionais para apurar as implicações desta constatação, estes resultados parecem indicar que se deverá tratar de uma estratégia de protecção adicional proporcionada por esta classe de flavonóides. Clarificámos a importância das condicionantes estruturais nomeadamente da estrutura catecólica (Cy- e Dp3glc), monofenólica (Pg3glc) e dos grupos 3',5'-metoxilo (Mv3glc) no anel B, em todos estes efeitos, reflectidos na inibição de vias de sinalização a montante e a jusante da mitocôndria.

Efectivamente, estas antocianinas, numa concentração de 25 μ M, preveniram a apoptose mediada pelo peroxinitrito, por um lado, contrariando a inactivação da via da PI3K/Akt, e por outro, diminuindo os níveis citoplasmáticos da proteína pró-apoptótica Bax e impedindo a perda do potencial mitocondrial e a activação das caspases-3 e -9. Todas estas acções celulares não poderiam ser justificadas com base apenas nas suas propriedades antioxidantes. De facto, embora a estrutura catecólica do anel B associada a um grupo OH na posição 3 confira às antocianinas actividades antioxidantes e *scavenger* mais elevadas, a protecção conseguida por todas as antocianinas estudadas, incluindo a pelargonidina monofenólica, contra os efeitos apoptóticos mitocondriais induzidos pelo peroxinitrito nas células endoteliais, não foi significativamente diferente. Todas as antocianinas estudadas mostraram uma capacidade similar em inibir tais efeitos através da interrupção de cascatas de sinalização críticas, indicando que as suas acções celulares vão muito para além das suas actividades antioxidantes.

Posteriormente, o enfoque do nosso trabalho recaiu na actividade da Mv3glc, uma das antocianinas mais abundantes e, provavelmente, das menos estudadas. Para além de exercer a sua protecção endotelial pelas vias já mencionadas, esta antocianina actuou também em mecanismos reconhecidamente implicados no processo aterogénico, demonstrando que o seu potencial impedimento estereoquímico, fruto do seu padrão de substituição, não constitui obstáculo à sua acção celular. Em concreto, constatámos a capacidade da Mv3glc em aumentar a biodisponibilidade do \cdot NO assim como em inibir a activação do NF- κ B induzida pelo peroxinitrito. A activação do NF- κ B tem sido implicada no estabelecimento da aterosclerose, estando diversas espécies reactivas envolvidas na activação de vias de sinalização conducentes à degradação do I κ B α e subsequente acumulação nuclear daquele factor de transcrição. Este estudo indicou que esta antocianina aumentou a biossíntese de \cdot NO dependente da eNOS através da fosforilação do Akt. Para além disso, foi capaz de suprimir a produção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, a expressão de COX-2 e a biossíntese de \cdot NO derivado da iNOS, em células endoteliais activadas pelo peroxinitrito, muito provavelmente através da inibição da activação do NF- κ B. Os seus efeitos estendem-se ao nível da expressão génica uma vez que, em células tratadas com peroxinitrito, aumentou os níveis de mRNA da eNOS, diminuindo aqueles respeitantes à iNOS. No nosso con-

texto experimental, tal incremento ao nível do respectivo ácido nucleico, devido à Mv3glc, não se traduziu num aumento imediato da expressão de eNOS, nas condições analisadas, mas antes numa estimulação significativa da fosforilação da eNOS e da sua actividade, suficientes para a célula debelar o insulto oxidante de que estava a ser alvo; ou seja, a antocianina conseguiu actuar como *scavenger* efectivo do peroxinitrito ou dos seus produtos de reacção, o que poderá, por exemplo, passar pela protecção do cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄), essencial para a actividade da eNOS.

Os efeitos antiapoptóticos e anti-inflamatórios da Mv3glc ficaram igualmente patentes nas investigações realizadas em células endoteliais humanas. Nesta etapa, para além de se consolidarem as experiências efectuadas no modelo celular bovino, constatou-se a capacidade desta antocianina em assegurar um balanço positivo entre os factores de transcrição NF-κB e Nrf2. Para além da reprodução dos resultados relativos à diminuição da produção de mediadores inflamatórios maioritariamente dependentes do NF-κB, a Mv3glc foi capaz de incrementar a translocação nuclear do Nrf2 e assim levar à produção de HO-1, uma enzima extremamente importante nas defesas celulares endoteliais. Para além disso, os efeitos desta antocianina em termos de actividade do proteassoma foram igualmente relevantes pois, ao diminuir a actividade deste complexo enzimático, exacerbada pelo tratamento com peroxinitrito, permitiu poupar o IκBα da degradação proteassómica, não comprometendo, contudo, a eliminação das proteínas degradadas.

A concentração de antocianina utilizada nestes estudos (25 μM), ainda que aparentemente excessiva permitiu a detecção intracelular de níveis, nomeadamente, de Mv3glc de cerca de 3nmoles/mg de proteína, ao fim das 14 horas de incubação, valores estes que parecem ser alcançáveis *in vivo* mediante o consumo regular de alimentos ricos em antocianinas. Este período de incubação procurou mimetizar o comportamento fisiológico das antocianinas que, não obstante toda a controvérsia acerca da sua metabolização e biodisponibilidade e, ao contrário de outros flavonóides, são rapidamente absorvidas, ao nível gastrointestinal, na forma intacta e assim detectadas na circulação até 24 h após o seu consumo, em doses normais. Como se salientou ao longo de todo o trabalho, a este período de pré-incubação seguiu-se a lavagem das células e o tratamento com peroxinitrito, ou seja, quando se adicionou o oxidante, não existia antocianina no meio de cultura, o que significa que a citoprotecção observada a diversos níveis foi devida à potenciação de mecanismos de defesa intrínsecos à própria célula e não a um efeito directo da antocianina. Dito de outra forma, e tendo em consideração que os efeitos mais notórios das antocianinas foram invariavelmente detectados após a agressão com peroxinitrito, estes flavonóides parecem induzir um estado fisiológico de alerta basal, isto é, um processo adaptativo compensatório que se segue a uma perturbação inicial da homeostase, permitindo que as células respondam pronta e eficazmente a qualquer estímulo agressor a que sejam sujeitas. Esta hipótese

vem de encontro à opinião de alguns autores que defendem que os polifenóis, de uma forma geral, induzem a formação transitória e controlada de espécies reactivas em células endoteliais, e que são estas espécies as responsáveis, por exemplo, pela activação da PI3K seguida pela cascata de eventos que inclui o recrutamento e fosforilação do Akt membranar, a fosforilação da eNOS e a produção do óxido nítrico, indispensável à vasodilatação arterial.

Neste contexto, a modelação de defesas celulares endógenas constitui uma estratégia inovadora para a intervenção preventiva e terapêutica em doenças com carácter de cronicidade, de que é paradigmática a aterosclerose. Existe um crescente interesse em moléculas exógenas capazes de proporcionar uma citoprotecção baseada no conceito de hormese, ou seja, na resposta adaptativa das células a situações de agressão moderadas. Descobertas recentes elucidaram as vias de sinalização celular e os mecanismos moleculares mediadores desta resposta hormética e que tipicamente envolvem enzimas como as cinases e factores de transcrição como o NF- κ B e o Nrf2. Um melhor entendimento dos mecanismos horméticos ao nível celular e molecular está a direccionar a investigação para novas abordagens para a prevenção e tratamento de variados tipos de doenças.

A manutenção de condições óptimas de saúde a longo prazo é acompanhada por uma complexa rede de processos que são controlados pelos designados vitagenes, um grupo de genes envolvidos na homeostase celular durante condições de *stress* (proteínas de choque térmico, sistemas de tioredoxina, sirtuínas, HO-1). Os componentes da dieta, onde se incluem as antocianinas, parecem estar envolvidas na citoprotecção através da activação das já referidas vias horméticas, que passam pela activação destes vitagenes.

Começa agora a ser ultrapassado, ainda que com a resistência que caracteriza a evolução da ciência nesta área, o preconceito resultante dos ensaios em humanos envolvendo polifenóis cujos resultados foram inconclusivos ou não foram, de todo, satisfatórios. Trataram-se de estudos cujos parâmetros em avaliação se prendiam, essencialmente, com a actividade antioxidante destes compostos e a sua repercussão no estado antioxidante plasmático. Actualmente, algumas meta-análises publicadas, que já têm em consideração propriedades que não as antioxidantes, têm demonstrado que se justifica continuar a aprofundar os conhecimentos acerca das inúmeras propriedades reconhecidas *in vitro* a estes compostos naturais.

Este estudo almejou, tão modesta quanto seriamente, contribuir para a tão propalada investigação translacional, procurando que os resultados dos ensaios na bancada do laboratório contribuam para encontrar, em tempo útil, uma aplicabilidade prática para o debelar de doenças tão nefastas como a aterosclerose. Concluindo, tal como se referiu no início deste trabalho, atendendo a que é previsível que o crescimento da patologia cardiovascular possa adquirir contornos avassaladores nas décadas que se avizinham e, assim sendo, qualquer contributo que possa ser

dados no sentido inverso, parece-nos meritório, tanto mais se consubstanciar uma estratégia de fácil acesso e execução, como seja a sensibilização para o consumo regular de alimentos ricos em antocianinas inseridos numa dieta designada, preventiva/terapêutica ou no desenvolvimento de suplementos com estes flavonóides sob a forma de nutracêuticos.

Agradecimentos

À Professora Doutora Leonor Almeida, a quem devo a orientação científica desta dissertação, expresso o meu sincero agradecimento pelo penhor de confiança e proposta do trabalho agora apresentado. O empenho científico emprestado a este projecto, o apoio sem tergiversação, os incentivos oportunos, os ensinamentos e lastro de experiência partilhada sem reservas, tudo fluiu com a segurança e despojamento típicos de quem vislumbra na partilha incremento altruísta de valia e prestígio, pessoal e intelectual, próprio e de terceiros.

Outrossim os meus agradecimentos à Professora Doutora Teresa Dinis, co-orientadora deste trabalho, pelo acolhimento, competência científica tão acumulada quanto devotada a este trabalho e também pelas observações pertinentes, catalisadoras de novas ideias. A disponibilidade sem restrições, a forma exigente, crítica e criativa de arguir as ideias agora apresentadas, facilitou o alcançar dos objectivos delineados para esta tese.

A todos os restantes docentes do laboratório de Bioquímica, bem como de Microbiologia e Métodos Instrumentais de Análise e, muito particularmente à Dra. Alexandrina Mendes, aos quais nunca conheci sonegação de conhecimentos, antes solicitude e a mais-valia da sugestão e comentário genuinamente interessado e despretencioso.

Aos meus colegas de laboratório, actuais e pretéritos, pela entreaajuda e partilha constantes; pelas discussões quotidianas, na perspicácia com que as souberam introduzir, mormente naqueles momentos de atavismo e frustração porque passa todo o investigador, neles sempre vislumbrei a intrepidez típica de quem faz ciência.

A todos os funcionários que desempenhado sem mácula aquela miríade de tarefas que, não cabendo aqui descrever, me propiciaram um suporte humano e técnico cuja constância não poderia deixar sem menção.

Institucionalmente os meus agradecimentos vão para a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e para o Centro de Neurociências e Biologia Celular, tendo ambos emprestado, sem peias, as condições necessárias à concretização deste projecto. Agradeço igualmente à FCT pelo financiamento com uma bolsa de doutoramento.

Aos amigos e família, tantas vezes incomodados, ao menos pela omissão da minha presença ou restrições no tempo que, para bem menos do que mereciam, lhes dispensei.

As palavras finais são para a minha família próxima, sem vacilações sempre comigo ao longo da minha caminhada, académica e científica.

Aos meus Pais, pelo seu apoio incondicional, expresso ou silencioso, materializado em toda uma vida de paciência, sacrifício e espírito de abnegação e pelos sólidos princípios de perseverança, humildade e dedicação que me inculcaram, sem os quais seria impensável concretizar mais esta etapa.

À minha Irmã, que com o seu espírito saudavelmente irreverente e optimista me animou e incentivou constantemente.

Ao meu Marido, por ter aceite as minhas arriscadas opções de vida e por tudo o que o seu apoio consubstanciou, que não precisa, nem pode, traduzir-se em palavras.

Finalmente, mas em especialíssimo lugar, à minha Madalena, por todos os mimos e colos de que a privei mas cujo sorriso sempre conseguiu dissipar os meus eventuais remorsos.

A todos o meu perene reconhecimento.

