

**Papel do resveratrol no contexto da prevenção da  
aterosclerose: mecanismos moleculares envolvidos na  
apoptose e proliferação celular**



**The role of resveratrol in the context of atherosclerosis  
prevention: molecular mechanisms involved in  
apoptosis and cell proliferation**

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

**Paula Matos de Brito  
2007**

Capa feita sobre tela de Mark Rothko

**Orientador:** Prof. Doutora Teresa do Carmo Pimenta Dinis

**Co-orientador:** Prof. Doutora Leonor Martins de Almeida

**Co-orientador no estrangeiro:** Doutora Anne Nègre-Salvayre

Os estudos apresentados nesta tese foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra (Prof. Doutora T. C.P. Dinis e Prof. Doutora L. M. de Almeida) e no insituto INSERM unidade 858, Toulouse, França (Doutora A. Nègre-Salvayre).

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela bolsa SFRH/BD/7986/2001 atribuída a Paula Matos de Brito; e pelos projectos POCTI/35019/AGR/2000 POCTI/AGR/59919/2004 atribuídos à Doutora Leonor Almeida pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Lisboa, Portugal.



**Abreviaturas**

AFC	<i>7-amido-4-trifluotomethylcoumarin</i>
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
AMC	<i>7-amido-4-methylcoumarin</i>
ANT	<i>mitochondrial inner membrane protein adenine nucleotide translocase</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
BAEC	<i>bovine aortic endothelial cell</i>
BH <sub>4</sub>	tetrahidrobiopterina
BSO	butionina sulfoximina
CARD	<i>caspase-recruitment domain</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DED	<i>death-effector domain</i>
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
4EBP1	<i>4E-binding protein 1</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
endoG	endonuclease G
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase-1,-2</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GPx	glutatião peroxidase
GSSG	glutatião oxidado
GSH	glutatião reduzido
GST	glutatião-S-transferases
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
IAPs	<i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
ICAD	<i>inhibitor of the caspase-activated DNase</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IDL	<i>intermediate density lipoproteins</i>

JNK	<i>c-jun-N-terminal kinases</i>
IL	<i>interleucina</i>
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LDLox	<b>LDL oxidadas</b>
LPS	<b>lipolissacarídeos</b>
MAPK	<b>mitogen-activated protein kinases</b>
MCP-1	<b>monocyte chemotactic protein-1</b>
M-CSF	<b>macrophage colony stimulating factor</b>
MPT	<b>mitochondrial permeability transition</b>
mTOR	<b>mammalian target of rapamycin</b>
NF- $\kappa$ B	<b>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</b>
NOS	<b>nitric oxide synthase</b>
PARP-1	<b>poly (ADP-ribose) polimerase-1</b>
PBS	<b>phosphate-buffered saline</b>
PDGF	<b>platelet-derived growth factor</b>
PDK-1	<b>3'-phosphoinositide-dependent-kinase-1</b>
PH	<b>pleckstrin homology</b>
PI3K	<b>phosphoinositide 3-kinases</b>
PIP2	3,4-bifosfato de fosfatidilinositol
PIP3	3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol
PKB/Akt	<b>protein kinase B</b>
PMSF	<b>phenylmethanesulfonyl fluoride</b>
PTEN	<b>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten</b>
PTP	<b>permeability transition pore</b>
Rheb	<b>Ras homolog enriched in brain</b>
RNS	<b>reactive nitrogen species</b>
ROS	<b>reactive oxigen species</b>
SMAC	<b>second mitochondria-derived activator of caspases</b>
SMC	<b>smooth muscle cells</b>
SOD	<b>superoxide dismutase</b>
TBARS	<b>thiobarbituric acid reactive substances</b>
TMRM	tetrametilrodamina
TNF- $\alpha$	<b>tumor necrosis factor - <math>\alpha</math></b>
TSC	<b>tuberous sclerosis complex</b>

VCAM-1	<i>vascular <b>c</b>ell <b>a</b>dhesion <b>m</b>olecule-1</i>
VDAC	<i>voltage-<b>d</b>ependent <b>a</b>nion <b>c</b>hannel</i>
VLDL	<i>very <b>l</b>ow <b>d</b>ensity <b>l</b>ipoproteins</i>





## Índice

Resumo .....	5
Abstract .....	7
<b>Capítulo 1 – Introdução geral .....</b>	<b>11</b>
1 – Aterosclerose – mecanismos celulares e moleculares .....	13
1.1 – Patogénese da aterosclerose .....	14
1.2. – Patogénese da aterosclerose e o <i>stress</i> oxidativo .....	19
2 – Apoptose – mecanismos moleculares reguladores .....	37
2.1 – As caspases .....	38
2.2 – Via dos receptores de morte .....	40
2.3. A via mitocondrial .....	41
3 – Vias de proliferação, crescimento e sobrevivência celular .....	47
3.1 – As proteínas cinases activadas por mitogénios .....	47
3.2 – A via PI3K/Akt(PKB) .....	49
3.3 – mTOR .....	51
4 – Resveratrol – potencial papel na aterogénese .....	53
4.1 – Fontes de resveratrol .....	54
4.2 – Biodisponibilidade do resveratrol .....	55
4.3 – Efeitos biológicos do resveratrol consonantes com um papel na cardioprotecção .....	56
5 – Objectivos gerais do trabalho .....	62
<b>Capítulo 2 – O resveratrol protege as células endoteliais da morte celular induzida pelo peroxinitrito: um papel para o GSH intracelular .....</b>	<b>83</b>
Resumo .....	85
1 – Introdução .....	86
2 – Materiais e Métodos .....	88
2.1 – Materiais .....	88
2.2 – Cultura primária de células endoteliais da aorta bovina .....	88
2.3 – Síntese do peroxinitrito .....	89
2.4 – <i>Stress</i> oxidativo induzido pelo peroxinitrito .....	89
2.5 – Ensaio de viabilidade celular .....	90
2.6 – Medida da libertação da lactato desidrogenase .....	91
2.7 – Morfologia nuclear .....	91
2.8 – Determinação do conteúdo intracelular de glutatião reduzido e oxidado .....	91
2.9 – Análise estatística .....	92
3 – Resultados .....	92

---

3.1 – O peroxinitrito induz alterações morfológicas apoptóticas em células endoteliais da aorta bovina .....	92
3.2 – O resveratrol preveniu as alterações apoptóticas mediadas pelo peroxinitrito .....	95
3.3 – O resveratrol preveniu a depleção do GSH induzida pelo peroxinitrito .....	95
3.4 – BSO aumentou a morte celular induzida pelo peroxinitrito .....	98
3.5 – Co-tratamento com a BSO anulou a citoprotecção mediada pelo resveratrol .....	100
4 – Discussão .....	101
<b>Capítulo 3 – O resveratrol protege as células endoteliais da apoptose induzida pelo peroxinitrito: um papel para a Bcl-2</b> .....	111
Resumo .....	113
1 – Introdução .....	114
2 – Materiais e Métodos .....	116
2.1 – Materiais .....	116
2.2 – Cultura primária de células endoteliais da aorta bovina .....	117
2.3 – Síntese do ONOO <sup>-</sup> .....	117
2.4 – Estimulação das células com peroxinitrito .....	118
2.5 – Morfologia nuclear .....	118
2.6 – Actividade de caspases .....	119
2.7 – Potencial de membrana mitocondrial .....	120
2.8 – <i>Immunoblot</i> .....	120
2.9 – Análise estatística .....	121
3 – Resultados .....	121
3.1 – O resveratrol inibe a activação das caspase-3 e -9, mas não da caspase-8, induzida pelo peroxinitrito .....	121
3.2 – O resveratrol não inibe a dissipação de potencial de membrana do mitocôndrio induzida pelo peroxinitrito .....	125
3.3 – O resveratrol aumenta os níveis intracelulares da proteína Bcl-2 diminuindo o quociente Bax/Bcl-2 aumentado pelo peroxinitrito .....	127
4 – Discussão .....	131
<b>Capítulo 4 - As LDL oxidadas activam a via de sinalização de mTOR: inibição pelo resveratrol</b> .....	141
Resumo .....	143
1 – Introdução .....	144
2 - Materiais e Métodos .....	146
2.1 - Materiais .....	146
2.2 – Cultura de células e tratamento das células com as LDL oxidadas e inibidores .....	147

2.3 – Preparação e oxidação das LDL .....	147
2.4 – Incorporação de [ <sup>3</sup> H] timidina .....	147
2.5 – <i>Immunoblot</i> .....	148
2.6 – Análise estatística .....	149
3.1 – As LDL oxidadas estimulam a proliferação de células musculares lisas .....	149
3.2 – As LDL oxidadas estimulam a via da mTOR .....	150
3.3 – Sinalização entre as vias ERK1/2 e mTOR .....	155
3.4 – O papel do resveratrol na proliferação de células musculares lisas dependente de LDL oxidadas .....	156
4 – Discussão .....	157
<b>Capítulo 5 - Conclusões gerais</b> .....	<b>165</b>
Agradecimentos .....	173



## Resumo

A aterosclerose, principal causa de morte nos países com estilo de vida ocidental, é uma doença inflamatória crónica associada a *stress* oxidativo. Inicialmente, pensou-se que o papel do *stress* oxidativo na aterosclerose, em consequência de um aumento da concentração de espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio na parede arterial, tais como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), se restringia à oxidação das lipoproteínas de baixa densidade humanas (LDL). De facto, as LDLox desencadeiam, *in vitro*, eventos que se crêem ocorrer *in vivo* durante a patogénese da doença, incluindo a disfunção endotelial, a formação de células esponjosas e a proliferação de células musculares lisas. No entanto, é hoje claro, que o *stress* oxidativo e o papel das espécies reactivas na parede arterial, vão muito para além da oxidação das LDL, uma vez que à semelhança do que ocorre com as LDLox, também desencadeiam *in vitro* vários processos subjacentes à iniciação e à evolução da doença *in vivo*.

O resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno) é uma fitoalexina sintetizada na casca da uva, que ocorre no vinho, em particular no vinho tinto. Recentemente, foi proposto que o resveratrol podia ser um dos compostos activos responsáveis pela diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, nos consumidores moderados de vinho. Os efeitos cardioprotectores do resveratrol têm sido atribuídos às suas actividades biológicas, tais como actividade antioxidante, actividade anti-proliferativa, actividade anti-plaquetar e actividade anti-inflamatória. Contudo, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos seus efeitos cardioprotectores permanecem por esclarecer.

Assim, neste estudo pretendeu-se: (1) investigar a capacidade do resveratrol prevenir a morte das células endoteliais da aorta bovina (BAEC) mediada pelo  $\text{ONOO}^-$  e potenciais mecanismos bioquímicos celulares subjacentes (capítulos 2 e 3); (2) avaliar a actividade anti-proliferativa do resveratrol em células musculares lisas (SMC) estimuladas com LDLox e, mais particularmente, na via de sinalização da mTOR (capítulo 4).

Numa primeira fase deste estudo, demonstrou-se que uma pré-incubação longa (14 h) das células endoteliais com o resveratrol protege as células do dano mediado pelo  $\text{ONOO}^-$  500  $\mu\text{M}$ , de uma forma dependente da concentração. Para a concentração mais elevada testada (50  $\mu\text{M}$ ), o resveratrol confere citoprotecção por um mecanismo que envolve o aumento do conteúdo intracelular de glutatião (capítulo 2).

Posteriormente, investigou-se o mecanismo pelo qual concentrações mais baixas de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) previnem a morte celular induzida pelo  $\text{ONOO}^-$  em BAEC (capítulo 3). O resveratrol inibe a actividade das caspases-3 e -9, mas não a da caspase-8, interrompendo preferencialmente a via mitocondrial da apoptose induzida pelo  $\text{ONOO}^-$ . Esta interferência na via mitocondrial é, muito provavelmente, uma consequência da capacidade do resveratrol em modular os níveis intracelulares da proteína Bcl-2, sem afectar os da proteína Bax.

Numa fase final deste trabalho, estudaram-se vias complementares pelas quais as LDLox exercem os seus efeitos mitogénicos, mais particularmente na via da mTOR e o papel do resveratrol nessa mesma via (capítulo 4). As LDLox estimulam a via da mTOR, como observado não só pelo padrão de fosforilação de mTOR e do seu alvo a jusante p70S6K como também pela inibição da proliferação das SMC induzida pelas LDLox, na presença do inibidor da mTOR, a rapamicina. Adicionalmente, os resultados indicam que a via ERK1/2 pode influenciar a via da mTOR, mas que o contrário não ocorre. O resveratrol inibe a proliferação das SMC induzida por LDLox, por um mecanismo dependente da via mTOR e independente de ERK1/2.

Em conclusão, o presente estudo desvenda mecanismos celulares e moleculares subjacentes à actividade anti-apoptótica e anti-proliferativa do resveratrol. Além disso, ele também expande o nosso conhecimento acerca dos efeitos cardioprotectores potenciais do resveratrol e reforça o seu papel na prevenção da formação das lesões ateroscleróticas, protegendo dois tipos de células vasculares, as células endoteliais e as células musculares lisas, de dois eventos precoces pró-aterogénicos mediados por *stress* oxidativo.

## Abstract

Atherosclerosis, the leading cause of death in western countries, is a chronic inflammatory disease associated to oxidative stress. This stress due to an increase in reactive oxygen and nitrogen species concentrations in the arterial wall, such as peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), was initially thought to be restricted to low density lipoprotein (LDL) oxidation. Indeed, oxLDL mimics *in vitro* several events known to occur *in vivo*, including endothelial dysfunction, foam cells formation and smooth muscle cells proliferation. However, it is clear now that the role of oxidative stress and of reactive species in the arterial wall goes far beyond LDL oxidation. Indeed, in a similar way to that observed for oxLDL, several reactive species, including peroxynitrite, also trigger *in vitro* several processes that underlies the initiation and evolution of the disease *in vivo*.

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a natural phytoalexin synthesized at the skin level of grapes, occurring in wine, specially red wine. Recently, it has been proposed that resveratrol could be one of the wine active ingredients responsible for the reduced coronary heart disease, in moderate wine drinkers. Resveratrol cardioprotective effects have been ascribed to its several biological activities, including antioxidant activity, anti-proliferative activity, anti-plaquetar activity and anti-inflammatory activity. However, the cellular and molecular mechanisms underlying cardioprotective effects of resveratrol are still largely unknown.

In this study, we aimed: (1) to investigate the resveratrol ability to prevent bovine aortic endothelial cell death mediated by ONOO<sup>-</sup> and potential underlying biochemical and molecular mechanisms (chapter 2 and 3); (2) to evaluate the resveratrol anti-proliferative activity in smooth muscle cells (SMC) stimulated by oxLDL and, more particularly in mTOR signaling pathway (chapter 4).

Firstly, we investigated the capacity of resveratrol to prevent cell death mediated by peroxynitrite and if this could be ascribed to the increase in

intracellular glutathione (GSH) concentrations observed in the presence of resveratrol (chapter 2). Glutathione is the principal non-protein thiol involved in the antioxidant defense present in high concentration in cells and an efficient scavenger of peroxynitrite. So, modulation of glutathione synthesis may provide a strategy to selectively protect cells. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were treated with  $\text{ONOO}^-$  and the cell viability and intracellular GSH content were assessed. Peroxynitrite (400–600  $\mu\text{M}$ ) is cytotoxic to BAEC, triggering a programmed cell death pathway, as indicated by nuclear morphology after Hoescht nuclei staining. A 14 h pre-treatment of cells with resveratrol (1–50  $\mu\text{M}$ ) prevented cell death mediated by  $\text{ONOO}^-$  (500  $\mu\text{M}$ ) in a concentration-dependent manner. However, only at the highest tested concentration (50  $\mu\text{M}$ ), resveratrol significantly increased the GSH intracellular content, an effect that was reverted by co-incubation of cells with BSO, an inhibitor of GSH synthesis. Moreover, BSO raised  $\text{ONOO}^-$ -induced apoptotic cell death, an effect not reverted by resveratrol. Thus, we demonstrated that the highest tested resveratrol concentration rescued endothelial cells from injury triggered by  $\text{ONOO}^-$  by a mechanism of up-regulation of the intracellular GSH content.

Next, we looked up for alternative mechanisms for resveratrol cytoprotective effects against  $\text{ONOO}^-$ -mediated injury, specially for the lowest concentrations tested (10  $\mu\text{M}$ ), where no significant increase in GSH intracellular level was observed. Caspases activation analysis showed that the molecular pathway leading to  $\text{ONOO}^-$  (500  $\mu\text{M}$ ) cytotoxicity is associated with an activation of caspase-3,-8 and -9, suggesting that both mitochondrial and death receptors apoptotic pathways are involved. Resveratrol cells pre-incubation (10 and 50  $\mu\text{M}$ ) for 14 h was able to efficiently prevent  $\text{ONOO}^-$ -induced caspase-9 and -3 activation, but this preventive effect was less pronounced in caspase-8 activation by  $\text{ONOO}^-$ . Additionally, we showed that  $\text{ONOO}^-$  increases the pro-apoptotic Bax protein intracellular level without affecting the anti-apoptotic Bcl-2 protein intracellular level, increasing therefore the ratio Bax/Bcl-2. This ratio decreased when cells were pre-incubated with 10 and 50  $\mu\text{M}$  resveratrol. This decrease is mainly due to



resveratrol ability *per se* to up-regulate Bcl-2 levels, without affecting Bax levels.

In the last part of this work, we show that oxLDL exert their mitogenic effects on SMC partly through mTOR signaling pathway. Indeed, SMC proliferation induced by oxLDL (50  $\mu$ g/mL) was inhibited by rapamycin, an mTOR inhibitor. This is further supported by an increase in the phosphorylation of mTOR and its downstream target, p70S6K. Additionally, we observed no effects of rapamycin and Ly294002, a PI3K inhibitor, on ERK1/2 phosphorylation and observed inhibitory effects of PD98059, a MEK1/2 inhibitor, on mTOR and p70S6K phosphorylation. Together, these results indicate that ERK1/2 pathway may trigger mTOR activation, but that mTOR pathway does not modulate ERK1/2 pathway. Resveratrol (25  $\mu$ M) prevented SMC proliferation induced by oxLDL by a mechanism independent of ERK1/2, since resveratrol does not inhibit its phosphorylation. Moreover, resveratrol inhibited mTOR and p70S6K phosphorylation, suggesting that its anti-proliferative effects are modulated through this signaling pathway.

In conclusion, the present study unravels molecular and cellular mechanisms that underlie the anti-apoptotic and the anti-proliferative activities of resveratrol. Also, it expands our knowledge on resveratrol cardioprotective effects and strengthens its role on the prevention of atherosclerotic lesions development, protecting two different vascular cell types, endothelial cells and smooth muscle cells, from two distinct early pro-atherogenic processes mediated by oxidative stress.



# **Capítulo 1**

## **Introdução geral**



## **1 – Aterosclerose – mecanismos celulares e moleculares**

A aterosclerose, doença vascular subjacente à maioria dos casos de enfarte do miocárdio e acidentes vasculares periféricos e cerebrais, é a principal causa de morte nas sociedades ocidentais. Actualmente, sabe-se que a aterosclerose não é uma simples consequência degenerativa do envelhecimento, mas antes, uma doença inflamatória crónica que envolve uma inter-relação complexa de elementos celulares circulantes e as células da parede arterial (Ross, 1999).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pela acumulação de lípidos e de elementos fibrosos nas grandes artérias. As lesões precoces da aterosclerose – as estrias gordas – são o resultado da acumulação subendotelial de macrófagos enriquecidos em colesterol, designados por células esponjosas. Nos humanos, estas lesões são observáveis na aorta na primeira década de vida, nas artérias coronárias na segunda década, e nas artérias cerebrais na terceira ou quarta década de vida. Apesar das estrias gordas não serem clinicamente significativas são precursoras de lesões mais avançadas caracterizadas pela acumulação de detritos necróticos ricos em lípidos e de células musculares lisas – as placas fibrosas. Estas placas podem tornar-se ainda mais complexas, devido por exemplo a calcificações, e aumentarem até limitarem a circulação sanguínea por formação de um trombo ou coágulo sanguíneo (Lusis, 2000).

Estudos epidemiológicos têm revelado vários factores de risco para a aterosclerose, que podem ser agrupados em dois tipos diferentes, ou seja factores com uma importante componente genética, e factores que são essencialmente ambientais (Quadro 1). São, no entanto, desconhecidos os mecanismos moleculares e celulares que ligam todos eles.

---

**Quadro 1 – Factores de risco genéticos e ambientais associados ao desenvolvimento da aterosclerose**

---

**Factores com uma forte componente genética**

---

Níveis elevados de LDL e de VLDL  
Níveis reduzidos de HDL  
Níveis elevados de lipoproteína(a)  
Hipertensão  
Níveis elevados de homocisteína  
Diabetes Mellitus e obesidade  
Níveis elevados de factores homeostáticos, por ex. fibrinogénio  
Síndrome metabólico, por ex. resistência à insulina  
Inflamação sistémica  
Depressão e outros comportamentos  
Género masculino  
História familiar

---

**Factores ambientais**

---

Dieta rica em gorduras  
Tabaco  
Vida sedentária  
Agentes infecciosos

---

### **1.1 – Patogénese da aterosclerose**

A causa exacta subjacente ao desenvolvimento da doença permanece ainda hoje desconhecida. Ainda assim, estudos patológicos em conjunto com estudos *in vitro* permitiram estabelecer uma sequência de eventos celulares que conduzem à formação das lesões.

#### **1.1.1– Disfunção endotelial ou iniciação da lesão?**

O endotélio, constituído por uma monocamada de células endoteliais, funciona não só, como uma barreira selectiva permeável entre o sangue e os tecidos, mas também, como um importante controlador vascular regulando o tónus vascular, a trombose, a inflamação, a coagulação e a regeneração vascular (controla a proliferação de células musculares lisas). Da alteração de qualquer uma destas propriedades resulta a disfunção endotelial, um dos elementos fundamentais em todo o processo da aterogénese (Ross, 1993). Vários factores, incluindo lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade humanas (LDL, *low density lipoprotein*) oxidadas, homocisteína, infecção, espécies reactivas de oxigénio (ROS, *reactive oxygen species*) e de nitrogénio

(RNS, *reactive nitrogen species*) e fluxo sanguíneo turbulento e oscilatório (baixo *shear stress*), têm sido implicados na disfunção endotelial (Ross, 1999).

Neste contexto, o *shear stress* é particularmente relevante, uma vez que, o local onde aparecem as lesões ateroscleróticas nos vasos sanguíneos parece estar sob o seu controlo. De facto, as lesões ateroscleróticas desenvolvem-se preferencialmente em áreas de curvatura e ramificações onde o fluxo sanguíneo é turbulento (baixo *shear stress*) e não em áreas tubulares onde o fluxo sanguíneo é laminar (elevado *shear stress*) (Gimbrone, Jr., 1999). Nas áreas de baixo *shear stress*, o endotélio é exposto a um fluxo reduzido e oscilatório, uma condição hemodinâmica que produz alterações físico-químicas e biológicas que predispõe à aterosclerose. A alteração físico-química mais relevante é o aumento da permeabilidade do endotélio a macromoléculas, a LDL e células sanguíneas, para a qual contribuem processos reológicos e biológicos tais como: (1) o aumento do tempo de permanência e de contacto destes elementos com o endotélio devido à recirculação do sangue (Glagov et al., 1988); (2) alteração da morfologia e da orientação das células endoteliais, nestas áreas, que têm uma forma poligonal e não se orientam de acordo com o fluxo sanguíneo como acontece em áreas tubulares (Davies, 1986); (3) elevada renovação das células endoteliais de baixa actividade mitótica, acompanhada de células senescentes que exibem maior aderência aos monócitos. O aumento da renovação das células endoteliais é consequência do aumento da apoptose nestas áreas (Tricot et al., 2000; Choy et al., 2001). A morte das células endoteliais afecta gravemente a integridade física do endotélio e consequentemente as suas funções. No que respeita às alterações bioquímicas, tem-se observado que nestas áreas há um aumento da produção do anião superóxido e uma diminuição dos níveis de óxido nítrico, conduzindo a um aumento drástico do *stress oxidativo* (Cooke, 2003). Adicionalmente, a expressão de proteínas potencialmente envolvidos na aterosclerose parece ser modulada pelo *shear stress* (Cooke, 2003).

As LDL são outro factor importante para a disfunção endotelial, uma vez que níveis elevados de LDL são o único factor capaz de, por si só, induzir a

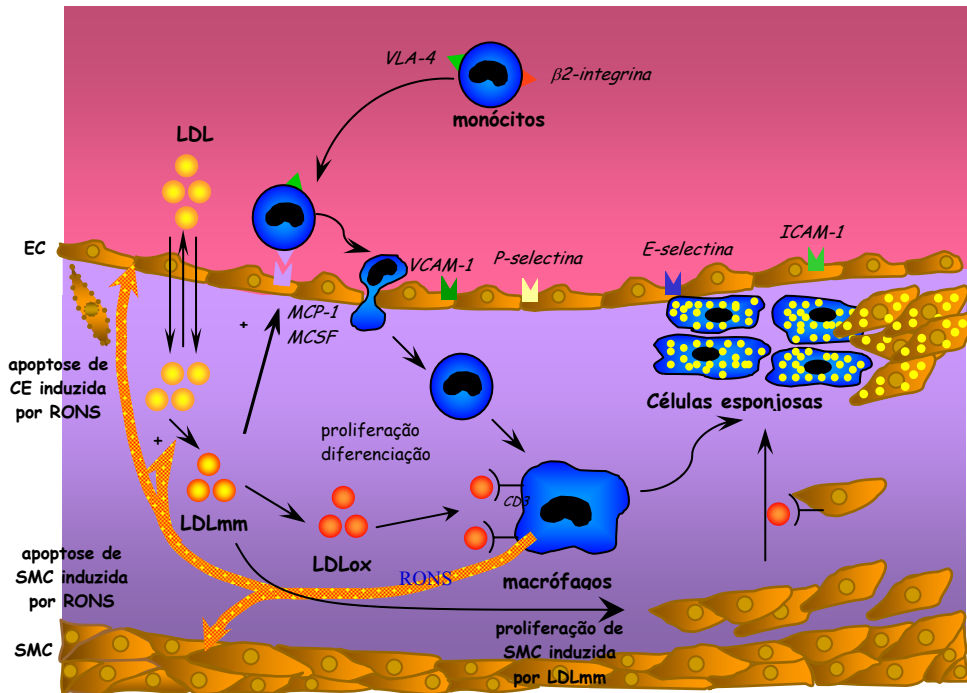
aterosclerose em modelos animais. O aumento da permeabilidade do endotélio facilita a acumulação das LDL na matriz subendotelial, por períodos mais ou menos longos. Aí, estão sujeitas a várias modificações, incluindo formação de complexos insolúveis por interacção com células vasculares e macromoléculas (proteoglicanos, colagénio e elastina) e modificação oxidativa, sendo subsequentemente captadas por macrófagos (Steinberg et al., 1989).

### 1.1.2 – Inflamação

Mediante um dano iniciado por qualquer um dos factores referidos anteriormente, o endotélio desencadeia uma resposta inflamatória que leva à entrada de leucócitos (monócitos e de linfócitos, mas não de neutrófilos) para o espaço subendotelial, que contribui para a formação de estrias gordas e expansão das lesões (Fig. 1).

A resposta inflamatória inicia-se pelo recrutamento de monócitos, sendo este mediado por moléculas de adesão expressas nos monócitos, a VLA-4 e a  $\beta$ 2-integrina, e nas células endoteliais, a molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*), as P- e E-selectinas e a molécula de adesão intracelular (ICAM-1, *intracellular adhesion molecule-1*) (Li et al., 1993; Dong et al., 1998; Collins et al., 2000). A migração dos monócitos para a parede arterial e subsequente maturação em macrófagos ocorre pela expressão de moléculas quimiotácticas, tais como, a proteína quimiotáctica de monócitos-1 (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*), o factor estimulante de colónia de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*) e a interleucina-8 (IL-8) nas células que constituem a parede arterial, mas principalmente, em células endoteliais (Rajavashisth et al., 1990; Yla-Herttuala et al., 1991; Smith et al., 1995). De realçar, que estudos realizados em ratos deficientes em MCP-1 ou no seu receptor CCR2 mostraram decréscimos significativos das lesões ateroscleróticas, sugerindo que a interacção MCP-1/CCR2 tem um papel importante na aterogénese (Boring et al., 1998).





**Fig. 1** – Representação esquemática da patogênese da aterosclerose. Para detalhes ver texto principal. Adaptado e modificado de Lusis, 2000.

### 1.1.3 – Estrias gordas

A evolução dos macrófagos (e de células musculares lisas, numa fase mais tardia da aterosclerose) para células contendo quantidades elevadas de ésteres de colesterol, armazenados em gotículas lipídicas, designadas por células esponjosas é um evento característico das lesões precoces (reversíveis) – estrias gordas – e tardias (irreversíveis) da aterosclerose. A acumulação do colesterol nos macrófagos parece ser mediada, principalmente, através da captação não controlada de formas modificadas de LDL (mas não de LDL nativas), que deixam de ser reconhecidas pelos receptores apoB/E, e passam a ser captados via receptores *scavenger*, que reconhecem uma grande variedade de ligandos e cujo número aumenta na presença de M-CSF (Yamada et al., 1998). De entre os receptores *scavenger*, os SRA e os CD36 parecem ser de importância primordial, embora os receptores SR-B1, LOX-1 e macrossialina/CD68 possam também ter alguma função, mas a sua

importância ainda não foi testada em modelos animais (Acton et al., 1994; Ramprasad et al., 1995; Suzuki et al., 1997; Sawamura et al., 1997; Febbraio et al., 2000). Contrariamente à captação das LDL nativas pelos receptores apoB/E, a internalização das LDLox via receptor *scavenger* não é regulada negativamente pela concentração intracelular de colesterol, ocorrendo captação em grandes quantidades de LDLox e, conseqüentemente, formação de células esponjosas. Estas depositam-se no espaço subendotelial constituindo as estrias gordas.

#### **1.1.4 – Lesões avançadas e ruptura da placa**

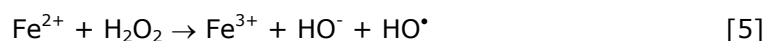
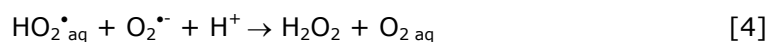
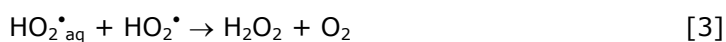
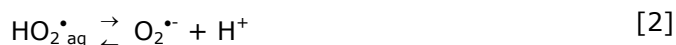
A transição das estrias gordas, lesões relativamente simples, para lesões fibrosas mais complexas caracteriza-se pela migração das células musculares lisas da camada média da parede arterial para o espaço subendotelial, seguida da sua proliferação e produção de uma matriz extracelular rica em colagénio, que em conjunto com as células musculares lisas forma uma capa fibrosa. Estas células podem captar lipoproteínas modificadas, contribuindo igualmente para a formação de células esponjosas. As citocinas e factores de crescimento secretados pelos macrófagos, nomeadamente, o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*), o factor de crescimento dos fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e o factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *tumoral necrosis factor- $\alpha$* ) são importantes para a migração e proliferação das células musculares lisas e para a produção da matriz extracelular (Ross, 1993).

Sob a capa fibrosa, encontra-se um centro necrótico constituído por fragmentos celulares e lípidos libertados em consequência da morte das células esponjosas (Lusis, 2000). Além disso, o centro necrótico e as áreas circundantes são também ricos em macrófagos que secretam metaloproteinases, tais como colagenases e elastases que podem degradar a matriz extracelular da capa fibrosa (Galis et al., 1994) (Mach et al., 1997). A ruptura da capa fibrosa expõe o conteúdo do centro necrótico, os lípidos e o

factor tecidual expresso em grandes quantidades pelas células que constituem a lesão, à corrente sanguínea, iniciando-se a coagulação, i.e. o recrutamento de plaquetas e a formação do trombo (Schonbeck et al., 2000). O trombo pode obstruir parcial ou totalmente o vaso sanguíneo e é a principal causa de eventos clínicos coronários agudos.

### 1.2. – Patogénese da aterosclerose e o stress oxidativo

O *stress* oxidativo foi definido por Sies como sendo “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, que potencialmente pode induzir uma lesão” (Sies, 1991). Os oxidantes são espécies com elevado potencial de oxidação-redução, enquanto que os antioxidantes são espécies com um potencial de oxidação-redução baixo (Cadenas, 1998). Os oxidantes podem ser radicais livres ou não, sendo os radicais, espécies que contêm um ou mais electrões desemparelhados. Os principais oxidantes da célula resultam do oxigénio, ou melhor da redução univalente deste, que origina o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ; reacção 1), um oxidante fraco, que se encontra em equilíbrio com a sua forma protonada, o radical perhidroxilo ( $HO_2^{\bullet-}$ ; reacção 2), um oxidante mais potente particularmente em ambientes lipídicos (Bielski, 1978; Chance et al., 1979). Estas duas espécies podem dismutar produzindo peróxido de hidrogénio (reacções 3 e 4), um oxidante não radicalar, que por sua vez pode reagir com metais de transição (reacção 5) formando o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), um poderoso oxidante. Além disso, o anião superóxido pode reagir com o radical  $^{\bullet}NO$ , um oxidante fraco, para produzir uma espécie química altamente reactiva, o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ; reacção 6).



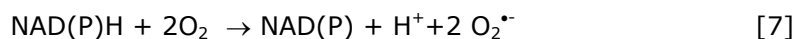
A hipótese da modificação oxidativa, inicialmente proposta por Steinberg e colaboradores, postulava que a oxidação das LDL era central, se não obrigatória para o processo da aterogénese (Steinberg et al., 1989). De acordo com ela, o papel das ROS e RNS produzidas na parede arterial limitar-se-ia apenas à oxidação das LDL. No entanto, nos últimos anos surgiram várias evidências, de que as espécies reactivas têm um papel mais abrangente no desenvolvimento da doença, estando o *stress* oxidativo associado à aterogénese, relacionado não só com as LDL oxidadas, mas também com a disfunção endotelial, com os monócitos e macrófagos, com a apoptose e a proliferação das células musculares lisas.

### **1.2.1 – Fontes de espécies reactivas na parede arterial**

Virtualmente, todas as células que compõe a parede arterial produzem ROS e RNS, através de diversos sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. Seguidamente, irão ser referidas de uma forma sucinta, as fontes fisiologicamente mais relevantes, implicadas na produção de espécies reactivas na aterosclerose.

#### **1.2.1.1 – NAD(P)H oxidase**

Várias evidências indicam que a NAD(P)H oxidase será a principal fonte de  $O_2^{\bullet-}$ , sendo determinante no estado redox dos vasos sanguíneos e miocárdio. A NAD(P)H oxidase, inicialmente identificada em células fagocíticas e posteriormente em todas as células da parede arterial, é uma enzima associada à membrana plasmática que catalisa a redução univalente do oxigénio a  $O_2^{\bullet-}$ , usando o NADH ou o NADPH como dador de electrões (reacção 7).



As oxidases fagocíticas e vasculares são estruturalmente diferentes (Griendling et al., 2000). A NAD(P)H oxidase fagocítica é constituída por duas subunidades transmembranares, a gp91 phox (Nox2) e a p22 phox, e duas subunidades citosólicas, a p47 phox e a p67 phox, e ainda por uma proteína G

ras1 ou ras2 (Griendling et al., 2000). A NAD(P)H oxidase vascular distingue-se pelo facto da subunidade gp91 phox poder ser substituída por um outro elemento da família das proteínas Nox (Nox1-Nox4), e por nas células musculares lisas parecer não existir p67 phox (Jones et al., 1996; Pagano et al., 1997; Patterson et al., 1999). Existe alguma controvérsia no que respeita à orientação das enzimas; enquanto que, nas células fagocíticas, células endoteliais e fibroblastos os electrões são transferidos através da membrana para o oxigénio extracelular, nas células musculares lisas o  $O_2^{\bullet-}$  parece ser produzido predominantemente no interior das células (Meier et al., 1991; Griendling et al., 2000; Ushio-Fukai et al., 2002). Ao contrário da enzima fagocítica, a enzima vascular está activa durante o metabolismo normal e uma activação sustida de minutos a horas é obtida como resposta a agonistas (Pagano et al., 1997).

Vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstram o papel crítico da NAD(P)H oxidase no *stress* oxidativo no contexto da aterosclerose. De facto, entre os vários agonistas que podem activar a enzima, contam-se vários factores conhecidos por estarem envolvidos na patogénese da doença, nomeadamente, a angiotensina II, trombina, PDGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 e, mais especificamente para as células endoteliais, forças mecânicas incluindo o shear *stress* e factores de crescimento do endotélio vascular. Assim, e por exemplo, estudos em células endoteliais e em células musculares lisas demonstram que a actividade da enzima aumenta de uma forma sustida, na presença de um shear *stress* oscilatório e na presença de angiotensina II, respectivamente (De Keulenaer et al., 1998; Griendling et al., 2000). Recentemente, estudos em ratos p47 phox (-/-), ratos apoE (-/-) e ratos p47 phox (-/-)/apoE (-/-) mostram que estes últimos desenvolvem lesões ateroscleróticas menores do que os ratos apoE (-/-) (Barry-Lane et al., 2001). Em doentes com angina de peito observou-se uma produção de ROS fortemente associada à distribuição de p22 phox nas artérias coronárias (Azumi et al., 2002). Em conjunto, estes e outros estudos sugerem que a produção de  $O_2^{\bullet-}$  pela NAD(P)H oxidase poderá, em parte, ser responsável pelo *stress* oxidativo subjacente à aterosclerose.

### 1.2.1.2 – Óxido nítrico sintases

As óxido nítrico sintases (NOS, *nitric oxide synthase*) são uma família de enzimas, em que a forma endotelial (eNOS) e a forma indutiva (iNOS) são as mais relevantes no contexto da aterosclerose (ver Alderton et al., 2001, para revisão exaustiva sobre a estrutura e função das NOS). Em condições normais, a NOS recebe electrões do NADPH no seu domínio redutase e transfere-os para o domínio oxigenase, via transportadores redox FAD e FMN. Uma vez no domínio oxigenase, os electrões interagem com o ferro do grupo heme e a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), cofactor importante para catalisar a reacção do O<sub>2</sub> com a L-arginina, produzindo L-citrulina e óxido nítrico (\*NO). No entanto, na ausência quer da L-arginina quer da BH<sub>4</sub>, a eNOS fica desacoplada reduzindo o O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Vasquez-Vivar et al., 1998). Têm surgido evidências de que o desacoplamento da eNOS, inicialmente observado apenas *in vitro*, também ocorre *in vivo* e poderá estar envolvido nas doenças cardiovasculares. De facto, o aumento de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> observado em ratos hipertensos diminui pela administração de L-NAME, um inibidor da iNOS (Kerr et al., 1999). Recentemente, foi igualmente observado, que a sobreexpressão da eNOS em ratos apoE (-/-) não reduziu, mas antes, aumentou as lesões ateroscleróticas (Ozaki et al., 2002). Este aumento foi inibido pela administração de BH<sub>4</sub>, sugerindo que, a deficiência neste cofactor seria responsável pela progressão das lesões. Laursen e colaboradores demonstraram que em ratos apoE (-/-) o ONOO<sup>-</sup> é o responsável pelo desacoplamento da eNOS por levar à oxidação da BH<sub>4</sub> (Laursen et al., 2001). De salientar, que tem sido sugerido que a eNOS fique apenas parcialmente desacoplada, produzindo simultaneamente o \*NO e o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que podem reagir entre si gerando o ONOO<sup>-</sup>, aumentando drasticamente o *stress oxidativo* (Cai e Harrison, 2000).

### 1.2.1.3 – Xantina oxidase

A xantina oxidase, uma flavoproteína contendo molibdénio, presente em elevadas concentrações nas células endoteliais, existe sob 2 formas, desidrogenase e oxidase, sendo a primeira a forma predominante (Jarasch et

al., 1981). A enzima catalisa a oxidação da xantina ou hipoxantina a ácido úrico produzindo  $O_2^{\bullet-}$  e constitui uma das principais fontes de ROS.

Vários estudos sugerem um papel para o  $O_2^{\bullet-}$  produzido pela xantina oxidase. Assim, em coelhos hipercolesterolémicos, a aterosclerose resultante da dieta foi atribuída ao *stress* oxidativo induzido pela activação da xantina oxidase (Ohara et al., 1993). Outro estudo demonstrou que a administração de oxipurinol, um inibidor da xantina oxidase, melhorou a vasodilatação de doentes hipercolesterolémicos (Cardillo et al., 1997). Recentemente, um estudo demonstrou uma activação significativa da NAD(P)H oxidase e da xantina oxidase nas artérias coronárias de doentes com doença da artéria coronária, avaliada pela formação de  $O_2^{\bullet-}$ , medido por ressonância paramagnética electrónica (Spiekermann et al., 2003). O mesmo estudo mostrou ainda que em jovens assintomáticos com história de hipercolesterolemia familiar, o aumento da actividade da xantina oxidase é um evento precoce.

#### **1.2.1.4 – Lipoxigenases**

As lipoxigenases são enzimas citosólicas, presentes em macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas, capazes de oxidar directamente os ácidos gordos polinsaturados, originando uma complexa família de lípidos biologicamente activos, incluindo as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos (Yamamoto, 1992). Apesar de ser ainda pouco claro o envolvimento da 15-lipoxigenase na oxidação das LDL, *in vitro*, induzida por células em cultura, quer a proteína, quer o mRNA da enzima foram já detectados nas lesões ateroscleróticas (Yla-Herttuala et al., 1990). Mais recentemente, experiências realizadas em modelos animais reforçam um papel aterogénico para a 15-lipoxigenase (Cyrus et al., 1999). De salientar ainda, que a activação da 12/15-lipoxigenase estimula a hipertrofia e proliferação das SMC, e a expressão de genes inflamatórios (Reddy et al., 2002).

#### **1.2.1.5 – Mieloperoxidase**

A mieloperoxidase é uma enzima secretada pelas células fagocíticas, que na presença de  $H_2O_2$  catalisa a oxidação do ião cloreto a ácido hipocloroso (HOCl) e a L-tirosina a radical tirosilo (Hazell e Stocker, 1993; Heinecke et al., 1993). Quer o ácido hipocloroso, quer o radical tirosilo oxidam as LDL *in vitro* de uma forma independente de metais, o que, aliado com a detecção da mieloperoxidase em lesões ateroscleróticas, sugere que, esta enzima pode ser um importante agente de oxidação das lipoproteínas *in vivo* (Daugherty et al., 1994). Adicionalmente, o sistema mieloperoxidase/ $H_2O_2/Cl^-$  e o HOCl oxidam o nitrito a cloreto de nitrito ( $NO_2Cl$ ) e ao radical dióxido de nitrogénio ( $\cdot NO_2$ ). Ambas as espécies químicas são agentes nitrantes capazes de nitrar a tirosina a 3-nitrotirosina detectada em lesões ateroscleróticas humanas (Beckmann et al., 1994; Leeuwenburgh et al., 1997).

#### **1.2.1.6 – Cadeia respiratória dos mitocôndrios**

Cerca de 1 a 2% dos electrões transportados ao longo dos complexos enzimáticos, que constituem a cadeia respiratória mitocondrial, escapam reduzindo o oxigénio a  $O_2^{\cdot-}$ , que é captado e convertido a  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase (SOD, *superoxide dismutase*) dependente de manganésio. A produção de  $O_2^{\cdot-}$  nos mitocôndrios ocorre principalmente no complexo I (NADH desidrogenase) e no complexo III (do ubiquinol-citocromo c oxidoreductase). A contribuição das ROS mitocondriais na aterosclerose foi recentemente sugerida num trabalho, em que a lesão no DNA mitocondrial se correlacionou positivamente com as lesões ateroscleróticas em ratos apoE (-/-) (Ballinger et al., 2002).

#### **1.2.2 – Defesas antioxidantes na parede arterial**

Para contrariar os efeitos deletérios dos oxidantes na aterosclerose, é necessário que a parede arterial esteja dotada de um sistema eficaz de defesas antioxidantes celulares e extracelulares. As defesas antioxidantes podem ser proteínas com ou sem actividade enzimática, antioxidantes



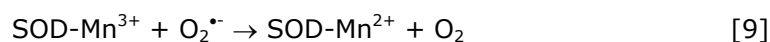
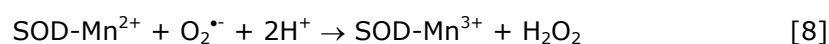
hidrossolúveis de baixa massa molecular e ainda antioxidantes lipossolúveis (Quadro 2). Seguidamente, irão ser descritas, sucintamente, apenas algumas das defesas antioxidantes mais importantes na parede arterial.

**Quadro 2 – Alguns antioxidantes proteicos e de baixa massa molecular**

Proteicos	Baixa massa molecular	
	Hidrossolúveis	Lipossolúveis
Superóxido dismutase, catalase, GSH peroxidases, GSH redutase, tioredoxina, tioredoxina redutase, glutaredoxina, peroxiredoxinas, sulfóxidos de metionina redutases, ferritina, transferrina, metalotioninas, ceruplasmina.	GSH, ascorbato, urato, bilirrubina	Tocoferóis, ubiquinol, carotenóides

### 1.2.2.1 – As superóxido dismutases

A SOD catalisa a redução univalente e oxidação de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ , respectivamente (reacções 8 e 9). Foram identificadas 3 isoformas de SOD: a citosólica dependente de cobre-zinco (Cu,Zn-SOD), a mitocondrial dependente de manganésio (Mn-SOD) e a SOD extracelular (EC-SOD). A velocidade da reacção de dismutação catalisada pela Cu,Zn-SOD é independente do pH, ao contrário da dismutação espontânea e da reacção catalisada pela Mn-SOD, que diminui com o aumento do pH. A actividade Mn-SOD contribui para 10% da actividade total SOD da célula (Stocker e Keaney, Jr., 2004).



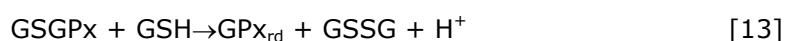
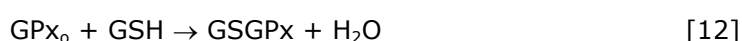
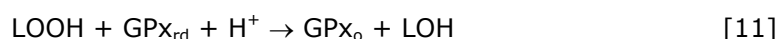
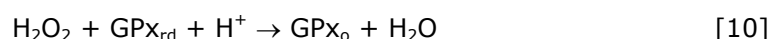
A SOD extracelular é uma enzima dependente de cobre-zinco, presente em grandes quantidades na parede arterial saudável a nível extracelular (Stralin et al., 1995). Na aorta humana, ela é sintetizada e secretada pelas células musculares lisas e liga-se a glicosaminoglicanos da matriz extracelular vascular na superfície endotelial. Esta síntese pode ser modulada por citocinas, factores de crescimento e oxidantes (Stralin e Marklund, 2000; Stralin et al., 2003). Tem sido sugerido que uma das funções-chave da SOD será a de

prevenir a reacção entre o  $\cdot\text{NO}$  e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , tendo-se observado que a sobreexpressão de EC-SOD em ratos hipertensos melhora a função endotelial (Fennell et al., 2002).

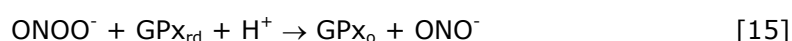
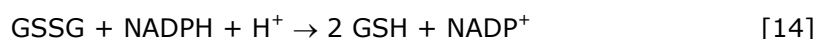
#### **1.2.2.2 – Defesas antioxidantes dependentes do glutatião**

As glutatião peroxidases (GPx) são enzimas antioxidantes que catalisam a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a água (reacção 10) e de hidroperóxidos lipídicos a hidroxilípidos (reacção 11), à custa da oxidação do glutatião (GSH) (reacções 12 e 13). A família das glutatião peroxidases é composta por cinco peroxidases diferentes, sendo quatro delas dependentes de selénio: a clássica, GPx1; a do epitélio intestinal, GPx2; a do plasma, GPx3; a dos hidroperóxidos de fosfolípidos, GPx4; e uma independente do selénio, GPx5. A GPx1, primeira isoforma a ser identificada, é citosólica e mitocondrial e actua no  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxidos de ácidos gordos e colesterol, lisofosfolípidos, mas não em diacilfosfolípidos. A redução destes hidroperóxidos lipídicos é da responsabilidade da enzima associada à membrana, a GPx4, que além do GSH pode utilizar outros tióis de baixa massa molecular como agentes redutores (Maiorino et al., 1991; Sattler et al., 1994). Nem a GPx1 nem a GPx4 estão presentes em fluidos extracelulares. A GPx2 presente no tracto gastrointestinal parece estar implicada na desintoxicação dos hidroperóxidos lipídicos ingeridos na dieta (Chu et al., 1993). A GPx3 parece actuar no  $\text{H}_2\text{O}_2$  e nos hidroperóxidos de fosfolípidos, sendo no entanto duvidoso que esta isoforma actue como uma GPx (Maddipati e Marnett, 1987; Takahashi et al., 1987). De facto, os níveis de GSH plasmático inferiores a  $0,5 \mu\text{M}$  são demasiados baixos quando comparados com a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) da enzima (Wendel e Cikryt, 1980). Foi, então, sugerido que a tioredoxina e a glutaredoxina seriam os putativos redutores da GPx plasmática, permitindo assim, que esta última reduza os hidroperóxidos circundantes mesmo na presença de baixas concentrações de GSH (Bjornstedt et al., 1994). No entanto, está por esclarecer se as concentrações plasmáticas destas proteínas são suficientes para a actividade da GPx3. Independentemente do tipo de actividade que a enzima exiba a sua

importância em acidentes vasculares e trombose tem sido apoiada por diversos estudos clínicos, demonstrando que a GPx3 modula a biodisponibilidade do  $\cdot\text{NO}$  e a trombose (Freedman et al., 1996; Kenet et al., 1999). Além de reduzir os peróxidos, a glutatíão peroxidase é igualmente capaz de reduzir o  $\text{ONOO}^-$  (reacção 15). De facto, Ma e colaboradores demonstraram que a depleção do GSH em coelhos hipercolesterolémicos aumenta os efeitos lesivos do  $\text{ONOO}^-$  nas funções vasculares (Ma et al., 1997).



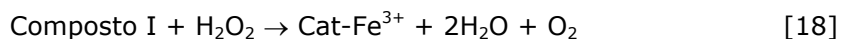
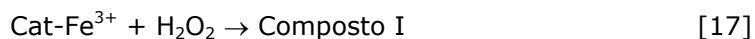
A glutatíão peroxidase actua de uma forma concertada com a glutatíão redutase que catalisa a redução do GSSG à custa do NADPH (reacção 14). Além destes sistemas enzimáticos, o GSH, principal tiol não proteico envolvido nas defesas antioxidantes, é o principal contribuinte para o estado redox da célula (Pastore et al., 2003). O GSH encontra-se ubiquitariamente em todos os tipos celulares em concentrações milimolares, distribuindo-se pelo núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrios. Apesar da constante de velocidade de reacção entre o GSH e o  $\text{ONOO}^-$  não ser muito alta, a elevada concentração intracelular do GSH torna o GSH na mais provável e na mais importante molécula de baixa massa molecular para captar o  $\text{ONOO}^-$  (reacção 16) (Klotz e Sies, 2003).



O GSH pode, ainda, participar na desintoxicação de xenobióticos através das glutatíão transferases, que podem também funcionar como peroxidases e consequentemente contribuir para as defesas antioxidantes celulares (Yang et al., 2001).

### 1.2.2.3 – Catalase

Nos mamíferos a catalase é uma enzima intracelular, presente essencialmente, nos peroxisomas. Ela catalisa a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (reacções 17 e 18), removendo assim de uma forma indirecta o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dismutado a  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela SOD. A enzima é particularmente importante no caso em que o conteúdo em GSH é limitado ou a actividade de GPx é reduzida e tem um papel significativo na adaptação das células ao *stress* oxidativo.



### 1.2.2.4 –Tioredoxina redutases

As tioredoxina redutases das células de mamíferos são uma família de oxidoreductases dependentes de selénio e que usam os nucleótidos de piridina, como o NADPH, como dadores de electrões para reduzir a tioredoxina (Holmgren, 2000). A tioredoxina redutase pode, ainda, reduzir vários compostos como hidroperóxidos lipidicos e o desidroascorbato (Wells et al., 1990; Bjornstedt et al., 1995). Adicionalmente, e como referido anteriormente, tem sido sugerido que a tioredoxina é um redutor da GPx plasmática (Bjornstedt et al., 1994).

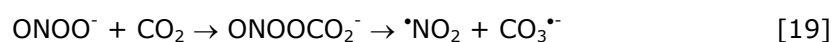
## 1.2.3 – O peroxinitrito na aterosclerose

### 1.2.3.1 – O peroxinitrito

O  $\text{ONOO}^-$  é uma espécie altamente reactiva não radicalar, formado *in vivo* pela reacção entre o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e o  $\bullet\text{NO}$  com constante de velocidade limitada pela difusão dos reagentes ( $\approx 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Beckman et al., 1990; Radi et al., 2001). Esta reacção é cerca de 6 vezes mais rápida que a reacção de dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pela SOD. Em condições normais, a SOD é suficiente para dismutar todo o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  formado, mas quando um nível elevado de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  prevalece

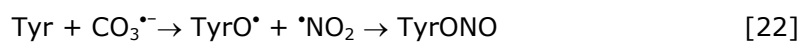
ou quando o  $\cdot\text{NO}$  é produzido em excesso, o  $\text{ONOO}^-$  é invariavelmente formado.

Como discutido anteriormente, uma grande variedade de células da parede vascular podem produzir simultaneamente quantidades significativas de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e de  $\cdot\text{NO}$ , sendo consideradas as principais fontes de  $\text{ONOO}^-$  *in vivo*. Este ião é relativamente estável podendo difundir e atravessar membranas celulares até ser clivado em potentes oxidantes, que apresentam reactividade semelhante ao  $\text{HO}\cdot$ , o ião  $\text{NO}_2^+$  e o radical  $\cdot\text{NO}_2$ . No entanto, com um  $\text{pKa}=6,8$ , a pH fisiológico encontra-se em equilíbrio com a forma protonada,  $\text{ONOOH}$ , uma forma mais reactiva com um tempo de meia vida de 1,9 s a 37 °C (Radi et al., 2001). Uma das principais reacções do  $\text{ONOO}^-$  em sistemas biológicos é a sua rápida reacção com o dióxido de carbono com cerca de 35% de produção dos oxidantes  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  e  $\cdot\text{NO}_2$  (reacção 19 - homólise) e 65% de produção de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{CO}_2$  (reacção 20 - isomerização). Além disso, a fissão homolítica do  $\text{ONOO}^-$  (reacção 21) pode também originar os oxidantes  $\text{HO}\cdot$  e  $\cdot\text{NO}_2$  (Radi et al., 2001). Contudo, esta reacção é lenta quando comparada com a velocidade de outras reacções do  $\text{ONOO}^-$  nos sistemas biológicos.



Vários estudos demonstram, que o  $\text{ONOO}^-$  causa danos generalizados, reagindo com uma grande variedade de biomoléculas, incluindo proteínas, lípidos e DNA. A modificação de proteínas pode envolver reacções directas com metais de transição de grupos hemes e reacções com aminoácidos, sendo as mais importantes, a oxidação dos resíduos de Cys e a nitração da tirosina (reacção 22) (Beckman, 1996; Radi et al., 2001). Estas alterações proteicas podem induzir alterações estruturais e funcionais. De salientar, que na ausência de macrófagos, a 3-nitrotirosina é considerada um marcador biológico do  $\text{ONOO}^-$  *in vivo*. O  $\text{ONOO}^-$  inicia a peroxidação lipídica em membranas alterando a permeabilidade e fluidez membranar com consequências biológicas importantes (Radi et al., 2001). O  $\text{ONOO}^-$  pode,

igualmente, oxidar lipoproteínas (Radi et al., 2001). Relativamente ao DNA, o ONOO<sup>-</sup> oxida as oses e as bases dos nucleótidos, sendo a guanina a mais reactiva (Burney et al., 1999; Yu et al., 2005). Estas oxidações induzem quebras do DNA em cadeias simples e representam um aspecto crítico na citotoxicidade induzida pelo ONOO<sup>-</sup>.



### **1.2.3.2 – Evidências que sugerem um papel do peroxinitrito na aterosclerose**

O papel do ONOO<sup>-</sup> na patogénese da aterosclerose foi, inicialmente, sugerido pela observação da 3-nitrotirosina em lesões ateroscleróticas humanas e em LDL isoladas destas lesões e pela sua capacidade em oxidar LDL *in vitro* (Radi et al., 1991b; Beckmann et al., 1994; Leeuwenburgh et al., 1997). Contudo, a 3-nitrotirosina detectada nas lesões ateroscleróticas pode não ser um produto de reacção do ONOO<sup>-</sup>, mas antes um produto de reacção de outras espécies nitrantes, formadas pela mieloperoxidase dos macrófagos cuja densidade celular é elevada nas lesões. A colocalização de 3-nitrotirosina com um aumento da expressão de iNOS observada em lesões humanas, apesar de fortemente indicativa da presença do ONOO<sup>-</sup>, não exclui totalmente a mieloperoxidase, uma vez que, o aumento de iNOS nas lesões ateroscleróticas parece estar associado maioritariamente aos macrófagos (Buttery et al., 1996; Esaki et al., 2000). A sobreexpressão da iNOS correlaciona-se igualmente com a apoptose observada nas placas (Esaki et al., 2000). Esta observação em conjunto com observações *in vitro*, de que a morte induzida por macrófagos requer uma iNOS activa associada a um aumento de produção de ONOO<sup>-</sup>, constitui uma evidência indirecta do ONOO<sup>-</sup> como agente pro-aterogénico (Boyle et al., 2002; Borutaite et al., 2006). O papel da iNOS na aterosclerose é ainda reforçado por estudos com ratos apoE<sup>-/-</sup>/iNOS<sup>-/-</sup> demonstrando que, uma deficiência em iNOS reduz as lesões ateroscleróticas (Detmers et al., 2000; Kuhlencordt et al., 2001). Outra evidência indirecta, *in vivo*, que reforça o papel do ONOO<sup>-</sup> no

desenvolvimento da doença é o desacoplamento da eNOS associado ao aumento de lesões ateroscleróticas em ratos apoE<sup>-/-</sup> que sobreexpressam a eNOS (Ozaki et al., 2002). Como discutido anteriormente, a eNOS parcialmente desacoplada gera simultaneamente <sup>•</sup>NO e O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, estando criadas todas as condições para a formação de ONOO<sup>-</sup>.

### **Quadro 3 – Efeitos biológicos do peroxinitrito**

#### **Stress oxidativo**

<b>Acção</b>	<b>Exemplos representativos</b>	<b>Referência</b>
Peroxidação lipídica	Oxidação de lipoproteínas e membranas celulares	(Radi et al., 1991a; Darley-Usmar et al., 1992)
Inibição de enzimas antioxidantes	SOD, glutatião redutase	(MacMillan-Crow et al., 1998; Savvides et al., 2002)
Depleção de antioxidantes	GSH, $\alpha$ -tocoferol, grupos tiólicos	(Hogg et al., 1994; Van, V et al., 1994; Quijano et al., 1997)
Oxidação de co-factores enzimáticos	BH <sub>4</sub>	(Milstien e Katusic, 1999)

#### **Morte celular**

<b>Acção</b>	<b>Exemplos representativos</b>	<b>Referência</b>
lesão do DNA	Modificações das bases do DNA, quebras do DNA em cadeias simples e duplas	(Salgo et al., 1995; Szabo et al., 1996; Burney et al., 1999)
Disfunção mitocondrial	Inactivação da respiração mitocondrial, permeabilidade transitória mitocondrial	(Cassina e Radi, 1996; Vieira et al., 2001)
Desregulação do cálcio	Depleção do Ca <sup>2+</sup> do retículo endoplasmático	(Dickhout et al., 2005)

#### **Inflamação**

<b>Acção</b>	<b>Exemplos representativos</b>	<b>Referência</b>
Produção de moléculas de adesão	ICAM-1, P-selectina, E-selectina	(Zingarelli et al., 1998; Zouki et al., 2001b)
Produção de citocinas	IL-6, IL-8	(Zouki et al., 2001a; Matata e Galinanes, 2002)
Activação de enzimas	Metaloproteinases, fibrinogénio	(Okamoto et al., 2001; Vadseth et al., 2004)
Modificação da sinalização celular	Activação ou inibição de NF- $\kappa$ B, activação de PI3K/Akt	(Klotz et al., 2000; Zouki et al., 2001b; Matata e Galinanes, 2002; Levrant et al., 2005)

Adaptado de (Szabo et al., 2007)

Além de todas as evidências directas e indirectas obtidas *in vivo*, estudos *in vitro* demonstram que o ONOO<sup>-</sup> exibe vários efeitos biológicos tidos como pro-aterogénicos. O ONOO<sup>-</sup> aumenta o *stress* oxidativo celular, induz a morte de células vasculares e modula processos inflamatórios, podendo estes dois últimos processos serem, igualmente, o resultado do *stress* oxidativo (Quadro 3). A importância da oxidação das LDL no desenvolvimento da doença é discutida a seguir.

#### **1.2.4 – As LDL oxidadas na aterosclerose**

##### **1.2.4.1 – Composição e função das LDL**

As lipoproteínas humanas de baixa densidade têm uma estrutura esférica com um diâmetro de 19-25 nm e uma massa molecular relativa média de  $2,5 \times 10^6$  Dalton, consistindo num sistema complexo constituído por proteína, lípidos neutros e polares e compostos lipofílicos com actividade antioxidante, sendo o maioritário o  $\alpha$ -tocoferol (Esterbauer et al., 1992). Assim, no seu interior as LDL encerram um núcleo hidrofóbico constituído por ésteres de colesterol, triacilgliceróis e pequenas quantidades de colesterol livre, envolvido por uma monocamada de fosfolípidos com as cabeças polares orientadas para o exterior, contribuindo desta forma para a solubilidade das LDL em solução aquosa, em particular no plasma. Para além dos fosfolípidos encontram-se ainda nesta camada externa, colesterol livre e uma proteína glicosilada de grandes dimensões – a apolipoproteína B-100 (apoB), também responsável pela estabilidade e solubilidade da lipoproteína (Esterbauer et al., 1992). Cerca de metade dos ácidos gordos presentes nas LDL são polinsaturados, o que confere a estas partículas um carácter lábil, tornando-as num alvo altamente susceptível à peroxidação lipídica. De notar, que o conteúdo das LDL em ácidos gordos e o padrão de distribuição é variável de indivíduo para indivíduo, reflectindo provavelmente a diversidade dietética e contribuindo para diferentes comportamentos das LDL face à oxidação (Kleinveld et al., 1993).



As LDL são responsáveis pelo transporte da maioria do colesterol plasmático (cerca de 60% em indivíduos normolipidémicos), tendo um papel fisiológico importante na cedência de colesterol aos tecidos periféricos. A entrada das LDL nas células pode ocorrer via endocitose não-específica, sendo no entanto, a endocitose específica mediada por um receptor, a principal via. Esta via implica o reconhecimento da apoB das LDL pelo receptor específico apoB/E presente na superfície celular e subsequente internalização do complexo receptor/LDL. As LDL são assim captadas para o interior das células, para os endossomas, onde o pH ácido permite a dissociação do complexo receptor/LDL com a consequente reciclagem dos receptores para a membrana plasmática e a degradação das LDL nos lisossomas (Brown e Goldstein, 1986).

A expressão dos receptores apoB/E é sujeita a um controlo de retroacção negativa pelos níveis intracelulares do colesterol, diminuindo quando o colesterol intracelular é elevado, e vice-versa. Uma elevada concentração destes receptores localiza-se nos hepatócitos, sendo aliás, os níveis plasmáticos de LDL determinados, essencialmente, pela velocidade de captação das LDL através dos receptores hepáticos. Uma das funções biológicas importante destes receptores é de fornecerem colesterol em quantidade suficientemente baixa para evitar a formação de placas ateroscleróticas. Tal facto é evidenciado pela acumulação em grandes quantidades de LDL em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica, doença hereditária caracterizada pela ausência de receptores apoB/E funcionais, e que se traduz pela ocorrência de enfartes do miocárdio em indivíduos com apenas 2 anos de idade (Brown e Goldstein, 1986).

#### **1.2.4.2 – As LDL oxidadas**

Todos os constituintes das LDL são susceptíveis à oxidação, sendo os ácidos gordos e o colesterol susceptíveis de sofrer peroxidação lipídica e a apoB degradação e/ou modificações oxidativas e/ou não oxidativas (Esterbauer et al., 1992) De acordo com o grau de oxidação, as LDL podem ser classificadas em LDL minimamente oxidadas (ou modificadas) e em LDL

oxidadas. As primeiras caracterizam-se por uma pequena extensão de peroxidação lipídica e alterações pouco significativas da apoB, continuando a serem captadas pelas células de uma forma regulada através dos receptores apoB/E. Nas LDL oxidadas observa-se uma peroxidação lipídica mais acentuada e modificações na apoB numa extensão tal, que as LDL deixam de ser reconhecidas pelos receptores específicos, passando a ser captadas de forma descontrolada pelos receptores *scavenger* dos macrófagos, levando à formação de células esponjosas (Steinbrecher et al., 1990). Não é de mais enfatizar, que esta classificação é geral, e que o termo LDL oxidadas não define uma espécie molecular bem caracterizada dada a variabilidade inter-individual da composição das LDL nativas.

Existem várias evidências de que a oxidação das LDL ocorre *in vivo*, podendo esta ocorrer através das várias espécies reactivas produzidas nas células vasculares pelas diversas fontes discutidas anteriormente. Contudo, está por esclarecer a contribuição relativa de cada tipo de célula e, o ou os mecanismos potencialmente envolvidos na modificação mediada pelas células.

#### **1.2.4.3 – Evidências que apoiam o papel das LDL oxidadas na aterosclerose**

Existe actualmente um conjunto vasto de evidências que sustentam que a modificação oxidativa das LDL é crucial para o desenvolvimento da aterosclerose. Estas podem ser associadas em quatro categorias.

i) As lipoproteínas estão presentes *in vivo*, em particular nas lesões arteriais – De facto, lipoproteínas com algumas características das LDL oxidadas, tais como, aumento da mobilidade electroforética e reactividade com anticorpos direccionados contra LDLox, têm sido isoladas a partir de lesões ateroscleróticas e do plasma humano (Yla-Herttuala et al., 1989) (Hodis et al., 1994). A oxidação das LDL *in vivo* é ainda corroborada pela presença de anticorpos contra LDLox no plasma e nas lesões ateroscleróticas (Horkko et al., 2000). Em geral, os títulos de tais anticorpos estão aumentados na população de risco de doenças cardiovasculares, tendo-se

inclusive, observado em muitos estudos uma correlação directa com as manifestações clínicas da doença aterosclerótica (Yla-Herttuala, 1998). No entanto, é necessário ter alguma cautela na interpretação dos resultados de estudos que envolvem anticorpos, uma vez que, alguns dos epítomos reactivos nas LDLox são imuniquimicamente e, provavelmente, quimicamente idênticos a epítomos formados noutras proteínas ou em células necróticas ou apoptóticas.

ii) Relevância de proteínas e sistemas enzimáticos potencialmente envolvidos na aterogénese – A teoria da oxidação na aterogénese tem sido fortemente apoiada por experiências realizadas em ratos, deficientes em apoE ou em receptores das LDL, que desenvolvem aterosclerose. A supressão de receptores *scavenger* de macrófagos, nomeadamente de SRA ou CD36, em ratos deficientes em apoE, reduziu marcadamente a extensão da lesão aterosclerótica nesses animais (Suzuki et al., 1997; Febbraio et al., 2000). Estes dados são consistentes com a possibilidade da supressão do receptor *scavenger* conduzir a uma diminuição da formação de células esponjosas.

Uma redução dramática na aterogénese foi também observada em ratos deficientes em apoE, após supressão do sistema 12/15-lipoxigenase, que poderá estar envolvido na modificação das LDL *in vivo* (Cyrus et al., 1999). Por outro lado, um aumento da expressão da 15-lipoxigenase no endotélio conduz a um aumento da aterosclerose em ratos deficientes em receptores de LDL (Harats et al., 2000). Apesar de ser possível a lipoxigenase afectar a patogénese da aterosclerose por outros mecanismos, estes estudos suportam o conceito da deficiência em 15-lipoxigenase diminuir a aterosclerose, por diminuir a formação de LDLox. Um mecanismo semelhante parece estar envolvido na redução da aterosclerose observada em ratos deficientes em apoE, em que se inibiu a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Detmers et al., 2000).

iii) Efeitos benéficos dos antioxidantes – Encontram-se descritos na literatura, vários estudos de administração de antioxidantes em modelos animais (coelhos, hamsters, ratos), que inibem ou retardam a formação de

lesões ateroscleróticas (Witztum e Steinberg, 2001). Poder-se-ia argumentar, que os efeitos protectores dos antioxidantes se devem a mecanismos de acção não relacionados com as suas propriedades antioxidantes, mas o facto de compostos diferentes terem sido bem sucedidos sugere o contrário.

No Homem, os antioxidantes parecem ter igualmente um efeito protector, constatado pela correlação negativa entre a ingestão dietética ou níveis plasmáticos de nutrientes antioxidantes e o risco de manifestação clínica de doença cardiovascular, observada em vários estudos epidemiológicos (Witztum e Steinberg, 2001). Contudo, a maioria dos ensaios clínicos realizados até agora, foram negativos podendo-se adiantar várias explicações: (1) foram utilizados antioxidantes naturais, na premissa de que não havia toxicidade e não por terem sido efectivos na aterosclerose experimental (Witztum e Steinberg, 2001); (2) os antioxidantes utilizados eram eficientes na prevenção da oxidação lipídica iniciada por radicais, mas não na iniciada por oxidantes não radicalares mais potentes e fisiologicamente relevantes, como o  $\text{ONOO}^-$  e o  $\text{HOCl}$ ; (3) os indivíduos, que normalmente participam nos ensaios clínicos apresentam graus avançados de doença cardiovascular e as LDLox podem ser críticas no desenvolvimento das estrias gordas, podendo não ter um papel importante na evolução das lesões mais tardias (Witztum e Steinberg, 2001).

Apesar disto, a prevenção da oxidação das LDL com recurso à administração de antioxidantes continua a constituir uma estratégia terapêutica efectiva para prevenir ou atenuar a progressão da doença.

iv) Um grande número de efeitos biológicos das LDLox *in vitro* traduzem eventos que se crêem críticos na formação de lesões ateroscleróticas *in vivo* – As LDL oxidadas são capazes de atrair monócitos, induzir a adesão de monócitos ao endotélio, induzir a formação de células esponjosas, destruir as células (por via necrótica e/ou apoptótica), induzir a migração e a proliferação de células musculares lisas, interferir com a relaxação do endotélio e induzir propriedades pró-coagulantes das células vasculares (Berliner e Heinecke, 1996; Glass e Witztum, 2001).

## **2 – Apoptose – mecanismos moleculares reguladores**

A apoptose é um mecanismo de morte celular, essencial para o desenvolvimento e manutenção dos organismos multicelulares, pelo qual são eliminadas células danificadas, envelhecidas e indesejáveis. Este termo foi introduzido em 1972 por Kerr e colaboradores, para definir um tipo de morte, que morfológicamente se caracteriza por uma diminuição do tamanho da célula, uma condensação da cromatina e formação de invaginações membranares das quais resultam vesículas, que são libertadas da superfície celular, designadas de corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são subsequentemente fagocitados limitando a ocorrência dum processo inflamatório. Esta morte celular distingue-se da necrose em que há uma ruptura da membrana plasmática e libertação do conteúdo celular para o meio extracelular, sendo neste caso desencadeados processos inflamatórios (Kerr et al., 1972).

Uma desregulação dos processos envolvidos na apoptose quebra a homeostase tecidual da qual resulta um processo patogénico. De facto, enquanto que uma deficiência de apoptose se pode manifestar em cancro ou doença autoimune, a morte celular exacerbada é evidente na imunodeficiência, infertilidade e em doenças degenerativas agudas e crónicas, como a aterosclerose.

O papel da apoptose na aterogénese será abordado no capítulo 3. Aqui, apresenta-se apenas uma visão genérica sobre os mecanismos moleculares subjacentes a este processo de morte celular.

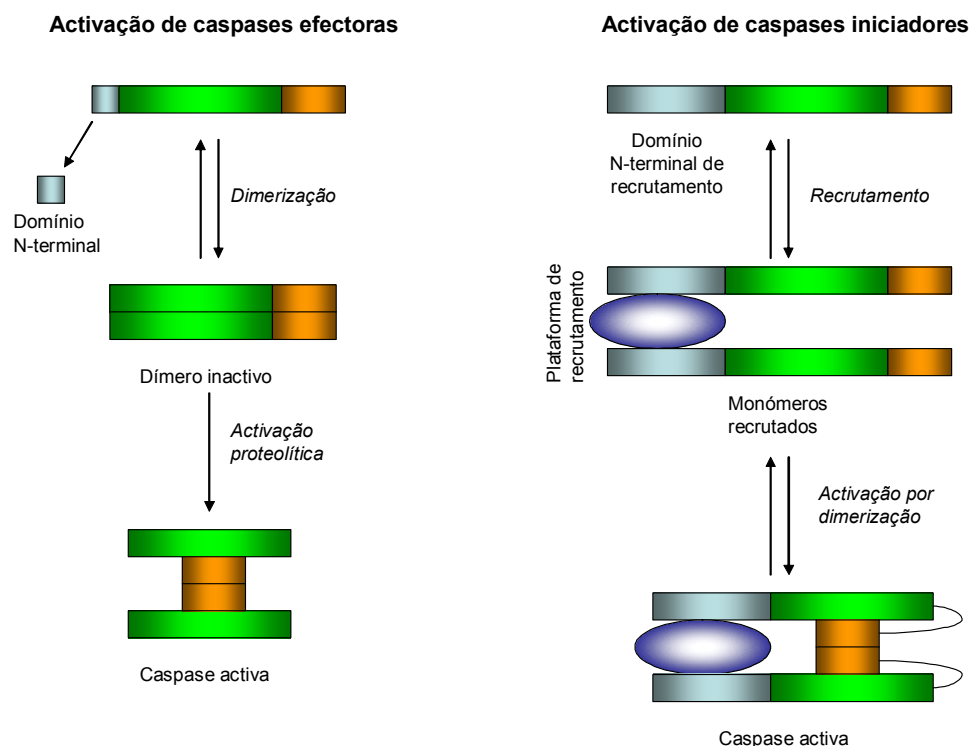
O conhecimento da maquinaria celular envolvida na apoptose, apesar de ainda hoje incompleto, revela que esta é bastante complexa. Vários organelos, como os mitocôndrios, o retículo endoplasmático e os lisossomas, e várias famílias de proteases, como as caspases, as calpaínas e as catepsinas participam neste processo (Leist e Jaattela, 2001). As caspases foram as primeiras proteases celulares a serem implicadas na maquinaria apoptótica, podendo a sua activação, perante um estímulo apoptótico, ocorrer através de

duas vias principais: a via extrínseca dos receptores de morte e a via intrínseca, na qual o mitocôndrio tem um papel chave (Hengartner, 2000). Apesar das duas vias iniciarem o processo apoptótico numa forma independente, em muitas células elas podem actuar numa forma coordenada podendo inclusive ocorrer uma interacção entre as 2 vias.

### 2.1 – As caspases

As caspases, um dos executores mais importantes e mais bem estudados da apoptose, pertencem a uma família de proteases dependentes de cisteína, que clivam as proteínas a seguir a resíduos de aspartato. Estas proteínas são sintetizadas na forma de cadeia simples constituída por um domínio N-terminal, um domínio central grande que contém o local activo de cisteína num motivo conservado QACXG, e um pequeno domínio C-terminal. O domínio N-terminal é separado do domínio central por um local de clivagem Asp; o domínio central é separado do domínio C-terminal por uma sequência interdomínio contendo um ou dois locais de clivagem Asp (Wolf e Green, 1999).

Constitutivamente, as caspases estão inactivas podendo ser classificadas em duas famílias, consoante a ordem de activação: i) caspases iniciadoras, como as caspases-2,-8,-9,-10, possuem domínios N-terminal de grande dimensão que contêm motivos de interacção homotípicos, como o domínio de recrutamento das caspases (CARD, ***caspase-recruitment domain***) e o domínio efector de morte (DED, ***death-effector domain***); ii) caspases efectoras, como as caspases-3,-4,-5,-6,-7 que possuem domínios N-terminal de menor dimensão (Riedl e Shi, 2004). As duas famílias de caspases distinguem-se, ainda, pelo seu mecanismo de activação (Fig. 2).



**Fig. 2** – Modelo de activação das caspases. Na activação das caspases efectoras, a caspase inactiva existe sob a forma de um dímero, que é activada após clivagem na superfície interdomínio. As caspases iniciadoras existem sob a forma de monómeros, sendo activadas por dimerização que é induzida pela proximidade, após terem sido recrutadas para uma plataforma de activação onde se concentram.

Assim, as caspases efectoras existem constitutivamente sob a forma dum homodímero que se forma após a clivagem do domínio N-terminal. Elas são activadas por clivagem proteolítica, nas sequências interdomínios, mediada por uma caspase iniciadora, seguida duma alteração conformacional de que resulta um aumento da actividade catalítica da enzima de várias ordens de grandeza (Shi, 2002; Riedl e Shi, 2004). Uma vez activada, a caspase efectora é responsável pela clivagem proteolítica dum largo espectro de alvos celulares, que ultimamente conduzem a alterações morfológicas características da apoptose. Um exemplo é a clivagem do inibidor da DNase activada por caspases (ICAD, *inhibitor of the caspase-activated DNase*) libertando CAD, que produz fragmentação do DNA nucleossomal. A activação das caspases iniciadoras ocorre por um mecanismo ainda não totalmente

esclarecido, tendo sido proposto o modelo de dimerização induzida pela proximidade (Boatright et al., 2003). De acordo com este modelo, as caspases iniciadoras existem sob a forma de monómeros, com alguma actividade, que são recrutados para as respectivas plataformas de activação, onde dada a elevada concentração local, iniciam um processo autocatalítico e um processo de dimerização que as torna activas (Boatright et al., 2003; Riedl e Salvesen, 2007). As plataformas de activação *in vivo* são complexas e resultam da associação de vários componentes. Uma das plataformas de activação mais bem estudada é o apoptossoma constituído pelo citocromo c e Apaf-1 que é responsável pela activação da caspase-9 e da via intrínseca de apoptose. Por seu lado, o complexo de sinalização indutor de morte (DISC, *death inducing signaling complex*) deverá também induzir a dimerização e subsequente auto-activação da caspase-8 e da via extrínseca da apoptose.

## **2.2 – Via dos receptores de morte**

A activação desta via ocorre após ligação de um ligando como o TNF- $\alpha$ , TRAIL ou Fas a receptores celulares transmembranares designados de receptores de morte, de entre os quais se destacam o receptor Fas/CD95, o receptor 1 TNF- $\alpha$  e receptores TRAIL (TNF- *related apoptosis inducing ligand*) DR4 e DR5 (Ashkenazi, 2002). Após esta ligação, uma molécula adaptadora que poderá ser FADD ou TRADD, dependendo se o receptor activado é Fas ou TNFR, respectivamente, é recrutada para a região intracelular do receptor através duma interacção domínio de morte – domínio de morte, constituindo o DISC. A molécula adaptadora possui um DED através do qual recruta a caspase-8, que também possui um DED, activando-a (Boatright e Salvesen, 2003).

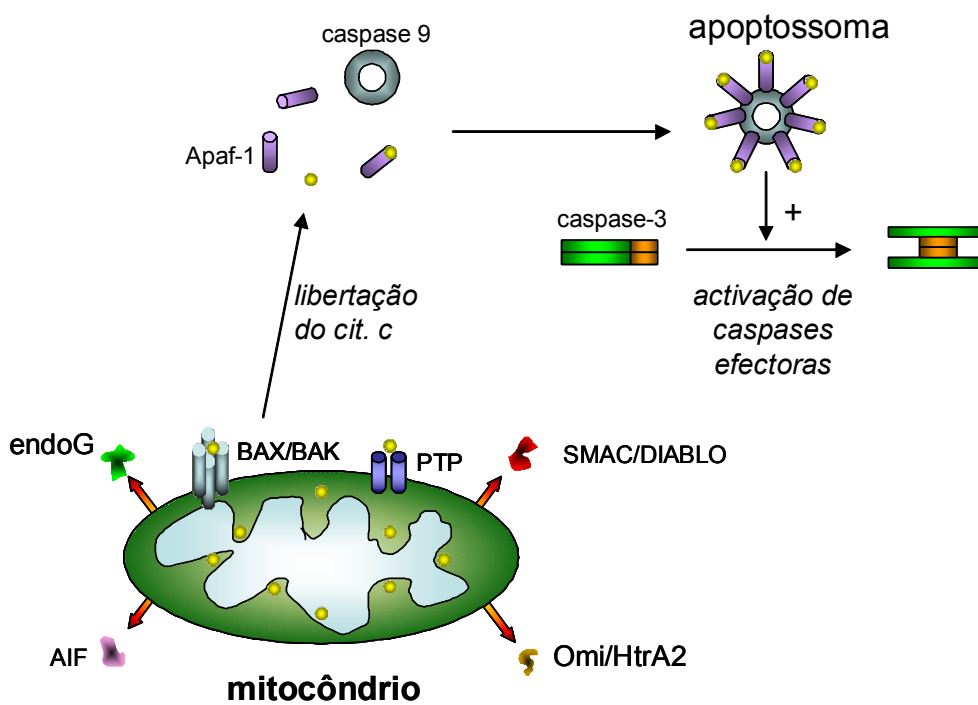
Em células do tipo I, a activação da caspase 8 é suficiente para activar directamente várias caspases a jusante, incluindo a caspase-3, -6 e -7 que por sua vez executam a apoptose degradando várias proteínas reguladoras. No entanto, em células do tipo II a activação da caspase-8 não é suficiente para activar directamente as caspases efectoras, clivando sim uma proteína da



família da Bcl-2, Bid truncada (tBid) que vai activar a via apoptótica mitocondrial e conseqüentemente a pró-caspase 3 (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Esta via constitui um sistema de amplificação do sinal de morte celular.

### 2.3. A via mitocondrial

A via mitocondrial ocorre por libertação de várias proteínas existentes no espaço intermembranar (factores apoptogénicos) dos mitocôndrios e activação de várias enzimas, incluindo as caspases, que por sua vez induzem a degradação de substratos e morte celular (Fig. 3).



**Fig. 3** – A via intrínseca da apoptose. Nesta via ocorre permeabilização da membrana mitocondrial e subsequente libertação de factores apoptogénicos presentes no espaço intramembranar mitocondrial como o citocromo c, o AIF, a endoG e SMAC/DIABLO. Uma vez no citosol, o citocromo c associa-se a Apaf-1 e caspase-9 que activa caspases efectoras. Adaptado e modificado de Sharpe et al., 2004 e Riedl e Salvessen, 2007.

### 2.3.1 – Permeabilização da membrana mitocondrial

A permeabilização da membrana externa mitocondrial é necessária para a libertação dos factores apoptogénicos mitocondriais e tem sido proposta como um ponto sem retorno no processo de morte celular (Kroemer e Reed, 2000). Apesar dos mecanismos pelos quais ela ocorre, não estarem totalmente esclarecidos, foram já propostos alguns modelos não exclusivos, que envolvem a permeabilidade transitória mitocondrial e a família de proteínas Bcl-2.

#### 2.3.1.1 – A permeabilidade transitória mitocondrial

Este modelo propõe que a permeabilização da membrana externa mitocondrial se inicia na membrana interna mitocondrial, pela abertura de poros designados de poro de permeabilidade transitória (PTP, *permeability transition pore*). A abertura destes poros está associada a uma despolarização mitocondrial, depleção de ATP e libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz mitocondrial, seguido de, intumescência da matriz mitocondrial e eventualmente ruptura da membrana externa e libertação de proteínas envolvidas na morte celular (Marchetti et al., 1996; Petit et al., 1998). Este processo designado de permeabilidade transitória mitocondrial tem sido implicado na apoptose e na necrose e pode ser despoletado por, entre outros agentes, ROS e  $\text{Ca}^{2+}$ . O PTP é um complexo multiproteico de elevada condutância, cuja composição molecular exacta ainda não foi totalmente determinada. Ainda assim, é actualmente reconhecido que o poro se estende da membrana interna à membrana externa mitocondrial sendo constituído por proteínas existentes em ambas as membranas e na matriz mitocondrial (Kroemer e Reed, 2000). De facto, o canal aniónico dependente da voltagem da membrana externa mitocondrial (VDAC, *voltage-dependent anion channel*) e a translocase do nucleótido de adenina da membrana interna mitocondrial (ANT, *mitochondrial inner membrane protein adenine nucleotide translocase*) foram identificados como componentes maioritários do PTP (Brustovetsky e Klingenberg, 1996; Crompton et al., 1998). Adicionalmente, também foi

proposto que uma proteína da matriz mitocondrial, a ciclofilina D (CypD) é um dos constituintes do PTP. Além disso, o poro parece incluir várias proteínas suplementares cuja interacção com os principais constituintes pode variar durante a apoptose (Garrido et al., 2006).

### **2.3.1.2 – A família Bcl-2**

As proteínas da família Bcl-2 são reguladores centrais da apoptose, integrando vários sinais de morte e sobrevivência gerados a nível extra e intracelular. De acordo com as suas funções, pró- ou anti-apoptóticas e a conservação dos domínios de homologia Bcl-2 (BH1-4), que correspondem a segmentos de hélice  $\alpha$ , as proteínas da família Bcl-2 podem ser subdivididas em 3 grupos (Borner, 2003). O grupo I é constituído por proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2, Bcl-XL ou MCL-1, que possuem quatro domínios de homologia BH (BH1-BH4). O grupo II é constituído por proteínas pró-apoptóticas como a Bax, Bak ou Bok, que possuem 3 domínios de homologia. Finalmente, o grupo III é constituído por proteínas pró-apoptóticas, como a Bad, Bid ou Bim que possuem apenas um domínio de homologia (BH3). Alguns membros desta família, como a Bcl-2 e Bak encontram-se constitutivamente localizados na membrana externa mitocondrial. No entanto, estas proteínas assim como outros membros da família Bcl-2 têm sido, também, encontrados no retículo endoplasmático, no citosol e ligados a microtubulos (Sharpe et al., 2004). A localização subcelular dos diferentes membros da família Bcl-2 é controlada pela sua heterodimerização, fosforilação, proteólise e interacção com FKBP38. Esta localização subcelular, assim como a capacidade que estas proteínas têm de se associar, formando complexos homo ou heterodiméricos, regulam a sua actividade.

Várias evidências experimentais sustentam que a acção reguladora destas proteínas na apoptose é mediada pela permeabilização da membrana externa mitocondrial e subsequente libertação das proteínas do espaço intermembranar. De facto, em resposta a um estímulo apoptótico, a Bax, que

está normalmente presente no citosol ou fracamente ligada à membrana externa mitocondrial, sofre uma alteração conformacional única expondo o seu domínio hidrófobo C-terminal, que promove a sua translocação para a membrana externa mitocondrial (Hsu et al., 1997). Aí, a Bax oligomeriza e induz a libertação de factores apoptogénicos dos mitocôndrios (Eskes et al., 1998; Antonsson et al., 2001). De uma forma semelhante, Bak, que já reside na membrana externa mitocondrial sofre uma alteração conformacional e também induz a libertação de factores apoptogénicos (Griffiths et al., 1999; Degenhardt et al., 2002). Este processo é inibido pelas proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL, que residem normalmente na membrana externa mitocondrial, através de interacções proteína-proteína, formação de heterodímeros e consequente sequestração das proteínas pró-apoptóticas (Antonsson et al., 1997). Em todo este processo também é de realçar o papel de alguns membros do grupo III, que podem não só actuar como co-factores da Bax e Bak (Bid e Bim), como também inibir a acção anti-apoptótica da Bcl-2 por sequestração (Bad) (Luo et al., 1998; Eskes et al., 2000). Os mecanismos, pelos quais as proteínas pró-apoptóticas induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial, são controversos, tendo sido proposto vários modelos. Assim, os modelos mais aceites sugerem que os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 permeabilizam a membrana externa mitocondrial por: (1) formar poros proteicos, (2) formar poros lipídicos, e (3) interagir com componentes do poro de permeabilidade transitória, aumentando ou diminuindo o tamanho do poro (Sharpe et al., 2004). Recentemente, foi também descrito, que a Bax poderia interferir com o processo de fissão mitocondrial, que também tem sido implicada na permeabilização da membrana mitocondrial, por interagir com a endofilina-1, um dos principais reguladores da divisão mitocondrial (Karbowski et al., 2004; Perfettini et al., 2005).

### **2.3.2 – Factores apoptogénicos mitocondriais**

Da permeabilização da membrana externa mitocondrial resulta a libertação de proteínas mitocondriais, com papéis fundamentais na mediação da morte

celular, numa forma dependente ou independente das caspases. De entre estas proteínas foram já identificadas o citocromo c, o segundo estímulo 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*), o factor inductor de apoptose (AIF, *apoptosis-inducing factor*), a endonuclease G (endoG) e Omi/HtrA2.

O citocromo c é um transportador de electrões entre o complexo III e IV da cadeia respiratória. Uma vez no citosol ele induz a formação do apoptossoma, que é constituído pelo citocromo c, Apaf-1 e dATP. Na presença de ATP ou dATP, o citocromo c liga-se aos domínios de repetição WD40 de Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), que adquire uma conformação heptamérica adaptada ao recrutamento da caspase-9 (Acehan et al., 2002). Por sua vez, a caspase-9, através do seu domínio de recrutamento CARD liga-se a Apaf-1, originando um complexo macromolecular, o apoptossoma (Riedl e Salvesen, 2007). Consequentemente, a caspase-9, assim como toda a cascata de caspases a jusante, como as caspases-3,-6 e-7 são activadas. Adicionalmente, foi recentemente proposto, que o citocromo c poderia mediar a apoptose por um mecanismo independente das caspases, tendo sido observado que ele se acumulava no núcleo, induzia a condensação da cromatina e libertação de histonas isoladas (Nur-E-Kamal et al., 2004).

A formação do apoptossoma nem sempre é suficiente para iniciar a cascata de activação das caspases, uma vez que estas podem ser inactivadas por proteínas inibidoras da apoptose (IAPs, *inhibitors of apoptosis proteins*) (Shiozaki e Shi, 2004). SMAC/DIABLO é uma proteína mitocondrial sintetizada como um precursor proteico de 29 kDa, que é proteoliticamente clivado, originando uma proteína activa de 23 kDa. Após um estímulo apoptótico, SMAC/DIABLO é libertada do espaço intramembranar mitocondrial para o citosol onde é capaz de se ligar a várias proteínas IAPs, nomeadamente, XIAP, c-IAP1 e c-IAP2, contrariando, assim, as suas funções inibitórias de caspases

(Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Em suma, SMAC/DIABLO activa indirectamente as caspases por reprimir os seus inibidores.

O factor indutor de apoptose (AIF) é uma flavoproteína mitocondrial, que uma vez no espaço intermembranar mitocondrial é clivada, originando a forma activa de 57 kDa. Após um estímulo apoptogénico, a forma activa do AIF transloca-se para o núcleo, onde induz uma condensação da cromatina periférica e fragmentação de DNA de elevadas massas moleculares (50 kbp) (Susin et al., 1999). Os mecanismos subjacentes a estes efeitos permanecem por esclarecer. Ainda assim, tem sido sugerido que o AIF pode interagir directamente com o DNA. A morte celular mediada pelo AIF, em células de mamíferos, é essencialmente independente de caspases, não sendo porém ignorado o possível envolvimento de caspases (Cande et al., 2004). Os efeitos apoptogénicos do AIF podem ser antagonizados pela proteína de choque térmico HSP70, com a qual ele é capaz de interagir directamente (Ravagnan et al., 2001). De realçar, que o AIF possui uma actividade NADH oxidase protegendo as células de *stress* oxidativo (Miramar et al., 2001).

A endonuclease G é uma nuclease mitocondrial, que inicialmente se pensou participar na replicação e reparação do DNA mitocondrial. Ela localiza-se no espaço intermembranar mitocondrial e durante a apoptose transloca dos mitocôndrios para o núcleo, onde fragmenta o DNA numa forma muito semelhante ao observado com CAD (Li et al., 2001; van Loo et al., 2001). No entanto, e ao contrário do que acontece com CAD, este processo mediado pela endoG é independente da activação das caspases.

Omi/HtrA2 é uma serina protease, que em células saudáveis se localiza nos mitocôndrios, sendo libertada para o citosol perante um estímulo apoptótico. A sua actividade pró-apoptótica tem sido atribuída quer à sua capacidade em inibir as IAPs quer à sua actividade proteolítica (Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2002). Esta última parece ocorrer numa forma independente da activação das caspases por mecanismos que permanecem desconhecidos. Assim sendo, esta proteína contribui para a apoptose, quer esta seja dependente ou independente de caspases.

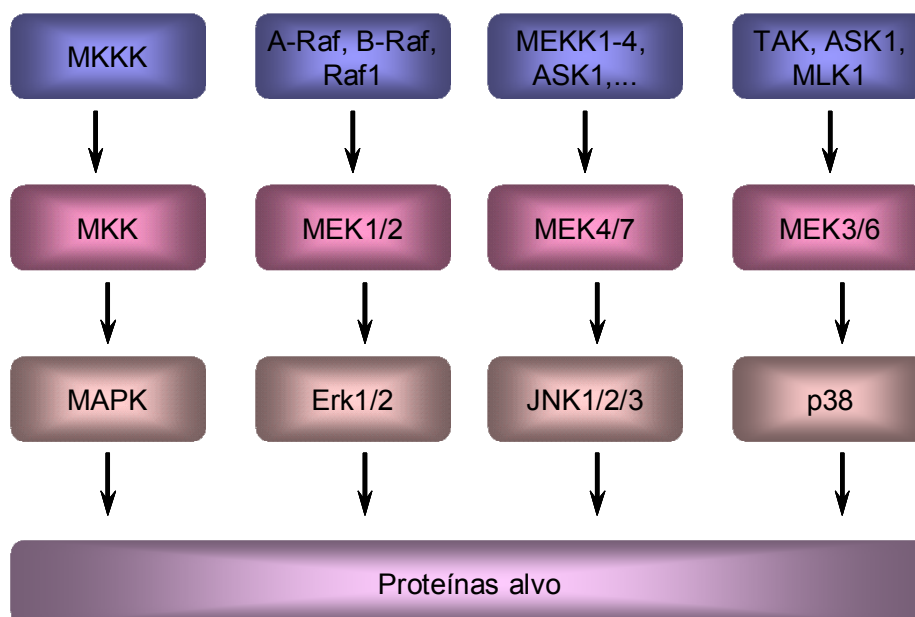
### 3 – Vias de proliferação, crescimento e sobrevivência celular

A homeostase tecidual resulta do equilíbrio delicado entre a morte e a proliferação das células, estando estes dois processos celulares intimamente ligados. De uma forma semelhante ao discutido anteriormente para a morte celular, uma desregulação dos processos envolvidos na proliferação celular, nomeadamente, uma exacerbação deste fenómeno, traduz-se em várias patologias como o cancro e a aterosclerose. A relevância, em particular, da proliferação das células do músculo liso da parede vascular na progressão das lesões ateroscleróticas e o papel das LDLox nesse processo mediado pela activação da via de sinalização de mTOR será o tema do capítulo 4. Obviamente que as vias de sinalização implicadas na proliferação, crescimento e sobrevivência celular são inúmeras e, contrariamente, ao que se pensava inicialmente, não são lineares, mas antes parecem formar uma rede complexa interligando-se entre si. No entanto, aqui serão apenas descritas as vias de sinalização abordadas neste trabalho, concretamente as conducentes à activação de ERK1/2, PI3K/Akt e mTOR.

#### 3.1 – As proteínas cinases activadas por mitogénios

As proteínas cinases activadas por mitogénios (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*) são elementos cruciais de várias vias subjacentes a processos celulares diversos, como a proliferação, a diferenciação e a migração. As vias das MAPK são activadas por diferentes estímulos como hormonas e factores de crescimento, que podem actuar através de diversas famílias de receptores, como receptores tirosina cinase, receptores de citocinas, e receptores acoplados à proteína G (Kyriakis e Avruch, 2001). Uma vez desencadeadas, estas vias são reguladas por uma cascata de sinalização que consiste na activação sucessiva de três cinases (Fig. 4). De facto, as MAPK são activadas por cinases de MAPK (MAPKK ou MEK), que por sua vez são activadas por cinases de cinases de MAPK (MAPKKK ou MEKK) (Zhang e Liu, 2002). Para serem activas as MAPK necessitam de ser fosforiladas simultaneamente num resíduo de treonina e de tirosina, sendo a sua

inactivação mediada por fosfatases capazes de remover um grupo fosfato dum resíduo de treonina ou dum resíduo de tirosina, ou de ambos, ou ainda por fosfatases específicas de MAPK (Chen et al., 2001). O controlo da actividade, pela fosforilação/desfosforilação, permite à célula ajustar-se rapidamente às suas necessidades de activação/inactivação de MAPK, de acordo com as modificações ambientais.



**Fig. 4** – A cascata das MAPK. Representação esquemática das conexões e dos múltiplos componentes das respectivas MAPK. A coluna da esquerda representa a cascata geral, enquanto que da segunda à quarta coluna são representadas as subfamílias de Erk, JNK e p38. Adaptado e modificado de Chen et al., 2001.

Até a data, as MAPK de células de mamífero foram classificadas em quatro grupos: (1) cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinase-1,-2*), também conhecida por MAPK clássicas; (2) cinases do domínio N-terminal do c-jun 1, 2 e 3 (JNK, *c-jun-N-terminal kinases*); (3) cinase p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ; (4) ERK5/BMK (Chen et al., 2001; Kondoh et al., 2005).



### 3.1.1 – ERK1/2

Dos vários grupos das MAPK, a via ERK1/2 é a mais conhecida. As ERK1/2 são proteínas de massa molecular de 42 e 44 kDa, respectivamente, fortemente activadas por factores de crescimento e soro, e numa menor extensão por ligandos de receptores heterotriméricos acoplados à proteína G, citocinas e *stress* osmótico (Chen et al., 2001). Uma vez activadas as ERK1/2 fosforilam numerosos substratos de todos os compartimentos celulares, incluindo proteínas do citoesqueleto (neurofilamentos), proteínas membranares, proteínas citoplasmáticas (cinases a jusante, proteína ribossomal S6K) e proteínas nucleares (factores de transcrição, Elk1 e c-Myc) (Roux e Blenis, 2004).

### 3.2 – A via PI3K/Akt(PKB)

Uma outra via que é fortemente activada por factores de crescimento é a via PI3K/Akt. Esta via caracteriza-se por estar envolvida, não só na proliferação, como também na sobrevivência e no crescimento celular (aumento da massa), dado o grande número de alvos em que actua a jusante.

PI3K (*phosphoinositide 3-kinases*) é um heterodímero composto por uma subunidade catalítica p110 e por uma subunidade reguladora p85, activado por uma proteína com actividade tirosina cinase, que maioritariamente é um receptor (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999). Após activação do receptor tirosina cinase, p110 é recrutada para o receptor e, conseqüentemente, para a membrana citoplasmática, através de p85. A interacção entre p85 e o receptor é mediada pela alta afinidade de interacção entre a homologia Src2 (SH2) de p85 e sequências específicas de tirosinas fosforiladas no extremo citoplasmático do receptor (Cantrell, 2001). Uma vez na membrana citoplasmática, p110 actua como uma cinase lipídica fosforilando o anel inositol na posição 3-OH dos fosfatidilinositóis e de alguns fosfoinositídeos, originando 3-fosfoinositídeos, como o 3,4-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2, *phosphatidylinositol biphosphate*) e o 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3, *phosphatidylinositol triphosphate*) (Vanhaesebroeck e Waterfield,

1999). Estes lípidos actuam como segundos mensageiros celulares, desencadeando o recrutamento, entre outros, de Akt à membrana plasmática e a sua subsequente activação. A acção da PI3K é antagonizada por fosfatases, nomeadamente, o supressor tumoral, PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*), que remove o grupo fosfato da posição 3-OH do inositol e a inositol fosfatase contendo Sh2 (SHIP, *Sh inositol phosphatase*) que remove o grupo fosfato da posição 5-OH do inositol. Esta última fosfatase constitui um mecanismo importante de regulação negativa da sinalização mediada por PI3K em linfócitos, pois contraria os efeitos de PIP3 desfosforilando-o especificamente a PIP2 (Ono et al., 1997; Stambolic et al., 1998; Helgason et al., 1998).

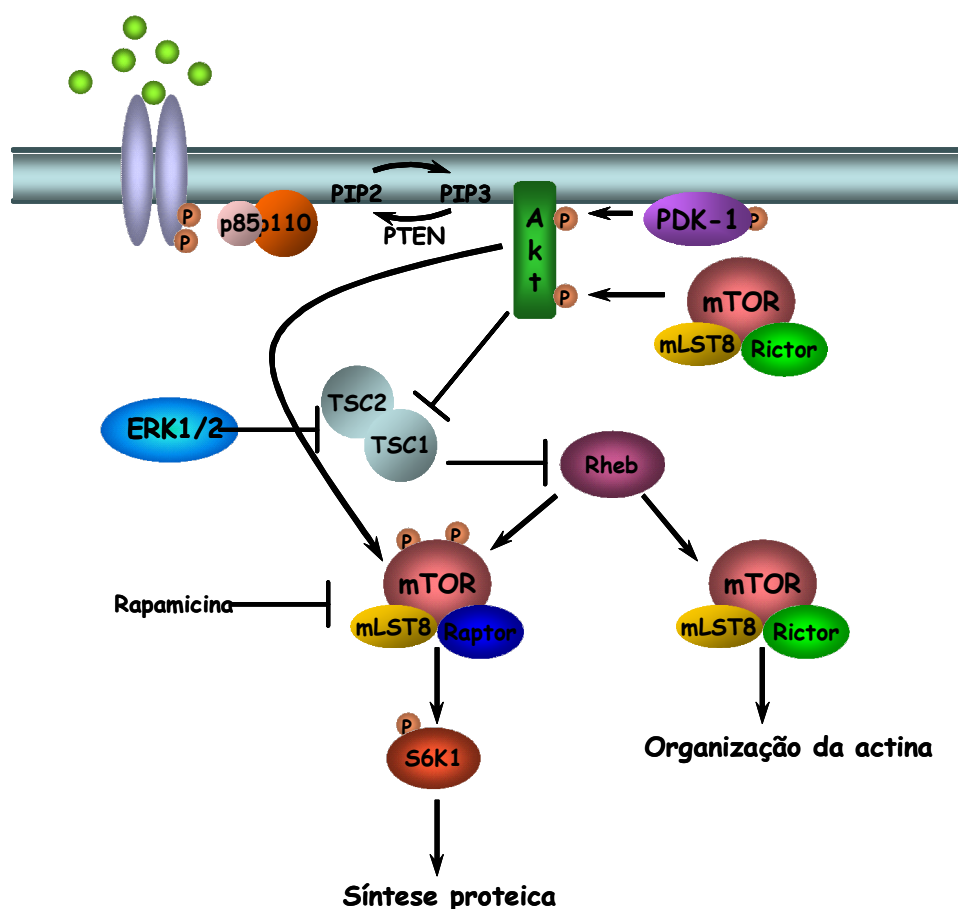
Akt, também designada de proteína cinase B (PKB, *protein kinase B*) devido à semelhança na sequência de homologias com as proteínas cinases A e C, é o homólogo do oncogene retroviral v-Akt (Coffer e Woodgett, 1991) (Jones et al., 1991; Bellacosa et al., 1991). Akt/PKB é uma proteína com actividade serina/treonina cinase de 57 kDa, constituída por um domínio N-terminal de homologia pleckstrina (PH, *pleckstrin homology*), um domínio catalítico e um domínio regulador hidrófobo C-terminal (Vanhaesebroeck e Alessi, 2000). Através do seu domínio PH, Akt/PKB interage com 3,4-bifosfato de fosfatidilinositol e 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol translocando do citosol para o folheto interno da membrana plasmática. Esta translocação coloca Akt/PKB em proximidade com as cinases reguladoras responsáveis pela sua fosforilação e activação. Após ligação com PIP<sub>3</sub>, Akt/PKB sofre alteração conformacional facilitando a fosforilação do resíduo Thr389 no domínio catalítico, fosforilação esta, catalisada por uma cinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK-1, *3'-phosphoinositide-dependent-kinase-1*) que também transloca para a membrana plasmática após activação da PI3K (Alessi et al., 1997) (Vanhaesebroeck e Alessi, 2000). Para ser totalmente activa, Akt necessita ainda de ser fosforilada no resíduo Ser473 no domínio regulador por uma cinase que foi, recentemente, identificada como sendo mTORC2 (Sarbasov et al., 2005). Akt/PKB é inactivada por PP2A, uma Ser/Thr fosfatase (Andjelkovic et al., 1996). Uma vez activada, Akt/PKB pode

fosforilar e activar várias proteínas, incluindo Bad, factores de transcrição da família FOXO, o alvo da rapamicina em células de mamíferos (mTOR, *mammalian target of rapamycin*) controlando processos como a síntese proteica, o ciclo celular e a sobrevivência celular (Cross et al., 1995; Datta et al., 1997) (Scott et al., 1998; Burgering e Medema, 2003).

### 3.3 – mTOR

O alvo da rapamicina (TOR) é uma Ser/Thr cinase que controla o crescimento da célula integrando vários sinais mitogénicos e de nutrientes. TOR é uma proteína grande com uma massa molecular de aproximadamente 280 kDa e existe nas células dos mamíferos sob a forma de dois complexos designados por complexo mTOR 1 (mTORC1, *mTOR complex 1*) e complexo mTOR 2 (mTORC2, *mTOR complex 2*). Ambos os complexos são constituídos por mTOR e mLST8, distinguindo-se um do outro por mTORC1 estar associado a raptor, enquanto que mTORC2 está associado a rictor, sendo por isso designados de mTORraptor e mTORrictor, respectivamente. Estes dois complexos não diferem apenas na sua composição, diferem também na sua sensibilidade à rapamicina e funções na célula. Assim, mTORC1 é sensível à rapamicina e controla aspectos temporais do crescimento celular por fosforilar proteínas envolvidas na síntese proteica como as proteínas cinases S6 (S6K, *S6 kinase*) e as proteínas da família 4EBP1. Pelo contrário, mTORC2 não é sensível à rapamicina e controla aspectos espaciais do crescimento da célula estando envolvido na organização da actina.

Estudos recentes indicam, que a via PI3K/Akt e a via ras/raf/MEK/ERK1/2 convergem para activar mTOR (Fig. 5). mTOR liga-se à via Akt/PKB através do complexo hamartina (TSC1)/tuberina(TSC2) (TSC, *tuberous sclerosis complex*)(Gao e Pan, 2001). TSC1 e TSC2 formam um heterodímero que regula negativamente a sinalização da mTOR. TSC2 é um substrato de Akt/PKB possuindo 7 potenciais locais de fosforilação, sendo os resíduos de Ser939 e Thr1462 os principais locais de fosforilação *in vivo* (Manning e Cantley, 2003). Uma vez fosforilada por Akt/PKB, TSC2 é funcionalmente



**Fig. 5** – Modelo da rede de sinalização de mTOR em células de mamíferos. Akt e Erk1/2 fosforilam e conseqüentemente inactivam TSC2, o regulador negativo de Rheb que activa mTOR. Adicionalmente, Akt pode activar directamente mTOR fosforilando a Ser2448 e a Thr2446. Uma vez activado, mTORC1 fosforila 4EBP1 e a cinase ribossomal S6 iniciando-se a translação de genes criticos para crescimento. mTORC2 controla a actina do citoesqueleto. As setas representam activação, enquanto que as barras representam inibição. Adaptado e modificado de Wullschleger et al., 2006.

inactivada. TSC2 possui um domínio de proteína activadora de GTPase (GAP, *GTPase-activating protein*) no seu C-terminal através do qual inibe a pequena GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) (Li et al., 2004). Portanto, de uma inactivação de TSC2 resulta a activação de Rheb. Rheb activa directamente mTOR, por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido (Li et al., 2004). Sabe-se que se liga directamente ao domínio cinase da mTOR, mas desconhece-se ainda como a ligação de GTP a Rheb activa mTOR (Long et al., 2005; Smith et al., 2005). Além deste mecanismo indirecto de

activação da mTOR por Akt/PKB foi proposto um outro modelo de activação directa, em que Akt/PKB fosforila directamente mTOR. A apoiar este modelo estão as observações de que Akt/PKB fosforila dois resíduos da mTOR, nomeadamente Thr2446 e Ser2448 (Nave et al., 1999; Sekulic et al., 2000) (Reynolds et al., 2002). No entanto, estudos recentes demonstraram que estes resíduos também poderiam ser fosforilados por S6K (Chiang e Abraham, 2005) (Holz e Blenis, 2005). Adicionalmente, o significado da fosforilação de mTOR, i.e., se é uma modificação positiva ou negativa, permanece por esclarecer parecendo depender do estímulo celular (Wullschleger et al., 2006) (Shaw e Cantley, 2006).

ERK1/2 converge para a sinalização da mTOR por fosforilar a Ser644 de TSC2 (Ballif et al., 2005; Ma et al., 2005). Esta fosforilação mediada por ERK1/2 regula negativamente TSC2 (Ma et al., 2005). Subsequentemente, e à semelhança do que foi descrito anteriormente para Akt/PKB, Rheb é activada.

Uma desregulação das vias de activação da mTOR conduz, por exemplo, a um aumento do tamanho de tumores e hipertrofia cardíaca tendo sido implicado não só no cancro como também nas doenças cardiovasculares.

#### **4 – Resveratrol – potencial papel na aterogénese**

Diversos estudos epidemiológicos apresentam correlações entre alguns componentes da dieta e o risco de doença cardiovascular. Inicialmente, estes estudos realçaram as vitaminas antioxidantes, particularmente, a vitamina E, mas também o  $\beta$ -caroteno e outros (Kaliora et al., 2006). No entanto, existe uma grande e complexa variedade de compostos veiculados na dieta com potencial antioxidante, tendo ganho nos últimos anos especial destaque, os compostos fenólicos. De facto, os compostos fenólicos existentes no vinho tinto explicariam em parte a aparente compatibilidade entre uma dieta rica em gordura e uma baixa incidência de doenças cardiovasculares observada no sul de França, mas não em outros países desenvolvidos com o mesmo tipo de

dieta (Renaud e de Lorgeril, 1992; Goldberg et al., 1995). Este fenómeno é correntemente designado de paradoxo francês.

Dos compostos fenólicos que constituem o vinho, o resveratrol (3,4',5 - trihidroxi-estilbeno) tem tido especial relevo desde que a sua presença foi detectada no vinho por Siemann e Creasy e que estes autores sugeriram que ele seria o composto biologicamente activo do vinho (Siemann e Creasy, 1992).

#### 4.1 – Fontes de resveratrol

O resveratrol (Fig. 6) é um composto fenólico, que quimicamente pertence ao grupo dos estilbenos que possuem um esqueleto característico C6-C2-C6. Encontra-se em vários frutos, como uvas, amendoins, e frutos do bosque e noutras partes das plantas como por exemplo raízes, como é o caso da sua presença no *Polygonum cuspidatum*. Este último é a fonte mais rica em resveratrol e é muito utilizado na medicina oriental para tratar, entre outras, doenças hiperlipidémicas, cardiovasculares e hepáticas e inflamação da pele. Nas plantas, o resveratrol é uma fitoalexina sendo sintetizado em resposta a um stress ambiental, nomeadamente infecções microbianas, radiações UV, variações de temperatura e exposição ao ozono (Wu et al., 2001).

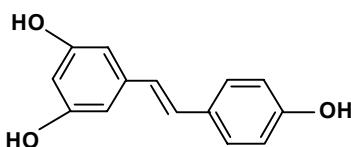


Fig. 6 – Estrutura química do *trans*-resveratrol

Por existir na casca da uva, o resveratrol é extraído para o vinho durante a maceração necessária à sua produção. Assim sendo, ele tem sido detectado em diversos tipos de vinhos, oriundos de várias regiões do globo, inclusive nos vinhos portugueses (Ribeiro de Lima et al., 1999). A concentração nos vinhos varia consideravelmente (1,5 – 14 mg/L, valores obtidos no laboratório) e depende da espécie da uva, do local geográfico, do tipo de vinho, do grau

de infecção pelo fungo *Botrytis cinerea*, das práticas enológicas e das condições climáticas (Bavaresco, 2003).

#### **4.2 – Biodisponibilidade do resveratrol**

Nos últimos 10 anos têm sido realizados vários estudos *in vitro* e *in vivo* (roedores e humanos) e *ex vivo*, que nos esclarecem acerca da absorção, do metabolismo e consequente biodisponibilidade do resveratrol. Em todos os modelos testados, o resveratrol demonstrou ser rapidamente absorvido após administração oral, e esta absorção não é favorecida por conteúdos alcoólicos semelhantes aos observados no vinho tinto (Bertelli et al., 1996; Andlauer et al., 2000; Kuhnle et al., 2000; Soleas et al., 2001; Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004; Meng et al., 2004). O resveratrol atinge concentrações plasmáticas máximas aos 15 min em ratinhos e entre 30 a 60 min em humanos (Soleas et al., 2001; Yu et al., 2002; Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004). Uma vez absorvido, o resveratrol é metabolizado, quer nas células intestinais, quer no fígado, por enzimas de fase 2 sendo o resveratrol-3-glucuronido e o resveratrol-3-sulfato, os principais metabolitos identificados até à data (de Santi et al., 2000a; de Santi et al., 2000c; Yu et al., 2002; Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004; Meng et al., 2004). Estes constituem as principais formas de resveratrol circulante no plasma. De salientar, que a metabolização hepática do resveratrol foi inibida *in vitro* por concentrações picomolares dum flavonóide, a quercetina (de Santi et al., 2000b). Em nenhum dos modelos foram identificados diglucuronidos ou metabolitos formados por reacções de fase 1, como oxidações e reduções. Em humanos, tem sido sugerido uma recirculação entérica dos metabolitos conjugados após hidrólise intestinal (Walle et al., 2004). Esta hipótese é apoiada pelos estudos em ratinhos em que se observou que a recirculação entero-hepática é responsável pela exposição sistémica global do resveratrol e dos seus glucuronidos (Marier et al., 2002; Walle et al., 2004). O resveratrol e os seus metabolitos distribuem-se por vários órgãos, nomeadamente o fígado, o coração e os rins (Bertelli et al., 1998), sendo os

rins a principal via de excreção (Soleas et al., 2001; Yu et al., 2002; Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004).

Todos os estudos em humanos foram realizados com um baixo número de indivíduos, o que poderá constituir um problema dada a variabilidade inter-individual na metabolização de xenobióticos. No entanto, a ausência de diferenças significativas nos resultados obtidos entre espécies diferentes, parece reduzir o significado dos resultados obtidos em humanos. Acresce ainda, que *in vivo* a influência de flavonoides, que *in vitro* inibem a metabolização do resveratrol e que já demonstraram ser potentes inibidores de sulfotransferases hepáticas humanas, não foi avaliada (Pacifi, 2004). Assim, o impacto de componentes da dieta na biodisponibilidade do resveratrol permanece por esclarecer.

### **4.3 – Efeitos biológicos do resveratrol consonantes com um papel na cardioprotecção**

#### **4.3.1 – Modulação do metabolismo lipídico e de lipoproteínas**

Estudos realizados em animais, há aproximadamente 25 anos, demonstraram que o resveratrol afectava o metabolismo lipídico (Arichi et al., 1982). Mais recentemente, estudos realizados *in vitro* com uma linha de hepatocarcinoma humano – HepG2, que retém a maioria das funções das células do parênquima hepático normal, em particular, as que se relacionam com a síntese e secreção de lipoproteínas, indicaram que o resveratrol diminui a concentração intracelular e a capacidade de secreção da apoB e de ésteres de colesterol, assim como a capacidade de secreção de triacilgliceróis, apesar dos seus níveis intracelulares se manterem inalterados (Goldberg et al., 1995; Pal et al., 2003). O resveratrol teria então capacidade de diminuir a produção de VLDL e conseqüentemente LDL.

No entanto, os resultados obtidos em modelos animais são contraditórios. O resveratrol não reduziu o colesterol plasmático em coelhos com dietas enriquecidas em colesterol, assim como não alterou a proporção de colesterol



associado à concentração de HDL, IDL ou LDL em ratos fêmeas (Wilson et al., 1996; Turrens et al., 1997). Pelo contrário, Miura e colaboradores observaram que o resveratrol diminui os níveis séricos de triacilgliceróis e colesterol associado às VLDL e LDL (Miura et al., 2003).

#### **4.3.2 – Actividade antioxidante**

Frankel e colaboradores foram os primeiros a estudar a capacidade antioxidante do resveratrol, tendo verificado que o resveratrol protege as LDL humanas da oxidação catalisada pelo cobre (Frankel et al., 1993). Desde então, vários estudos demonstraram, que a actividade antioxidante directa do resveratrol se deve essencialmente à sua capacidade em quelatar o cobre e à actividade captadora de radicais livres (Belguendouz et al., 1997; Fauconneau et al., 1997; Fremont et al., 1999; Zou et al., 1999b). Adicionalmente, o resveratrol também diminui de uma forma eficiente a peroxidação lipídica das LDL induzida pela ferrilmioglobina, reduzindo o complexo oxoferrilo a metamioglobina, assim como as modificações oxidativas proteicas das LDL induzidas pelo peroxinitrito (Brito et al., 2002). No que respeita à relação estrutura - actividade, os estudos apontam para a importância do hidroxilo em posição *para* na actividade captadora de radicais livres na prevenção de peroxidações lipídicas catalisadas por metais (Fauconneau et al., 1997; Stojanovic et al., 2001). De salientar, que a capacidade do resveratrol se ligar às lipoproteínas devido ao seu carácter lipofílico e a proteínas poderá contribuir para a sua actividade antioxidante (Blache et al., 1997; Belguendouz et al., 1998; Jannin et al., 2004).

Além da actividade antioxidante directa, o resveratrol caracteriza-se por uma acção antioxidante indirecta devido aos seus efeitos em diferentes sistemas enzimáticos e antioxidantes celulares que no seu conjunto melhoram o estado redox da célula. Por um lado, o resveratrol diminui a actividade de várias enzimas envolvidas na produção de espécies reactivas, nomeadamente a NAD(P)H oxidase, a xantina ou hipoxantina oxidase, a mieloperoxidase e as lipoxigenases (Pinto et al., 1999; MacCarrone et al., 1999; Orallo et al., 2002;

Cavallaro et al., 2003; Cao e Li, 2004). Por outro lado, o resveratrol induz vários antioxidantes celulares como o GSH e enzimas implicadas na desintoxicação de espécies reactivas, nomeadamente, a SOD, a catalase, a glutatião peroxidase e a glutatião-S-transferase (Yen et al., 2003; Cao e Li, 2004; Brito et al., 2006).

#### **4.3.3 – Actividade anti-inflamatória**

Os diversos estudos que se encontram publicados na literatura, relativos às propriedades anti-inflamatórias do resveratrol, indicam que ele poderá melhorar a inflamação subjacente à aterosclerose por, em parte, reduzir a produção de moléculas de adesão e citocinas. A expressão proteica e de mRNA de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, produzidos por células endoteliais estimuladas com LDLox, TNF- $\alpha$ , LPS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é inibida pelo resveratrol, assim como a adesão dos monócitos às células endoteliais (Ferrero et al., 1998; Bertelli et al., 2001; Pendurthi e Rao, 2002; Carluccio et al., 2003; Csiszar et al., 2006). O resveratrol suprime ainda, de uma forma dependente da concentração, a expressão do factor tecidual em células endoteliais estimuladas com IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e lipopolissacarídeos (LPS) (Pendurthi et al., 1999). A indução do mRNA do TNF- $\alpha$  por LPS nas células endoteliais, a síntese dos mRNA do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  nos monócitos, e a libertação de IL-8 em macrófagos peritoneais de ratos, foram todas substancialmente reduzidas pelo resveratrol (Pendurthi et al., 1999; Zhong et al., 1999). Além do mais, o resveratrol inibe a transcrição do gene de IL-8 assim como a produção da proteína em monócitos tratados com ésteres de forbol (Shen et al., 2003). A inibição da produção de várias citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, nomeadamente IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-12, também foi descrita (Gao et al., 2001; Gao et al., 2003; Boscolo et al., 2003). Adicionalmente, o resveratrol bloqueia a síntese e secreção de MCP-1 (Holmes-McNary e Baldwin, Jr., 2000; Cullen et al., 2007). Muitos destes efeitos podem ser explicados em virtude do resveratrol interferir com a via de sinalização do NF- $\kappa$ B, um factor de transcrição que regula os genes da grande maioria destas moléculas (Collins e Cybulsky, 2001). Assim, tem sido descrito, que o resveratrol inibe a

translocação, fosforilação e transactivação da subunidade p65, a fosforilação e degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , e a activação de IKK $\alpha$  (Holmes-McNary e Baldwin, Jr., 2000; Manna et al., 2000; Pendurthi e Rao, 2002; Adhami et al., 2003).

Adicionalmente, as propriedades anti-inflamatórias do resveratrol são, também, sustentadas pela sua capacidade em alterar a síntese de eicosanóides. Assim, o resveratrol inibe de uma forma selectiva e directa a cicloxigenase-1 e a cicloxigenase-2, suprimindo ainda a activação da expressão do gene desta última, via transdução directa do sinal da proteína cinase C (Jang et al., 1997; Subbaramaiah et al., 1998; MacCarrone et al., 1999; Takada et al., 2004). O resveratrol inibe, igualmente, a actividade do leucotrieno B4 e dos seus isómeros, produto da via da 5-lipoxigenase, com diversas funções fisiológicas, como o aumento da aderência dos leucócitos polimorfonucleares ao endotélio e amplificação da resposta inflamatória de agregação (Rotondo et al., 1998; MacCarrone et al., 1999).

Finalmente, a inibição da síntese de \*NO, e a diminuição da expressão de mRNA da iNOS e da proteína pelo resveratrol poderão igualmente contribuir para a sua actividade anti-inflamatória (Tsai et al., 1999).

#### **4.3.4 – Inibição da proliferação de células musculares lisas**

O resveratrol inibe a proliferação de células musculares lisas tratadas por diferentes estímulos, como o soro, PDGF, EGF, angiotensina II, TNF- $\alpha$ . Os efeitos antiproliferativos do resveratrol não estão associados à indução da apoptose, mas antes a uma paragem do ciclo celular na fase G1 (Zou et al., 1999a; Araim et al., 2002). Porém, o mecanismo molecular subjacente a esta paragem permanece controverso. Haider e colaboradores observaram que a paragem do ciclo celular era acompanhada por uma acumulação de proteína do retinoblastoma hiperfosforilada, diminuição dos inibidores de cinases dependentes de ciclinas, p21/Cip e p27/Kip, e aumento da fosforilação de p53 (Haider et al., 2003). No entanto, outros estudos demonstraram que o resveratrol aumenta a expressão de p21 e de p53, assim como de ciclinas e de cinases dependentes de ciclinas (Mnjoyan e Fujise, 2003; Lee e Moon,

2005). Adicionalmente, o resveratrol também inibe a proliferação celular por interferir com vias de sinalização mitogénicas e de sobrevivência, nomeadamente a via ERK1/2 e a via PI3K/Akt/p70. De facto, o resveratrol inibe a fosforilação de ERK1/2, de Akt e de p70 induzida pela angiotensina e o EGF (Haider et al., 2002; Haider et al., 2005).

#### **4.3.5 – Modulação da agregação plaquetar e da trombose**

Nas plaquetas humanas existem duas vias principais para a síntese de eicosanóides a partir do ácido araquidónico. A via da cicloxigenase, a partir da qual é formado o tromboxano A<sub>2</sub>, que tem um papel importante na propagação da agregação plaquetar e a via que envolve o sistema enzimático da 12-lipoxigenase, que sintetiza uma família de eicosanóides designados de hepoxilinas, que são mediadores da mobilização de cálcio, permeabilidade vascular e activação de neutrófilos. Vários estudos realizados *in vitro* sugerem que o resveratrol inibe ambas as vias. O resveratrol inibe a agregação plaquetar, assim como a síntese de 12-hidroxiheptadecatrienoato, 5-hidroxiieicosatetraenoato, 12-hidroxiieicosatetraenoato e tromboxano B<sub>2</sub> induzidas por ácido araquidónico, colagénio, trombina e ADP (Kimura et al., 1985; Pace-Asciak et al., 1995; Bertelli et al., 1995; Olas et al., 2002). Alguns destes estudos sugeriram a inibição da 12-lipoxigenase. A actividade anti-plaquetar do resveratrol também foi observada *in vivo* (Wang et al., 2002). Recentemente, Dobrydneva e colaboradores concluíram que a acção bloqueadora do resveratrol no influxo de cálcio é responsável pela inibição da agregação plaquetar induzida pela trombina em plasma rico em plaquetas (Dobrydneva et al., 1999; Dobrydneva et al., 2003). Adicionalmente, o resveratrol inibe a adesão de plaquetas, activadas por trombina e ADP, ao fibrinogénio (Zbikowska e Olas, 2000; Olas et al., 2002).

#### **4.3.6 – Modulação do relaxamento vascular**

O relaxamento vascular, deficiente na aterosclerose, é modulado por dois reguladores cruciais: o vasoconstritor endotelina-1 e o vasodilatador \*NO. O

resveratrol tem demonstrado ser capaz de melhorar a função vasomotora por modular ambas as entidades. O resveratrol inibe a endotelina-1 ao nível da sua secreção, do seu mRNA e da sua actividade promotora por atenuar a actividade de ligação de AP-1 e interferir com ERK1/2 (Ruef et al., 2001; Liu et al., 2003; Chao et al., 2005). O papel do  $^*NO$  no relaxamento vascular foi sugerido, após ter sido demonstrado que o resveratrol relaxa anéis de aortas pré-contraídas com endotélio intacto, sem afectar aortas cujo endotélio foi removido (Fitzpatrick et al., 1993; Li et al., 2006; Rush et al., 2007). Adicionalmente, observou-se que o resveratrol aumenta o cGMP em artérias coronárias, principalmente por activação de pGC, indicando que os efeitos vasodilatadores do resveratrol são mediados através da via  $^*NO$ -cGMP (Fitzpatrick et al., 1993; El Mowafy, 2002). Vários estudos demonstraram que o resveratrol modula os níveis de  $^*NO$  pelos seus diversos efeitos na eNOS. Assim, o resveratrol aumenta a expressão da eNOS, por estabilizar o seu mRNA, a proteína e a sua actividade (Wallerath et al., 2002).

O resveratrol pode, ainda, exercer os seus efeitos vasodilatadores numa forma independente do endotélio e conseqüentemente do  $^*NO$  por estimular directamente canais de  $K^+/Ca^{2+}$  (Chen e Pace-Asciak, 1996; Li et al., 2000; Novakovic et al., 2006).

Como referido atrás, o resveratrol tem sido o foco de múltiplos estudos, em particular desde que a sua presença foi detectada no vinho e que ele foi apontado como um composto biologicamente activo. O resveratrol é uma molécula genuinamente promissora em termos de benefício para a saúde e apesar das muitas evidências acumuladas, ao longo desta última década, acerca dos mecanismos de protecção muito está ainda por esclarecer.

## **5 – Objectivos gerais do trabalho**

A prevenção da formação e progressão das lesões ateroscleróticas é fundamental no tratamento de doenças cardiovasculares. Neste contexto, compostos existentes no vinho tinto, e em particular o resveratrol, têm tido especial destaque desde que os efeitos cardioprotectores do vinho tinto foram demonstrados por estudos epidemiológicos. Neste trabalho pretendeu-se contribuir para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais o resveratrol pode ser um cardioprotector, investigando os seus efeitos em processos que se crêem precoces na formação das lesões. Assim, os principais objectivos deste trabalho foram:

(1) Investigar a capacidade do resveratrol em prevenir a citotoxicidade mediada pelo peroxinitrito em células endoteliais da aorta bovina, assim como mecanismos bioquímicos e moleculares subjacentes a essa citoprotecção. Assim, numa primeira fase observámos que o resveratrol protege as células endoteliais da morte celular despoletada pelo peroxinitrito e que este efeito protector se relaciona com a capacidade do resveratrol aumentar os níveis intracelulares de GSH (capítulo 2). Numa fase posterior investigaram-se vias bioquímicas responsáveis pela apoptose induzida pelo peroxinitrito e exploraram-se mecanismos citoprotectores adicionais do resveratrol, particularmente os efeitos do resveratrol na modulação das proteínas da família Bcl-2 (capítulo 3);

(2) Estudar vias de sinalização em células musculares lisas potencialmente envolvidas nos efeitos mitogénicos das LDLox. Considerando que a via EGFR/PI3K/Akt foi recentemente identificada como uma via pela qual as LDLox estimulam a proliferação de SMC, investigaram-se alvos a jusante desta via, e em particular mTOR. Paralelamente foi nosso objectivo investigar os putativos efeitos anti-proliferativos do resveratrol em células musculares lisas estimuladas pelas LDLox e explorar os respectivos mecanismos moleculares (capítulo 4).

## Bibliografia

- Acehan D., Jiang X., Morgan D. G., Heuser J. E., Wang X. e Akey C. W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol.Cell.* **9**, 423-432.
- Acton S. L., Scherer P. E., Lodish H. F. e Krieger M. (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* **19;269**, 21003-21009.
- Adhami V. M., Afaq F. e Ahmad N. (2003) Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia.* **5**, 74-82.
- Alderton W. K., Cooper C. E. e Knowles R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.* **357**, 593-615.
- Alessi D. R., James S. R., Downes C. P., Holmes A. B., Gaffney P. R., Reese C. B. e Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr.Biol.* **7**, 261-269.
- Andjelkovic M., Jakubowicz T., Cron P., Ming X. F., Han J. W. e Hemmings B. A. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 5699-5704.
- Andlauer W., Kolb J., Siebert K. e Furst P. (2000) Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Exp.Clin.Res.* **26**, 47-55.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J. J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R. e Martinou J. C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* **277**, 370-372.
- Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B. e Martinou J. C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* **276**, 11615-11623.
- Araim O., Ballantyne J., Waterhouse A. L. e Sumpio B. E. (2002) Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. *J Vasc Surg.* **35**, 1226-1232.
- Arichi H., Kimura Y., Okuda H., Baba K., Kozawa M. e Arichi S. (1982) Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo).* **30**, 1766-1770.
- Ashkenazi A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat.Rev.Cancer.* **2**, 420-430.
- Azumi H., Inoue N., Ohashi Y., Terashima M., Mori T., Fujita H., Awano K., Kobayashi K., Maeda K., Hata K., Shinke T., Kobayashi S., Hirata K., Kawashima S., Itabe H., Hayashi Y., Imajoh-Ohmi S., Itoh H. e Yokoyama M. (2002) Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**, 1838-1844.

- Ballif B. A., Roux P. P., Gerber S. A., MacKeigan J. P., Blenis J. e Gygi S. P. (2005) Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**, 667-672.
- Ballinger S. W., Patterson C., Knight-Lozano C. A., Burow D. L., Conklin C. A., Hu Z., Reuf J., Horaist C., Lebovitz R., Hunter G. C., McIntyre K. e Runge M. S. (2002) Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation.* **106**, 544-549.
- Barry-Lane P. A., Patterson C., van der M. M., Hu Z., Holland S. M., Yeh E. T. e Runge M. S. (2001) p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin.Invest.* **108**, 1513-1522.
- Bavaresco L. (2003) Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Exp.Clin.Res.* **29**, 181-187.
- Beckman J. S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem.Res Toxicol.* **9**, 836-844.
- 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**, 1620-1624.
- Beckmann J. S., Ye Y. Z., Anderson P. G., Chen J., Accavitti M. A., Tarpey M. M. e White C. R. (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem.Hoppe Seyler.* **375**, 81-88.
- Belguendouz L., Fremont L. e Gozzelino M. T. (1998) Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem.Pharmacol.* **55**, 811-816.
- Belguendouz L., Fremont L. e Linard A. (1997) Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem.Pharmacol.* **53**, 1347-1355.
- Bellacosa A., Testa J. R., Staal S. P. e Tsichlis P. N. (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science.* **254**, 274-277.
- Berliner J. A. e Heinecke J. W. (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic.Biol Med.* **20**, 707-727.
- Bertelli A. A., Baccalini R., Battaglia E., Falchi M. e Ferrero M. E. (2001) Resveratrol inhibits TNF alpha-induced endothelial cell activation. *Therapie.* **56**, 613-616.
- Bertelli A. A., Giovannini L., Giannessi D., Migliori M., Bernini W., Fregoni M. e Bertelli A. (1995) Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int.J Tissue React.* **17**, 1-3.
- Bertelli A. A., Giovannini L., Stradi R., Urien S., Tillement J. P. e Bertelli A. (1996) Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. *Int.J Clin.Pharmacol.Res.* **16**, 77-81.
- Bertelli A. A., Giovannini L., Stradi R., Urien S., Tillement J. P. e Bertelli A. (1998) Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp.Clin.Res.* **24**, 51-55.
- Bielski, B. H. J. Reevaluation of the spectral and kinetics properties of HO<sub>2</sub>. and O<sub>2</sub>-free radicals. *Photochem.Photobiol* **28**, 645-649. 1-1-1978.
- Ref Type: Generic



- Bjornstedt M., Hamberg M., Kumar S., Xue J. e Holmgren A. (1995) Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem.* **19;270**, 11761-11764.
- Bjornstedt M., Xue J., Huang W., Akesson B. e Holmgren A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* **269**, 29382-29384.
- Blache D., Rustan I., Durand P., Lesgards G. e Loreau N. (1997) Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. *J Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **702**, 103-110.
- Boatright K. M., Renatus M., Scott F. L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I. M., Ricci J. E., Edris W. A., Sutherlin D. P., Green D. R. e Salvesen G. S. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol.Cell.* **11**, 529-541.
- Boatright K. M. e Salvesen G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr.Opin.Cell Biol.* **15**, 725-731.
- Boring L., Gosling J., Cleary M. e Charo I. F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* **394**, 894-897.
- Borner C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol.Immunol.* **39**, 615-647.
- Borutaite V., Hope H. e Brown G. C. (2006) Arachidonate and NADPH oxidase synergise with iNOS to induce death in macrophages: mechanisms of inflammatory degeneration. *Pharmacol.Rep.* **58 Suppl:96-102.**, 96-102.
- Boscolo P., del Signore A., Sabbioni E., Di Gioacchino M., Di Giampaolo L., Reale M., Conti P., Paganelli R. e Giaccio M. (2003) Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release. *Ann.Clin.Lab Sci.* **33**, 226-231.
- Boyle J. J., Weissberg P. L. e Bennett M. R. (2002) Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**, 1624-1630.
- Brito P., Almeida L. M. e Dinis T. C. (2002) The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic.Res.* **36**, 621-631.
- 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**, 157-166.
- Brown M. S. e Goldstein J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* **232**, 34-47.
- Brustovetsky N. e Klingenberg M. (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry.* **35**, 8483-8488.
- Burgering B. M. e Medema R. H. (2003) Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc.Biol.* **73**, 689-701.
- Burney S., Niles J. C., Dedon P. C. e Tannenbaum S. R. (1999) DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. *Chem.Res Toxicol.* **12**, 513-520.

- Buttery L. D., Springall D. R., Chester A. H., Evans T. J., Standfield E. N., Parums D. V., Yacoub M. H. e Polak J. M. (1996) Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* **75**, 77-85.
- cadenas Enrique. Mechanisms of antioxidant action. Free Radicals, Oxidative stress and antioxidant. Pathological and Physiological Significance , 237-252. 1-1-1998.
- Ref Type: Generic
- Cai H. e Harrison D. G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* **87**, 840-844.
- Cande C., Vahsen N., Garrido C. e Kroemer G. (2004) Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death.Differ.* **11**, 591-595.
- Cantrell D. A. (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci.* **114**, 1439-1445.
- Cao Z. e Li Y. (2004) Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur.J Pharmacol.* **489**, 39-48.
- Cardillo C., Kilcoyne C. M., Cannon R. O., III, Quyyumi A. A. e Panza J. A. (1997) Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension.* **30**, 57-63.
- Carluccio M. A., Siculella L., Ancora M. A., Massaro M., Scoditti E., Storelli C., Visioli F., Distante A. e De Caterina R. (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**, 622-629.
- Cassina A. e Radi R. (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch.Biochem.Biophys.* **328**, 309-316.
- Cavallaro A., Ainis T., Bottari C. e Fimiani V. (2003) Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiol Res.* **52**, 555-562.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**, 527-605. 1979.
- Ref Type: Generic
- Chao H. H., Juan S. H., Liu J. C., Yang H. Y., Yang E., Cheng T. H. e Shyu K. G. (2005) Resveratrol inhibits angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression and subsequent proliferation in rat aortic smooth muscle cells. *Eur.J Pharmacol.* **515**, 1-9.
- Chen C. K. e Pace-Asciak C. R. (1996) Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen.Pharmacol.* **27**, 363-366.
- Chen Z., Gibson T. B., Robinson F., Silvestro L., Pearson G., Xu B., Wright A., Vanderbilt C. e Cobb M. H. (2001) MAP kinases. *Chem.Rev.* **101**, 2449-2476.
- Chiang G. G. e Abraham R. T. (2005) Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem.* **280**, 25485-25490.

- Choy J. C., Granville D. J., Hunt D. W. e McManus B. M. (2001) Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol.Cell Cardiol.* **33**, 1673-1690.
- Chu F. F., Doroshow J. H. e Esworthy R. S. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem.* **268**, 2571-2576.
- Coffer P. J. e Woodgett J. R. (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur.J Biochem.* **201**, 475-481.
- Collins R. G., Velji R., Guevara N. V., Hicks M. J., Chan L. e Beaudet A. L. (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp.Med.* **191**, 189-194.
- Collins T. e Cybulsky M. I. (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin.Invest.* **107**, 255-264.
- Cooke J. P. (2003) Flow, NO, and atherogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 768-770.
- Crompton M., Virji S. e Ward J. M. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur.J Biochem.* **258**, 729-735.
- Cross D. A., Alessi D. R., Cohen P., Andjelkovich M. e Hemmings B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* **378**, 785-789.
- Csiszar A., Smith K., Labinskyy N., Orosz Z., Rivera A. e Ungvari Z. (2006) Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **291**, H1694-H1699.
- Cullen J. P., Morrow D., Jin Y., Curley B., Robinson A., Sitzmann J. V., Cahill P. A. e Redmond E. M. (2007) Resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen, inhibits endothelial monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion. *J Vasc Res.* **44**, 75-84.
- Cyrus T., Witztum J. L., Rader D. J., Tangirala R., Fazio S., Linton M. F. e Funk C. D. (1999) Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin.Invest.* **103**, 1597-1604.
- 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**, 9-20.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. e Greenberg M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* **91**, 231-241.
- Daugherty A., Dunn J. L., Rateri D. L. e Heinecke J. W. (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin.Invest.* **94**, 437-444.
- Davies P. F. (1986) Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* **55**, 5-24.

- De Keulenaer G. W., Chappell D. C., Ishizaka N., Nerem R. M., Alexander R. W. e Griendling K. K. (1998) Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res.* **82**, 1094-1101.
- de Santi C., Pietrabissa A., Mosca F. e Pacifici G. M. (2000a) Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica.* **30**, 1047-1054.
- de Santi C., Pietrabissa A., Spisni R., Mosca F. e Pacifici G. M. (2000b) Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica.* **30**, 857-866.
- de Santi C., Pietrabissa A., Spisni R., Mosca F. e Pacifici G. M. (2000c) Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. *Xenobiotica.* **30**, 609-617.
- 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.* **19;277**, 14127-14134.
- Detmers P. A., Hernandez M., Mudgett J., Hassing H., Burton C., Mundt S., Chun S., Fletcher D., Card D. J., Lisnock J., Weikel R., Bergstrom J. D., Shevell D. E., Hermanowski-Vosatka A., Sparrow C. P., Chao Y. S., Rader D. J., Wright S. D. e Pure E. (2000) Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol.* **165**, 3430-3435.
- Dickhout J. G., Hossain G. S., Pozza L. M., Zhou J., Lhotak S. e Austin R. C. (2005) Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**, 2623-2629.
- Dobrydyneva Y., Williams R. L. e Blackmore P. F. (1999) trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br.J Pharmacol.* **128**, 149-157.
- Dobrydyneva Y., Williams R. L., Katzenellenbogen J. A., Ratz P. H. e Blackmore P. F. (2003) Diethylstilbestrol and tetrahydrochrysenes are calcium channel blockers in human platelets: relationship to the stilbene pharmacophore. *Thromb Res.* **110**, 23-31.
- Dong Z. M., Chapman S. M., Brown A. A., Frenette P. S., Hynes R. O. e Wagner D. D. (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin. Invest.* **102**, 145-152.
- 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**, 33-42.
- El Mowafy A. M. (2002) Resveratrol activates membrane-bound guanylyl cyclase in coronary arterial smooth muscle: a novel signaling mechanism in support of coronary protection. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **291**, 1218-1224.
- Esaki T., Hayashi T., Muto E., Kano H., Kumar T. N., Asai Y., Sumi D. e Iguchi A. (2000) Expression of inducible nitric oxide synthase and Fas/Fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atheromatous plaques of human coronary arteries. *Nitric.Oxide.* **4**, 561-571.
- Eskes R., Antonsson B., Osen-Sand A., Montessuit S., Richter C., Sadoul R., Mazzei G., Nichols A. e Martinou J. C. (1998) Bax-induced cytochrome C release from

- mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol.* **143**, 217-224.
- 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**, 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**, 341-390.
- Fauconneau B., Waffo-Teguo P., Hugué F., Barrier L., Decendit A. e Merillon J. M. (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* **61**, 2103-2110.
- Febbraio M., Podrez E. A., Smith J. D., Hajjar D. P., Hazen S. L., Hoff H. F., Sharma K. e Silverstein R. L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin. Invest.* **105**, 1049-1056.
- Fennell J. P., Brosnan M. J., Frater A. J., Hamilton C. A., Alexander M. Y., Nicklin S. A., Heistad D. D., Baker A. H. e Dominiczak A. F. (2002) Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene Ther.* **9**, 110-117.
- Ferrero M. E., Bertelli A. E., Fulgenzi A., Pellegatta F., Corsi M. M., Bonfrate M., Ferrara F., De Caterina R., Giovannini L. e Bertelli A. (1998) Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin. Nutr.* **68**, 1208-1214.
- 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**, H774-H778.
- Frankel E. N., Waterhouse A. L. e Kinsella J. E. (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* **341**, 1103-1104.
- Freedman J. E., Loscalzo J., Benoit S. E., Valeri C. R., Barnard M. R. e Michelson A. D. (1996) Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin. Invest.* **97**, 979-987.
- Fremont L., Belguendouz L. e Delpal S. (1999) Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* **64**, 2511-2521.
- Galis Z. S., Sukhova G. K., Lark M. W. e Libby P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin. Invest.* **94**, 2493-2503.
- Gao X., Deeb D., Media J., Divine G., Jiang H., Chapman R. A. e Gautam S. C. (2003) Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant in vitro and in vivo immunological effects. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 2427-2435.
- Gao X. e Pan D. (2001) TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev.* **15**, 1383-1392.
- Gao X., Xu Y. X., Janakiraman N., Chapman R. A. e Gautam S. C. (2001) Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1299-1308.

- Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P. E., Didelot C. e Kroemer G. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death.Differ.* **13**, 1423-1433.
- Gimbrone M. A., Jr. (1999) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* **82**, 722-726.
- Glagov S., Zarins C., Giddens D. P. e Ku D. N. (1988) Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch.Pathol.Lab Med.* **112**, 1018-1031.
- Glass C. K. e Witztum J. L. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* **104**, 503-516.
- Goldberg D. M., Hahn S. E. e Parkes J. G. (1995) Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin.Chim.Acta.* **237**, 155-187.
- Goldberg D. M., Yan J. e Soleas G. J. (2003) Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin.Biochem.* **36**, 79-87.
- Griendling K. K., Sorescu D. e Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* **86**, 494-501.
- Griffiths G. J., Dubrez L., Morgan C. P., Jones N. A., Whitehouse J., Corfe B. M., Dive C. e Hickman J. A. (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol.* **144**, 903-914.
- Haider U. G., Roos T. U., Kontaridis M. I., Neel B. G., Sorescu D., Griendling K. K., Vollmar A. M. e Dirsch V. M. (2005) Resveratrol inhibits angiotensin II- and epidermal growth factor-mediated Akt activation: role of Gab1 and Shp2. *Mol.Pharmacol.* **68**, 41-48.
- Haider U. G., Sorescu D., Griendling K. K., Vollmar A. M. e Dirsch V. M. (2002) Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.* **62**, 772-777.
- Haider U. G., Sorescu D., Griendling K. K., Vollmar A. M. e Dirsch V. M. (2003) Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.* **63**, 925-932.
- Harats D., Shaish A., George J., Mulkins M., Kurihara H., Levkovitz H. e Sigal E. (2000) Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**, 2100-2105.
- Hazell L. J. e Stocker R. (1993) Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem.J.* **290**, 165-172.
- Heinecke J. W., Li W., Daehnke H. L., III e Goldstein J. A. (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J Biol Chem.* **268**, 4069-4077.
- Helgason C. D., Damen J. E., Rosten P., Grewal R., Sorensen P., Chappel S. M., Borowski A., Jirik F., Krystal G. e Humphries R. K. (1998) Targeted disruption of

- SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev.* **12**, 1610-1620.
- Hengartner M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407**, 770-776.
- Hodis H. N., Krams D. M., Avogaro P., Bittolo-Bon G., Cazzolato G., Hwang J., Peterson H. e Sevanian A. (1994) Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J Lipid Res.* **35**, 669-677.
- Hogg N., Joseph J. e Kalyanaraman B. (1994) The oxidation of alpha-tocopherol and trolox by peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* **314**, 153-158.
- Holmes-McNary M. e Baldwin A. S., Jr. (2000) Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res.* **60**, 3477-3483.
- Holmgren A. (2000) Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biofactors.* **11**, 63-64.
- Holz M. K. e Blenis J. (2005) Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem.* **280**, 26089-26093.
- Horkko S., Binder C. J., Shaw P. X., Chang M. K., Silverman G., Palinski W. e Witztum J. L. (2000) Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic.Biol Med.* **28**, 1771-1779.
- Hsu Y. T., Wolter K. G. e Youle R. J. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 3668-3672.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C. e Pezzuto J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* **275**, 218-220.
- Jannin B., Menzel M., Berlot J. P., Delmas D., Lancon A. e Latruffe N. (2004) Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem.Pharmacol.* **68**, 1113-1118.
- 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**, 67-82.
- Jones P. F., Jakubowicz T. e Hemmings B. A. (1991) Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul.* **2**, 1001-1009.
- Jones S. A., O'Donnell V. B., Wood J. D., Broughton J. P., Hughes E. J. e Jones O. T. (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol.* **271**, H1626-H1634.
- Kaliora A. C., Dedoussis G. V. e Schmidt H. (2006) Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* **187**, 1-17.
- Karbowski M., Arnoult D., Chen H., Chan D. C., Smith C. L. e Youle R. J. (2004) Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol.* **164**, 493-499.
- Kenet G., Freedman J., Shenkman B., Regina E., Brok-Simoni F., Holzman F., Vavva F., Brand N., Michelson A., Trolliet M., Loscalzo J. e Inbal A. (1999) Plasma glutathione peroxidase deficiency and platelet insensitivity to nitric oxide in children with familial stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**, 2017-2023.

- 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**, 239-257.
- Kerr S., Brosnan M. J., McIntyre M., Reid J. L., Dominiczak A. F. e Hamilton C. A. (1999) Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension*. **33**, 1353-1358.
- Kimura Y., Okuda H. e Arichi S. (1985) Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim.Biophys.Acta*. **834**, 275-278.
- Kleinveld H. A., Naber A. H., Stalenhoef A. F. e Demacker P. N. (1993) Oxidation resistance, oxidation rate, and extent of oxidation of human low-density lipoprotein depend on the ratio of oleic acid content to linoleic acid content: studies in vitamin E deficient subjects. *Free Radic.Biol Med*. **15**, 273-280.
- Klotz L. O., Schieke S. M., Sies H. e Holbrook N. J. (2000) Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem.J*. **352**, 219-225.
- Klotz L. O. e Sies H. (2003) Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol.Lett*. **140-141**, 125-132.
- Kondoh K., Torii S. e Nishida E. (2005) Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma*. **114**, 86-91.
- Kroemer G. e Reed J. C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat.Med*. **6**, 513-519.
- Kuhlencordt P. J., Chen J., Han F., Astern J. e Huang P. L. (2001) Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. **103**, 3099-3104.
- Kuhnle G., Spencer J. P., Chowrimootoo G., Schroeter H., Debnam E. S., Srai S. K., Rice-Evans C. e Hahn U. (2000) Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem.Biophys.Res Commun*. **272**, 212-217.
- Kyriakis J. M. e Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. **81**, 807-869.
- Laursen J. B., Somers M., Kurz S., McCann L., Warnholtz A., Freeman B. A., Tarpey M., Fukai T. e Harrison D. G. (2001) Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. **103**, 1282-1288.
- Lee B. e Moon S. K. (2005) Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. *J Nutr*. **135**, 2767-2773.
- Leeuwenburgh C., Hardy M. M., Hazen S. L., Wagner P., Oh-ishi S., Steinbrecher U. P. e Heinecke J. W. (1997) Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem*. **272**, 1433-1436.
- Leist M. e Jaattela M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*. **2**, 589-598.
- Levrard S., Pesse B., Feihl F., Waeber B., Pacher P., Rolli J., Schaller M. D. e Liaudet L. (2005) Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B activation triggered by



- inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines. *J Biol Chem.* **280**, 34878-34887.
- Li H., Cybulsky M. I., Gimbrone M. A., Jr. e Libby P. (1993) An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb.* **13**, 197-204.
- Li H., Zhu H., Xu C. J. e Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* **94**, 491-501.
- Li H. F., Chen S. A. e Wu S. N. (2000) Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* **45**, 1035-1045.
- Li H. F., Tian Z. F., Qiu X. Q., Wu J. X., Zhang P. e Jia Z. J. (2006) A study of mechanisms involved in vasodilatation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery. *Physiol Res.* **55**, 365-372.
- Li L. Y., Luo X. e Wang X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* **412**, 95-99.
- Li Y., Inoki K. e Guan K. L. (2004) Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity. *Mol.Cell Biol.* **24**, 7965-7975.
- Liu J. C., Chen J. J., Chan P., Cheng C. F. e Cheng T. H. (2003) Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension.* **42**, 1198-1205.
- Long X., Lin Y., Ortiz-Vega S., Yonezawa K. e Avruch J. (2005) Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr.Biol.* **15**, 702-713.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. e Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* **94**, 481-490.
- Lusis A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature.* **407**, 233-241.
- Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P. e Pandolfi P. P. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* **121**, 179-193.
- Ma X. L., Lopez B. L., Liu G. L., Christopher T. A., Gao F., Guo Y., Feuerstein G. Z., Ruffolo R. R., Jr., Barone F. C. e Yue T. L. (1997) Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury. *Circ Res.* **80**, 894-901.
- MacCarrone M., Lorenzon T., Guerrieri P. e Agro A. F. (1999) Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur.J Biochem.* **265**, 27-34.
- Mach F., Schonbeck U., Bonnefoy J. Y., Pober J. S. e Libby P. (1997) Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation.* **96**, 396-399.
- MacMillan-Crow L. A., Crow J. P. e Thompson J. A. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry.* **37**, 1613-1622.
- Maddipati K. R. e Marnett L. J. (1987) Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* **262**, 17398-17403.

- Maiorino M., Thomas J. P., Girotti A. W. e Ursini F. (1991) Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Radic.Res Commun.* **12-13**, 131-135.
- Manna S. K., Mukhopadhyay A. e Aggarwal B. B. (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* **164**, 6509-6519.
- Manning B. D. e Cantley L. C. (2003) Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem.Sci.* **28**, 573-576.
- Marchetti P., Castedo M., Susin S. A., Zamzami N., Hirsch T., Macho A., Haeffner A., Hirsch F., Geuskens M. e Kroemer G. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp.Med.* **184**, 1155-1160.
- Marier J. F., Vachon P., Gritsas A., Zhang J., Moreau J. P. e Ducharme M. P. (2002) Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **302**, 369-373.
- 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**, 2330-2335.
- Meier B., Cross A. R., Hancock J. T., Kaup F. J. e Jones O. T. (1991) Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem.J.* **275**, 241-245.
- Meng X., Maliakal P., Lu H., Lee M. J. e Yang C. S. (2004) Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric.Food Chem.* **52**, 935-942.
- Milstien S. e Katusic Z. (1999) Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **263**, 681-684.
- Miramar M. D., Costantini P., Ravagnan L., Saraiva L. M., Haouzi D., Brothers G., Penninger J. M., Peleato M. L., Kroemer G. e Susin S. A. (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem.* **276**, 16391-16398.
- Miura D., Miura Y. e Yagasaki K. (2003) Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci.* **73**, 1393-1400.
- Mnjoyan Z. H. e Fujise K. (2003) Profound negative regulatory effects by resveratrol on vascular smooth muscle cells: a role of p53-p21(WAF1/CIP1) pathway. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **311**, 546-552.
- Nave B. T., Ouwens M., Withers D. J., Alessi D. R. e Shepherd P. R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem.J.* **344**, 427-431.
- Novakovic A., Gojkovic-Bukarica L., Peric M., Nezic D., Djukanovic B., Markovic-Lipkovski J. e Heinle H. (2006) The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery. *J Pharmacol.Sci.* **101**, 85-90.

- Nur-E-Kamal, Gross S. R., Pan Z., Balklava Z., Ma J. e Liu L. F. (2004) Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis. *J Biol Chem.* **279**, 24911-24914.
- Ohara Y., Peterson T. E. e Harrison D. G. (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin. Invest.* **91**, 2546-2551.
- Okamoto T., Akaike T., Sawa T., Miyamoto Y., Van d., V e Maeda H. (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem.* **276**, 29596-29602.
- Olas B., Wachowicz B., Saluk-Juszczak J. e Zielinski T. (2002) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. *Thromb Res.* **107**, 141-145.
- Ono M., Okada H., Bolland S., Yanagi S., Kurosaki T. e Ravetch J. V. (1997) Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell.* **90**, 293-301.
- Orallo F., Alvarez E., Camina M., Leiro J. M., Gomez E. e Fernandez P. (2002) The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* **61**, 294-302.
- Ozaki M., Kawashima S., Yamashita T., Hirase T., Namiki M., Inoue N., Hirata K., Yasui H., Sakurai H., Yoshida Y., Masada M. e Yokoyama M. (2002) Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin. Invest.* **110**, 331-340.
- Pace-Asciak C. R., Hahn S., Diamandis E. P., Soleas G. e Goldberg D. M. (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta.* **235**, 207-219.
- Pacifici G. M. (2004) Inhibition of human liver and duodenum sulfotransferases by drugs and dietary chemicals: a review of the literature. *Int. J Clin. Pharmacol. Ther.* **42**, 488-495.
- Pagano P. J., Clark J. K., Cifuentes-Pagano M. E., Clark S. M., Callis G. M. e Quinn M. T. (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14483-14488.
- Pal S., Ho N., Santos C., Dubois P., Mamo J., Croft K. e Allister E. (2003) Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J Nutr.* **133**, 700-706.
- Pastore A., Federici G., Bertini E. e Piemonte F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* **333**, 19-39.
- Patterson C., Ruef J., Madamanchi N. R., Barry-Lane P., Hu Z., Horaist C., Ballinger C. A., Brasier A. R., Bode C. e Runge M. S. (1999) Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **274**, 19814-19822.
- Pendurthi U. R. e Rao L. V. (2002) Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb Res.* **106**, 243-248.
- Pendurthi U. R., Williams J. T. e Rao L. V. (1999) Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**, 419-426.

- Perfettini J. L., Roumier T. e Kroemer G. (2005) Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **15**, 179-183.
- Petit P. X., Gubern M., Diolez P., Susin S. A., Zamzami N. e Kroemer G. (1998) Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* **426**, 111-116.
- Pinto M. C., Garcia-Barrado J. A. e Macias P. (1999) Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *J Agric.Food Chem.* **47**, 4842-4846.
- Quijano C., Alvarez B., Gatti R. M., Augusto O. e Radi R. (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem.J.* **322**, 167-173.
- Radi R., Beckman J. S., Bush K. M. e Freeman B. A. (1991a) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch.Biochem.Biophys.* **288**, 481-487.
- Radi R., Beckman J. S., Bush K. M. e Freeman B. A. (1991b) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch.Biochem.Biophys.* **288**, 481-487.
- Radi R., Peluffo G., Alvarez M. N., Naviliat M. e Cayota A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic.Biol Med.* **30**, 463-488.
- Rajavashisth T. B., Andalibi A., Territo M. C., Berliner J. A., Navab M., Fogelman A. M. e Lusis A. J. (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature.* **344**, 254-257.
- Ramprasad M. P., Fischer W., Witztum J. L., Sambrano G. R., Quehenberger O. e Steinberg D. (1995) The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 9580-9584.
- Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S. A., Maise C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J. M., Garrido C. e Kroemer G. (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat.Cell Biol.* **3**, 839-843.
- Reddy M. A., Thimmalapura P. R., Lanting L., Nadler J. L., Fatima S. e Natarajan R. (2002) The oxidized lipid and lipoxygenase product 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces hypertrophy and fibronectin transcription in vascular smooth muscle cells via p38 MAPK and cAMP response element-binding protein activation. Mediation of angiotensin II effects. *J Biol Chem.* **277**, 9920-9928.
- Renaud S. e de Lorgeril M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* **20;339**, 1523-1526.
- Reynolds T. H., Bodine S. C. e Lawrence J. C., Jr. (2002) Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem.* **277**, 17657-17662.
- Ribeiro de Lima M. T., Waffo-Teguo P., Teissedre P. L., Pujolas A., Vercauteren J., Cabanis J. C. e Merillon J. M. (1999) Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *J Agric.Food Chem.* **47**, 2666-2670.
- Riedl S. J. e Salvesen G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**, 405-413.

- Riedl S. J. e Shi Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 897-907.
- Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* **362**, 801-809.
- Ross R. (1999) Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126.
- Rotondo S., Rajtar G., Manarini S., Celardo A., Rotillo D., de Gaetano G., Evangelista V. e Cerletti C. (1998) Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br.J Pharmacol.* **123**, 1691-1699.
- Roux P. P. e Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol.Mol.Biol Rev.* **68**, 320-344.
- Ruef J., Moser M., Kubler W. e Bode C. (2001) Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc.Pathol.* **10**, 311-315.
- Rush J. W., Quadriatero J., Levy A. S. e Ford R. J. (2007) Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Exp.Biol Med (Maywood.)*. **232**, 814-822.
- Salgo M. G., Stone K., Squadrito G. L., Battista J. R. e Pryor W. A. (1995) Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **210**, 1025-1030.
- Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M. e Sabatini D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* **307**, 1098-1101.
- Sattler W., Maiorino M. e Stocker R. (1994) Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch.Biochem.Biophys.* **309**, 214-221.
- Savvides S. N., Scheiwein M., Bohme C. C., Arteel G. E., Karplus P. A., Becker K. e Schirmer R. H. (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem.* **277**, 2779-2784.
- Sawamura T., Kume N., Aoyama T., Moriwaki H., Hoshikawa H., Aiba Y., Tanaka T., Miwa S., Katsura Y., Kita T. e Masaki T. (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* **386**, 73-77.
- Schonbeck U., Mach F., Sukhova G. K., Herman M., Graber P., Kehry M. R. e Libby P. (2000) CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* **156**, 7-14.
- Scott P. H., Brunn G. J., Kohn A. D., Roth R. A. e Lawrence J. C., Jr. (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 7772-7777.
- Sekulic A., Hudson C. C., Homme J. L., Yin P., Otterness D. M., Karnitz L. M. e Abraham R. T. (2000) A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* **60**, 3504-3513.

- Sharpe J. C., Arnoult D. e Youle R. J. (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim.Biophys.Acta.* **1644**, 107-113.
- Shaw R. J. e Cantley L. C. (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* **441**, 424-430.
- Shen F., Chen S. J., Dong X. J., Zhong H., Li Y. T. e Cheng G. F. (2003) Suppression of IL-8 gene transcription by resveratrol in phorbol ester treated human monocytic cells. *J Asian Nat.Prod.Res.* **5**, 151-157.
- Shi Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol.Cell.* **9**, 459-470.
- Shiozaki E. N. e Shi Y. (2004) Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem.Sci.* **29**, 486-494.
- Siemann E. H. e Creasy L. L. (1992) Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *Am.J.Enol.Vitic.* **43**, 49-52.
- Sies H. Oxidative Stress:Oxidants and Antioxidants. London Academic . 1991.
- Ref Type: Generic
- Smith E. M., Finn S. G., Tee A. R., Browne G. J. e Proud C. G. (2005) The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J Biol Chem.* **280**, 18717-18727.
- Smith J. D., Trogan E., Ginsberg M., Grigaux C., Tian J. e Miyata M. (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 8264-8268.
- Soleas G. J., Angelini M., Grass L., Diamandis E. P. e Goldberg D. M. (2001) Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol.* **335**, 145-154.
- Spiekermann S., Landmesser U., Dikalov S., Brecht M., Gamez G., Tatge H., Reepschlager N., Hornig B., Drexler H. e Harrison D. G. (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation.* **107**, 1383-1389.
- Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa J. L., Brothers G. M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J. M., Siderovski D. P. e Mak T. W. (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* **95**, 29-39.
- 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**, 915-924.
- Steinbrecher U. P., Zhang H. F. e Loughheed M. (1990) Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic.Biol Med.* **9**, 155-168.
- Stocker R. e Keaney J. F., Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* **84**, 1381-1478.
- Stojanovic S., Sprinz H. e Brede O. (2001) Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch.Biochem.Biophys.* **391**, 79-89.
- Stralin P., Jacobsson H. e Marklund S. L. (2003) Oxidative stress, NO\* and smooth muscle cell extracellular superoxide dismutase expression. *Biochim.Biophys.Acta.* **1619**, 1-8.

- Stralin P., Karlsson K., Johansson B. O. e Marklund S. L. (1995) The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **15**, 2032-2036.
- Stralin P. e Marklund S. L. (2000) Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* **151**, 433-441.
- Subbaramaiah K., Chung W. J., Michaluart P., Telang N., Tanabe T., Inoue H., Jang M., Pezzuto J. M. e Dannenberg A. J. (1998) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* **273**, 21875-21882.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. e Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* **397**, 441-446.
- Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., Kamada N., Kataoka M., Jishage K., Ueda O., Sakaguchi H., Higashi T., Suzuki T., Takashima Y., Kawabe Y., Cynshi O., Wada Y., Honda M., Kurihara H., Aburatani H., Doi T., Matsumoto A., Azuma S., Noda T., Toyoda Y., Itakura H., Yazaki Y., Kodama T. e . (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* **20;386**, 292-296.
- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K. e Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell.* **8**, 613-621.
- Szabo C., Ischiropoulos H. e Radi R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat.Rev.Drug Discov.* **6**, 662-680.
- Szabo C., Zingarelli B., O'Connor M. e Salzman A. L. (1996) DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 1753-1758.
- Takada Y., Bhardwaj A., Potdar P. e Aggarwal B. B. (2004) Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene.* **23**, 9247-9258.
- Takahashi K., Avissar N., Whitin J. e Cohen H. (1987) Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch.Biochem.Biophys.* **256**, 677-686.
- Tricot O., Mallat Z., Heymes C., Belmin J., Leseche G. e Tedgui A. (2000) Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* **101**, 2450-2453.
- Tsai S. H., Lin-Shiau S. Y. e Lin J. K. (1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br.J Pharmacol.* **126**, 673-680.
- Turrens J. F., Lariccia J. e Nair M. G. (1997) Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats. *Free Radic.Res.* **27**, 557-562.

- Ushio-Fukai M., Tang Y., Fukai T., Dikalov S. I., Ma Y., Fujimoto M., Quinn M. T., Pagano P. J., Johnson C. e Alexander R. W. (2002) Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res.* **91**, 1160-1167.
- Vadseth C., Souza J. M., Thomson L., Seagraves A., Nagaswami C., Scheiner T., Torbet J., Vilaire G., Bennett J. S., Murciano J. C., Muzykantov V., Penn M. S., Hazen S. L., Weisel J. W. e Ischiropoulos H. (2004) Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* **279**, 8820-8826.
- van Loo G., Schotte P., van Gorp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodriguez I., Ruiz-Carrillo A., Vandekerckhove J., Declercq W., Beyaert R. e Vandenamee P. (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death.Differ.* **8**, 1136-1142.
- Van d., V, Smith D., O'Neill C. A., Kaur H., Darley-Usmar V., Cross C. E. e Halliwell B. (1994) Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem.J.* **303**, 295-301.
- Vanhaesebroeck B. e Alessi D. R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem.J.* **346**, 561-576.
- Vanhaesebroeck B. e Waterfield M. D. (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp.Cell Res.* **253**, 239-254.
- Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Masters B. S., Karoui H., Tordo P. e Pritchard K. A., Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 9220-9225.
- Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J. e Vaux D. L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* **102**, 43-53.
- Verhagen A. M., Silke J., Ekert P. G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L. M., Day C. L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R. L., Simpson R. J. e Vaux D. L. (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem.* **277**, 445-454.
- Vieira H. L., Belzacq A. S., Haouzi D., Bernassola F., Cohen I., Jacotot E., Ferri K. F., El Hamel C., Bartle L. M., Melino G., Brenner C., Goldmacher V. e Kroemer G. (2001) The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene.* **20**, 4305-4316.
- Walle T., Hsieh F., DeLegge M. H., Oatis J. E., Jr. e Walle U. K. (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* **32**, 1377-1382.
- Wallerath T., Deckert G., Ternes T., Anderson H., Li H., Witte K. e Forstermann U. (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* **106**, 1652-1658.
- Wang Z., Zou J., Huang Y., Cao K., Xu Y. e Wu J. M. (2002) Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Chin Med J (Engl).* **115**, 378-380.



- Wells W. W., Xu D. P., Yang Y. F. e Rocque P. A. (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem.* **265**, 15361-15364.
- Wendel A. e Cikryt P. (1980) The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS Lett.* **120**, 209-211.
- Wilson T., Knight T. J., Beitz D. C., Lewis D. S. e Engen R. L. (1996) Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci.* **59**, L15-L21.
- Witztum J. L. e Steinberg D. (2001) The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc.Med.* **11**, 93-102.
- Wolf B. B. e Green D. R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.* **274**, 20049-20052.
- Wu J. M., Wang Z. R., Hsieh T. C., Bruder J. L., Zou J. G. e Huang Y. Z. (2001) Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int.J.Mol.Med.* **8**, 3-17.
- Wullschleger S., Loewith R. e Hall M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* **124**, 471-484.
- Yamada Y., Doi T., Hamakubo T. e Kodama T. (1998) Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol.Life Sci.* **54**, 628-640.
- Yamamoto S. (1992) Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim.Biophys.Acta.* **1128**, 117-131.
- Yang Y., Cheng J. Z., Singhal S. S., Saini M., Pandya U., Awasthi S. e Awasthi Y. C. (2001) Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J Biol Chem.* **276**, 19220-19230.
- Yen G. C., Duh P. D. e Lin C. W. (2003) Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic.Res.* **37**, 509-514.
- Yla-Herttuala S. (1998) Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr.Opin.Lipidol.* **9**, 337-344.
- Yla-Herttuala S., Lipton B. A., Rosenfeld M. E., Sarkioja T., Yoshimura T., Leonard E. J., Witztum J. L. e Steinberg D. (1991) Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 5252-5256.
- Yla-Herttuala S., Palinski W., Rosenfeld M. E., Parthasarathy S., Carew T. E., Butler S., Witztum J. L. e Steinberg D. (1989) Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin.Invest.* **84**, 1086-1095.
- Yla-Herttuala S., Rosenfeld M. E., Parthasarathy S., Glass C. K., Sigal E., Witztum J. L. e Steinberg D. (1990) Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 6959-6963.
- Yu C., Shin Y. G., Chow A., Li Y., Kosmeder J. W., Lee Y. S., Hirschelman W. H., Pezzuto J. M., Mehta R. G. e van Breemen R. B. (2002) Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm.Res.* **19**, 1907-1914.

- Yu H., Venkatarangan L., Wishnok J. S. e Tannenbaum S. R. (2005) Quantitation of four guanine oxidation products from reaction of DNA with varying doses of peroxynitrite. *Chem.Res Toxicol.* **18**, 1849-1857.
- Zbikowska H. M. e Olas B. (2000) Antioxidants with carcinostatic activity (resveratrol, vitamin E and selenium) in modulation of blood platelet adhesion. *J Physiol Pharmacol.* **51**, 513-520.
- Zhang W. e Liu H. T. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9-18.
- Zhong M., Cheng G. F., Wang W. J., Guo Y., Zhu X. Y. e Zhang J. T. (1999) Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine.* **6**, 79-84.
- Zingarelli B., Salzman A. L. e Szabo C. (1998) Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* **83**, 85-94.
- Zou J., Huang Y., Chen Q., Wang N., Cao K., Hsieh T. C. e Wu J. M. (1999a) Suppression of mitogenesis and regulation of cell cycle traverse by resveratrol in cultured smooth muscle cells. *Int.J Oncol.* **15**, 647-651.
- Zou J. G., Huang Y. Z., Chen Q., Wei E. H., Hsieh T. C. e Wu J. M. (1999b) Resveratrol inhibits copper ion-induced and azo compound-initiated oxidative modification of human low density lipoprotein. *Biochem.Mol.Biol Int.* **47**, 1089-1096.
- Zouki C., Jozsef L., Ouellet S., Paquette Y. e Filep J. G. (2001a) Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. *J Leukoc.Biol.* **69**, 815-824.
- Zouki C., Zhang S. L., Chan J. S. e Filep J. G. (2001b) Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J.* **15**, 25-27.

## **Capítulo 2**

### **O resveratrol protege as células endoteliais da morte celular induzida pelo peroxinitrito: um papel para o GSH intracelular**

Paula M. Brito, Anabela Mariano, Leonor M. Almeida e Teresa C.P. Dinis

Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra e  
Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Universidade de  
Coimbra, 3000-295 Coimbra-Portugal



## **Resumo**

A aterosclerose, principal causa de doenças cardiovasculares, é uma doença inflamatória crónica associada a uma produção exacerbada de espécies oxidantes, nomeadamente o peroxinitrito, um poderoso oxidante que reage directamente com todas as biomoléculas. O glutatião é um captador eficiente de peroxinitrito, podendo a modulação da sua síntese constituir uma estratégia para proteger selectivamente as células deste oxidante. Neste trabalho, investigou-se a capacidade do resveratrol prevenir a toxicidade mediada pelo peroxinitrito em células endoteliais, assim como eventuais mecanismos moleculares subjacentes. Para isso, culturas primárias de células endoteliais da aorta bovina foram tratadas com peroxinitrito autêntico tendo a viabilidade celular e o conteúdo intracelular de glutatião sido analisados. Estes resultados demonstram que uma pré-incubação longa (14 h) das células endoteliais com resveratrol (1-50  $\mu\text{M}$ ) previne o dano despoletado pelo peroxinitrito por um mecanismo que envolve o aumento do conteúdo intracelular do glutatião, para a concentração mais elevada de resveratrol testada. Tendo em conta a importância da regulação da concentração intracelular do glutatião na vida da célula, esta capacidade do resveratrol fornece um dado novo para os seus efeitos cardioprotectores e pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## 1 – Introdução

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica caracterizada pela acumulação de lípidos, pela proliferação de células musculares lisas e pela migração de monócitos para o endotélio. Estes eventos são consequência dum disfunção endotelial associada a um *stress* oxidativo (Lusis, 2000). Este *stress* é o resultado dum aumento de espécies reactivas que são capazes de oxidar LDL e mediar vários efeitos celulares deletérios que podem culminar em morte celular. Virtualmente, todas as células vasculares produzem espécies reactivas, via enzimas celulares específicas, tais como NAD(P)H e xantina oxidases, as principais fontes de produção do anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), e NO sintases que produzem óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) (Cai e Harrison, 2000). Apesar do  $^{\bullet}NO$  ser uma molécula anti-aterogénica devido aos seus efeitos benéficos na parede vascular, ele pode reagir rapidamente com o  $O_2^{\bullet-}$ , numa reacção com constante de velocidade limitada pela difusão dos reagentes, formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), uma espécie oxidante potente e nitrante (Koppenol, 1998). O peroxinitrito pode oxidar e modificar covalentemente uma grande variedade de biomoléculas como o DNA, as proteínas e os lípidos, assim como várias biomoléculas de baixa massa molecular (Salgo et al., 1995; Ischiropoulos e al-Medhi, 1995; Radi et al., 1991). Estas modificações podem afectar importantes funções celulares de tal modo que a homeostase celular pode estar comprometida podendo, subsequentemente, ocorrer apoptose ou necrose. O envolvimento do peroxinitrito na aterosclerose tem sido sugerido quer pela sua capacidade de oxidar LDL, quer pela observação de nitração de resíduos da tirosina em lesões ateroscleróticas humanas (Darley –Usmar et al., 1992; Beckman et al., 1994; Leeuwenburgh et al., 1997; Rubbo e O’Donnell, 2005). É, então, importante contrariar os efeitos do peroxinitrito sendo a sua captação uma das possíveis estratégias.

O glutatião (GSH) é o principal tiol não proteico envolvido nas defesas antioxidantes e é o principal contribuinte para o estado redox das células (Pastore et al., 2003). O GSH encontra-se em todos os tipos celulares em

concentrações milimolares, distribuindo-se pelo núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrios. Apesar da constante de velocidade de reacção do GSH com o peroxinitrito não ser muito alta, a elevada concentração intracelular do GSH torna-o na mais provável e importante molécula de baixa massa molecular capaz de captar o peroxinitrito (Klotz e Sies, 2003). Adicionalmente, o GSH está implicado na desintoxicação do peroxinitrito através do sistema enzimático, glutatião peroxidase, capaz de catalisar a redução do peroxinitrito a nitrito consumindo glutatião. De facto, Ma e colaboradores demonstraram que a depleção do GSH em coelhos hipercolesterolémicos exacerba os efeitos lesivos do peroxinitrito nas funções vasculares, reforçando o papel crucial do GSH na neutralização e eventual desintoxicação do peroxinitrito (Ma et al., 1997).

Por outro lado, tem sido sugerido que o resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno), uma fitoalexina natural encontrada no vinho, principalmente no vinho tinto, é um dos ingredientes activos responsáveis pelos efeitos cardiovasculares benéficos do consumo moderado de vinho tinto, devido às suas numerosas actividades biológicas, tais como a inibição (1) da oxidação das LDL, (2) da proliferação de células musculares lisas e (3) da agregação plaquetar (Frankel et al., 1993; Pace-Asciak et al., 1995; Brito et al., 2002; Liu e Liu, 2004). No entanto, os mecanismos subjacentes responsáveis pelos seus efeitos cardioprotectores são ainda largamente desconhecidos. Recentemente, o grupo de Cao e Li demonstrou que o resveratrol induz um aumento do conteúdo intracelular de GSH em cardiomiócitos e células musculares lisas (Cao e Li, 2004; Li et al., 2006).

Assim, na continuação da nossa linha de investigação, e na sequência de um trabalho anterior que demonstra o papel protector do resveratrol contra a oxidação das LDL mediada pelo peroxinitrito (Brito et al., 2002); e tendo em conta que o resveratrol aumenta o teor de GSH e que esta molécula é relevante para a desintoxicação do peroxinitrito, colocámos a hipótese do resveratrol proteger a morte celular induzida pelo peroxinitrito por aumentar os níveis de glutatião intracelulares. Este estudo foi realizado em culturas

primárias de células endoteliais da aorta bovina (BAEC, *bovine aortic endothelial cell*) como modelo e começámos por observar se o resveratrol tinha potencial para proteger as células da morte celular induzida pelo peroxinitrito e em que concentrações e posteriormente, se nessa gama de concentrações tinha capacidade para induzir o aumento do GSH intracelular.

Os dados aqui apresentados indicam que o resveratrol é capaz de diminuir a morte celular programada em BAEC estimuladas por uma adição única de peroxinitrito autêntico, não por uma reacção directa com este oxidante mas antes por aumentar o conteúdo intracelular do glutationa.

## **2 – Materiais e Métodos**

### **2.1 – Materiais**

Os reagentes gerais do laboratório e alguns mais específicos, nomeadamente, a colagenase, a gelatina, a estreptomicina/penicilina, MTT, BSO, Hoescht 3328, *orto*-ftaldeído e GSH foram adquiridos à Sigma Chemicals (St Louis, MO). Para a cultura celular, *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM), tripsina 0,25%, fungizona, soro fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) e tampão fosfato (PBS) pH 7,4 foram comprados à Gibco-Invitrogen. O resveratrol foi adquirido à extrasynthèse (Genay, France). Todos os reagentes usados possuíam pureza adequada para os estudos a realizar.

### **2.2 – Cultura primária de células endoteliais da aorta bovina**

As células endoteliais da aorta bovina foram isoladas a partir duma aorta torácica bovina por digestão com colagenase (2 mg/mL). Brevemente, secções de aorta foram cortadas e seladas com pinças tesouras. O interior da aorta foi, então, lavado com *Dulbecco's* PBS (DPBS) e tratado com a solução de colagenase com a ajuda de uma seringa. As secções de aorta foram colocadas a 37 °C por um período de tempo variável de 5 a 10 min. Findo esse tempo, as células foram recuperadas para um tubo com meio de cultura, centrifugadas a 200xg durante 5 min e semeadas em caixas de 6 poços



previamente revestidas com gelatina. As células foram cultivadas em frascos de cultura T-75 revestidos com gelatina em DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL fungizona, a 37 °C numa incubadora com atmosfera humidificada e com 5 % de CO<sub>2</sub>. As células endoteliais foram identificadas pela morfologia arredonda (*cobblestone*) e distribuição espacial. As células foram sub-cultivadas à confluência e utilizadas entre a 4ª e a 7ª passagem. Para os ensaios usaram-se as células a uma confluência de 80 % e foram sempre privadas de soro 24 horas antes dos ensaios.

### 2.3 – Síntese do peroxinitrito

O peroxinitrito foi sintetizado num reactor *quenched flow* como previamente descrito (Dinis et al., 2002). Em resumo, uma solução aquosa de NaNO<sub>2</sub> 0,6 M foi rapidamente misturada com igual volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,7 M em HCl 0,6 M e imediatamente *quenched* com igual volume de NaOH 1,5 M. A solução obtida foi então congelada a -20 °C por aproximadamente 24 horas. A essa temperatura, o peroxinitrito, devido a um processo de congelamento fraccionado da solução, concentra-se numa camada superior de cor amarela mais intensa. Essa camada foi cuidadosamente removida e passada através duma pequena coluna de MnO<sub>2</sub> para remover o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual de acordo com Uppu e colaboradores (1996). O peroxinitrito foi então armazenado em alíquotas a -80 °C sob atmosfera de azoto. Antes de cada utilização, o peroxinitrito foi sempre quantificado por espectrofotometria e após diluição em NaOH 1 M com base no valor da absorptividade molar a 302 nm ( $\epsilon_{302}=1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.4 – Stress oxidativo induzido pelo peroxinitrito

Nas experiências com o peroxinitrito, as células foram previamente lavadas e equilibradas com PBS (tampão fosfato com Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) pH 7,4 durante 5 minutos. Subsequentemente, o peroxinitrito diluído em NaOH 10 mM à concentração necessária foi adicionado de uma só vez, nas concentrações

respectivas, contra um dos lados do poço seguido de uma rápida homogeneização de forma a assegurar uma exposição máxima e óptima das células ao peroxinitrito antes da sua decomposição. As células foram expostas ao peroxinitrito durante 10 minutos, tempo após o qual elas foram lavadas e recolocadas em meio de cultura durante 6 horas. Não foi observada qualquer alteração de pH durante o tratamento com o peroxinitrito. Para o tratamento das células com o peroxinitrito utilizou-se preferencialmente o PBS e não o DMEM de modo a evitar reacções secundárias do peroxinitrito com os constituintes do meio. Volumes iguais de NaOH 10 mM (controlo do solvente) ou de peroxinitrito decomposto (o peroxinitrito foi decomposto em PBS ou NaOH 10 mM durante a noite) foram utilizados como controlos. Quando necessário, as células foram pré-incubadas com resveratrol, butionina sulfoximina (BSO) ou ambos, durante 14 horas. Ao fim deste tempo, o meio de incubação foi removido e as células incubadas com peroxinitrito como previamente descrito. Nestas condições, o resveratrol ou a BSO não estavam presentes ao longo da experiência com o peroxinitrito.

### **2.5 – Ensaio de viabilidade celular**

As células ( $0,5 \times 10^6$  células / poço) semeadas em caixas de 6 poços foram incubadas com várias concentrações de BSO durante 14 horas. A viabilidade celular foi então analisada pelo teste do MTT de acordo com Denizot e Lang (1986). Resumidamente, após o período de incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e posteriormente incubadas com 1 mL de PBS contendo 100  $\mu$ L de MTT (1 g/L) por poço durante 1 hora a 37 °C. Os cristais de formazana, resultante da redução do MTT pelas células viáveis, foram então dissolvidos em DMSO e a absorvência foi lida a 530 nm. Os resultados foram expressos em termos de percentagem de células viáveis relativamente ao controlo, i.e., células que não foram submetidas a qualquer estímulo.

## **2.6 – Medida da libertação da lactato desidrogenase**

A lise das células (necrose) foi avaliada pela libertação da lactato desidrogenase (LDH), pois sendo a LDH uma enzima citoplasmática a sua presença no meio de cultura é sinal de alterações membranares. A libertação dessa enzima para o meio de cultura foi avaliada espectrofotometricamente, após reacção enzimática adequada, num autoanalisador Synchron cx (Beckman Coulter) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em termos de percentagem de libertação da LDH total, obtida pela quociente entre a actividade da LDH no sobrenadante e a actividade da LDH no lisado celular total.

## **2.7 – Morfologia nuclear**

As células, em caixas de petri de 40 mm, foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 min à temperatura ambiente e subsequentemente coradas com Hoechst 33258 5 µg/mL durante 15 min e lavadas com PBS. Procedeu-se, então, à montagem da lamela com uma mistura de PBS/glicerol (3:1, v/v). As células foram depois observadas num microscópio de fluorescência (Nikon). Os núcleos foram contados de acordo com as características de marcação e condensação nuclear da cromatina. Os núcleos apoptóticos foram identificados pela cromatina condensada e fragmentação nuclear e foram contados pelo menos 6 campos diferentes por amostra com  $\approx$  80 células por campo (x400). Apenas as células que se mantinham aderentes ao fundo das caixas foram observadas e contadas. A média das 6 contagens foi calculada e expressa como o número de células apoptóticas relativamente ao número total de células contadas.

## **2.8 – Determinação do conteúdo intracelular de glutatião reduzido e oxidado**

Os níveis intracelulares de glutatião reduzido (GSH) e de glutatião oxidado (GSSG) foram determinados por um ensaio fluorimétrico descrito previamente (Hissin e Hilf, 1976). Resumidamente, as células foram raspadas, após adição

de ácido perclórico 0,6 M e recuperadas em tampão fosfato de sódio 100 mM contendo 5 mM EDTA, pH 8,0 a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 16 000xg a 4 °C durante 10 min. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi misturada com 100 µL de *orto*-ftaldeído (0,1% w/v em metanol) e 1,8 mL de NaHPO<sub>4</sub> 100 mM durante 15 min à temperatura ambiente. Para a determinação do glutatião oxidado o sobrenadante foi previamente tratado durante 30 min com N-etilmaleimide (NEM) e então misturado com *orto*-ftaldeído em NaOH 100 mM. A intensidade de fluorescência foi posteriormente lida num espectrómetro Perkin-Elmer LS 50B a um comprimento de onda de emissão de 420 nm e um comprimento de onda de excitação de 350 nm (fendas de 5 nm). Os níveis celulares de GSH e GSSG foram calculados por interpolação numa curva de calibração e expressos em nmoles de GSH ou GSSG por miligrama de proteína celular. A proteína celular foi quantificada pelo método de Bradford recorrendo a um conjunto de reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA).

### **2.9 – Análise estatística**

Os resultados foram expressos como o valor médio  $\pm$  SEM de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *one-way analysis of variance* ou pelo teste *t*. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

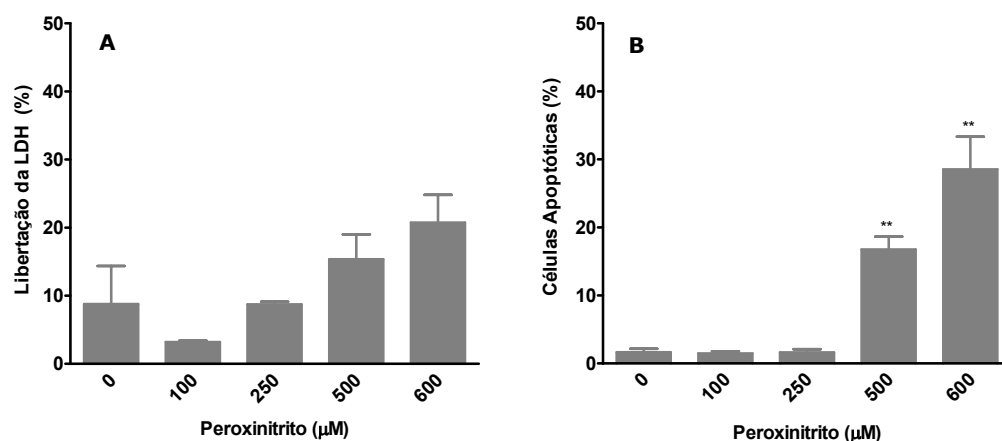
## **3 – Resultados**

### **3.1 – O peroxinitrito induz alterações morfológicas apoptóticas em células endoteliais da aorta bovina**

A morte celular induzida pelo peroxinitrito tem sido descrita em diversos tipos celulares incluindo as BAEC (Foresti et al., 1999). No entanto, estes estudos diferem não só no tipo de células usado para a realização do estudo como também na proveniência do peroxinitrito e na forma como ele foi

adicionado às células e subsequentemente no tipo de morte celular induzida, apoptose ou necrose.

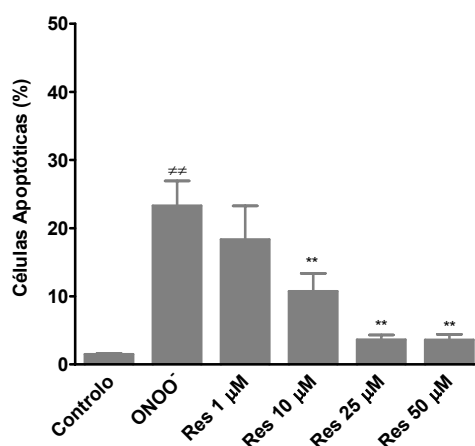
Para perceber a natureza da morte celular desencadeada pelo peroxinitrito autêntico, células endoteliais de aorta bovina foram tratadas com concentrações diversas de peroxinitrito (100-600  $\mu\text{M}$ ) e os efeitos foram avaliados 6 h após o tratamento. Um teste elucidativo acerca do tipo de morte



**Fig. 1** – O peroxinitrito induz alterações morfológicas apoptóticas em BAEC. Células endoteliais da aorta bovina confluentes, mantidas em meio a 0% de soro fetal bovino foram tratadas com várias concentrações de peroxinitrito autêntico (0-600  $\mu\text{M}$ ). Após lavagem das células com PBS, os tratamentos foram realizados em 1mL/poço de PBS durante 10 min. Subsequentemente, o PBS foi removido e substituído por meio de cultura sem soro fresco e as células incubadas a 37 °C durante 6 horas. A liberação da lactato desidrogenase (**A**) foi analisada no meio de cultura, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos em termos de percentagem da lise total das células. As alterações morfológicas apoptóticas (**B**) foram avaliadas por observação da morfologia nuclear num microscópio de fluorescência após marcação nuclear com Hoechst 33258, sendo consideradas células apoptóticas as que apresentavam núcleos condensados ou fragmentados. Os resultados foram expressos em percentagem da população celular total. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 4 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\* $p < 0,01$  vs controle.

celular é a medida da actividade da lactato desidrogenase no meio de cultura, uma vez que essa actividade só é significativa se houver perda de integridade da membrana celular, característica da necrose. Conforme representado na Fig. 1A, um ligeiro aumento na liberação da LDH foi observado com o aumento da concentração do peroxinitrito. No entanto, este aumento não foi

estatisticamente significativo, inclusive para a concentração de peroxinitrito mais elevada testada. Por outro lado, um aumento do número de células apoptóticas dependente da concentração do peroxinitrito usado pôde ser observado e quantificado por contagem celular após marcação nuclear com Hoeschst (Fig. 1B). De facto, as células tratadas com as



**Fig. 2** – O resveratrol preveniu as alterações apoptóticas mediadas pelo peroxinitrito. Células endoteliais da aorta bovina confluentes mantidas em meio a 0% de FBS foram pré-incubadas com várias concentrações de resveratrol (Res) 1 – 50 µM durante 14 horas. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS e tratadas com peroxinitrito 500 µM como descrito na legenda da Fig. 1. As alterações morfológicas apoptóticas foram então analisadas após marcação nuclear com Hoechst 33258. O controlo refere-se às experiências em condições similares sem peroxinitrito e sem resveratrol. As barras indicam o valor médio  $\pm$  SEM de 4 experiências independentes realizadas em duplicado.  $\neq$   $p < 0,01$  vs controlo; \*\*  $p < 0,01$  vs células tratadas com peroxinitrito.

concentrações mais elevadas de peroxinitrito testadas (500 e 600 µM) exibiram fragmentação e condensação nuclear significativa (cerca de 20 e 30 %, respectivamente), enquanto que estes marcadores apoptóticos não foram evidentes em células controlo, i.e, células que não foram sujeitas ao tratamento com o peroxinitrito (menos de 2 % de células controlo exibiram condensação e fragmentação nuclear).

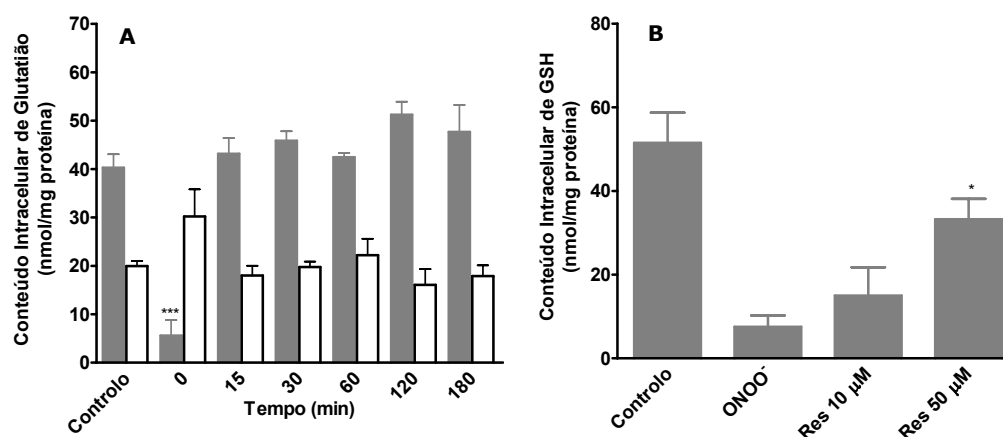
### **3.2 – O resveratrol preveniu as alterações apoptóticas mediadas pelo peroxinitrito**

Para investigar os efeitos protectores do resveratrol na morte celular mediada pelo peroxinitrito, as BAEC foram pré-incubadas com várias concentrações de resveratrol (1 a 50  $\mu\text{M}$ ) por 14 horas e seguidamente tratadas com  $\text{ONOO}^-$  500  $\mu\text{M}$  como previamente descrito em Materiais e Métodos. O resveratrol não estava presente no meio durante e após o tratamento com o peroxinitrito. Apesar do *stress* oxidativo induzido pelo  $\text{ONOO}^-$  500  $\mu\text{M}$  causar a morte celular apoptótica de aproximadamente 25% das células, o pré-tratamento das mesmas com resveratrol por 14 horas reverteu marcadamente a morte celular programada de uma forma dependente da concentração (Fig. 2). O resveratrol numa concentração de 10  $\mu\text{M}$  inibia apoptose em cerca de 50%, enquanto que 1  $\mu\text{M}$  não teve qualquer efeito significativo. Uma protecção quase total foi observada em células pré-incubadas com resveratrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ .

### **3.3 – O resveratrol preveniu a depleção do GSH induzida pelo peroxinitrito**

Para avaliar o mecanismo pelo qual o resveratrol protege as BAEC da apoptose induzida pelo peroxinitrito, investigámos a sua influência no glutatião, o antioxidante celular mais abundante e o alvo preferencial para as oxidações mediadas pelo peroxinitrito. Assim, começámos por pesquisar o que acontecia ao glutatião intracelular após tratamento das células com peroxinitrito. De acordo com os resultados representados na Fig. 3A, detectou-se uma diminuição significativa no conteúdo intracelular do glutatião reduzido logo após o tratamento com o peroxinitrito (tempo 0). No entanto, após esta diminuição inicial, o conteúdo celular do GSH subiu para valores semelhantes aos do controlo 15 minutos após o tratamento das células com o peroxinitrito, e manteve-se mais ou menos constante até pelo menos 180 min. Pelo contrário, o conteúdo intracelular do glutatião oxidado aumentou ligeiramente no final do tratamento com o peroxinitrito, mas após 15 min

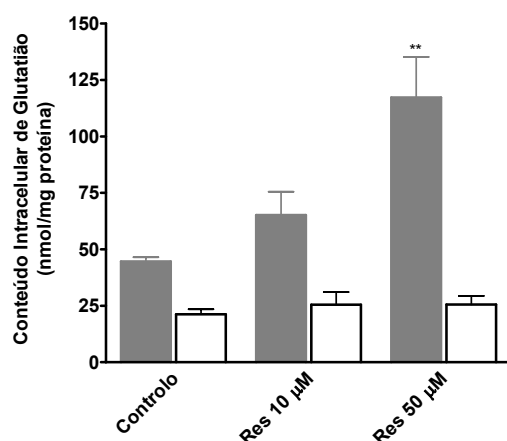
diminuiu para os níveis controlo e manteve-se constante durante o tempo da experiência como se pode observar na Fig. 3A. A pré-incubação de BAEC com resveratrol preveniu a depleção do glutatião mediada pelo ONOO<sup>-</sup> ainda que esse efeito só fosse significativo para a concentração de 50  $\mu$ M (Fig. 3B).



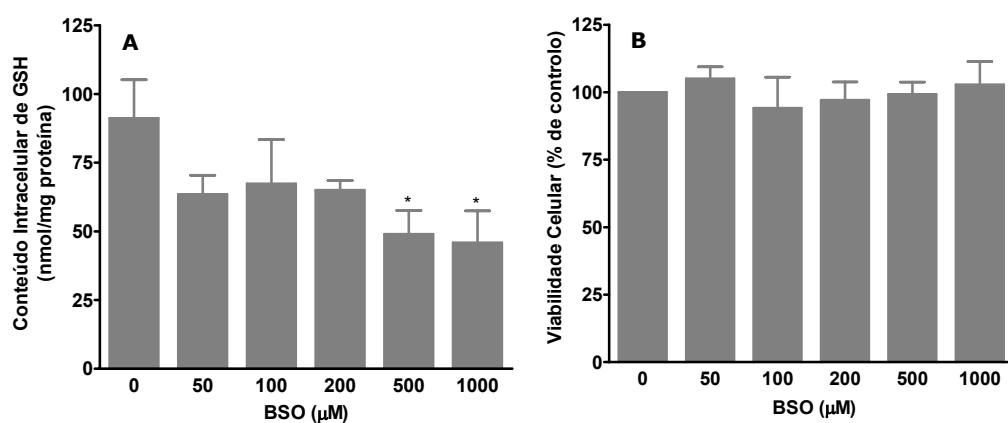
**Fig. 3** – O resveratrol previne a depleção de GSH mediada pelo peroxinitrito. **(A)** BAEC foram incubadas com peroxinitrito 500  $\mu$ M e os conteúdos intracelulares de GSH (barras cinzentas) e GSSG (barras brancas) foram quantificados a diferentes tempos (0-180 min) após tratamento das células. **(B)** As células foram tratadas com peroxinitrito 500  $\mu$ M, após pré-incubação com resveratrol 10 e 50  $\mu$ M e o GSH foi imediatamente quantificado no final do tratamento (tempo 0 min) como descrito em Materiais e Métodos. O controlo refere-se às BAEC sem qualquer tratamento. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 5 experiências independentes realizadas em duplicado.\*\*\*  $p < 0,001$  vs controlo; \* $p < 0,05$  vs células tratadas com peroxinitrito.

Para clarificar o mecanismo pelo qual o resveratrol previne a depleção do GSH mediada pelo peroxinitrito assim como as diferenças entre as diferentes concentrações de resveratrol testadas, analisámos o impacto do resveratrol, *per se*, nos níveis de GSH e de GSSG na ausência do peroxinitrito. Como evidenciado na Fig. 4, observou-se um pequeno aumento no conteúdo constitutivo do GSH em células tratadas com resveratrol 10  $\mu$ M. No entanto, só a pré-incubação das células com resveratrol 50  $\mu$ M induziu um aumento significativo, de cerca de 2 vezes, no conteúdo intracelular do GSH. De notar que os níveis de GSSG foram constantes quer na ausência (controlo) quer na presença de resveratrol.

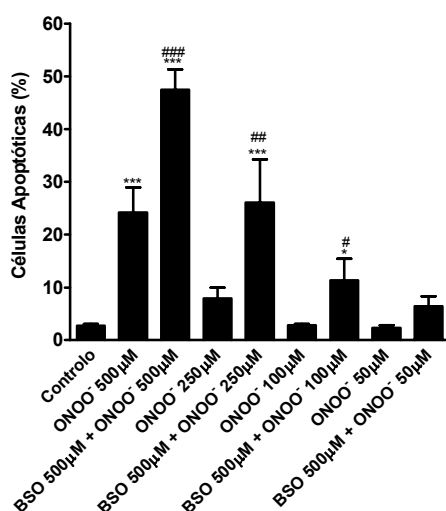




**Fig. 4** – O resveratrol *per se* induz um aumento do conteúdo de GSH em BAEC. Após incubação das células por 14 horas com resveratrol 10 e 50 µM, o GSH (barras cinzentas) e o GSSG (barras brancas) foram quantificados como descrito em Materiais e Métodos. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 6 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\* $p < 0,01$  vs controlo (experiência sem resveratrol).



**Fig. 5** – Efeitos da BSO no conteúdo celular do GSH e na viabilidade celular. As células foram incubadas com várias concentrações de BSO 0-1000 µM durante 14 h. Então, os níveis de GSH (**A**) ou a viabilidade celular (**B**) foram avaliados como descrito em Materiais e Métodos. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes realizadas em duplicado. \* $p < 0,05$  vs controlo.



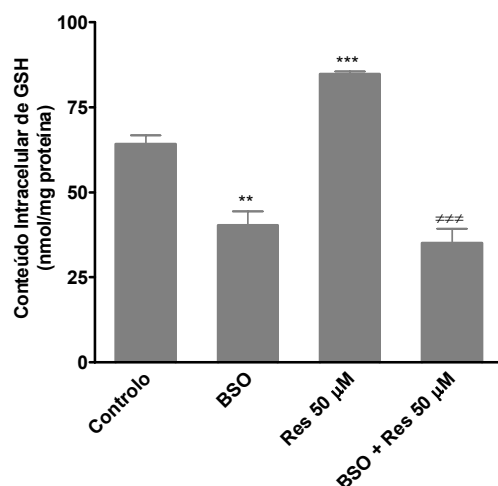
**Fig. 6** – A BSO potencia a morte celular mediada pelo peroxinitrito. As células pré-incubadas na ausência ou presença de BSO 500 μM por 14 h foram tratadas com várias concentrações de peroxinitrito 50 – 500 μM como previamente descrito. Seis horas após tratamento com peroxinitrito o número de células apoptóticas foi avaliado como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos como percentagem da população total de células. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 4 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\*\* $p < 0,001$  vs controlo (experiência sem peroxinitrito e sem BSO); \* $p < 0,05$  vs controlo; ### $p < 0,001$  vs a mesma concentração de peroxinitrito; ## $p < 0,01$  vs a mesma concentração de peroxinitrito; # $p < 0,05$  vs a mesma concentração de peroxinitrito.

### 3.4 – BSO aumentou a morte celular induzida pelo peroxinitrito

Para estabelecer uma relação entre o conteúdo intracelular de GSH e os efeitos citoprotectores do resveratrol 50 μM, as células foram tratadas com BSO. BSO é um inibidor irreversível selectivo e potente da  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase, a enzima que catalisa o passo limitante da síntese *de novo* do glutationo (Anderson, 1998). As células foram incubadas com várias concentrações de BSO durante 14 horas, tendo posteriormente sido avaliado o efeito no conteúdo intracelular de GSH. Enquanto que concentrações de 50, 100 e 200 μM de BSO não alteraram de forma significativa o conteúdo intracelular de GSH, BSO 500 μM causou uma diminuição de cerca de 45%. Curiosamente, uma concentração bastante superior (1000 μM) não provocou uma diminuição adicional, como demonstrado na Fig. 5A. Além disso,

nenhuma das concentrações testadas afectou a viabilidade celular (Fig. 5B), como avaliado pelo teste do MTT. Conjugando estes dois resultados, seleccionámos a concentração de 500  $\mu\text{M}$  de BSO para os ensaios posteriores, uma vez que era a menor concentração que afectava de forma significativa o conteúdo intracelular de glutatião sem afectar a viabilidade celular.

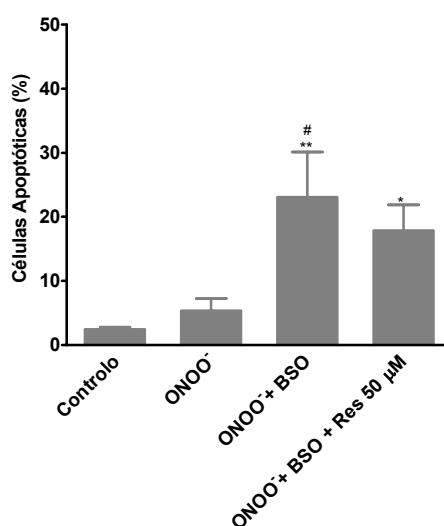
Seguidamente, fomos investigar os efeitos da depleção do GSH induzida pela BSO na morte celular mediada pelo peroxinitrito (Fig. 6). A pré-incubação de BAEC com BSO 500  $\mu\text{M}$  por 14 h seguida de tratamento com diferentes concentrações de peroxinitrito (50 a 500  $\mu\text{M}$ ) resultou num aumento de 2 a 3 vezes no número de células apoptóticas, denotando uma dramática exacerbação da citotoxicidade induzida pelo peroxinitrito. Como o número de células apoptóticas observado na presença do peroxinitrito 250  $\mu\text{M}$  mais BSO 500  $\mu\text{M}$  foi semelhante ao observado só com peroxinitrito 500  $\mu\text{M}$  (Figs. 1B e 2), decidiu-se utilizar a concentração de peroxinitrito 250  $\mu\text{M}$  num estudo posterior para averiguar os eventuais efeitos protectores do resveratrol na morte celular induzida pelo peroxinitrito na presença de BSO.



**Fig. 7** – A BSO anula o aumento nos níveis intracelulares do GSH induzido pelo resveratrol. As células foram incubadas quer com BSO 500  $\mu\text{M}$ , resveratrol 50  $\mu\text{M}$  ou ambos durante 14 h. Os níveis celulares de GSH foram então quantificados como descritos em Materiais e Métodos. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\* $p < 0,01$  vs controlo (experiência sem BSO e resveratrol); \*\*\* $p < 0,001$  vs controlo; ### $p < 0,001$  vs resveratrol.

### 3.5 – Co-tratamento com a BSO anulou a citoproteção mediada pelo resveratrol

Para clarificar o mecanismo subjacente à protecção conferida pelo resveratrol contra a toxicidade do peroxinitrito, as células foram pré-incubadas com resveratrol na presença de BSO tendo subsequentemente sido tratadas com peroxinitrito. A co-incubação das células com resveratrol e BSO aboliu completamente o aumento no conteúdo celular de GSH induzido pelo resveratrol (Fig. 7). Por outro lado, aproximadamente 25 % das células morreram por apoptose após pré-incubação com BSO seguida do tratamento com peroxinitrito 250  $\mu\text{M}$  (Fig. 8). A co-incubação de resveratrol 50  $\mu\text{M}$  com BSO protegeu ligeiramente as células contra a apoptose mediada pelo peroxinitrito, uma vez que o número de células apoptóticas diminuiu apenas em 6 % relativamente ao ensaio sem resveratrol, i.e, células pré-incubadas



**Fig 8** – A BSO inibe os efeitos protectores do resveratrol na morte celular mediada pelo peroxinitrito. BAEC sozinhas ou pré-tratadas com BSO 500  $\mu\text{M}$  ou BSO 500  $\mu\text{M}$  mais resveratrol 50  $\mu\text{M}$  foram incubadas com peroxinitrito 250  $\mu\text{M}$  durante 10 min em PBS. O número de células apoptóticas foi avaliado 6 h após esse tratamento. Os resultados estão expressos em percentagem da população total de células. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 5 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\* $p < 0,01$  vs controlo; \* $p < 0,05$  vs controlo; # $p < 0,05$  vs ONOO<sup>-</sup>.

com BSO e tratadas com peroxinitrito (Fig. 8).

Da análise conjunta dos resultados podemos concluir, que a protecção conferida pelo resveratrol às células endoteliais sujeitas à acção tóxica do peroxinitrito, foi significativamente reduzida na presença de BSO quando comparada com a observada em condições similares sem BSO, em que se verificou uma diminuição de aproximadamente 21% no número de células apoptóticas relativamente ao ensaio do peroxinitrito sozinho (Fig. 2).

#### **4 – Discussão**

Um conjunto vasto de evidências aponta para um papel relevante do resveratrol enquanto agente anti-aterosclerótico (Delmas et al., 2005 e referências aí mencionadas). Tal tem sido, pelo menos, parcialmente sustentado pela sua capacidade em reduzir o *stress* oxidativo que ocorre na parede arterial durante o processo aterosclerótico. Tem sido demonstrado que o resveratrol reduz a oxidação das LDL mediada por diferentes iniciadores, tais como o cobre, o peroxinitrito e a ferrilmioglobina, um evento crítico na aterogénese, que contribui significativamente para o *stress* oxidativo na parede arterial (Frankel et al., 1993; Brito et al., 2002). Além disso, o resveratrol pode afectar vários sistemas enzimáticos conduzindo a uma diminuição da formação intracelular de espécies reactivas oxidantes nas células vasculares, assim como, a uma alteração no estado redox da célula, via indução de antioxidantes, aumentando a resistência celular aos danos provocados por espécies reactivas (Delmas et al., 2005). De facto, estudos *in vitro*, realizados por Cao e Li (2004) em cardiomiócitos e por Li e colaboradores (2006) em células musculares lisas da aorta demonstraram que o resveratrol induz um aumento quer no conteúdo celular de GSH, quer em diferentes actividades enzimáticas, nomeadamente enzimas dependentes do glutatião, catalase e superóxido dismutase. Adicionalmente, estudos preliminares *in vivo*, dos mesmos autores, apontam para que o resveratrol seja também capaz de induzir a expressão de antioxidantes cardíacos e enzimas de fase 2 em ratinhos após a administração oral de resveratrol (Li e

Cao, 2004). Por outro lado, é bem conhecido que o GSH e enzimas relacionadas com ele são ferramentas celulares importantes para desintoxicar oxidantes, nomeadamente o peroxinitrito. De facto, vários estudos recentes mostram que a depleção de GSH potencia o *stress* induzido pelo peroxinitrito, caracterizado, por ex., por uma resposta inflamatória e lesão vascular (Cuzzocrea et al., 1998). Anteriormente, demonstrámos que o resveratrol previne eficientemente a oxidação da apoproteína das LDL mediada pelo peroxinitrito, sendo o resveratrol preferencialmente mais oxidado do que nitrado por esta espécie (Brito et al., 2002). Tendo em conta este conhecimento e continuando na nossa linha de investigação fomos verificar se o resveratrol teria potencial para proteger as células endoteliais da toxicidade mediada pelo peroxinitrito e, em caso afirmativo, explorar a via do glutationo intracelular como um mecanismo possível subjacente a essa protecção, uma vez que, tanto quanto sabemos não existe qualquer estudo a esse respeito.

Os nossos resultados demonstraram, que a adição de concentrações de peroxinitrito autêntico, na ordem dos 500 e 600  $\mu\text{M}$ , a células endoteliais de aorta bovina induziu uma morte celular programada não necrótica caracterizada por uma condensação e fragmentação do núcleo sem libertação de LDH para o meio extracelular (Fig. 1A e B). Tais efeitos estão de acordo com os descritos por Foresti e colaboradores, sugerindo uma via apoptótica para a morte celular induzida pelo peroxinitrito. No entanto, resultados de Szabó e colaboradores, utilizando uma gama semelhante de concentrações de peroxinitrito, são controversos sugerindo um padrão de morte celular diferente, uma vez que eles observaram activação da enzima nuclear PARP-1 [poli(ADP-ribose) polimerase], um evento relacionado mais com a necrose celular do que com a apoptose (Szabo et al., 1997; Foresti et al., 1999; Szabó et al., 2006). Estes efeitos diferentes podem ser resultado de diferentes condições experimentais, tais como o tempo de exposição das células ao oxidante e o meio de incubação utilizado, meio de cultura ou tampão. Como referido anteriormente, e com base em resultados de experiências realizadas (dados não apresentados), utilizou-se o tampão

fosfato para evitar efeitos secundários dos produtos da reacção entre o peroxinitrito e o meio de cultura das células.

A pré-incubação das células endoteliais com resveratrol 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  durante 14 horas protegeu-as significativamente do dano mediado pelo peroxinitrito (Fig. 2), um efeito não observado para a concentração mais baixa testada (1  $\mu\text{M}$ ). No entanto, apenas a concentração mais elevada (50  $\mu\text{M}$ ) de resveratrol preveniu significativamente a depleção de glutatião induzida pelo peroxinitrito (Fig. 3B) o que está de acordo com a observação de que apenas essa concentração produziu um aumento significativo no reservatório intracelular de GSH (Fig. 4). É importante realçar que os efeitos do resveratrol podem ser imputados aos seus efeitos directos na célula, uma vez que foi removido do meio antes do tratamento das células com o oxidante. Por outro lado, a diminuição no conteúdo intracelular de GSH após tratamento com o peroxinitrito não foi acompanhada pelo correspondente aumento no conteúdo intracelular de GSSG, como se pode observar na Fig. 3A, sugerindo que essa diminuição foi devida a uma remoção do GSH para o exterior da célula ou a uma S-nitrosação do glutatião pelo peroxinitrito (Pastore et al., 2003; Schrammel et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, o GSH é um elemento chave na desintoxicação do peroxinitrito, quer por captá-lo directamente, quer como co-factor de enzimas que servem o processo de desintoxicação mediado pelo peroxinitrito. De forma a obter uma evidência directa do envolvimento do aumento do GSH induzido pelo resveratrol nos seus efeitos citoprotectores contra o peroxinitrito, uma série de experiências foram desenhadas na presença de um inibidor da síntese do GSH, como a butionina sulfoximina. A BSO inibe especifica e irreversivelmente a  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase, limitando por conseguinte o GSH intracelular (Anderson et al., 1998; Pastore et al., 2003). De facto, a síntese *de novo* do GSH é mediada por duas enzimas dependentes do ATP: a  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase e a glutatião sintetase, sendo a primeira a enzima que cataliza a etapa limitante e por isso sensível a um controlo de retroacção negativa pelo glutatião. Outro factor

relevante na síntese *de novo* do GSH é a disponibilidade da cisteína (Anderson et al., 1998). Este facto pode explicar a rápida recuperação (15 min) dos níveis intracelulares de GSH após o tratamento com o peroxinitrito (Fig. 3A), uma vez que a este tempo (15 min) as células já estavam no meio de cultura das células que contém cisteína disponível para a captação celular e subsequentemente, para a síntese do GSH. A co-incubação das células com o peroxinitrito e concentrações não tóxicas de BSO potenciaram significativamente a morte celular induzida pelo peroxinitrito (Fig. 6), sustentando o papel importante do GSH na protecção contra essa espécie oxidante. Além disso, a BSO foi capaz de anular o aumento intracelular do GSH devido à pré-incubação das células com resveratrol 50  $\mu$ M (Fig. 7), sugerindo que o aumento do GSH pelo resveratrol ocorra através da indução da  $\gamma$ -GCS.

De forma a elucidar a estratégia do resveratrol na citoprotecção contra a morte celular mediada pelo peroxinitrito comparámos essa protecção na ausência e presença de BSO (Fig. 8). De notar que com base nos resultados da Fig. 6, nas experiências com BSO utilizámos apenas 250  $\mu$ M de peroxinitrito. Curiosamente, células pré-incubadas durante 14 horas com resveratrol 50  $\mu$ M foram fortemente protegidas contra o dano induzido pelo peroxinitrito sozinho (Fig. 2) mas, na presença da BSO não foi observada nenhuma protecção significativa (Fig. 8). Estes resultados sugerem fortemente que o resveratrol numa concentração de 50  $\mu$ M previne as células dos efeitos deletérios do peroxinitrito por aumentar o reservatório intracelular de GSH.

Quanto aos mecanismos moleculares pelos quais um aumento intracelular de GSH protege as células da morte induzida pelo peroxinitrito, várias vias são possíveis. Por um lado, o aumento de cerca de 2 vezes no GSH induzido pelo resveratrol, demonstrado neste trabalho, pode aumentar a capacidade celular de reduzir o peroxinitrito através duma reacção não catalisada. Por outro lado, o aumento na concentração celular de GSH aumenta a actividade da glutatião peroxidase (GPx), uma via de desintoxicação do peroxinitrito



biologicamente eficiente *in vivo*. De facto, estudos cinéticos demonstram que a reacção catalizada pela GPx predomina por um factor de 3 sobre a redução não catalizada do peroxinitrito pelo glutatião (Briviba et al., 1998; Sies et al., 2000). Também as glutatião-S-transferases (GST) podem estar implicadas nos mecanismos protectores do resveratrol. Algumas destas enzimas, nomeadamente as microssomais, exibem uma actividade de glutatião peroxidase, reduzindo os hidroperóxidos lipídicos gerados nas membranas celulares por oxidantes. Por conseguinte, o aumento nos níveis celulares do GSH pode levar ao aumento da actividade peroxidásica da GST, diminuindo os produtos de peroxidação lipídica e, conseqüentemente, modular a sinalização para a apoptose. Curiosamente, a GST microssomal é activada pelo peroxinitrito (Yang et al., 2001; Bin e Bennet, 2003).

Para concentrações baixas de resveratrol, vias protectoras diferentes devem estar implicadas. De facto, o resveratrol 10  $\mu$ M reduz eficientemente a morte celular induzida pelo peroxinitrito (Fig. 2) mas, tal protecção não foi associada nem a uma inibição significativa da depleção de GSH na presença do peroxinitrito (Fig. 3B) nem a um aumento significativo do conteúdo intracelular do GSH (Fig. 4). Conseqüentemente, o resveratrol para essa concentração e no nosso modelo de estudo, terá um papel protector nas vias bioquímicas implicadas na morte celular induzida pelo peroxinitrito, mas um grande número de mecanismos prováveis podem ser considerados uma vez que o peroxinitrito pode mediar o dano e a morte celular por diversas vias (Szabó et al., 2003).

Em conclusão, o nosso estudo demonstra pela primeira vez que uma pré-incubação longa (14 h) de células endoteliais de aorta bovina com resveratrol é capaz de resgatar as células do dano despoletado por peroxinitrito autêntico duma forma dependente da concentração. Além disso, este efeito citoprotector parece ser devido a um aumento no reservatório intracelular de GSH para a maior concentração de resveratrol testada – 50  $\mu$ M. Por conseguinte, os nossos resultados dão credibilidade forte a uma visão muito mais lata dos efeitos cardioprotectores do resveratrol que vai muito

além da sua actividade antioxidante clássica, sendo capaz de modular o estado redox das células ao aumentar os níveis intracelulares de glutatião.

## Bibliografia

- Anderson M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* **111-112**, 1-14.
- Beckmann J.S., Ye Y.Z., Anderson P.G., Chen J., Accavitti M.A., Tarpey M.M. e White C.R. (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 81-88.
- Bin Y. e Bennet B.M. (2003) Activation of microsomal glutathione S-transferase by peroxynitrite. *Mol. Pharmacol.* **63**, 136-146.
- Brito P., Almeida L.M. e Dinis T.C.P. (2002) The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic. Res.* **36**, 621-631.
- Briviba K., Kissner R., Koppenol W.H. e Sies H. (1998) Kinetic studies of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1398-1401.
- Cai H. e Harrison D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**, 840-844.
- Cao Z. e Li Y. (2004) Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur. J. Pharmacol.* **489**, 39-48.
- Cuzzocrea S., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A.L. e Szabo C. (1998) Effect of L-buthionine-(S,R)-sulfoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite- and endotoxic shock-induced vascular failure. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 525-537.
- 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**, 9-20.
- Delmas D., Janin B., Latruffe N. (2005) Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 377-395.
- 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. Method* **89**, 271-277.
- Dinis T.C.P., Santos 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**, 531-543.
- Foresti R., Sarathchandra P., Clark J.E., Green C.J. e Mortelini R. (1999) Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem. J.* **339**, 729-736.
- Frankel E.N., Waterhouse A.L. e Kinsella J.E. (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **341**, 1103-1104.
- Hissin P.J. and Hilf R. (1976) A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* **74**, 214-226.

- Ischiropoulos H. e al-Mehdi A.B. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* **364**, 279-282.
- Klotz L.O. e Sies H. (2003) Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol. Lett.* **140-141**, 125-132.
- Koppenol W.H. (1998) The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 385-391.
- Leeuwenburgh C., Hardy M.M., Hazen S.L., Wagner P., Oh-ishi S., Steinbrecher U.P. e Heinecke J.W. (1997) Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.* **272**, 1433-1436.
- Li Y. e Cao Z. (2004) Chemical induction of endogenous antioxidants in mouse cardiac tissue: implications for cardioprotection. *Toxicol. Sci.* **78** (suppl.1), 168.
- Li Y., Cao Z. e Zhu H. (2006) Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol. Res.* **53**, 6-15.
- Liu Y e Liu G (2004) Isorhapontigenin and resveratrol suppress oxLDL-induced proliferation and activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases of bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 777-785.
- Lusis A.J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241.
- Ma X.L., Lopez B.L., Liu G.L., Christopher T.A., Gao F., Guo Y., Feuerstein G.Z., Ruffolo Jr R.R., Barone F.C. e Yue T.L. (1997) Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury. *Circ. Res.* **80**, 894-901.
- Pace-Asciak C.R., Hahn S., Diamandis E.P., Soleas G. e Goldberg D.M (1995) The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for proliferation against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* **235**, 207-219.
- Pastore A., Federici G., Bertini E. e Piemonte F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* **333**, 19-39.
- Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481-487.
- Rubbo H. e O'Donnell V. (2005) Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicol.* **208**, 305-317.
- Salgo M.G., Stone K., Squadrito G.L., Battista J.R. e Pryor W.A (1995) Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 1025-1030.
- Schrammel A., Gorren A.C.F., Schmidt K., Pfeiffer S. e Mayer B. (2003) S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite and NO<sup>•</sup>/O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1078-1088.
- Sies H e Arteel G. E. (2000) Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1451-1455.
- Szabó C. (2003) Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* **140-141**, 105-112.

- Szabó C. (2006) Poly(ADP-ribose) activation by reactive nitrogen species-relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric oxide* **14**, 169-179.
- Szabó C, Cuzzocrea S. Zingarelli B., O'Connor M. e Salzman A.L. (1997) Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly(ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* **100**, 723-735.
- Uppu R.M., Squadrito G.L., Cueto R. e Pryor W.A. (1996) Selecting the most appropriate synthesis of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **269**, 285-295.
- Yang Y., Cheng J.Z., Singhal S.S., Saini M., Pandya U. e Awasthi S. ( 2001) Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 19220- 19230.



## **Capítulo 3**

### **O resveratrol protege as células endoteliais da apoptose induzida pelo peroxinitrito: um papel para a Bcl-2**

Paula M. Brito, Núria F. Simões, Leonor M. Almeida e Teresa C.P. Dinis

Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra e  
Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Universidade de  
Coimbra, 3000-295 Coimbra-Portugal





## Resumo

O resveratrol (3,4',5 – trihidroxi-estilbeno) é um fitoquímico que se crê ser um dos responsáveis pelos efeitos cardioprotectores do vinho tinto devido às suas numerosas actividades biológicas. A aterosclerose, principal causa subjacente às doenças cardiovasculares, caracteriza-se por um aumento na produção de espécies reactivas, nomeadamente o peroxinitrito, uma molécula altamente reactiva capaz de reagir com todas as biomoléculas. Num estudo anterior, demonstrámos que concentrações elevadas de resveratrol protegiam as células endoteliais da aorta bovina (BAEC) da morte celular induzida pelo peroxinitrito por aumentar as defesas antioxidantes da célula, nomeadamente o glutatião, uma das primeiras linhas de defesas celulares contra o peroxinitrito. Neste estudo, investigámos as vias bioquímicas subjacentes à apoptose, em células endoteliais, mediada pelo peroxinitrito e mecanismos adicionais para os efeitos citoprotectores do resveratrol, especialmente para baixas concentrações. O peroxinitrito 500  $\mu$ M desencadeia a apoptose por induzir a activação das caspases-8, -9 e -3 sugerindo o envolvimento quer da via mitocondrial, quer da via de receptores de morte. No entanto, apesar do resveratrol ser capaz de prevenir duma forma eficiente a activação das caspases-3 e -9 induzida pelo peroxinitrito, os seus efeitos são menos pronunciados na activação da caspase-8 pelo peroxinitrito. Adicionalmente, demonstrou-se que o peroxinitrito induz apoptose por aumentar os níveis intracelulares da Bax, sem alterar os níveis intracelulares da Bcl-2, aumentando por conseguinte o quociente Bax/Bcl-2. Este quociente diminui quando as células são pré-incubadas com o resveratrol 10 e 50  $\mu$ M. Esta diminuição deve-se à capacidade do resveratrol *per se* aumentar os níveis da Bcl-2, sem alterar os níveis de Bax. No seu conjunto, estes resultados propõem um mecanismo adicional para os efeitos benéficos cardioprotectores do resveratrol e sugerem que a Bcl-2 tem um papel chave nos seus efeitos anti-apoptóticos, nomeadamente na interrupção da via mitocondrial iniciada pelo peroxinitrito.

## 1 – Introdução

A aterosclerose é uma doença multifacetada na qual a disfunção endotelial desempenha um papel crucial (Hansson, 2005). O endotélio, constituído por uma monocamada de células endoteliais, funciona como uma barreira selectiva e permeável com função reguladora de diversos processos, que inclui o tónus vascular, trombose, inflamação e a regeneração vascular (Ross, 1999). Assim sendo, qualquer dano ou *stress* nas células endoteliais afecta as funções do endotélio conduzindo a disfunções deste tecido. Por sua vez, a apoptose das células arteriais, incluindo as células endoteliais, é uma característica importante das placas ateroscleróticas que contribui para sua instabilidade e amplifica a disfunção endotelial e, subsequentemente a aterosclerose através da indução de uma resposta inflamatória exacerbada (Choy et al., 2001). Evidências experimentais associam os *stress* oxidativo e nitrosativo/nitrativo à disfunção endotelial, dado que as lesões ateroscleróticas ocorrem predominantemente em áreas de fluxo sanguíneo não uniforme, onde são observados aumento do radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e diminuição do radical óxido nítrico ( $^{\cdot}NO$ ) (Cooke, 2003). Isto é extremamente importante, uma vez que uma produção elevada de  $O_2^{\cdot-}$  por activação de enzimas, como as NAD(P)H oxidases, xantina oxidase, e NO sintase desacoplada, contraria os efeitos benéficos do  $^{\cdot}NO$  na vasculatura, oxidando-o a peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) uma espécie altamente reactiva (Cai e Harrison, 2000). De facto, a 3-nitrotirosina, um marcador biológico do peroxinitrito, está aumentada no tecido aterosclerótico humano (Beckmann et al., 1994; Leeuwenburgh et al., 1997). O peroxinitrito é um poderoso oxidante e espécie nitrante, capaz de reagir e modificar uma vasta gama de biomoléculas, incluindo o DNA, proteínas e lípidos (Radi et al., 1991; Salgo et al., 1995; Ischiropoulos e al Mehdi, 1995). Estas alterações podem levar à disfunção de processos biológicos chave como, por exemplo, a desregulação de vias sinalizadoras ou mesmo à morte celular por apoptose ou necrose.

Estudos *in vitro* demonstraram que o peroxinitrito pode induzir morte celular, quer por apoptose quer por necrose, dependendo das condições de

exposição e concentrações de peroxinitrito utilizadas. Szabó e colaboradores observaram uma morte por necrose não passiva iniciada pela lesão oxidativa do DNA e activação exacerbada da enzima nuclear PARP-1 (*poly (ADP-ribose) polimerase-1*) (Szabo et al., 1997; Virag et al., 2003). A activação de PARP-1 pode baixar drasticamente a concentração intracelular do substrato (NAD<sup>+</sup>), conduzindo posteriormente à crise energética da célula. Pelo contrário, resultados do nosso e outros laboratórios apontam para modificações morfológicas nas células endoteliais após exposição ao peroxinitrito consistentes com uma morte por apoptose (Foresti et al., 1999; Brito et al., 2006). O mecanismo molecular desta apoptose induzida pelo peroxinitrito em células endoteliais não foi no entanto investigado, permanecendo pouco conhecido e constitui um dos objectivos deste trabalho.

O resveratrol (3,4',5 – trihidroxi-estilbeno), uma fitoalexina sintetizada em várias plantas, tem sido alvo de investigação intensa, em particular na área cardiovascular, após ter sido detectado no vinho tinto e Siemann e Creasy terem sugerido que poderia ser o responsável pelos efeitos cardioprotectores observados em consumidores moderados de vinho tinto (Siemann e Creasy, 1992). Além disso, o resveratrol também pode ser encontrado no Kojikon, um produto proveniente das raízes de *Polygonum cuspidatum* usado na medicina popular oriental no tratamento de doenças do coração. Desde então, têm sido descritas inúmeras actividades biológicas do resveratrol, incluindo as actividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-proliferativa, e ainda a inibição da agregação das plaquetas (Frankel et al., 1993; Pace-Asciak et al., 1995; Brito et al., 2002; Liu e Liu, 2004). Todas estas acções são benéficas, não só para a função endotelial, como para o sistema cardiovascular em geral, apoiando um possível papel cardioprotector para o resveratrol. Tal como apresentado no capítulo anterior, recentemente demonstrámos que uma concentração relativamente elevada de resveratrol protege as células endoteliais da aorta bovina (BAEC, *bovine aortic endothelial cell*) da morte induzida pelo peroxinitrito através do aumento dos níveis intracelulares de glutatião (Brito et al., 2006). No entanto, outros mecanismos devem contribuir para os efeitos citoprotectores do resveratrol, uma vez que

concentrações mais baixas protegeram, igualmente, as células do dano provocado pelo peroxinitrito sem induzirem qualquer aumento nos níveis de glutatião. Assim, o objectivo central deste trabalho foi investigar quais as vias bioquímicas responsáveis pela apoptose induzida pelo peroxinitrito e quais os mecanismos moleculares adicionais responsáveis pela acção protectora do resveratrol.

Os dados apresentados indicam (1) que o peroxinitrito desencadeia apoptose das BAEC por iniciar a via mitocondrial e a via de receptores de morte; (2) que o resveratrol contraria os efeitos deletérios do peroxinitrito não só pela sua acção antioxidante, como também por interferir com a via apoptótica mitocondrial através do aumento dos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

## **2 – Materiais e Métodos**

### **2.1 – Materiais**

Reagentes de uso geral, colagenase, gelatina, estreptomicina/penicilina, MTT, BSO, Hoescht 33258, a mistura de inibidores de proteases foram obtidos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). Para a cultura de células, soro fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*), tampão fosfato salino (PBS, *phosphate-buffered saline*) pH=7,4, tampão fosfato salino de Dulbecco (DPBS, *Dulbecco's phosphate-buffered saline*) pH=7,4, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle medium*) foram adquiridos à GIBCO-Invitrogen (Barcelona, Espanha). O resveratrol foi adquirido à Extrasynthèse (Genay, França). Os substratos para a capase-3 (DEVD-7-amido-4-metilcoumarino), caspase-8 (IEPD-7-amido-4-metilcoumarino) e caspase-9 (LEDH-7-amido-4-trifluotometilcoumarino) foram adquiridos à Bachem (Bubendorf-Suíça). O anticorpo primário monoclonal produzido em rato contra a Bax e o anticorpo secundário contra anticorpos de rato foram adquiridos à Abcam (Cambribdge, Reino Unido); o anticorpo primário monoclonal produzido em rato contra a Bcl-2 foi adquirido à Santa Cruz

Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Todos os reagentes usados possuíam pureza adequada para os estudos bioquímicos.

## 2.2 – Cultura primária de células endoteliais da aorta bovina

As células endoteliais da aorta bovina foram isoladas da aorta torácica após digestão com colagenase (2 mg/mL). Brevemente, secções de aorta foram cortadas e seladas com pinças tesouras. O interior da aorta foi, então, lavado com DPBS e tratado com a solução de colagenase com a ajuda de uma seringa. As secções de aorta foram colocadas a 37 °C por um período de tempo variável de 5 a 10 min. Findo esse tempo, as células foram recuperadas para um tubo com meio de cultura, centrifugadas a 200xg durante 5 min e semeadas em caixas de 6 poços previamente revestidas com gelatina. As células foram cultivadas em frascos de cultura T-75 revestidos com gelatina em DMEM suplementado com 10 % de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 ng/mL de fungizona, a 37 °C em incubadora com atmosfera humidificada e contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. As células endoteliais foram identificadas pela morfologia arredondada (*cobblestone*) e distribuição espacial. As células foram sub-cultivadas à confluência e utilizadas entre a 4<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> passagem. Para os ensaios, usaram-se as células a uma confluência de 80% e foram privadas de FBS 24 horas antes.

## 2.3 – Síntese do ONOO<sup>-</sup>

O peroxinitrito foi sintetizado num reactor *quenched flow* como previamente descrito (Dinis et al., 2002). Em resumo, uma solução aquosa de NaNO<sub>2</sub> 0,6 M foi rapidamente misturada com igual volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,7 M em HCl 0,6 M e imediatamente *quenched* com igual volume de NaOH 1,5 M. A solução obtida foi então congelada a -20 °C por aproximadamente 24 horas. A essa temperatura, o peroxinitrito devido a um processo de congelamento fraccionado da solução concentra-se numa camada superior de cor amarela mais intenso. Essa camada foi cuidadosamente removida e passada através duma pequena coluna de MnO<sub>2</sub> para remover o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual de acordo com

Uppu e colaboradores (Uppu e Pryor, 1996). O peroxinitrito foi então armazenado em alíquotas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob atmosfera de azoto. Antes de cada utilização, o peroxinitrito foi sempre quantificado espectrofotometricamente, após diluição em NaOH 1 M, com base na sua absorvidade molar na banda de absorção centrada a 302 nm ( $\epsilon_{302}=1670\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### **2.4 – Estimulação das células com peroxinitrito**

Nas experiências com o  $\text{ONOO}^-$ , as células foram previamente lavadas com DPBS e equilibradas com PBS pH 7,4, durante 5 minutos. Subsequentemente, as células foram expostas a uma dose única de  $\text{ONOO}^-$  500  $\mu\text{M}$ , previamente diluído em NaOH 10 mM, que foi adicionada contra a parede do poço enquanto se agitava rapidamente o meio de modo a assegurar uma exposição óptima das células ao  $\text{ONOO}^-$  antes da decomposição deste. A incubação com o  $\text{ONOO}^-$  foi feita em PBS e não em DMEM a fim de evitar reacções secundárias do peroxinitrito com os constituintes do meio. Após 10 minutos de incubação o  $\text{ONOO}^-$  foi retirado, as células foram lavadas e incubadas com meio pelo período indicado e não superior a 6 h. Não foram observadas alterações do pH durante o tratamento com  $\text{ONOO}^-$ . Volumes iguais de NaOH 10 mM (controlo solvente) ou de peroxinitrito decomposto (o peroxinitrito foi decomposto em PBS ou NaOH 10 mM durante a noite) foram utilizados como controlos.

Quando especificado, as células foram pré-incubadas com resveratrol durante 14 h, sendo este removido antes da exposição ao  $\text{ONOO}^-$ .

#### **2.5 – Morfologia nuclear**

As células em caixas de petri de 40 mm foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 min à temperatura ambiente e subsequentemente coradas com Hoechst 33258 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 15 min e lavadas com PBS. Procedeu-se, então, à montagem da lamela com uma mistura de PBS/glicerol (3:1, v/v) para observação microscópica em microscópio de fluorescência (Nikon). Os núcleos foram contados de acordo

com as características de marcação e condensação nuclear da cromatina. Os núcleos apoptóticos foram identificados pela cromatina condensada e fragmentação nuclear e foram contados pelo menos 6 campos diferentes por amostra com  $\approx 80$  células por campo (x400). Apenas as células que se mantinham aderentes ao fundo das caixas foram observadas e contadas. A média das 6 contagens foi calculada e expressa como o número de células apoptóticas relativamente ao número total de células contadas.

## 2.6 – Actividade de caspases

A actividade das caspases foi medida nos extractos proteicos citosólicos. Resumidamente, no final de cada experiência as células foram ressuspensas em tampão de lise a 4 °C (HEPES 25 mM pH 7,4, CHAPS 0,1% (p/v), Na-EDTA 1 mM, Na-EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, PMSF 100  $\mu$ M, DTT 2 mM, mistura de inibidores de proteases 1/100) durante 20 min. De seguida, as células foram lisadas através de 5 ciclos de congelamento/fusão (em azoto liquido/37 °C) e centrifugadas a 16 000xg durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi então recolhido e guardado a -80° C, após a determinação da proteína pelo método de Bradford, com um conjunto de reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A actividade enzimática das caspases foi determinada por espectrofotometria de fluorescência usando substratos fluorescentes contendo locais de hidrólise específicos, nomeadamente DEVD para a caspase-3, IEPD para a caspase-8 e LEDH para a caspase-9, ligados ao AMC (para as caspases-3 e -8) ou AFC (para a caspase-9). Quantidades iguais de proteína (20-25  $\mu$ g) foram incubadas num tampão de ensaio [HEPES pH 7,4, sacarose 10% (p/v), chaps 0,1% (p/v), DTT 10 mM] com 100  $\mu$ M de cada um dos substratos durante 2 h a 37°C. A libertação do AMC ou AFC foi determinada por fluorescência num espectralfluorímetro Perkin-Elmer LS50, com  $\lambda_{exc}$  =390 nm e  $\lambda_{em}$ =475 para o AMC, ou  $\lambda_{exc}$ =395 nm e  $\lambda_{em}$ = 495 nm para o AFC (fendas de 5 nm). A actividade das caspases foi calculada em termos de aumento do controlo para a mesma quantidade de proteína, assumindo como valor do controlo o valor de 1.

### **2.7 – Potencial de membrana mitocondrial**

As células foram incubadas com éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) 500 nM, 30 min antes do fim de cada experiência (Scaduto, Jr. e Grotyohann, 1999). Posteriormente, as células foram lavadas, recolhidas e resuspensas em DMEM sem vermelho de fenol ( $1,5 \times 10^6$  células/mL) e a fluorescência medida num espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50 com  $\lambda_{exc} = 550$  nm e  $\lambda_{em} = 572$  nm (fendas 10 nm). Nestas condições o TMRM não foi tóxico para as células, sendo os resultados expressos em termos de percentagem de fluorescência do controlo, i.e., células não tratadas.

### **2.8 – Immunoblot**

Os extractos celulares proteicos totais foram obtidos após lise da suspensão celular num tampão de lise a 4 °C [HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, glicerol 10% (p/v), desoxicolato de sódio 0,5% (p/v), Triton X-100 (v/v), PMSF 1 mM, mistura de inibidores de proteases 1/100 (v/v)] durante 20 min, fazendo vórtex de 5 em 5 min. Os lisados foram centrifugados a 16 000xg durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi então recolhido e guardado a -80° C, após a determinação da proteína pelo método de Bradford com um conjunto de reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). As proteínas dos extractos celulares (25 – 40 µg) foram separadas por electroforese em gele de poliacrilamida de 12 ou 15% em condições desnaturantes na presença de SDS (SDS-PAGE) a uma intensidade de corrente constante de 20 mA por gel (Laemmli, 1970). Após separação foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 2 h a 200 mA. As proteínas em estudo foram posteriormente identificadas por incubação das membranas com anticorpos específicos, sendo a detecção destes feita após incubação das membranas com anticorpos secundários (dirigido contra as imunoglobulinas da espécie em que foi produzido o anticorpo primário) conjugados com a fosfatase alcalina para permitir a detecção e quantificação da proteína em estudo. Para evitar ligações não específicas dos anticorpos às



membranas, estas foram imersas durante 1 h à temperatura ambiente com leite magro em pó 5% (p/v) em tampão TBS-T [(Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (v/v)]. As membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários monoclonais produzidos em rato anti-Bax (1:10 000) e anti-Bcl-2 (1/300). Depois de cinco lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário ligados à fosfatase alcalina (1:45 000) durante 1 h à temperatura ambiente. Todos os anticorpos foram diluídos em TBS-T. A detecção das proteínas foi feita após reacção enzimática utilizando um substrato fluorescente (ECF, *enhanced chemifluorescence reagent*) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante e visualizadas no sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). A  $\beta$ -actina foi usada como controlo interno.

## **2.9 – Análise estatística**

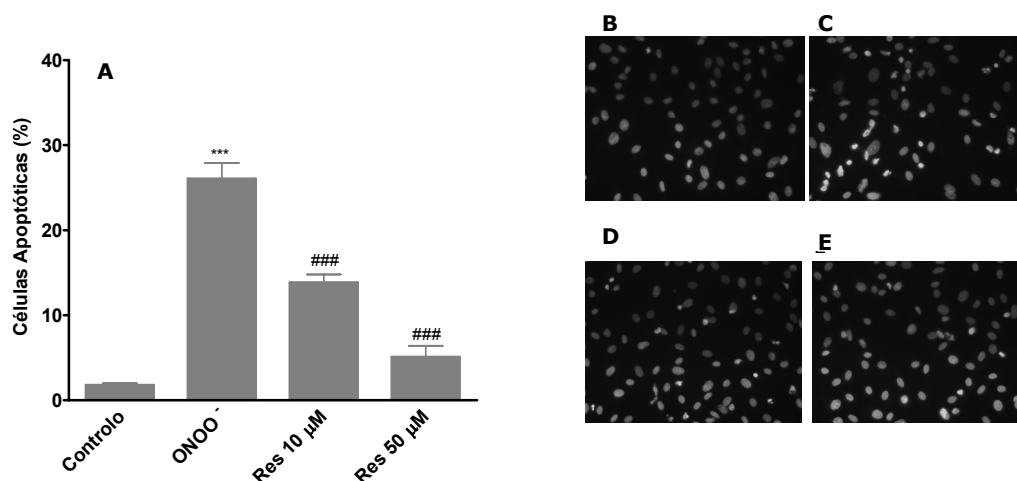
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *one-way analysis of variance* ou pelo teste *t*. O valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **3 – Resultados**

### **3.1 – O resveratrol inibe a activação das caspase-3 e -9, mas não da caspase-8, induzida pelo peroxinitrito**

A apoptose é, em muitas circunstâncias, mediada pela activação de caspases iniciadoras e efectoras, nomeadamente as caspases-8 e -9, e a caspase-3, respectivamente (Danial e Korsmeyer, 2004). Por outro lado, o resveratrol inibe as alterações morfológicas da apoptose induzidas pelo peroxinitrito em BAEC (Brito et al., 2006). Assim, investigou-se o potencial envolvimento das caspases na protecção conferida pelo resveratrol contra a morte celular induzida pelo peroxinitrito. As alterações morfológicas nucleares

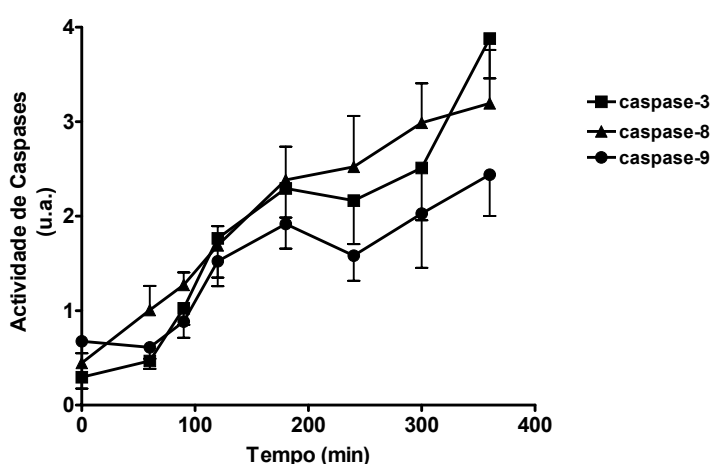
das células observadas após coloração com Hoechst 33258 confirmaram que uma pré-incubação de 14 h das BAEC com resveratrol 10 e 50  $\mu\text{M}$  protege as células da apoptose induzida por peroxinitrito 500  $\mu\text{M}$  (Fig. 1). De salientar, que o resveratrol não estava presente no meio durante e após a incubação com o peroxinitrito. De facto, o aumento significativo de apoptose ( $26,05\% \pm 1,86$ ) observado 6 horas após o tratamento das células com peroxinitrito



**Fig. 1** – O resveratrol protege as BAEC das alterações morfológicas causadas pelo peroxinitrito. Culturas de células confluentes, mantidas em meio a 0 % de soro fetal bovino, foram pré-incubadas com resveratrol 10 e 50  $\mu\text{M}$  durante 14 h. Após lavagem com PBS, as células foram tratadas com peroxinitrito 500  $\mu\text{M}$  durante 10 min em PBS. De seguida, o PBS foi removido e substituído por meio de cultura fresco sem soro e as células incubadas a 37 °C durante 6 horas. As alterações morfológicas foram registadas após a coloração dos núcleos com Hoescht 33258. As amostras controlo foram obtidas na ausência de peroxinitrito e resveratrol. **(A)** Quantificação de células apoptóticas em termos de percentagem do número total de células. As barras representam o valor médio  $\pm$  SEM de 5 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\*\* $p < 0,001$  vs. controlo, ### $p < 0,001$  vs. peroxinitrito. As fotografias representam a morfologia nuclear típica após coloração com Hoechst 33258 de **(B)** células controlo, **(C)** células expostas ao peroxinitrito, **(D)** células expostas a resveratrol 10  $\mu\text{M}$  e peroxinitrito, e **(E)** células expostas a resveratrol 50  $\mu\text{M}$  e peroxinitrito.

500  $\mu\text{M}$  foi eficientemente reduzido pelo resveratrol numa forma dependente da concentração (Fig. 1A). Enquanto, o resveratrol na concentração de 10  $\mu\text{M}$  reduziu os níveis de apoptose em aproximadamente 50% ( $13,85\% \pm 0,942$ ), na concentração de 50  $\mu\text{M}$  praticamente reduziu estes níveis para valores idênticos aos do controlo ( $5,094 \pm 1,312$ ) (Fig. 1A, D e E). De seguida,

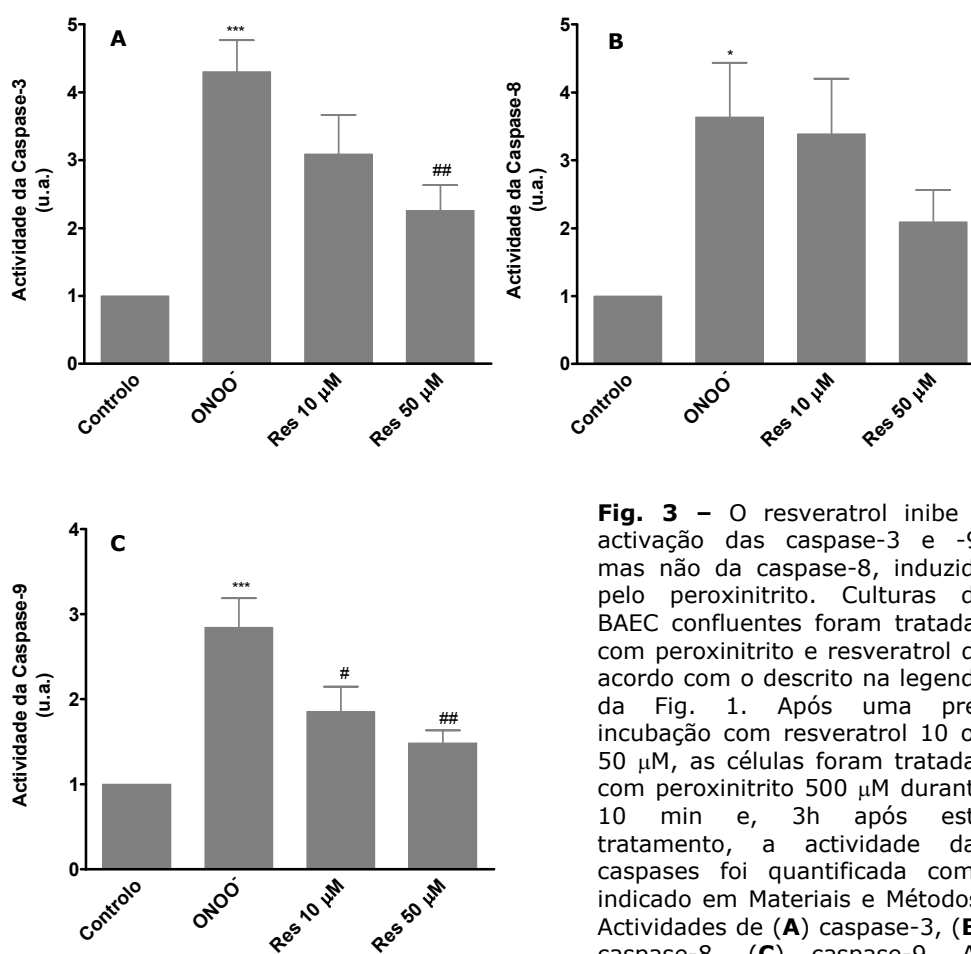
mediram-se as actividades das caspases-3, -8 e -9 nos extractos proteicos citosólicos obtidos após a incubação das células com o peroxinitrito. Para tempos curtos (0 - 1h) as actividades das várias caspases diminuíram para cerca de metade do valor do controlo (Fig. 2). Após este período inicial de inactivação, observou-se um aumento substancial da actividade das caspases. Assim, às 3 h houve um aumento de 130% da actividade da caspases-3 ( $p<0,05$ ) e da caspase-8 ( $p<0,01$ ) e um aumento de 100% da actividade de caspase-9 ( $p<0,05$ ). Para tempos mais longos,



**Fig. 2** – A apoptose induzida pelo peroxinitrito é mediada pelas caspases-3, -8 e -9. Culturas de BAEC confluentes foram tratadas com peroxinitrito de acordo com o descrito na legenda da Fig. 1. As actividades das caspases foram medidas com substratos fluorescentes, como indicado em Materiais e Métodos. Os valores são médias  $\pm$  SEM de 4 a 6 experiências independentes realizadas em duplicado.

continuou a observar-se um aumento da actividade das caspases tendo-se observado, às 6h, aumentos de 280% ( $p<0,01$ ), 210% ( $p<0,01$ ) e 140% ( $p<0,01$ ), para as caspases-3, -8 e -9, respectivamente. A inactivação inicial das caspases observada na presença do peroxinitrito ocorre provavelmente pela reacção directa entre o peroxinitrito e o resíduo de Cys do centro activo das caspases, pois a reacção entre o peroxinitrito e os grupos sulfidrilos é uma das reacções mais rápidas e importantes descrita para o peroxinitrito. Posteriormente, em resposta ao dano causado pelo peroxinitrito as caspases

são activadas iniciando a apoptose. Uma vez estabelecido o perfil da activação das caspases-3, -8 e -9 na apoptose de BAEC mediada por peroxinitrito, fomos investigar se o resveratrol seria capaz de modular a activação das caspases induzida pelo peroxinitrito. O resveratrol inibiu a activação da caspase-3 induzida pelo peroxinitrito numa forma dependente da concentração. Enquanto, o resveratrol 10  $\mu\text{M}$  diminuiu em 28% a activação de 330% da caspase-3 observada 3 h após o tratamento com o peroxinitrito, o



**Fig. 3** – O resveratrol inibe a activação das caspase-3 e -9, mas não da caspase-8, induzida pelo peroxinitrito. Culturas de BAEC confluentes foram tratadas com peroxinitrito e resveratrol de acordo com o descrito na legenda da Fig. 1. Após uma pré-incubação com resveratrol 10 ou 50  $\mu\text{M}$ , as células foram tratadas com peroxinitrito 500  $\mu\text{M}$  durante 10 min e, 3h após este tratamento, a actividade das caspases foi quantificada como indicado em Materiais e Métodos. Actividades de **(A)** caspase-3, **(B)** caspase-8, **(C)** caspase-9. As barras representam o valor médio

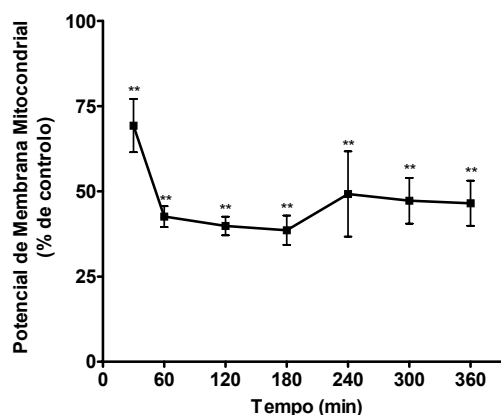
$\pm$  SEM de 5 (A e B) ou 6 (C) experiências independentes realizadas em duplicado. \* $p < 0,05$  vs controlo, \*\*\* $p < 0,001$  vs controlo, # $p < 0,05$  vs. peroxinitrito, ## $p < 0,01$  vs peroxinitrito.

resveratrol 50  $\mu\text{M}$  inibiu em 48% a activação observada (Fig. 3A). Pelo contrário, nenhuma das concentrações testadas reduziu significativamente o aumento de 260% da actividade da caspase-8, 3 h após o tratamento das células com o peroxinitrito (Fig. 3B). Na verdade, embora se observe uma diminuição da actividade na presença de resveratrol 50  $\mu\text{M}$ , esta diminuição não é estatisticamente significativa (Fig. 3B). Finalmente, pode-se observar na Fig. 3C que ambas as concentrações de resveratrol inibiram eficientemente a activação da caspase-9 induzida pelo peroxinitrito: o aumento de 180% da actividade induzido pelo peroxinitrito foi diminuído em 34% e em 52% pela pré-incubação das células com resveratrol 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Uma vez que a activação da caspase-9 pode ser considerada um marcador da via mitocondrial da apoptose, enquanto que a caspase-8 está associada à via apoptótica mediada por receptores (Hengartner, 2000), estes resultados sugerem que o resveratrol inibe a apoptose induzida pelo peroxinitrito através da inibição da via mitocondrial e não pela via mediada pelos receptores.

### **3.2 – O resveratrol não inibe a dissipação de potencial de membrana do mitocôndrio induzida pelo peroxinitrito**

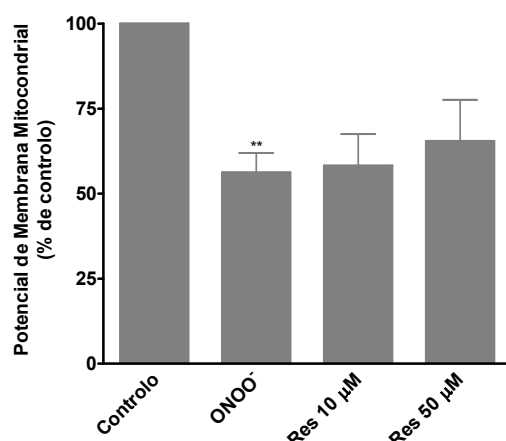
Um dos eventos chave na via apoptótica mitocondrial é a permeabilização da membrana externa mitocondrial e subsequente libertação de factores apoptogénicos existentes no espaço intermembranar mitocondrial como o citocromo *c*, que uma vez no citosol, se liga a Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) e recruta a caspase-9 activando-a (Riedl e Salvesen, 2007). Um dos modelos propostos para a permeabilização da membrana externa mitocondrial envolve a permeabilização transitória da membrana interna mitocondrial (Kroemer e Reed, 2000). Assim sendo, avaliou-se o efeito, ao longo do tempo, do peroxinitrito no potencial de membrana mitocondrial em BAEC. Observou-se uma diminuição do potencial de membrana, 30 min após o tratamento das células com o peroxinitrito, de aproximadamente 30% em relação ao controlo obtido na ausência do oxidante, que se acentua para aproximadamente 60%, ao fim de 1 hora (Fig. 4). A dissipação do potencial de membrana mitocondrial manteve-se então de

uma forma relativamente constante até às 6 horas após o tratamento das células com o peroxinitrito. De notar que o tempo 0 min é o tempo que corresponde ao final do tratamento das células com o peroxinitrito que é de 10 min, como descrito na secção 2.4. Dado as condições experimentais para a determinação do potencial de membrana mitocondrial (secção 2.7),



**Fig. 4** – O peroxinitrito dissipa o potencial da membrana mitocondrial. O potencial de membrana dos mitocondrios foi medido a vários tempos (30 a 360 min) em BAEC, como descrito em Materiais e Métodos, após o tratamento com peroxinitrito 500  $\mu$ M. Os pontos representam a média  $\pm$  SEM de 4 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\* $p < 0,01$  vs. controlo.

não foi possível avaliar este parâmetro no tempo 0 min. Subsequentemente, investigaram-se os efeitos do resveratrol na dissipação mitocondrial induzida 1 h após a estimulação das células com o peroxinitrito. Nenhuma das concentrações de resveratrol testadas protegeu as células da dissipação do potencial de membrana mitocondrial induzida pelo peroxinitrito, sugerindo que os efeitos protectores do resveratrol ao nível mitocondrial não ocorrerem por interferência do resveratrol com o poro de permeabilidade transitória, mas antes por outro mecanismo (Fig. 5). O resveratrol *per se* não tem efeito no potencial de membrana mitocondrial (dados não apresentados).

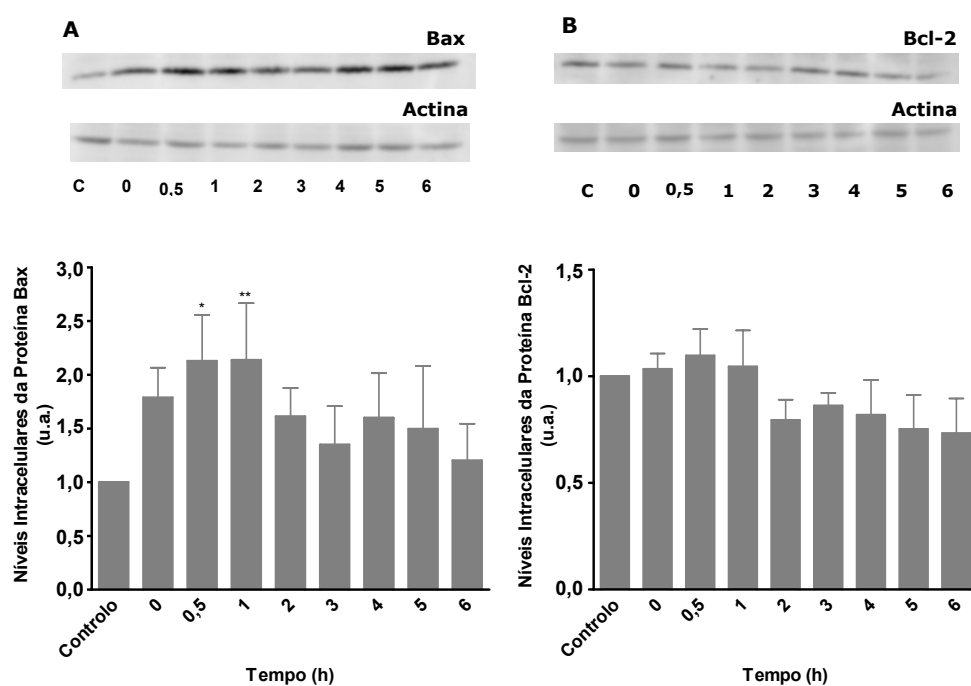


**Fig. 5** – O resveratrol não inibe a dissipação do potencial de membrana mitocondrial causada pelo peroxinitrito. O potencial de membrana mitocondrial foi medido 1 h após a incubação de 10 min com o peroxinitrito em células pré-incubadas com resveratrol 10 e 50 µM, como descrito em Materiais e Métodos. As barras correspondem à média ± SEM de 4 experiências independentes realizadas em duplicado. \*\* $p < 0,01$  vs. controle.

### **3.3 – O resveratrol aumenta os níveis intracelulares da proteína Bcl-2 diminuindo o quociente Bax/Bcl-2 aumentado pelo peroxinitrito**

Alternativamente ao poro de permeabilidade transitória tem sido proposto que as proteínas da família Bcl-2, reguladores importantes da apoptose em células de mamíferos, estariam implicadas na permeabilização da membrana externa mitocondrial (Sharpe et al., 2004). As proteínas da família Bcl-2 dividem-se em proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, etc) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, etc), desencadeando efeitos opostos nos mitocôndrios. O balanço entre as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas é, então, vital no controlo da sobrevivência celular. Por conseguinte, averiguou-se se o peroxinitrito modificava os níveis intracelulares das proteínas da família Bcl-2, nomeadamente da Bax e da Bcl-2. No final do tratamento das células com o peroxinitrito (tempo 0 min) observou-se um aumento dos níveis intracelulares da Bax de cerca de 80% relativamente ao obtido em células controle, incubadas na ausência do oxidante (Fig. 6A). No entanto, este aumento foi mais significativo e atingiu um valor máximo 30

min após o estímulo que se manteve até 1 hora após o tratamento com o peroxinitrito, observando-se um aumento nos níveis intracelulares da Bax de cerca de 120% relativamente ao observado nas células controlo. Contudo, este aumento não foi contínuo ao longo do tempo da experiência, i.e., para tempos superiores a 1 hora após o estímulo com o peroxinitrito os níveis de expressão da Bax diminuíram para valores que se mantiveram relativamente

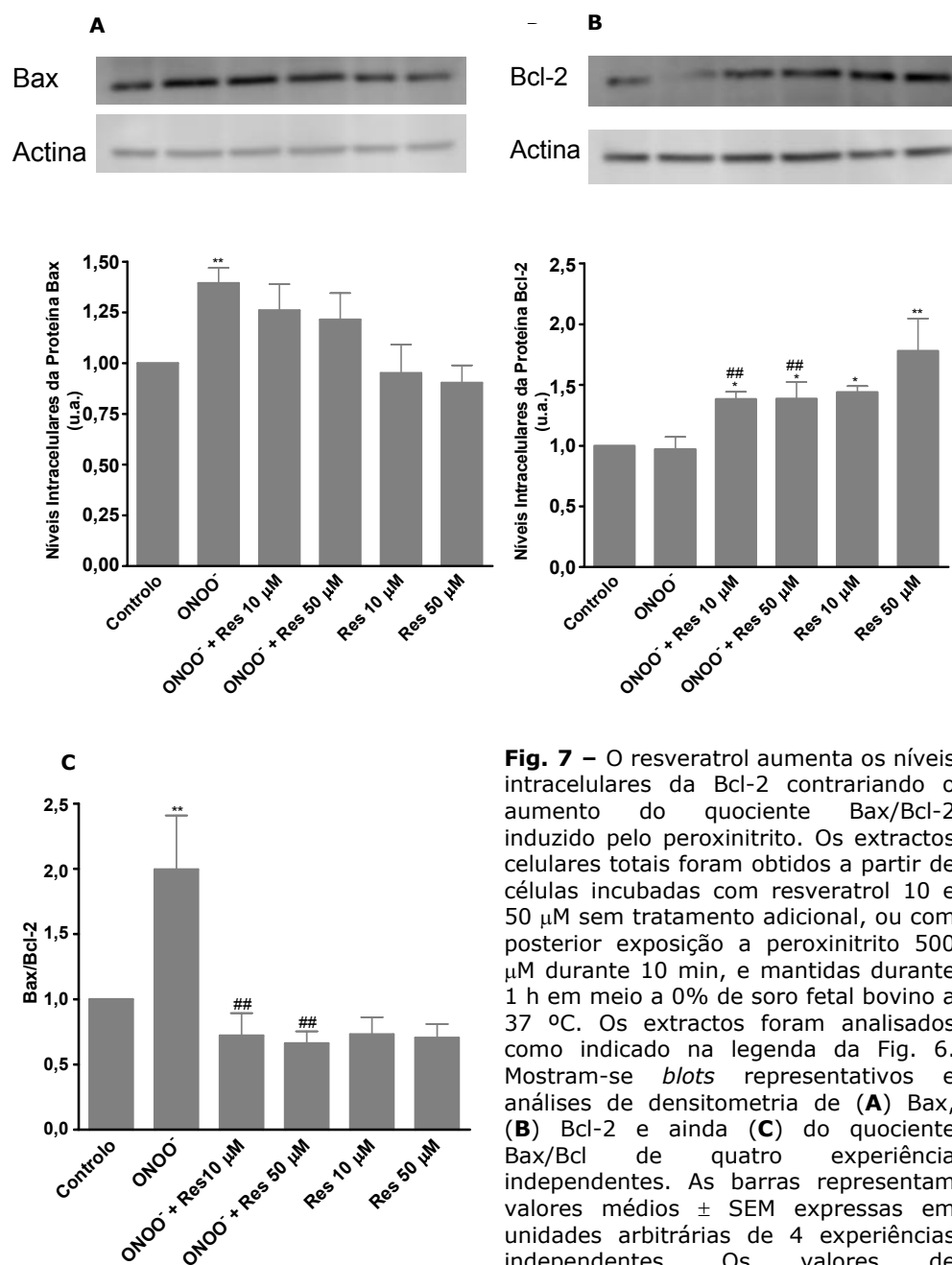


**Fig. 6** – O peroxinitrito aumenta os níveis intracelulares da Bax sem afectar os níveis intracelulares da Bcl-2. As BAEC foram tratadas com peroxinitrito 500  $\mu$ M e aos tempos indicados os extractos celulares totais foram analisados por *immunoblot* com anticorpos específicos contra (A) Bax e (B) Bcl-2, como descrito em Materiais e Métodos. Mostram-se *blots* representativos e análises de densitometria de quatro experiências independentes. As barras representam valores médios  $\pm$  SEM expressas em unidades arbitrárias de 4 experiências independentes. Os valores de densitometria foram normalizados tendo como referência os valores respectivos de actina. \*  $p < 0,05$  vs. controlo, \*\* $p < 0,01$  vs. controlo.

constantes até ao final da experiência. Paralelamente e contrariamente ao que aconteceu com os níveis intracelulares da Bax, os níveis de expressão da



Bcl-2 não foram significativamente alterados, ao longo do tempo, pelo peroxinitrito indicando que ele poderá iniciar a morte celular das BAEC por alterar o balanço existente entre a Bax e a Bcl-2 (Fig. 6B). Com efeito, ao aumentar os níveis de Bax sem alterar os níveis de Bcl-2 aumenta o quociente Bax/Bcl-2 favorecendo os níveis intracelulares das proteínas pró-apoptóticas relativamente às anti-apoptóticas. Atendendo a que a Bax e a Bcl-2 poderão ser elementos cruciais na morte celular induzida pelo peroxinitrito investigou-se a capacidade do resveratrol em modular os níveis intracelulares destas proteínas e, a ocorrer, se esta modulação seria capaz de reverter os efeitos mediados pelo peroxinitrito. Assim, os resultados obtidos indicaram que a incubação das células com resveratrol *per se*, durante 14 horas, não modificava os níveis intracelulares da Bax mas, surpreendentemente, a pré-incubação das células com resveratrol 10 e 50  $\mu\text{M}$  parecia ter tendência em inibir, ainda que numa forma não significativa, o aumento de cerca de 50% da Bax induzido pelo peroxinitrito (Fig. 7A). Relativamente à Bcl-2, o resveratrol *per se* aumenta os níveis de expressão desta proteína observando-se aumentos de cerca de 44% e de 78% de Bcl-2 em células incubadas durante 14 horas com resveratrol 10 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente, relativamente às células controlo (Fig. 7B). Quando paralelamente, as células foram estimuladas com peroxinitrito, os valores de expressão da Bcl-2 das células pré-incubadas com ambas as concentrações de resveratrol aumentaram, mantendo-se ainda cerca de 38% acima dos valores registados para as células controlo 1 hora após o estímulo (Fig. 7B). Analisando conjuntamente os resultados e tal como evidenciado no gráfico C da Fig. 7, o quociente Bax/Bcl-2 aumentou cerca de 100% 1 hora após o tratamento das células com o peroxinitrito relativamente ao controlo. A pré-incubação das células com ambas as concentrações de resveratrol reverteu completamente o efeito do peroxinitrito, reflectindo a diminuição do quociente Bax/Bcl-2 que ocorreu na presença do resveratrol sozinho (Fig. 7C). Em conclusão, estes resultados sugerem que ambas as concentrações de resveratrol testadas podem interferir com a via apoptótica mitocondrial



**Fig. 7** – O resveratrol aumenta os níveis intracelulares da Bcl-2 contrariando o aumento do quociente Bax/Bcl-2 induzido pelo peroxinitrito. Os extractos celulares totais foram obtidos a partir de células incubadas com resveratrol 10 e 50  $\mu$ M sem tratamento adicional, ou com posterior exposição a peroxinitrito 500  $\mu$ M durante 10 min, e mantidas durante 1 h em meio a 0% de soro fetal bovino a 37  $^{\circ}$ C. Os extractos foram analisados como indicado na legenda da Fig. 6. Mostram-se *blots* representativos e análises de densitometria de **(A)** Bax, **(B)** Bcl-2 e ainda **(C)** do quociente Bax/Bcl de quatro experiências independentes. As barras representam valores médios  $\pm$  SEM expressas em unidades arbitrárias de 4 experiências independentes. Os valores de densitometria foram normalizados tendo como referência os valores respectivos de actina. \*  $p < 0,05$  vs. controlo, \*\* $p < 0,01$  vs. controlo, ##  $p < 0,01$  vs. ONOO<sup>-</sup>.

desencadeada pelo peroxinitrito por modular os níveis intracelulares das proteínas da família Bcl-2.

#### **4 – Discussão**

Os mecanismos bioquímicos subjacentes à apoptose induzida pelo peroxinitrito em células endoteliais e à citoprotecção conferida pelo resveratrol não estão ainda totalmente esclarecidos. Anteriormente, demonstrámos que a concentração mais elevada de resveratrol protege da morte celular desencadeada pelo peroxinitrito por aumentar os níveis intracelulares de glutatião (Brito et al., 2006). Os resultados apresentados neste trabalho indicam vias que poderão estar implicadas na apoptose induzida pelo peroxinitrito, assim como revelam novos mecanismos citoprotectores do resveratrol.

Vários trabalhos existentes na literatura demonstram que em função do tipo celular e das concentrações utilizadas, o peroxinitrito pode induzir diversos tipos de morte celular, da apoptose, dependente ou independente de caspases, à necrose (Zhuang e Simon, 2000; Whiteman et al., 2004); (Szabo et al., 2007). Relativamente às células endoteliais, o trabalho pioneiro de Szabo e colaboradores descreveu alterações morfológicas e bioquímicas, que actualmente estão associadas a necrose não passiva (Szabo et al., 1997). Assim, foi descrito que o peroxinitrito induz uma clivagem nas cadeias de DNA seguida de activação da enzima nuclear PARP-1 cuja activação exacerbada pode induzir uma severa depleção energética e conseqüente necrose (Szabo et al., 1997; Virag et al., 2003). Posteriormente, foi demonstrado que o peroxinitrito também induz alterações morfológicas, nomeadamente condensação nuclear e citoplasmática, consistentes com a apoptose (Foresti et al., 1999; Brito et al., 2006). No entanto, as vias bioquímicas conducentes à apoptose desencadeada pelo peroxinitrito permanecem por elucidar. Os resultados obtidos neste trabalho, em que se observou activação das caspases, confirmam pela primeira vez a activação bioquímica da apoptose nas células endoteliais pelo peroxinitrito. As caspases, um dos

elementos-chave da maquinaria envolvida na apoptose, podem ser activadas extrinsecamente pelos receptores de morte ou intrinsecamente por factores apoptogénicos libertados dos mitocôndrios (Hengartner, 2000). A caspase-8 e a caspase-9, caspases iniciadoras da via de receptores de morte e da via mitocondrial, respectivamente, são capazes de activar caspases efectoras como a caspase-3 (Danial e Korsmeyer, 2004). A activação das três caspases indica que ambas as vias, a de receptores de morte e a mitocondrial são desencadeadas após tratamento das células com o peroxinitrito. De notar, que uma possível interacção entre as duas vias através de Bid não pode ser negligenciada e requer posterior elucidação. A activação das caspases observada em células tratadas com peroxinitrito, dificilmente se deverá a uma activação directa pelo peroxinitrito, uma vez que esta ocorre cerca de 3 horas após o tratamento das células com o peroxinitrito e aumenta até ao fim da experiência, ou seja, quando ele já não está presente. Além disso, para os períodos de tempo mais curtos observou-se, inclusive, uma inactivação das enzimas que será muito provavelmente devido a uma reacção directa do oxidante com o resíduo de Cys do local catalítico das enzimas.

A permeabilização da membrana externa mitocondrial é condição necessária para a libertação de factores apoptogénicos, incluindo o citocromo *c*, que se associa a Apaf-1 constituindo o apoptossoma que subsequentemente activa a caspase-9 (Kroemer e Reed, 2000). Tem sido proposto, que a permeabilização da membrana mitocondrial pode ser mediada através do poro de permeabilidade transitória (PTP, ***permeability transition pore***), que induz uma permeabilidade transitória mitocondrial (MPT, ***mitochondrial permeability transition***) ou através das proteínas da família Bcl-2 (Marchetti et al., 1996; Petit et al., 1998; Sharpe et al., 2004). Os nossos resultados sugerem que o peroxinitrito pode induzir a permeabilização da membrana externa mitocondrial, por modular os níveis intracelulares da Bax, sem alterar os níveis intracelulares da Bcl-2. A Bax é um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, que poderá permeabilizar a membrana externa mitocondrial por formar poros proteicos, poros lípidicos ou interagir com poros mitocondriais já existentes, como o PTP (Sharpe et al., 2004). A

acção da Bax pode ser antagonizada pela proteína anti-apoptótica Bcl-2 através da formação de heterodímeros. Desta forma, o quociente Bax/Bcl-2 determina o destino da célula em termos de sobrevivência e tipo de morte celular.

O papel do PTP na permeabilização da membrana externa mitocondrial e consequente activação da caspase-9 induzida pelo peroxinitrito em BAEC, nas nossas condições de estudo, não está totalmente esclarecido. A abertura do poro induz uma dissipação do potencial de membrana mitocondrial, seguida de intumescência mitocondrial e ruptura da membrana externa mitocondrial (Marchetti et al., 1996; Petit et al., 1998). Tal como descrito em vários trabalhos, no nosso modelo de estudo o peroxinitrito induziu uma rápida e substancial diminuição do potencial de membrana mitocondrial (Virag e Szabo, 2000; Choi et al., 2005; Li et al., 2006; Shacka et al., 2006). Por um lado, este efeito pode dever-se à permeabilidade transitória mitocondrial, processo que tem sido largamente descrito ocorrer em mitocôndrios isolados e que tem sido associado à capacidade do peroxinitrito oxidar os grupos sulfidrilos do resíduo de Cys da ANT (*mitochondrial inner membrane protein adenine nucleotide translocase*), uma das proteínas que compõem o PTP (Vieira et al., 2001). Por outro lado, a dissipação do potencial de membrana mitocondrial observada pode ser o resultado da inibição da cadeia respiratória, cujos diversos componentes são inibidos pelo peroxinitrito quer em mitocôndrios isolados quer em células ou pode ser consequência duma grave depleção energética (Cassina e Radi, 1996; Virag e Szabo, 2000; Radi et al., 2002). De realçar que a MPT não é um processo exclusivo da apoptose e que tem, nos últimos anos, sido observada durante a necrose (Gogvadze e Orrenius, 2006).

Recentemente, demonstrámos que uma pré-incubação longa das células com o resveratrol as protegia da morte celular induzida pelo peroxinitrito (Brito et al., 2006). Adicionalmente, propusemos que o aumento de GSH intracelular seria o mecanismo pelo qual a concentração mais elevada de resveratrol (50  $\mu$ M) conferiria citoprotecção, não tendo sido proposto qualquer mecanismo citoprotector para a concentração mais baixa (10  $\mu$ M). Este

trabalho fornece novos elementos que poderão ajudar a explicar os efeitos celulares para ambas as concentrações de resveratrol testadas, subjacentes aos efeitos protectores contra os danos celulares do peroxinitrito. Os resultados da avaliação da actividade das caspases indicam que o resveratrol exerce os seus efeitos benéficos por interferir preferencialmente com a via mitocondrial do que com a via dos receptores de morte. A inibição da via apoptótica mitocondrial pelo resveratrol está provavelmente relacionada com a sua capacidade em aumentar os níveis intracelulares da proteína anti-apoptótica Bcl-2, sem afectar os níveis da proteína pró-apoptótica Bax, diminuindo consideravelmente o quociente Bax/Bcl-2. O aumento de Bcl-2 foi também, recentemente, observado em corações de rato pré-condicionados farmacologicamente com resveratrol (Das et al., 2005). Este aumento de Bcl-2 pode constituir um importante mecanismo pelo qual o resveratrol protege as células da apoptose induzida pelo peroxinitrito. De facto, estudos recentes demonstraram que a sobre-expressão de Bcl-2 inibe a apoptose mas não a necrose induzida pelo peroxinitrito (Virag e Szabo, 2000; Vieira et al., 2001; Shacka et al., 2006). Enquanto a Bcl-2 inibe, por exemplo, a activação das caspases mediada pelo peroxinitrito, ela não afecta a dissipação de potencial da membrana mitocondrial associada à necrose não passiva (Virag e Szabo, 2000). A ausência de efeitos significativos do resveratrol na diminuição do potencial de membrana mitocondrial desencadeada pelo peroxinitrito sugere que esta diminuição poderá não estar implicada na apoptose e parece reforçar a ideia de que os efeitos citoprotectores do resveratrol são mediados através da modulação das proteínas da família Bcl-2. O mecanismo pelo qual o resveratrol afecta os níveis intracelulares da Bcl-2 não foi objectivo deste estudo considerando-se contudo que a sua elucidação é importante. De salientar e como já referido anteriormente, de que mesmo que a dissipação do potencial de membrana mitocondrial seja consequência da MPT, que esta também se pode traduzir em necrose e não em apoptose. Nas nossas condições experimentais é provável que ambos os tipos de morte estejam a ser iniciados em simultâneo e que a dissipação do potencial de membrana mitocondrial observada seja um somatório de efeitos diferentes do

peroxinitrito, com consequências apoptóticas ou necróticas, nos mitocôndrios. No conjunto, o resveratrol à semelhança da Bcl-2, surgiria como um composto capaz de proteger as células da apoptose mas não da necrose induzida pelo peroxinitrito.

De realçar, que estes efeitos do resveratrol não são observados apenas para a concentração mais elevada de resveratrol testada (50  $\mu\text{M}$ ) e capaz de aumentar os níveis de GSH intracelular. Eles são também observados para a concentração mais baixa (10  $\mu\text{M}$ ). Esta concentração mais baixa não actuará indirectamente como um antioxidante aumentando as defesas antioxidantes das células, mas antes através duma regulação da sinalização celular modulando os níveis intracelulares das proteínas da família da Bcl-2. Uma vez mais se frisa que os efeitos do resveratrol não podem ser atribuídos a reacções directas com o peroxinitrito, uma vez que o resveratrol não está presente durante o tratamento das células com o peroxinitrito. Portanto, a protecção conferida pelo resveratrol contra os danos celulares mediados pelo peroxinitrito são putativamente consequência dos seus efeitos celulares, nomeadamente, a nível de modulação de proteínas, moléculas e factores de transcrição, entre outros.

Por outro lado, a maioria dos estudos descrevem efeitos do resveratrol opostos aos observados neste trabalho, isto é, efeitos pró-apoptóticos e de activação das caspases pelas duas vias (Virag et al., 1998; Zhuang e Simon, 2000). Estas diferenças devem-se essencialmente aos diferentes tipos celulares, uma vez que o resveratrol tem efeitos específicos consoante o tipo de célula e às concentrações utilizadas, que são superiores nesses estudos às por nós utilizadas. As concentrações de resveratrol utilizadas neste estudo não são citotóxicas para as BAEC (dados não apresentados), tendo-se trabalhado com concentrações tão baixas quanto possível de modo a que fossem expressão das quantidades de resveratrol que podem ser absorvidas a partir do consumo moderado do vinho tinto.

Em conclusão, este estudo confirma uma via bioquímica apoptótica na morte celular induzida pelo peroxinitrito e expande o nosso conhecimento

acerca de mecanismos celulares envolvidos nos efeitos citoprotectores do resveratrol. Os nossos resultados demonstram que concentrações de resveratrol tão baixas quanto 10  $\mu$ M inibem os processos subjacentes à apoptose desencadeada pelo peroxinitrito. O resveratrol interfere preferencialmente com a via mitocondrial, em alternativa à via de receptores de morte, através do aumento dos níveis intracelulares da Bcl-2. Em suma, este estudo reforça o conhecimento de que os efeitos do resveratrol não se limitam à sua acção antioxidante, exercendo-se também através de mecanismos de sinalização celulares. Dado que as concentrações de resveratrol atingidas *in vivo* são relativamente baixas, torna-se difícil compreender que possa exercer os seus efeitos biológicos através de acção antioxidante directa, pelo que a modulação da sinalização celular observada neste trabalho reforça o papel cardioprotector do resveratrol.



## Bibliografia

- Beckmann J. S., Ye Y. Z., Anderson P. G., Chen J., Accavitti M. A., Tarpey M. M. e White C. R. (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem.Hoppe Seyler*. **375**, 81-88.
- Brito P., Almeida L. M. e Dinis T. C. (2002) The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic.Res.* **36**, 621-631.
- 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**, 157-166.
- Cai H. e Harrison D. G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* **87**, 840-844.
- Cassina A. e Radi R. (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch.Biochem.Biophys.* **328**, 309-316.
- Choi J. W., Yoo B. K., Ryu M. K., Choi M. S., Park G. H. e Ko K. H. (2005) Adenosine and purine nucleosides prevent the disruption of mitochondrial transmembrane potential by peroxynitrite in rat primary astrocytes. *Arch.Pharm.Res.* **28**, 810-815.
- Choy J. C., Granville D. J., Hunt D. W. e McManus B. M. (2001) Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol.Cell Cardiol.* **33**, 1673-1690.
- Cooke J. P. (2003) Flow, NO, and atherogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 768-770.
- Danial N. N. e Korsmeyer S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell.* **116**, 205-219.
- Das S., Cordis G. A., Maulik N. e Das D. K. (2005) Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H328-H335.
- 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**, 531-543.
- Foresti R., Sarathchandra P., Clark J. E., Green C. J. e Motterlini R. (1999) Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem.J.* **339**, 729-736.
- Frankel E. N., Waterhouse A. L. e Kinsella J. E. (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* **341**, 1103-1104.
- Gogvadze V. e Orrenius S. (2006) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem.Biol Interact.* **163**, 4-14.
- Hansson G. K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* **352**, 1685-1695.
- Hengartner M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407**, 770-776.
- Ischiropoulos H. e al Mehdi A. B. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* **364**, 279-282.

- Kroemer G. e Reed J. C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat.Med.* **6**, 513-519.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Leeuwenburgh C., Hardy M. M., Hazen S. L., Wagner P., Oh-ishi S., Steinbrecher U. P. e Heinecke J. W. (1997) Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem.* **272**, 1433-1436.
- Li M. H., Cha Y. N. e Surh Y. J. (2006) Carbon monoxide protects PC12 cells from peroxynitrite-induced apoptotic death by preventing the depolarization of mitochondrial transmembrane potential. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **342**, 984-990.
- Liu Y. e Liu G. (2004) Isorhapontigenin and resveratrol suppress oxLDL-induced proliferation and activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases of bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem.Pharmacol.* **67**, 777-785.
- Marchetti P., Castedo M., Susin S. A., Zamzami N., Hirsch T., Macho A., Haefner A., Hirsch F., Geuskens M. e Kroemer G. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp.Med.* **184**, 1155-1160.
- Pace-Asciak C. R., Hahn S., Diamandis E. P., Soleas G. e Goldberg D. M. (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin.Chim.Acta.* **235**, 207-219.
- Petit P. X., Gubern M., Diolez P., Susin S. A., Zamzami N. e Kroemer G. (1998) Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* **426**, 111-116.
- 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**, 481-487.
- Radi R., Cassina A. e Hodara R. (2002) Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem.* **383**, 401-409.
- Riedl S. J. e Salvesen G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**, 405-413.
- Ross R. (1999) Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126.
- Salgo M. G., Stone K., Squadrito G. L., Battista J. R. e Pryor W. A. (1995) Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **210**, 1025-1030.
- Scaduto R. C., Jr. e Grotyohann L. W. (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys.J.* **76**, 469-477.
- 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**, 1506-1514.
- Sharpe J. C., Arnoult D. e Youle R. J. (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim.Biophys.Acta.* **1644**, 107-113.

- Siemann E. H. e Creasy L. L. (1992) Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *Am.J.Enol.Vitic.* **43**, 49-52.
- Szabo C., Cuzzocrea S., Zingarelli B., O'Connor M. e Salzman A. L. (1997) Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin.Invest.* **100**, 723-735.
- Szabo C., Ischiropoulos H. e Radi R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat.Rev.Drug Discov.* **6**, 662-680.
- Uppu R. M. e Pryor W. A. (1996) Biphasic synthesis of high concentrations of peroxynitrite using water-insoluble alkyl nitrite and hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* **269**, 322-329.
- Vieira H. L., Belzacq A. S., Hauouzi D., Bernassola F., Cohen I., Jacotot E., Ferri K. F., El Hamel C., Bartle L. M., Melino G., Brenner C., Goldmacher V. e Kroemer G. (2001) The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene.* **19**;20, 4305-4316.
- 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**, 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**, 704-713.
- Virag L., Szabo E., Gergely P. e Szabo C. (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol.Lett.* **140-141:113-24.**, 113-124.
- Whiteman M., Armstrong J. S., Cheung N. S., Siau J. L., Rose P., Schantz J. T., Jones D. P. e Halliwell B. (2004) Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. *FASEB J.* **18**, 1395-1397.
- Zhuang S. e Simon G. (2000) Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *Am.J Physiol Cell Physiol.* **279**, C341-C351.



## **Capítulo 4**

### **As LDL oxidadas activam a via de sinalização de mTOR: inibição pelo resveratrol**

Paula M. Brito<sup>1</sup>, Leonor M. Almeida<sup>1</sup>, Teresa C.P. Dinis<sup>1</sup>, Robert Salvayre<sup>2</sup>,  
Anne Nègre-Salvayre<sup>2</sup> e Nathalie Augé<sup>2</sup>

1 – Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade de  
Coimbra e Centro de Neurociências, Universidade de Coimbra, Coimbra,  
Portugal.

2 – INSERM-U858, Institut Louis Bugnard CHU Rangueil, Toulouse, France.



## Resumo

A proliferação das células musculares lisas (SMC) é um dos processos subjacentes à formação das lesões fibrosas ateroscleróticas, no qual se pensa que as LDLox tenham um papel crucial, dado que *in vitro* apresentam actividade mitogénica. Esta actividade parece ser modulada através da activação da via das MAPK e da via receptor EGF/PI3K/Akt(PKB). No entanto, permanecem por esclarecer os efeitos das LDLox a jusante de Akt/PKB, nomeadamente a nível da mTOR. O resveratrol é um dos constituintes do vinho tinto que se crê ser responsável pelos benefícios cardiovasculares do consumo moderado de vinho tinto. Neste trabalho pretendeu-se averiguar (1) se mTOR estaria envolvida na actividade mitogénica das LDLox; (2) os putativos efeitos anti-proliferativos do resveratrol, assim como os mecanismos moleculares subjacentes. A proliferação das SMC induzida pelas LDLox é inibida pela rapamicina, um inibidor da mTOR, sugerindo o envolvimento deste nos efeitos proliferativos das LDL. Este facto é complementado pelo aumento da fosforilação da mTOR e do seu alvo a jusante, p70S6K1. Adicionalmente, a ausência de efeitos da rapamicina e de Ly294002, um inibidor de PI3K, na fosforilação de ERK1/2 induzida pelas LDLox e os efeitos inibitórios de PD98059, um inibidor de MEK1/2, na fosforilação de mTOR e de p70S6K1 indicam que a via ERK1/2 pode influenciar a de mTOR, mas que o contrário não ocorrerá. O resveratrol inibe a proliferação das SMC induzida por LDLox, num mecanismo independente de ERK1/2, uma vez que ele não foi capaz de inibir a sua fosforilação. Além disso, o resveratrol inibiu a fosforilação de mTOR e de p70S6K1 sugerindo que os seus efeitos são modulados através desta via. No conjunto, estes resultados indicam (1) que as LDL oxidadas exercem os seus efeitos mitogénicos, em parte, através da activação da via mTOR e (2) que a actividade anti-proliferativa do resveratrol é consequência de uma interferência na via de mTOR, mas de uma forma independente de ERK1/2.

## 1 – Introdução

A proliferação das células musculares lisas (SMC, *smooth muscle cells*) do tecido vascular é um processo chave na patogénese da aterosclerose, estando na base da formação das lesões fibrosas, um importante marcador biológico da doença (Lusis, 2000; Dzau *et al.*, 2002). Neste contexto, pensa-se que as lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) desempenham um papel central na aterosclerose, pois *in vitro* desencadeiam vários processos cruciais na aterogénese, incluindo a proliferação das células musculares lisas (Berliner e Heinecke, 1996). As LDLox exercem os seus efeitos mitogénicos através da activação da sinalização mediada por esfingolípidos que culmina na activação das MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) e através da via do receptor de EGF/PI3K/Akt(PKB) (Chatterjee *et al.*, 1996; Augé *et al.*, 1998; Augé *et al.*, 2002). As vias ras e PI3K (*phosphoinositide 3-kinases*) convergem no alvo da rapamicina presente em células de mamíferos (mTOR, *mammalian target of rapamycin*), uma Ser/Thr cinase que existe em dois complexos designados por mTORC1 e mTORC2 e que está implicada nos aspectos temporais e espaciais do crescimento celular, controlando por exemplo, a tradução e a progressão do ciclo celular através da fosforilação das proteínas da família 4EBP1 (*4E-binding protein 1*) e das cinases S6 (Shawn e Cantley, 2006; Wullschlerger *et al.*, 2006). A activação da mTOR através de PI3K envolve inactivação por Akt/PKB do complexo hamartina (TSC1)/tuberina(TSC2) (TSC, *tuberous sclerosis complex*) (Dan *et al.*, 2002; Manning e Cantley, 2003). Este heterodímero regula negativamente mTOR inibindo Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), uma proteína G pequena que se pensa ser o activador directo da mTOR através de um mecanismo ainda desconhecido (Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Além disso, Akt/PKB é também capaz de fosforilar directamente mTOR ao nível da Ser2448 e da Thr2446 (Navé *et al.*, 1999; Sekulic *et al.*, 2000). Por outro lado, o TSC pode ser inactivado através da fosforilação da tuberina pela via de ERK (Ma *et al.*, 2005). Deve salientar-se, que a complexidade desta via pode ainda ser aumentada pela



presença de mecanismos de *cross-talk* e de retroacção positiva. De facto, p70S6K1, uma proteína ribossomal a jusante de mTOR fosforila directamente mTOR, e mTORC2 foi recentemente implicada na fosforilação da Ser473 de Akt/PKB (PKB, **protein kinase B**) e consequentemente na sua activação completa (Chiang e Abraham, 2005; Holz e Blenis, 2005; Sarbassov et al., 2005). Ainda que mTOR esteja implicada na etiologia das doenças cardiovasculares e em particular na hipertrofia cardíaca, o seu papel na aterosclerose e na mitogénese das células musculares lisas induzida pela LDLox é ainda desconhecido (Proud, 2004). Um melhor conhecimento das vias envolvidas no estímulo da proliferação das células musculares lisas induzida pelas LDLox permitirá identificar novos alvos com potencial farmacológico.

O resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno) é uma fitoalexina natural presente nas uvas e vinho. Tal como atrás já foi referido, os conhecimentos que têm vindo a ser adquiridos ao longo dos últimos anos atribuem ao resveratrol funções biológicas diversas, tais como, funções antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-trombóticas e anti-proliferativas, que o implicam como o agente responsável pela cardioprotecção observada em consumidores moderados de vinho tinto. (Frankel et al., 1993; Pace-Asciak et al., 1995 ; Brito et al., 2002 ; Liu e Liu, 2004; Brito et al., 2006). Os mecanismos moleculares e as vias de sinalização responsáveis pela capacidade do resveratrol inibir a proliferação das células musculares lisas parece depender do tipo de estímulo e do tipo de célula. Neste sentido, o resveratrol inibe a fosforilação de ERK1/2 na presença de TNF- $\alpha$ , angiotensina II e LDLox, mas não na presença de soro ou factor de crescimento epidérmico (EGF, **epidermal growth factor**) (Haider et al., 2002; Haider et al., 2003; Li e Li, 2004; Lee e Moon, 2005; Godichaud et al., 2006). Para além disso, o resveratrol interrompe a via Akt/PKB quando o estímulo usado é a angiotensina II, o EGF e o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, **platelet derived growth factor**), mas não quando é soro (Haider et al., 2002; Godichaud et al., 2006). Liu e Liu mostraram que o resveratrol inibe a proliferação das células musculares lisas mediada pelas LDLox ao reduzir a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, **reactive oxygen species**) e a activação da via

ERK1/2 (Liu e Liu, 2004). No entanto, a informação acerca dos efeitos do resveratrol noutras vias de sinalização implicadas na proliferação das células musculares lisas mediada pelas LDLox é ainda escassa.

Assim, neste trabalho tivemos como objectivos (1) investigar o papel da mTOR na proliferação das células musculares lisas mediada pelas LDLox e (2) investigar os putativos efeitos anti-proliferativos do resveratrol nesta via e explorar os respectivos mecanismos moleculares.

Os resultados obtidos mostraram pela primeira vez que (1) a via de sinalização da mTOR está envolvida nos efeitos mitogénicos das LDLox, e que (2) o resveratrol inibe a proliferação das células musculares lisas estimulada pelas LDLox através da inibição da via mTOR e independentemente da via ERK1/2.

## **2 - Materiais e Métodos**

### **2.1 - Materiais**

Para a cultura de células, soro fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*), tampão fosfato salino de Dulbecco (DPBS, *Dulbecco's phosphate-buffered saline*) pH=7,4 e meio de cultura RPMI-1640 foram adquiridos à GIBCO-Invitrogen (Barcelona, Espanha). A timidina foi adquirida à Amersham (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). O resveratrol foi adquirido à Extrasynthèse (Genay, França). Ly294002, PD98059 e a rapamicina foram obtidos da Calbiochem (Darmstadt, Alemanha). Anticorpos policlonais primários de coelho contra a mTOR fosforilada (Ser2448) e p70S6K fosforilada (Thr389) foram adquiridos à Cell Signaling (Beverly, MA, EUA); MAPK activa da Promega (Madison, WI, EUA); e ERK2 à Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). O anticorpo secundário contra anticorpos de coelho foi adquirido à Abcam (Cambridge, Reino Unido). Todos os outros reagentes foram adquiridos à Sigma Chemicals (St Louis, MO) ou Merck (Darmstadt, Alemanha) e foram de pureza adequada aos ensaios a realizar.

## **2.2 – Cultura de células e tratamento das células com as LDL oxidadas e inibidores**

As células musculares lisas femorais de coelho (ATCC, EUA) cresceram em frascos de cultura T-75 em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml a 37 °C numa incubadora com atmosfera humidificada e com 5% de CO<sub>2</sub>. Para os ensaios, as células foram semeadas a uma densidade celular de 3000 células por cm<sup>2</sup> em caixas de 24 poços (ensaios de proliferação) ou caixas de petri de 10 cm (ensaios de *immunoblot*) e cresceram em meio contendo FBS durante 24 h. O meio foi então removido, as células lavadas uma vez com DPBS e privadas de soro durante 24 horas. Findo esse tempo, as células foram pré-incubadas com as concentrações indicadas de resveratrol, Ly294002 ou rapamicina durante 30 min e subsequentemente com LDLox por diferentes tempos, como indicado em cada uma das experiências.

## **2.3 – Preparação e oxidação das LDL**

As lipoproteínas de baixa densidade humanas foram isoladas a partir de plasma fresco por ultracentrifugação em gradiente de densidade e armazenadas a 4 °C em atmosfera de azoto, como descrito anteriormente (Vieira et al., 1996). As LDL foram oxidadas através da irradiação com luz UV-C, e a extensão da oxidação avaliada pela formação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*), como descrito anteriormente (Steinbrecher et al., 1984). Nas condições da experiência, obtiveram-se LDLox contendo 2,5 a 6 nmoles TBARS/mg protein. A proteína das LDL foi quantificada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

## **2.4 – Incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina**

A síntese de DNA foi avaliada, através da incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina, 24 h após o tratamento das células com LDLox. Doze horas antes do final de cada experiência, as células foram marcadas com [<sup>3</sup>H] timidina (0,5 µCi/ml) e

a incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina foi realizada de acordo com Augé e colaboradores (1998).

### **2.5 – Immunoblot**

A fosforilação das ERK1/2, da mTOR e da p70S6K1 foi analisada ao longo do tempo (30, 60, 120 e 180 min) depois do estímulo com LDLox na ausência ou na presença de resveratrol, PD098059, Ly294002 ou rapamicina. Os extractos celulares proteicos totais foram obtidos após lise da suspensão celular num tampão de lise a 4 °C [HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glicerol 10% (p/v), desoxicolato de sódio 0,5% (p/v), Triton X-100 (v/v), PMSF 1 mM, mistura de inibidores de proteases 1/100 (v/v), NaVO<sub>4</sub> 1 mM, β-glicerofosfato 10 mM, NaF 5 mM] durante 20 min, fazendo vórtex de 5 em 5 min. Os lisados foram centrifugados a 16000xg durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi, então, recolhido e guardado a -80 °C, após a determinação da proteína pelo método de Bradford, recorrendo para o efeito a um conjunto de reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). Quantidades idênticas de proteína dos extractos celulares totais (25 – 30 µg) foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida a 6% (mTOR) ou a 10% (ERK1/2, p70S6k) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e com uma intensidade de corrente constante de 20 mA por gel (Laemmli, 1970). Após separação, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 2 horas a 200 mA ou durante a noite a 30 V (mTOR). Para evitar ligações não específicas dos anticorpos às membranas, estas foram imersas durante 1 h à temperatura ambiente com leite magro em pó 5% (p/v) em tampão TBS-T [Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)]. As membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários contra ERK1/2 fosforilada (1:2500), mTOR fosforilada (1:1000) e p70S6K1 fosforilada (1:1000). Depois de cinco lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários ligados à fosfatase alcalina durante 1 h à temperatura ambiente. Os anticorpos foram diluídos de acordo com as instruções do fabricante. A detecção das proteínas foi feita após reacção

enzimática utilizando um substrato fluorescente (ECF, *enhanced chemifluorescence*) de acordo com as instruções do fabricante (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), tendo a visualização sido efectuada no sistema de imagem VersaDoc (BioRad, Hércules, CA, EUA). O controlo da quantidade de proteína em cada poço foi realizado com a coloração com Ponceau S (mTOR fosforilada) ou com marcação contra ERK-2 (ERK1/2 fosforilada e p70S6K fosforilada).

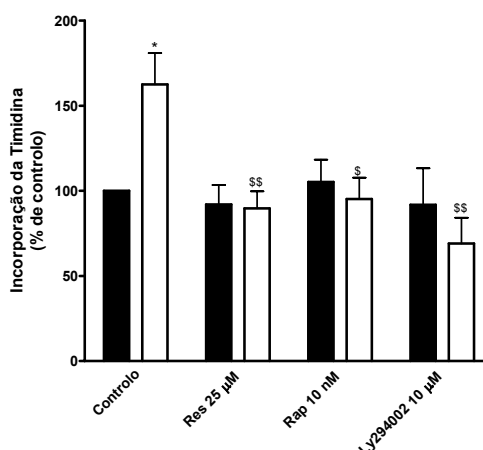
## **2.6 – Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *one-way analysis of variance* seguida do teste de Tukey ou de Dunnet. O valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **3 – Resultados**

### **3.1 – As LDL oxidadas estimulam a proliferação de células musculares lisas**

Sabe-se que concentrações não tóxicas de LDLox modulam a proliferação das células musculares lisas (Augé et al., 1995). Neste estudo começou-se por investigar a proliferação das células musculares lisas estimulada pelas LDLox (Fig. 1). Observou-se um aumento da incorporação da [<sup>3</sup>H] timidina de cerca de 60% em células incubadas com LDLox 50  $\mu$ g/mL (Fig. 1). Este aumento foi bloqueado por concentrações baixas de rapamicina (10 nM), um inibidor da mTOR, e de Ly294002 (10  $\mu$ M), um inibidor da PI3K (Fig. 1,

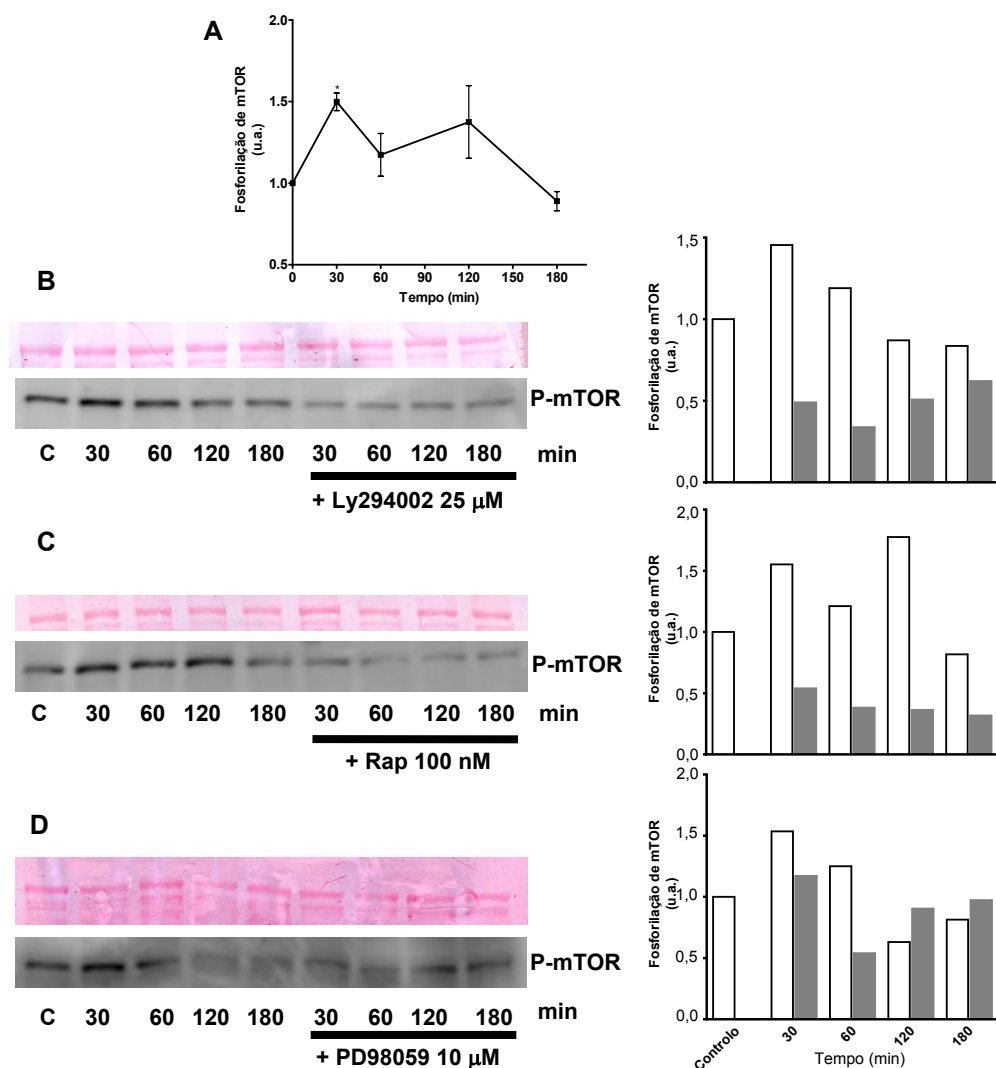


**Fig. 1** – Efeito dos inibidores da mTOR (Rap), da PI3K (Ly294002) e do resveratrol na proliferação de SMC sem estimulação prévia (barras pretas) ou estimuladas por LDLox (barras brancas). SMC mantidas na ausência de soro foram pré-incubadas durante 30 min com resveratrol, Ly294002 ou rapamicina nas concentrações indicadas e de seguida estimuladas com LDLox (barras brancas) durante 24 h. A incorporação da [<sup>3</sup>H] timidina foi medida como descrito nos Materiais e Métodos. As barras indicam o valor médio ± SEM de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. \*p<0,05 vs controlo; \$p<0,05 vs LDLox; \$\$p<0,01 vs LDLox.

barras brancas), que por si só não tiveram quaisquer efeitos na proliferação de células não estimuladas (barras pretas). No seu conjunto, estas observações sugerem, que a proliferação induzida por LDLox utiliza as vias de sinalização da mTOR e da PI3K.

### 3.2 – As LDL oxidadas estimulam a via da mTOR

Com base no resultado anterior, investigou-se o envolvimento da mTOR na proliferação induzida por LDLox, através da observação da fosforilação da mTOR na Ser2448, durante o período inicial do processo. Um aumento de 50% na fosforilação da mTOR foi medido 30 min após o estímulo das células musculares lisas com LDLox (Fig. 2A). Um segundo pico na fosforilação da mTOR, correspondendo a cerca de 40% de aumento, foi observado aos 120 min, sugerindo que as LDLox induzem a fosforilação de mTOR de um modo



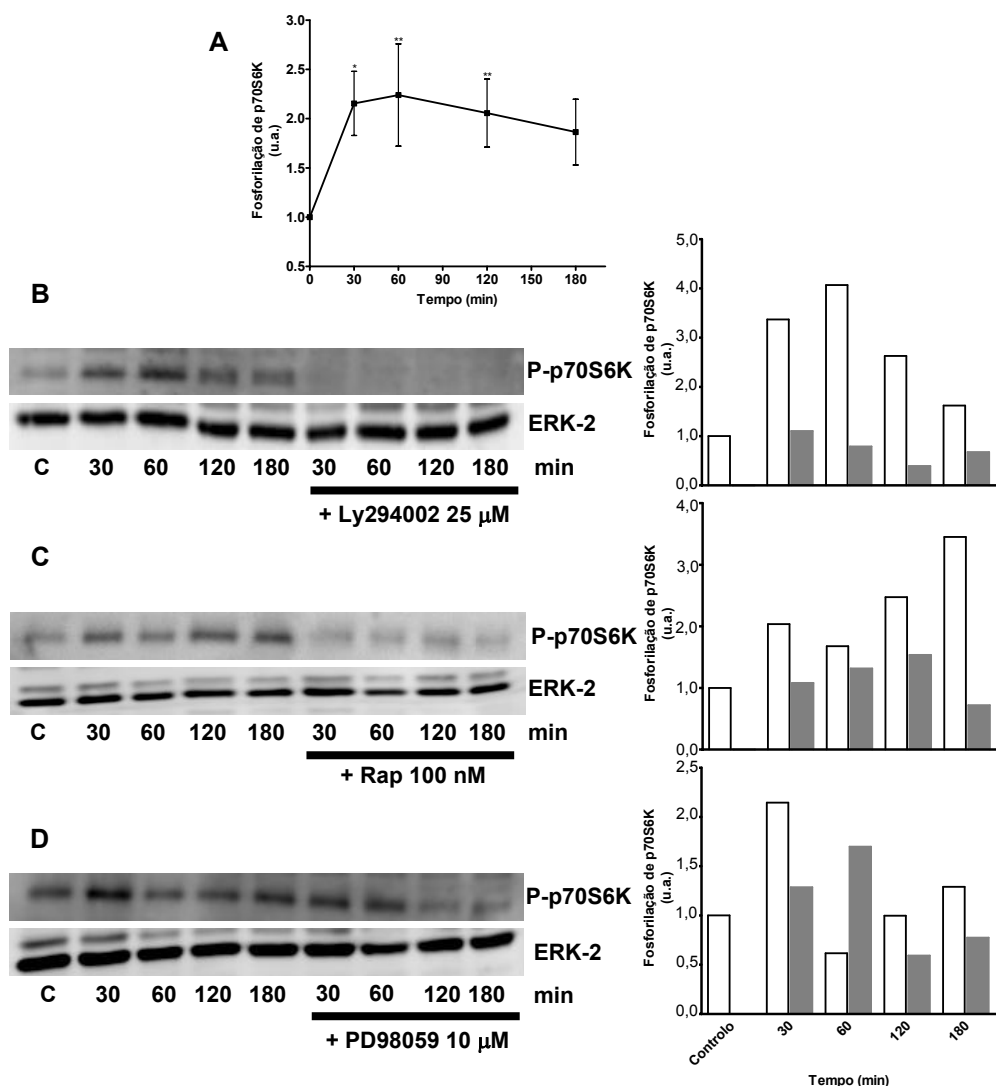
**Fig. 2** – As LDLox induzem fosforilação da mTOR– efeito dos inibidores das PI3K (Ly294002), mTOR (Rap) e ERK1/2 (PD98059). SMC mantidas na ausência de FBS foram pré-incubadas durante 30 min com rapamicina, Ly294002 ou PD98059 nas concentrações indicadas e subsequentemente estimuladas com LDLox 50  $\mu$ g/ml durante 30 a 180 min. Os extractos proteicos foram analisados com anticorpo específico para mTOR fosforilado na Ser2448. **(A)** Análise quantitativa por densitometria da fosforilação da mTOR após estímulo das SMC com LDLox. *Blots* representativos e respectiva análise quantitativa, por densitometria, na presença de Ly294002 **(B)**, rapamicina **(C)** ou PD98059 **(D)** de quatro experiências independentes (barras brancas – LDLox; barras cinzentas – LDLox + inibidores). A barra controlo representa as células não estimuladas. Efectuou-se o controlo da quantidade de proteína com coloração com ponceau S. Os pontos indicam o valor médio  $\pm$  SEM de pelo menos 4 experiências independentes. \* $p < 0,05$  vs controlo.

oscilatório (Fig. 2A). O inibidor da PI3K, Ly294002 bloqueou drasticamente a fosforilação da mTOR para todos os tempos analisados (Fig. 2B). O Ly294002 inibe indirectamente a Akt/PKB, uma das cinases responsável pela fosforilação de mTOR, através da ligação reversível ao local catalítico da PI3K (Navé et al., 1999; Sekulic et al., 2000). A rapamicina (Fig. 2C) também inibiu significativamente a fosforilação da mTOR. A rapamicina forma um complexo com a FKBP12, que inibe directamente a actividade da mTOR e, conseqüentemente, a sinalização a jusante, incluindo p70S6K1, a segunda cinase identificada como sendo responsável pela fosforilação da mTOR (Chiang e Abraham, 2005; Holz e Blenis, 2005).

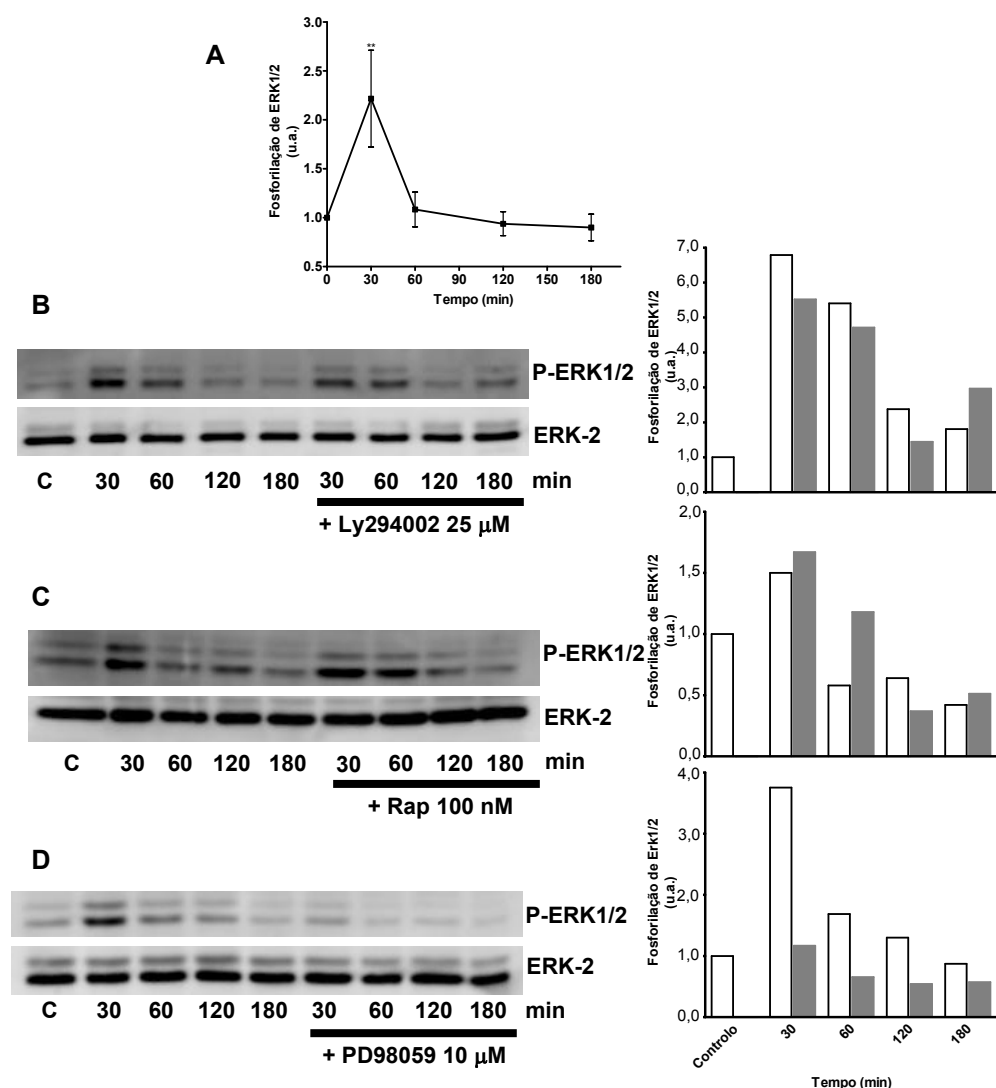
O papel da fosforilação da Ser2448 da mTOR é ambíguo, podendo activar ou inactivar mTOR, dependendo do ambiente celular (Wullschleger et al., 2006). Para confirmar que a fosforilação da Ser2448 da mTOR induzida pelas LDLox activou de facto esta cinase, mediu-se a fosforilação de um dos alvos a jusante de mTOR, p70S6K1, o qual é responsável pela tradução e síntese proteicas. As LDLox induziram um aumento rápido e sustentado de 100% na fosforilação da Thr389 de p70S6K1 (Fig. 3A). Esta fosforilação é dependente da mTOR e portanto, uma vez que tanto o Ly294002 como a rapamicina inibiram a sua fosforilação (Fig. 2), poder-se-ia esperar que estes inibidores também inibissem a fosforilação de p70S6K1, o que foi de facto observado (Fig. 3B e C) (Burnett et al., 1998; Shaw e Cantley, 2006). A fosforilação da p70S6K1 parece ser mais sustentada do que a da mTOR (comparar Fig. 3A com Fig. 2A), o que pode indicar que outros mecanismos para além da fosforilação da mTOR podem ser responsáveis pela activação da mTOR. Em particular, as LDLox poderão inactivar TSC, o efector negativo de Rheb que modula positivamente mTOR (Inoki et al., 2003; Tee et al., 2003; Li et al., 2004).

A análise conjunta destes resultados sugere, que a proliferação de SMC dependente de LDLox é mediada por mTOR.





**Fig. 3** – As LDLox induzem fosforilação de p70S6K– efeito dos inibidores da PI3K (Ly294002), da mTOR (Rap) e da ERK1/2 (PD98059). SMC mantidas na ausência de soro foram pré-incubadas durante 30 min com rapamicina, Ly294002 ou PD98059 nas concentrações indicadas e subsequentemente estimuladas com LDLox 50 µg/ml durante 30 a 180 min. Os extractos proteicos totais foram analisados por *immunoblot* com anticorpo específico para p70S6K fosforilada na Thr389. **(A)** Análise quantitativa por densitometria, da fosforilação da p70S6K após estímulo das SMC com LDLox. *Blots* representativos e respectiva análise quantitativa por densitometria, na presença de Ly294002 **(B)**, rapamicina **(C)** ou PD98059 **(D)** de quatro experiências independentes (barras brancas – LDLox; barras cinzentas – LDLox + inibidores). A barra controle representa as células não estimuladas. Todos os valores de densitometria foram normalizados relativamente à respectiva ERK2. Os pontos indicam o valor médio  $\pm$  SEM de pelo menos 4 experiências independentes. \* $p < 0,05$  vs controle.



**Fig. 4** – Efeito dos inibidores da PI3K (Ly294002), da mTOR (Rap) e da ERK1/2 (PD98059) na fosforilação da ERK1/2 induzida por LDLox. SMC mantidas na ausência de soro foram pré-incubadas durante 30 min com rapamicina, Ly294002 ou PD98059 nas concentrações indicadas e subsequentemente estimuladas com LDLox 50  $\mu$ g/ml durante 30 a 180 min. Os extractos proteicos totais foram analisados por *immunoblot* com anticorpo específico para a fosforilação da ERK1/2. **(A)** Análise quantitativa, por densitometria, da fosforilação da ERK1/2 após estímulo das SMC com LDLox. *Blots* representativos e respectiva análise quantitativa por densitometria na presença de Ly294002 **(B)**, rapamicina **(C)** ou PD98059 **(D)** nas concentrações indicadas, de quatro experiências independentes (barras brancas – LDLox; barras cinzentas – LDLox + inibidores). A barra controlo representa as células não estimuladas. Todos os valores de densitometria foram normalizados relativamente à respectiva ERK2. Os pontos indicam o valor médio  $\pm$  SEM de pelo menos 4 experiências independentes. \* $p < 0,05$  controlo.

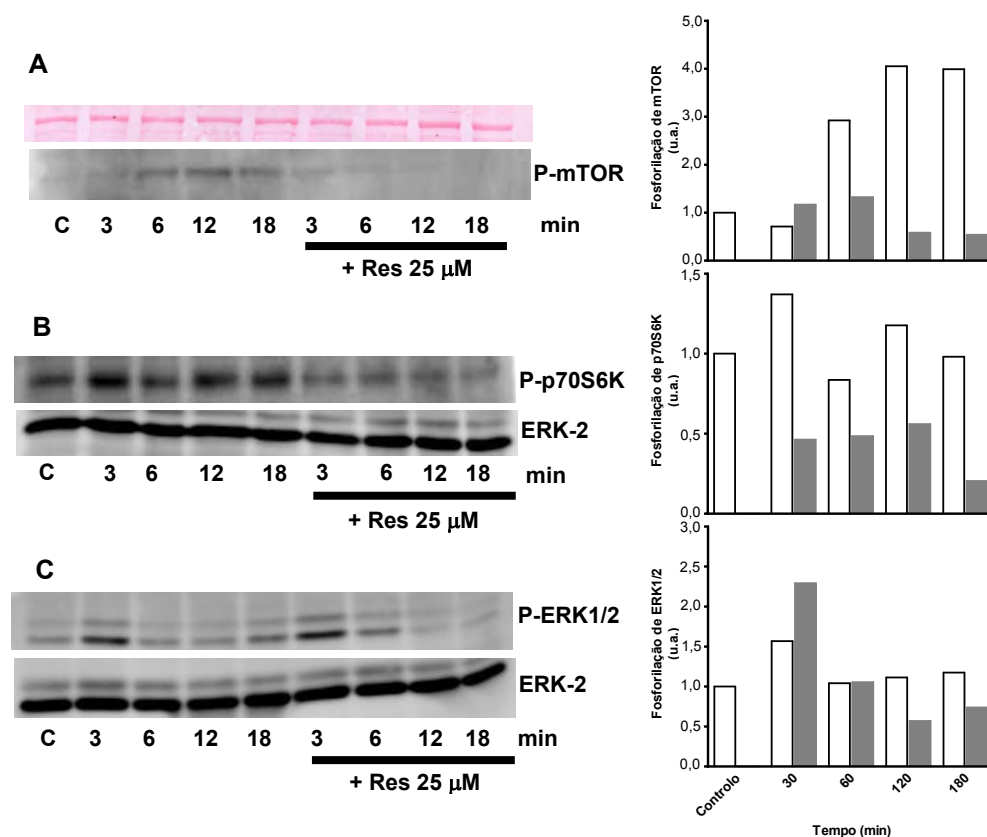
### **3.3 – Sinalização entre as vias ERK1/2 e mTOR**

A activação das ERK1/2 promove o crescimento celular e a proliferação através da fosforilação de vários substratos, tais como factores de transcrição, proteínas ribossomais, e ainda a tuberina que ao ser fosforilada permite a activação de mTOR (Kolch, 2005; Shaw e Cantley, 2006). É, igualmente conhecido, que os efeitos mitogénicos das LDLox são mediados através da activação e translocação nuclear das ERK1/2, resultante da activação da via esfingomiéline-ceramida (Augé et al., 1998). Assim, foi nossa intenção verificar se a activação da via ERK1/2 pelas LDLox é responsável pela activação da mTOR. Com efeito, as LDLox causaram um aumento temporário, mas muito significativo, da fosforilação das ERK1/2 aos 30 min seguido de uma diminuição para níveis idênticos ao observado nas células controlo, i.e, células não estimuladas (Fig. 4A). Este aumento transitório contrasta com os aumentos mais sustentados que se observaram nos níveis de fosforilação da mTOR e, mais particularmente, da p70S6K1, que continuam aumentados aos 120 e aos 180 min, respectivamente. Apesar desta diferença não se pode excluir, que a fosforilação de ERK1/2 tenha um efeito activador a jusante da via de mTOR. Para obtermos uma informação mais precisa, investigou-se o efeito de PD98059, um inibidor bem caracterizado da via MEK1/2, que inibe a fosforilação das ERK1/2. O PD98059 não só inibiu completamente a fosforilação de ERK1/2 dependente das LDLox (Fig. 4D), como também inibiu a fosforilação da Ser2448 de mTOR (Fig. 2D) e da Thr389 de p70S6K1 (Fig. 3D). Em contraste, os inibidores das PI3K e mTOR, Ly294002 e rapamicina, não afectaram a fosforilação das ERK1/2 (Fig. 4B,C).

Em conclusão, a via mTOR não modula a via ERK1/2, mas esta última pode sinalizar a activação de mTOR para períodos curtos de incubação com as LDLox.

### 3.4 – O papel do resveratrol na proliferação de células musculares lisas dependente de LDL oxidadas

O segundo objectivo deste trabalho foi investigar o papel do resveratrol na proliferação induzida pelas LDLox. Uma dose baixa de resveratrol (25  $\mu$ M)



**Fig. 5** – Efeito do resveratrol na via da mTOR e ERK1/2 estimulada por LDLox. SMC mantidas na ausência de soro foram pré-incubadas durante 30 min com resveratrol nas concentrações indicadas e subsequentemente estimuladas com LDLox 50  $\mu$ g/ml durante 30 a 180 min. Os extractos proteicos totais foram analisados por *immunoblot* com anticorpos específicos para a fosforilação de (A) mTOR, (B) p70S6K e (C) ERK1/2. São apresentados *blots* representativos e respectiva análise quantitativa por densitometria de quatro experiências independentes (barras brancas – LDLox; barras cinzentas – LDLox + inibidores). A barra controlo representa as células não estimuladas. O controlo da quantidade de proteína foi realizado com coloração com ponceau S ou com a marcação para ERK2.

inibiu esta proliferação (Fig. 1). A ausência de efeitos do resveratrol na proliferação de células não estimuladas com LDLox sugere que o resveratrol poderá ter um papel na modulação de vias de proliferação, sem afectar a viabilidade celular e vias de morte celular. Para testar esta hipótese, investigou-se o efeito do resveratrol na via de mTOR. O resveratrol inibiu completamente a fosforilação da mTOR na Ser2448 (Fig. 5A) e da p70S6K1 na Thr389 (Fig. 5B) estimulada pelas LDLox, inclusive para valores inferiores aos valores basais observados em células não estimuladas com LDLox. Curiosamente, o resveratrol não inibiu a fosforilação das ERK1/2 induzida pelas LDLox, indicando que o seu mecanismo de inibição da proliferação das células musculares lisas é independente da sinalização via ERK1/2 (Fig. 5C).

Em conclusão, o resveratrol bloqueia a proliferação das células musculares lisas induzida pelas LDLox através da inibição da via mTOR, mas por um mecanismo independente da sinalização via ERK1/2.

#### 4 – Discussão

A oxidação das LDL tem sido implicada na aterosclerose uma vez que, *in vitro*, as LDLox induzem processos celulares, como a inflamação, a migração e a proliferação, que ocorrem *in vivo* (Berliner e Heinecke, 1996). As LDLox podem desencadear dois tipos de resposta em células musculares lisas, de acordo com a concentração usada. Assim, podem ser citotóxicas em concentrações altas ou mitogénicas em concentrações baixas. A resposta mitogénica das células musculares lisas às LDLox está parcialmente associada com a activação das ERK1/2 através de duas vias distintas de sinalização: (1) a via da esfingomielina/ceramida/1-fosfato de esfingosina e (2) a via lactosilceramide sintetase/lactosilceramide, que activa a NADPH oxidase que produz  $O_2^{\cdot-}$  que por sua vez activa a p21<sup>ras</sup> e a via das MAPK (Chatterjee et al., 1996; Augé et al., 1998). Paralelamente à via esfingomielina/ceramida/1-fosfato de esfingosina, as LDLox activam também a via EGFR/PI3K/Akt (Augé et al., 2002). No entanto, não existe sinalização entre estas duas vias, não estando a via da EGFR/PI3K/Akt(PKB) envolvida na activação das ERK1/2. A

parte da via de sinalização responsável pela proliferação das células musculares lisas a jusante de Akt/PKB não é ainda conhecida, sendo os efeitos mitogénicos das LDLox exercidos através de um mecanismo não totalmente esclarecido.

Neste estudo, mostrou-se pela primeira vez que mTOR é uma mediadora importante da proliferação das células musculares lisas induzida por LDLox. De facto, esta proliferação é significativamente reduzida por inibição da mTOR com um inibidor específico, a rapamicina. Adicionalmente, a medida dos níveis de fosforilação da mTOR e do seu alvo a jusante p70S6K1, constituem as primeiras evidências de uma activação da sinalização, via mTOR e de um processo de tradução associado à p70S6K1 na proliferação das células musculares lisas estimulada pelas LDLox. A activação da mTOR pode ocorrer através de duas vias de sinalização convergentes, a via Ras/ERK1/2 e a via PI3K/Akt(PKB) (Shaw e Cantley, 2006; Wullschlerger et al., 2006). Estudos com inibidores da PI3K e das MEK1/2, respectivamente, Ly294002 e PD98059, sugerem que, ambas as vias podem contribuir para a activação da mTOR mediada pelas LDLox. O facto de termos observado uma activação mais sustentada da fosforilação da mTOR e da p70S6K1, quando comparadas com a activação transitória da fosforilação das ERK1/2, sugere que ERK1/2 está implicada na activação de mTOR apenas nos períodos iniciais da estimulação com as LDLox. No entanto, também é possível que a activação inicial das ERK1/2 seja suficiente para a activação sustentada da mTOR e da p70S6K1. De facto, ERK1/2 poderá fosforilar TSC, inactivando-o, com a subsequente activação de Rheb, mTOR e p70S6K1, tendo já sido descrito que Akt/PKB não é a única cinase responsável pela fosforilação da mTOR, mas também o seu alvo a jusante, p70S6K1 (Ma et al., 2005; Chiang e Abraham, 2005; Holz e Blenis, 2005). Assim, uma retroacção positiva poderá ser responsável pela activação/fosforilação sustentada da mTOR e da p70S6K1 via ERK1/2. Um papel para a PI3K a montante da mTOR é apoiado pela inibição da fosforilação da mTOR e da p70S6K1 por Ly294002 observada neste trabalho. A PI3K tem sido associada à sinalização celular, via mTOR através da Akt/PKB, que activa mTOR por dois mecanismos distintos. O primeiro envolve a fosforilação

directa da mTOR por Akt/PKB; o segundo envolve a inactivação de TSC através da fosforilação desta em locais distintos dos fosforilados por ERK1/2 (Nave et al., 1999; Sekulic et al., 2000; Dan et al., 2002; Manning e Cantley, 2003). De um modo semelhante ao discutido anteriormente para ERK1/2, é possível que a fosforilação da mTOR agora observada não seja apenas causada pela fosforilação directa por Akt/PKB, mas antes pela activação da via da TSC/Rheb com uma retroacção positiva, via p70S6K1.

Apesar dos efeitos cardioprotectores do resveratrol estarem associados a vários efeitos biológicos, tais como as acções antioxidante, anti-plaquetar e anti-proliferativa, os mecanismos moleculares e celulares envolvidos são, ainda, pouco conhecidos (Brito et al., 2002; Delmas et al., 2005; Brito et al., 2006). Neste estudo, mostrou-se pela primeira vez que o resveratrol bloqueia a proliferação das células musculares lisas, induzida pelas LDLox, através da modulação da sinalização de mTOR, e não através de ERK1/2. De facto, os resultados mostraram claramente que o resveratrol, ao contrário da forte inibição da fosforilação de mTOR apresentada, não teve quaisquer efeitos na fosforilação de ERK1/2 mediada pelas oxLDL. Estes dados não estão de acordo com as observações de Liu e Liu (2004). As diferenças entre os estudos devem-se, provavelmente, não só às diferentes concentrações de resveratrol usadas, mas também aos diferentes tempos de pré-incubação e concentração de LDLox usadas para estimular as células musculares lisas. Além disso, sabe-se que a capacidade do resveratrol para inibir ou não a fosforilação de ERK1/2 depende do tipo de célula e do estímulo usado (Haider et al., 2003; Godichaud et al., 2006). Conforme já discutido, as LDLox induzem a via ERK1/2 também através da formação de espécies reactivas de oxigénio. A este respeito, a actividade antioxidante do resveratrol é bem conhecida. Por um lado, o resveratrol tem actividade antioxidante directa através da quelatação de metais de transição, como por exemplo o cobre, mas também através da captação de radicais (Frankel et al., 1993). Por outro lado, o resveratrol tem efeitos antioxidantes indirectos ao diminuir os níveis intracelulares de ROS, quer pela inibição de sistemas enzimáticos produtores dessas espécies como a NAD(P)H oxidase, quer pela indução intracelular de

antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como o glutatião e as enzimas a ele associadas (Liu et al., 2003; Cao e Li, 2004; Brito et al., 2006). No entanto, as actividades antioxidantes do resveratrol não parecem explicar os seus efeitos anti-proliferativos, dado que o resveratrol não inibiu a via ERK1/2, uma via sensível ao estado redox da célula.

Os resultados obtidos neste trabalho apoiam um papel do resveratrol como inibidor da sinalização da mTOR pelas LDLox. Como referido anteriormente, PI3K e Akt/PKB convergem para mTOR activando-a. No entanto, a ausência de efeitos inibitórios do resveratrol na fosforilação das ERK1/2 induzida pelas LDLox, não só indica que o resveratrol interfere com a sinalização da mTOR por interromper a sinalização PI3K/Akt, como também sugere fortemente que a sinalização da mTOR mediada pelas LDLox é preferencialmente activada por PI3K/Akt do que por ERK1/2. Por outro lado, sabe-se que a activação da PI3K pelas LDLox ocorre através da activação do EGFR (Augé et al., 2002). Contudo, parece improvável que o resveratrol iniba esta activação pois não tem quaisquer efeitos na transactivação do EGFR e na fosforilação do EGF (Haider et al., 2002; Haider et al., 2005; Godichaud et al., 2006). Por outro lado, o resveratrol poderá inibir a fosforilação de Akt/PKB estimulada por LDLox, uma vez que inibe a fosforilação de Akt/PKB estimulada por EGF e angiotensina II (Haider et al., 2002; Haider et al., 2005; Godichaud et al., 2006). O resveratrol poderá também inibir a actividade da PI3K, pois num estudo recente, o resveratrol em concentrações semelhantes às usadas neste trabalho, inibiu competitivamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, a PI3K através da ligação reversível ao local de ligação do ATP (Fröjdö et al., 2007). Para além disso, o resveratrol modula ainda a actividade da PI3K associada ao receptor- $\alpha$  do estrogénio (Pozo-Guisado et al., 2003). Finalmente, o resveratrol poderá ter um efeito inibitório directo sobre mTOR, de um modo semelhante ao observado para a rapamicina. Assim, existem várias possibilidades para explicar o modo como o resveratrol inibe mTOR, sendo necessário mais estudos para definir o mecanismo molecular de actuação.



Em conclusão, os nossos resultados identificaram a via de mTOR como (1) uma via adicional pela qual as LDLox exercem os efeitos mitogénicos e como (2) o alvo principal do resveratrol que pode explicar os efeitos anti-proliferativos do resveratrol observados na presença de LDLox. Assim, este estudo reforça os efeitos benéficos do resveratrol no sistema cardiovascular.

**Bibliografia**

- Augé N., Pieraggi M-T., Thiers J-C, Nègre-Salvayre A. e Salvayre R. (1995) Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **309**, 1015-1020.
- Augé N., *et al.*, (1998) Potential Role for ceramide in mitogen-activated protein kinase activation e proliferation of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein. *J.Biol. Chem.* **273 (21)**, 12893-12900.
- Augé N., Garcia V., Maupas-Schwalm F., Levade T., Salvayre R. e Nègre-Salvayre A. (2002) Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves EGF receptor/PI-3 Kinase e the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1990-1995.
- Berliner J.A. e Heinecke J.W (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 707-727.
- Brito P., Almeida L.M., Dinis T.C.P. (2002) The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin e peroxynitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic. Res.* **36**, 621-631.
- Brito P., Mariano A., Almeida L.M., Dinis T.C.P. (2006) Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem. Biol. Interact.* **164**, 157-166.
- Burnett P.E., Barrow R.K., Cohen N.A., Snyder S.H. e Sabatini D.M. (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase e 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95(4)**, 1432-1437.
- Cao Z. e Li Y. (2004) Potent induction of cellular antioxidants e phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative e electrophilic injury. *Eur. J. Pharmacol.* **489**, 39-48.
- Chatterjee S. e Ghosh N (1996) Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation *Glycobiology* **6**, 303-311.
- Chiang C.G. e Abraham R.T. (2005) Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6Kinase. *J Biol. Chem.* **280**, 25485-25490.
- Dan H.C., Sun M., Yang L., Feldman R.I., Sui X.M., Ou C.C., Nellist M., Yeung R.S., Halley D.J., Nicosia S.V. *et al.*, (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem* **277**, 35364-35370.
- Delmas D., Janin B., Latruffe N. (2005) Resveratrol: preventing properties against vascular alterations e ageing. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 377-395.
- Dzau V., Braun-Dullaeus R.C. e Sedding D.G (2002) Vascular proliferation e atherosclerosis: New perspectives e therapeutic strategies. *Nature Medicine.* **8**, 1249-1256.
- Frankel E. N., Waterhouse A. L., Kinsella J. E. (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **341**, 1103-1104.
- Fröjdö S., Cozzone D., Vidal H. E Pirola L. (2007) Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor. *Biochem. J.* online manuscript.

- Godichaud S., Si-Tayeb K., Augé N., Desmoulière A., Balabaud C., Payrastra B., Nègre-Salvayre A. e Rosenbaum J. (2006) The grape-derived polyphenol resveratrol differentially affects epidermal e platelet-derived growth factor signaling in human liver myofibroblasts. *The Intern. J. of Biochem & Cell Biology* **38**, 629-637.
- Holz M.K. e Blenis J. (2005) Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 26089-26093.
- Inoki K., Li Y. E Guan K.L. (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity e regulates mTOR signalling. *Genes Dev.* **17**, 1829-1834.
- Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds e inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6(11)**, 827-37.
- Pozo-Guisado E., Lorenzo- Benayas M.J. e Fernández-Salguero P.M ( 2004) Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor- $\alpha$ -dependent mechanism: relevance in cell proliferation. *Int. J. Cancer.* **109**, 167-173.
- Haider U.G.B., Sorescu D., Griendling K.K., Vollmar A.M e Dirsch V.M (2002) Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B e p70S6 kinase phosphorylation e subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **62**, 772-777.
- Haider U.G.B., Sorescu D., Griendling K.K., Vollmar A.M e Dirsch V.M (2003) Resveratrol increases serine 15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 e induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **63**, 925-932.
- Haider U.G.B., Roos T.U., Kontaridis M.I., Neel B.G., Sorescu D., Griendling K.K., Vollmar A.M e Dirsch V.M (2003) Resveratrol inhibits angiotensin II- e epidermal growth factor-mediated Akt activation: role of Gab1 e Shp2. *Mol. Pharmacol.* **68**, 41-48.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Lee B. e Moon S-K. (2005) Resveratrol inhibits TNF- $\alpha$ -induced proliferation e matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. *J. Nutr.* **135**, 2767-2773.
- Li Y., Corradetti M.N., Inoki K. e Guan K.L (2004) TSC2 :filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 32-38.
- Liu J.C., Chen J.J., Chan P., Cheng C.F. e Cheng T.H. (2003) Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension.* **42**, 1198-1205.
- Liu Y. e Liu G. (2004) Isorhapontigenin e resveratrol suppress oxLDL-induced proliferation e activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases of bovine aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 777-785.
- Lowry O., Rosebrough A., Farr M., e Randall R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lusis A. (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241.

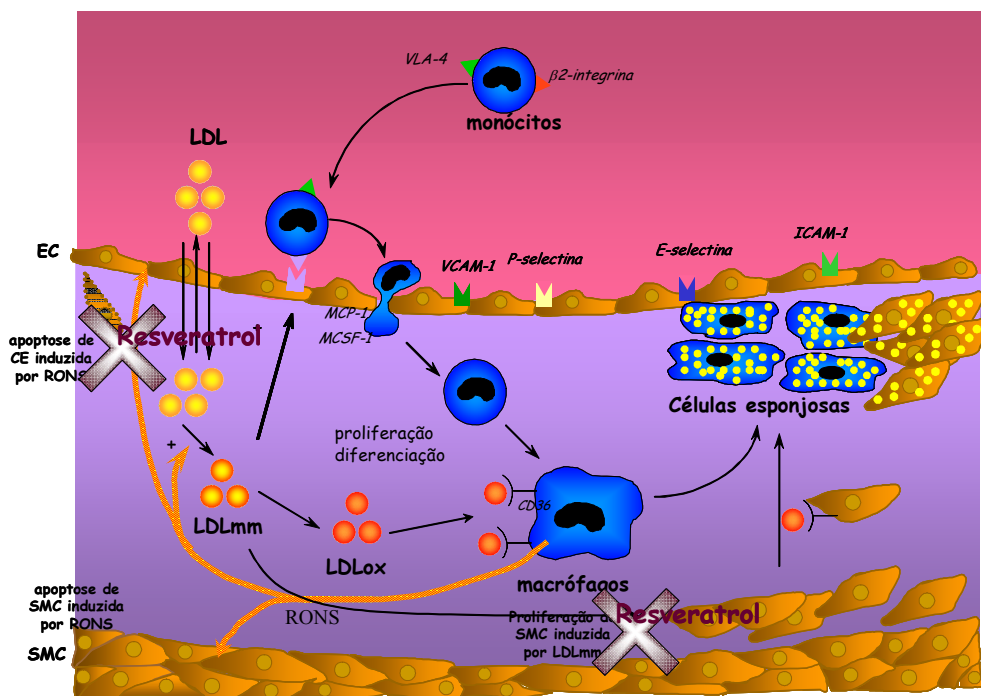
- Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P. e Peolfi P.P. (2005) Phosphorylation e functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis e cancer pathogenesis. *Cell* **121**, 179-193.
- Manning, B.D. e Cantley L.C. (2003) United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 573-578.
- Navé B.T., Ouwens M., Withers D.J., Alessi D.R. adn ShepHerd P.R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin e amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J.* **344**, 427-431.
- Pace-Asciak C. R., Hahn S., Diameis E. P., Soleas G., Goldberg D. M. (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol e quercetin block human platelet aggregation e eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* **235**, 207-219.
- Proud C.G. (2004) Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **63(3)**, 403-13.
- Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M. e Sabatini D.M. (2005) Phosphorylation e regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101.
- Sekulic A., Hudson C.C., Homme J.L., Yin P., Otterness D.M., Karnitz L.M. e Abraham R.T. (2000) A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway e the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated e transformed cells. *Cancer Res* **60(13)**, 3504-3513.
- Shaw R.J. e Cantley L.C. (2006) Ras, PI3K e mTOR signaling controls tumour cell growth. *Nature.* **44**, 424-430.
- Steinbrecher U.P., Parthasarathy S., Laeke 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. USA* **81**, 3884-3887.
- Tee A.R., Manning B.D., Roux P.P., Cantley L.C. e Blenis J. (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin e hamartin, control mTOR signaling by acting as GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* **13**, 1259-1268.
- Viera O.V., Laranjinha J., Madeira V.M.C. e Almeida L (1996) Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *J. Lipid Res.* **37**, 2715-2721.
- Wullschleger S., Loewith R. e Hall M.N (2006) TOR signaling in growth e metabolism. *Cell* **124**, 471-484.

## **Capítulo 5**

### **Conclusões gerais**



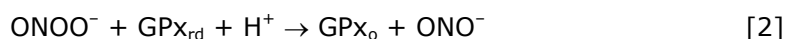
Nos últimos anos, o resveratrol revelou uma miríade de actividades biológicas potencialmente benéficas no tratamento das doenças cardiovasculares (DCV). O trabalho apresentado nesta tese reforça o papel do resveratrol, na prevenção do aparecimento das lesões ateroscleróticas, ao proteger os dois tipos de células vasculares em estudo, células endoteliais e musculares lisas, de diferentes efeitos pro-aterogénicos precoces mediados por *stress* oxidativo (Fig. 1).



**Fig. 1** – Representação esquemática dos efeitos anti-ateroscleróticos do resveratrol. Para detalhes ver o texto principal.

O peroxinitrito é um oxidante potente, susceptível de se formar na região das artérias onde ocorrem as lesões ateroscleróticas, capaz de desencadear disfunção endotelial ao lesionar as células endoteliais. O resveratrol protege as células endoteliais da apoptose induzida pelo peroxinitrito por aumentar os níveis intracelulares de glutatião (GSH) e da proteína Bcl-2. O GSH é o principal composto não proteico envolvido na defesa antioxidante da célula e a sua elevada concentração intracelular torna-o no composto com maior

potencial para a desintoxicação celular do peroxinitrito, quer captando-o directamente quer coadjuvando a actividade da glutatíon peroxidase (reacções 1 e 2) (Sies e Arteel, 2000).



A capacidade do resveratrol, numa concentração de 50  $\mu\text{M}$ , exercer uma actividade antioxidante indirecta ao aumentar os níveis intracelulares do GSH, parece ser primordial para os seus efeitos citoprotectores contra os danos celulares iniciados pelo peroxinitrito. Esta actividade antioxidante poderá ser, igualmente, importante, contra outros efeitos deletérios do peroxinitrito, em células endoteliais, como a iniciação de uma resposta inflamatória, normalmente desencadeada com concentrações substancialmente mais baixas do que as usadas neste estudo (Matata e Galinanes, 2002). Ao modular os níveis de GSH, o resveratrol altera o estado redox da célula, o que deverá por si só, afectar vários factores de transcrição cuja actividade é sensível ao estado redox da célula, tais como p53, Ap-1 e NF- $\kappa$ B (Sun e Oberley, 1996). Estes factores de transcrição controlam a expressão de genes envolvidos em vários processos, tais como a apoptose e a inflamação, podendo o aumento do GSH induzido pelo resveratrol 50  $\mu\text{M}$ , constituir um mecanismo indirecto pelo qual ele controla estes processos.

Porém, concentrações mais baixas de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) não exercem os seus efeitos citoprotectores através da modulação do GSH intracelular, mas antes através da modulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Ambas as concentrações testadas (10 e 50  $\mu\text{M}$ ) aumentaram os níveis intracelulares desta proteína, por um mecanismo desconhecido, permanecendo por identificar o ou os alvos moleculares a montante. Pode especular-se que o resveratrol afecta determinados factores de transcrição como o CREB, que tem sido implicado na expressão da Bcl-2 em determinados tipos de células, inclusive em células endoteliais (Wilson et al., 1996; Endo et al., 2007).



O mecanismo conhecido para a actividade anti-apoptótica da Bcl-2 é a formação de heterodímeros com membros pro-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2, como a Bax, inibindo conseqüentemente a libertação de factores apoptogénicos dos mitocôndrios (Sharpe et al., 2004). Porém, nos últimos anos tem sido proposto, que a actividade anti-apoptótica da Bcl-2 está igualmente associada a uma actividade antioxidante. De facto, vários estudos demonstram que um aumento de Bcl-2 aumenta os níveis intracelulares de vários sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, com especial destaque para o GSH (Hochman et al., 1998; Lee et al., 2001). Além disso, a Bcl-2 parece ser responsável por uma realocização do GSH, do citosol para o núcleo, tendo sido sugerido que o GSH nuclear, via mecanismo dependente da Bcl-2, actua como um regulador de transcrição por alterar o ambiente redox (Voehringer et al., 1998). Neste estudo, os níveis intracelulares de GSH e de Bcl-2 não estão directamente correlacionados um com outro, dado que o aumento de Bcl-2 observado na presença de resveratrol 10  $\mu$ M não é acompanhado por um aumento de GSH. Assim, é pouco provável que, nestas condições experimentais, a actividade anti-apoptótica da Bcl-2 seja uma consequência indirecta de um aumento do GSH intracelular. Contudo, este trabalho não fornece informação acerca da localização intracelular do GSH, não se podendo excluir que este se acumule no núcleo em resposta a um aumento da Bcl-2 intracelular, influenciando a actividade de ligação de alguns factores de transcrição e, conseqüentemente, a transcrição de genes pro- ou anti-apoptóticos.

Além dos efeitos anti-apoptóticos, o resveratrol reduz a proliferação das células musculares lisas estimulada por LDL oxidadas, por interferir com a via de crescimento mTOR e não com a via ERK1/2. Ao contrário dos efeitos anti-apoptóticos, os efeitos anti-proliferativos do resveratrol não parecem estar associados a uma actividade antioxidante, seja ela directa ao interagir com lípidos oxidados das LDL, que podem ser os responsáveis pelos efeitos mitogénicos destas, seja ela indirecta ao alterar o equilíbrio redox da célula.

A actividade anti-proliferativa do resveratrol poderá parecer paradoxal relativamente à sua actividade anti-apoptótica. Estes efeitos, no entanto, são observados em células diferentes e o resveratrol já demonstrou exibir comportamentos diferentes de acordo com o tipo de células e o tipo de estímulo conforme referido em várias publicações. De realçar, que esta capacidade do resveratrol em, por um lado, prevenir a morte celular de células endoteliais e por outro lado prevenir a proliferação de células musculares lisas, tornam-no num agente anti-aterosclerótico importante, por ser capaz de prevenir a progressão das lesões em diferentes fases. Assim, ao prevenir a morte das células endoteliais, o resveratrol preserva a integridade e as funções do endotélio prevenindo a disfunção endotelial subjacente à iniciação da doença. Ao prevenir a proliferação das células musculares lisas, o resveratrol actua numa fase mais tardia da evolução da doença limitando a extensão das lesões fibrosas. Adicionalmente, os efeitos na apoptose devem ser diferenciados de acordo não só com o tipo de células, mas também com a fase de progressão da doença. De facto, enquanto que na fase inicial da doença se pretende farmacologicamente preservar a integridade das células endoteliais, numa fase mais tardia a intervenção farmacológica pretendida é a inibição da proliferação das células musculares lisas, que poderá eventualmente ser conseguida por indução da morte destas células.

As concentrações de resveratrol utilizadas neste estudo não vão além dos 50  $\mu\text{M}$ , uma gama de concentrações semelhante à de outros estudos *in vitro* no campo da investigação das doenças cardiovasculares. No entanto, permanece por esclarecer se estas concentrações são atingidas *in vivo* a partir do consumo moderado do vinho tinto e subsequentemente, a sua relevância fisiológica. Apesar dos avanços nos últimos anos no que concerne ao conhecimento da biodisponibilidade do resveratrol, muito permanece por esclarecer. Sabe-se que ele é rapidamente absorvido, sofre metabolização extensa a sulfatos e glucuronatos, acumula-se em determinados tecidos e que é excretado, essencialmente, através dos rins (Wenzel e Somoza, 2005). A presença maioritária dos metabolitos e não do resveratrol no sangue, tem sugerido, que estes deveriam ser os compostos em estudo. Porém, é possível

que à semelhança do que acontece no intestino durante a circulação entero-hepática, os metabolitos do resveratrol noutros tecidos e locais do organismo sejam hidrolisados libertando o resveratrol que poderia, então, actuar desta forma *in vivo*. Além disso, deve ser lembrado que nos estudos de biodisponibilidade o resveratrol é muitas vezes administrado sob a forma de uma solução aquosa ou alcoólica, existindo poucos estudos de biodisponibilidade do resveratrol a partir do vinho tinto (Bertelli et al., 1996). Este é uma mistura complexa de vários compostos e já tem sido demonstrado que a metabolização do resveratrol pode ser inibida pela administração conjunta de compostos fenólicos, nomeadamente a quercetina (de Santi et al., 2000). Portanto, é urgente fazer estudos de biodisponibilidade do resveratrol, a partir do vinho tinto, mais aprofundados, uma vez que esta pode ser bem diferente da que tem sido observada nos estudos realizados até agora. Também é importante, que estes estudos sejam realizados com um maior número de indivíduos do que os estudos feitos em humanos que falham pelo número reduzido de indivíduos (1 a 6) e por períodos de tempo mais longos, para mimetizar de uma forma mais fidedigna o que provavelmente acontece num consumidor moderado de vinho tinto. Por último parece-nos inoportante realçar, que a importância do resveratrol no contexto da prevenção das doenças cardiovasculares não é apenas sugerida pelos efeitos cardioprotectores do vinho tinto, mas também por séculos de utilização do *Kojo-kon* na medicina tradicional japonesa e chinesa para tratar toda uma série de estados patológicos intimamente ligadas às doenças cardiovasculares.

## Bibliografia

- Bertelli, A. A., Giovannini, L., Stradi, R., Urien, S., Tillement, J. P., Bertelli, A. (1996) Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. *Int.J Clin.Pharmacol.Res.* **16**, 77-81.
- de Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., Pacifici, G. M. (2000) Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica.* **30**, 857-866.
- Endo, A., Sumi, D., Kumagai, Y. (2007) 1,2-Naphthoquinone disrupts the function of cAMP response element-binding protein through covalent modification. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **361**, 243-248.
- Hochman, A., Sternin, H., Gorodin, S., Korsmeyer, S., Ziv, I., Melamed, E., Offen, D. (1998) Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J Neurochem.* **71**, 741-748.
- Lee, M., Hyun, D. H., Marshall, K. A., Ellerby, L. M., Bredesen, D. E., Jenner, P., Halliwell, B. (2001) Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic.Biol Med.* **31**, 1550-1559.
- Matata, B. M., 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**, 2330-2335.
- Sharpe, J. C., Arnoult, D., Youle, R. J. (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim.Biophys.Acta.* **1644**, 107-113.
- Sies, H., Arteel, G. E. (2000) Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic.Biol Med.* **28**, 1451-1455.
- Sun, Y., Oberley, L. W. (1996) Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic.Biol Med.* **21**, 335-348.
- Voehringer, D. W., McConkey, D. J., McDonnell, T. J., Brisbay, S., Meyn, R. E. (1998) Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 2956-2960.
- Wenzel, E., Somoza, V. (2005) Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol.Nutr.Food Res.* **49**, 472-481.
- Wilson, B. E., Mochon, E., Boxer, L. M. (1996) Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol.Cell Biol.* **16**, 5546-5556.

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Leonor Almeida, a quem devo a minha opção pela Bioquímica, pelas palavras amigas de incentivo e pela confiança, que desde sempre depositou em mim.

À Professora Doutora Teresa Dinis pela orientação da presente dissertação e ainda pela sua revisão crítica, assim como pelo apoio moral e aconselhamentos ao longo destes últimos anos. Agradeço-lhe ainda, a simpatia e a amizade que tornaram todo este trabalho mais fácil e agradável.

Ao Professor Robert Salvayre e à Doutora Anne Nègre-salvayre por me acolherem de forma afável no seu laboratório em Toulouse.

À Doutora Nathalie Augé pela orientação e criticismos, sempre bem-vindos, da última parte deste trabalho realizado em Toulouse.

Ao Doutor Miguel Soares do IGC pelos ensinamentos relativos ao isolamento e cultura de BAEC.

Ao matadouro de Aveiro por facultar todas as condições necessárias para a recolha da aorta bovina, e conseqüentemente ao isolamento de BAEC.

Ao Laboratório de Análises de Sangue da Faculdade de Farmácia de Coimbra pela colheita de sangue e determinação da LDH.

Aos meus amigos, por todos os bons e maus momentos, todas as alegrias e tristezas partilhadas, ou simplesmente por terem estado sempre presentes quando precisei.

Por fim, mas não em último lugar à minha família, cada vez maior, por me apoiar em todas as minhas decisões, e pelo amor e carinho incondicional com que sempre me acompanharam.