



**EFFECTE ANTIGENOTÒXIC I MODULADOR  
DE L'EXPRESSION D'ENZIMS  
ANTIOXIDANTS PER PROCIANIDINES DEL  
VI NEGRE EN CONDICIONS D'ESTRÈS  
OXIDATIU**

---

Memòria presentada per

**FRANCESC PUIGGRÒS I LLAVINÉS**

per optar al Grau de Doctor en Bioquímica





UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

MEMÒRIA PRESENTADA PER OPTAR AL GRAU DE  
DOCTOR EN BIOQUÍMICA:

**Francesc Puiggròs i Llavínés**

L'interessat:

Vist-i-plau de la directora:

Francesc Puiggròs i Llavínés

M.Josepa Salvadó i Rovira



Dra. M. Josepa Salvadó i Rovira, Catedràtica d'Escola Universitària de Bioquímica i Biologia Molecular del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili,

FAIG CONSTAR,

que el present treball, amb títol “ **Efecte antigenotòxic i modulador de l'expressió d'enzims antioxidants per procianidines del vi negre en condicions d'estrès oxidatiu**” que presenta el Sr. Francesc Puiggròs i Llavínés, ha estat realitzat sota la meva direcció, i que tots els resultats obtinguts són fruit dels experiments duts a terme per aquest doctorand.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signo aquesta certificació

Dra. M. Josepa Salvadó i Rovira

Tarragona, febrer de 2005



*A la memòria del meu padrí,  
Joan Vallbona i Riera.*





En primer lloc, vull agrair a la Dra. M. Josepa Salvadó la seva direcció, el seu suport, i, sobretot, el fet que des del primer dia m'hagi dit les coses pel seu nom. D'ella, n'he après molt i un no sap com ni quan dir-ho. Ara és el moment. Gràcies, Pepa.

En segon lloc em cal agrair als membres del grup Vi i Salut la sensació sempre present de poder recórrer a ells per a un cop de mà. La seva col·laboració ha estat de gran importància. Així que gràcies, Dra. Cinta Bladé, Dra. Anna Ardévol, Dr. Lluís Arola, Dr. Gerard Pujadas, Dra. Mayte Blay i Dr. Juan Fernández.

Gràcies a la resta de components del Departament de Bioquímica i Biotecnologia. En especial al Santiago Moreno, per tot, no sabia concretar més. Em quedo amb la seva envejable humanitat.

Pensar per un minut en el temps de tesi. Temps de sobres per ser conscient que sempre hi ha molt per recordar, i, sobretot, molt a agrair. A tu, aquell amic que qualsevol persona hauria de tenir. La constància de l'amistat té un valor incalculable i potser és més del que puc desitjar, però jo he tingut sort. A vosaltres, els amics que hi heu estat sempre. A l'amic que ho va ser des del primer dia de tesi, venint de Reus, per deixar-me compartir tots i cada un dels moments (molts d'ells difícils) en aquest camí. Sempre, a la teva manera, m'has ajudat. Gràcies. Als amics de la carrera, conviure fa pinya. A aquells que heu arribat a mig camí, sigui de León o de Granollers (amb els que comporta), que em coneixeu i, per tant, sabeu des d'on us escric aquestes paraules. Gràcies. A tu, que has arribat ara. Gràcies. Les paraules queden escrites i en el futur algú podrà llegir que en el 2005 jo sentia el que sento ara. Que sàpiga que els fets amb els que les demostraré queden per a cadascú de vosaltres.

També penso en tots aquells que, amb fugacitat o no, han vorejat, trepitjat, o simplement aturat per descansar en alguns moments d'aquest camí. Alguns ja no sé on paren, altres.... En fi, fugaçment, gràcies.

Finalment, vull agrair a tota la meva família el seu suport i impaciència per veure'm feliç. Germans (tots), pas a pas. Gràcies per fer el camí més fàcil. Els passos són més senzills amb vosaltres a prop.

Molt especialment, vull referir-me als meus pares als quals els dec la vida i moltes coses més. A risc de ser excessivament nostàlgic, vull que sapiguen que aquest és el fruit de l'estiu de 1993, on vaig comprendre molt del que m'havíeu ensenyat. Gràcies pel vostre suport, sense límits, abans, durant i sempre. Sense límits també: us estimo.



**abreviacions**

---

---



**ADP** : Adenosine 5' diphosphate  
**Akt** : Protein Kinase B (PKB)  
**ALS** : Amiotrophic Lateral Sclerosis  
**AREs** : Antioxidant Responsive Elements  
**ASK1** : Apoptosis Signal Regulating Kinase 1  
**ATP** : Adenosine 5' triphosphate

**CAT** : Catalase  
**Cys** : Cysteine  
**Cu,Zn-SOD**: Cooper,Zinc-Superoxide Dismutase

**DAG**: Diacylglycerol

**EC** : Endothelial cells  
**EC-SOD**: Extracellular-Superoxide Dismutase  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor  
**ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase

**GCL** : Glutamylcysteine ligase  
 **$\gamma$ -GCS**:  $\gamma$ - Glutamylcysteine syntethase  
 **$\gamma$ -GGT**:  $\gamma$ - Glutamyltranspeptidase  
**G6PDH**: Glucose 6-phoshphate dehydrogenase  
**GPx** : Glutathione Peroxidase  
**GR** : Glutathione Reductase  
**GSH** : Glutathione Reduced  
**GSPE** : Grape Seed Procyanidin Extract  
**GSSG** : Glutathione Oxidized  
**GST** : Glutathione S-transferase

**HIV** : Human Immunodeficiency virus

**I $\kappa$ B** : Inhibitor NF- $\kappa$ B  
**IKK** : I $\kappa$ B kinase  
**IRP** : Iron Regulatory Protein

**JNK** : c-jun N-terminal kinase

**K<sub>m</sub>** : Michaelis-Menten constant

**LDL** : Low Density Lipoprotein

**LPH** : Lactase Plorizine Hydrolase

**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase

**MEK** : MAPK/ERK activating kinase

**MEKK:** MEK kinase

**MKK** : MAPkinase kinase

**Mn-SOD:** Managenese-Superoxide Dismutase

**MPO** : Mieloperoxidase

**NF-κB** : Nuclear Factor- κB

**NIK** : NF-κB inducing kinase

**NADH:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced)

**NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidized)

**NADPH:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced)

**NADP<sup>+</sup>** : Nicotiniamide Adenine Dinucleotide Phosphate (oxidized)

**PDGF:** Platelet-derived growth factor

**PDGFR:** Platelet-derived growth factor Receptor

**PI3K** : Phosphatidylinositol 3-kinase

**PIP2** : Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate

**PKC** : Protein Kinase C

**PLC-γ** : Phospholipase C -γ

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SAPK:** Stress-activated Protein Kinase

**SMC** : Smooth Muscular Cells

**TBARS** : Thiobarbituric Acid Reactive Substances

**VEGFR:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

**índex**







---

<b>Introducció</b>	<b>19</b>
<b>1. L'oxigen</b>	<b>21</b>
<b>2. Formació de les ROS</b>	<b>22</b>
2.1. Anió Superòxid ( $O_2^{\bullet-}$ )	22
2.2. Peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ )	22
2.3. Radical hidroxil ( $\bullet OH$ )	24
2.4. Fonts de ROS	24
<b>3. Dianes de les ROS</b>	<b>26</b>
<b>4. Estrès oxidatiu</b>	<b>28</b>
4.1. Estrès oxidatiu i malalties humanes	28
<b>5. Sistemes de defensa</b>	<b>29</b>
5.1. Sistemes de defensa enzimàtics	29
5.1.1. Superòxid dismutasa	29
5.1.2. Catalasa	31
5.1.3. Cicle del Glutatió	32
5.2. Sistemes de defensa no enzimàtics	33
5.2.1. Glutatió (GSH)	34
5.3. Integració dels sistemes antioxidants	36
<b>6. Estrès oxidatiu i enzims antioxidants</b>	<b>36</b>
<b>7. ROS i senyalització cel·lular</b>	<b>44</b>
7.1. Vies MAPK	45
7.1.1. Via ERK	46
7.1.2. Via SAPK (p38 & JNK)	47
7.1.3. PI3K i Akt	49
7.1.4. Fosfolipasa C- $\gamma$ 1	50
7.1.5. Factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)	50
7.1.6. p53	52
7.1.7. AP-1	53
7.2. Fenòmens cel·lulars associats a l'efecte de l'estrès en les cascades de senyalització	53
7.2.1. Cicle cel·lular	54
7.2.2. Apoptosis	54

<b>8. El vi</b>	<b>55</b>
<b>8.1. La Paradoxa Francesa</b>	<b>55</b>
<b>9. Flavonoides</b>	<b>56</b>
<b>9.1. Proantocianidines</b>	<b>58</b>
<b>9.2. Ingesta i biodisponibilitat</b>	<b>60</b>
<b>9.3. Flavonoides i malalties</b>	<b>64</b>
<b>9.3.1. Capacitat antioxidant</b>	<b>64</b>
<b>9.3.1.1. Flavonoides i peroxidació lipídica</b>	<b>65</b>
<b>9.3.1.2. Flavonoides i DNA</b>	<b>66</b>
<b>9.3.1.3. Flavonoides i proteïnes</b>	<b>66</b>
<b>9.3.2. Procianidines i activitat antioxidant</b>	<b>67</b>
<b>9.4. Flavonoides i vies de senyalització</b>	<b>68</b>
<b>Hipòtesi i Objectius</b>	<b>71</b>
<b>Resultats I</b>	<b>75</b>
<b>Resultats II</b>	<b>93</b>
<b>Resultats III</b>	<b>119</b>
<b>Conclusions</b>	<b>145</b>
<b>Referències</b>	<b>149</b>

**introducció**

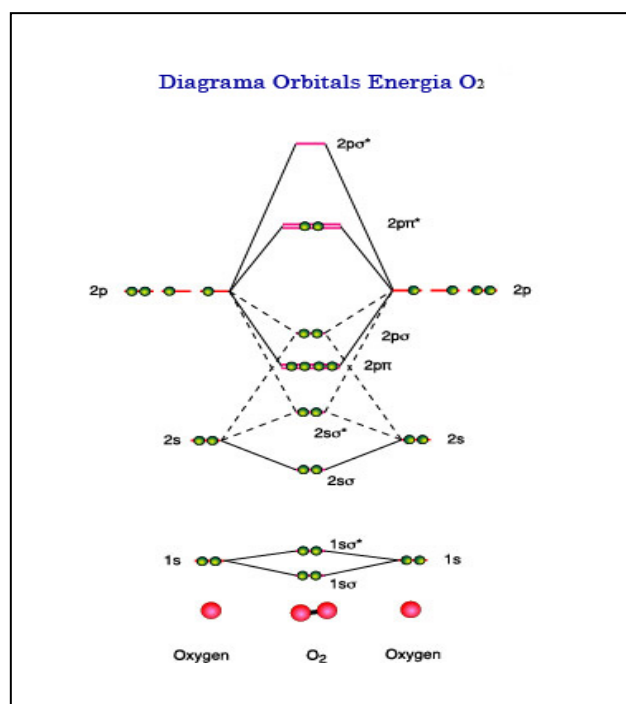




## 1. L'oxigen.

L'oxigen ( $O_2$ ) (Figura 1), molècula essencial per a la majoria de formes de vida, proporciona a l'organisme l'energia necessària que li permet fer viables totes les funcions metabòliques. Aquesta energia deriva de la reducció de l' $O_2$  per 4 electrons generant aigua, reducció que es dona en la cadena de transport mitocondrial (Figura 5). No obstant això, l'oxigen pot ser potencialment nociu si aquesta reducció no és completa, i dona pas a la generació de radicals lliures i espècies reactives d'oxigen, conjuntament denominades ROS (Reactive Oxygen Species). ROS, és el terme que s'aplica col·lectivament a les molècules químiques radicals i no radicals que són agents oxidants i/o són fàcilment convertits a radicals.

Aquesta potencial toxicitat de l'oxigen deriva de les propietats que li confereix la seva estructura molecular (Figura 1). Químicament, l'oxigen és un birradical altament reactiu per la presència de dos electrons desaparellats en el darrer orbital antienllaçant ( $2p\pi^*$ ).



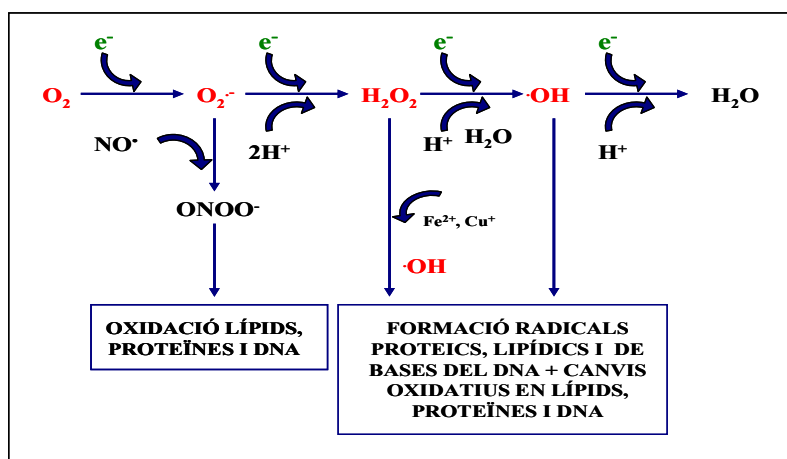
**Figura 1.** Diagrama d'orbitals energètics de la molècula  $O_2$ . S'observa la presència de dos electrons desaparellats en l'orbital  $2p\pi^*$ .

## 2. Formació de ROS.

### 2.1. Anió superòxid ( $O_2^{\bullet-}$ ).

L'anió superòxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) és la primera espècie molecular que es forma pel procés de reducció univalent de l'oxigen (Figura 2). Aquesta espècie es genera de forma predominant a la cadena de transport mitocondrial en dues localitzacions possibles: el complex NADH deshidrogenasa i el complex citocrom *bc<sub>1</sub>* [1].

Aquest radical no és particularment reactiu respecte altres ROS. Tanmateix, tant per reacció espontània com a través de reaccions enzimàtiques de dismutació es genera peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i  $O_2$  [2,3].



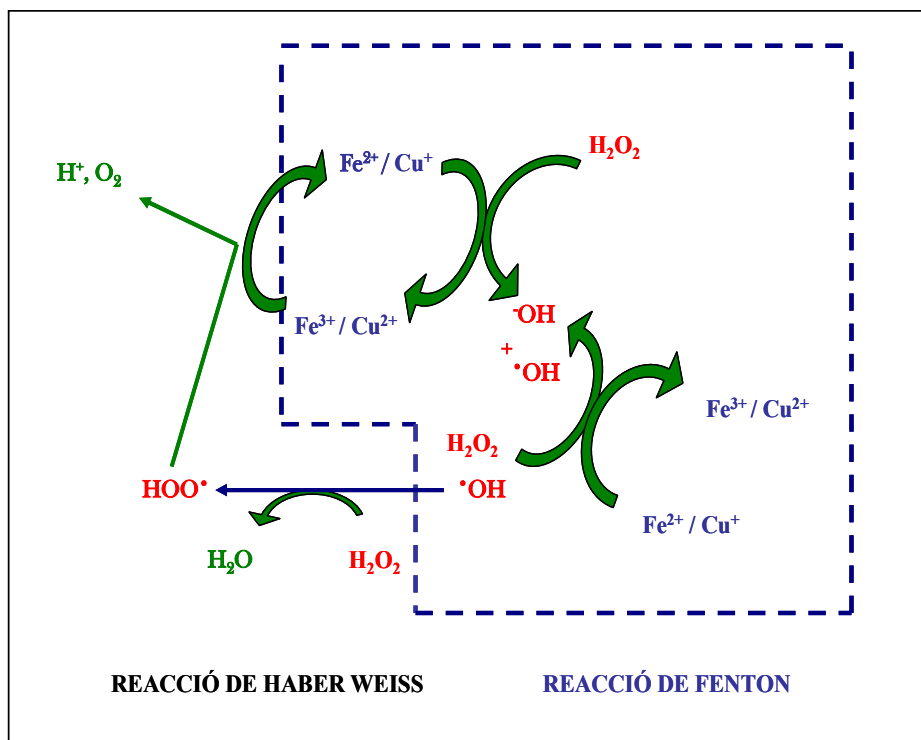
**Figura 2.** Formació i efecte de les ROS.  $O_2$ :oxigen;  $O_2^{\bullet-}$ : anió superòxid;  $\bullet OH$ : radical hidroxil;  $NO\bullet$ :radical nitrosil;  $ONOO^-$ : ió nitrat.

### 2.2. Peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ).

El peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) es forma directament per transferència de dos electrons (reducció divalent) a l'oxigen per acció de diferents oxidases (urat oxidasa, monoamina oxidasa i xantina oxidasa) (Figura 2). L'estructura química del peròxid d'hidrogen no ens permet referir-nos-hi pròpiament com a radical lliure, atès que no posseeix electrons desaparellats. Tanmateix, a causa de la seva reactivitat, sí que es considera inclòs en el grup de ROS. Si el comparem amb els radicals lliures que per definició ho

són (anió superòxid, radical hidroxil, etc...), l' $\text{H}_2\text{O}_2$  és relativament estable, essent la seva principal característica la facilitat de difusió a través de les membranes cel·lulars. És important tenir en compte que en presència de metalls de transició en estat d'oxidació baix, com el  $\text{Cu}^+$  o el  $\text{Fe}^{2+}$ , l' $\text{H}_2\text{O}_2$  pot sofrir la reducció a anió hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) per la reacció de Fenton, generant així el radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) [3] (Figura 3), d'elevadíssima reactivitat.

Els anions superòxid presents poden esdevenir en aquest cas agents reductors, generant aquests ions metàl·lics en la denominada reacció de Haber-Weiss [4] (Figura 3). Aquests metalls, passaran a ser substrats per a la reacció de Fenton que s'ha descrit anteriorment.



**Figura 3.** Reaccions de Fenton i de Haber-Weiss. La presència d'ions metàl·lics possibilita la generació de radicals hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) a partir de peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

## 2.3. Radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ).

El radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), a més dels mecanismes descrits en figures 2 i 3, es pot formar també a partir de la fissió hemolítica de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  per acció de la llum ultraviolada i l'hidròlisi de l'aigua per radiació ionitzant de certs agents químics [3]. És el radical d'oxigen més potent pel que fa a la seva reactivitat i això li confereix una capacitat molt alta de reaccionar inespecíficament amb una gran diversitat de molècules biològiques (DNA, carbohidrats, àcids grassos poliinsaturats de membrana) esdevenint el radical més actiu, i per tant més perillós, entre totes les ROS.

## 2.4. Fonts de ROS.

Les ROS es poden generar per fonts exògenes, factors mediambientals, i/o endògenes per l'activitat de les mateixes cèl·lules, producte de la seva acció directe o com a productes secundaris de reaccions del metabolisme (Taula 1).

<u>FONTS D'ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN (ROS)</u>	
<u>CEL·LULARS</u>	<u>NO CEL·LULARS</u>
Cadena de respiració mitocondrial	Pol·lució
Complexes NADH-oxidases	Radiació UV
Cèl·lules fagocítiques (macròfags i neutròfils)	Radiació ionitzant
$\beta$ -oxidació en peroxisomes	Tabaquisme
Síntesi de prostaglandines (lipoxigenases; cicloxigenases)	Sals metàl·liques
Citocrom P450 (reaccions de detoxificació)	

**Taula 1.** La generació de ROS pot ser a partir de fonts endògenes (cel·lulars) com de fonts exògenes (no cel·lulars).



Ja s'ha comentat que la font més important de producció endògena de ROS és la cadena de respiració mitocondrial. Malgrat el fet que aquesta és altament eficient, la naturalesa dual de les reaccions redox catalitzades pels complexos mitocondrials predisposa cada complex a reaccions secundàries amb l'oxigen molecular. Un petit percentatge (1-2%) dels electrons que passen a través de la cadena de transport mitocondrial s'escapen i es combinen amb l'oxigen per formar ROS [5,6] pels mecanismes que s'han descrit.

Un sistema endogen productor d' $O_2^{\cdot-}$  és el complex nicotinamida dinucleòtid fosfat (NADPH)-oxidasa i les ROS produïdes juguen un paper clau en l'eliminació de microbis i agents foranis nocius [7,8]. D'altra banda, cèl·lules fagocítiques com els neutròfils i macròfags tenen un sistema únic de producció d'anions superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) que resulta en una explosió respiratòria que s'activa en cas d'inflamació, infeccions, entre altres.

Altres fonts intracel·lulars de ROS són els peroxisomes, orgànuls responsables de l'oxidació d'àcids grassos de cadena llarga, produint  $H_2O_2$  com a subproducte [9] i, a través de les lipooxigenases, de la síntesi de l'àcid araquidònic. Per tant, la producció de ROS, en general, deriva principalment de subproductes que estan en constant formació, producte tant de la gran quantitat de fosforil·lacions oxidatives com per una varietat d'oxidases necessàries per a suportar el metabolisme aerobi.

Les fonts exògenes de ROS són els agents contaminants (pol·lució), tabaquisme, que resulten en una mescla potent d'òxids de nitrogen ( $NO^{\cdot}$ ) i radicals hidroxil ( $\cdot OH$ ) sals de ferro (substrats per a les reaccions de Fenton i Haber-Weiss), radiacions ultraviolada i ionitzant [9,10] (Taula 1).

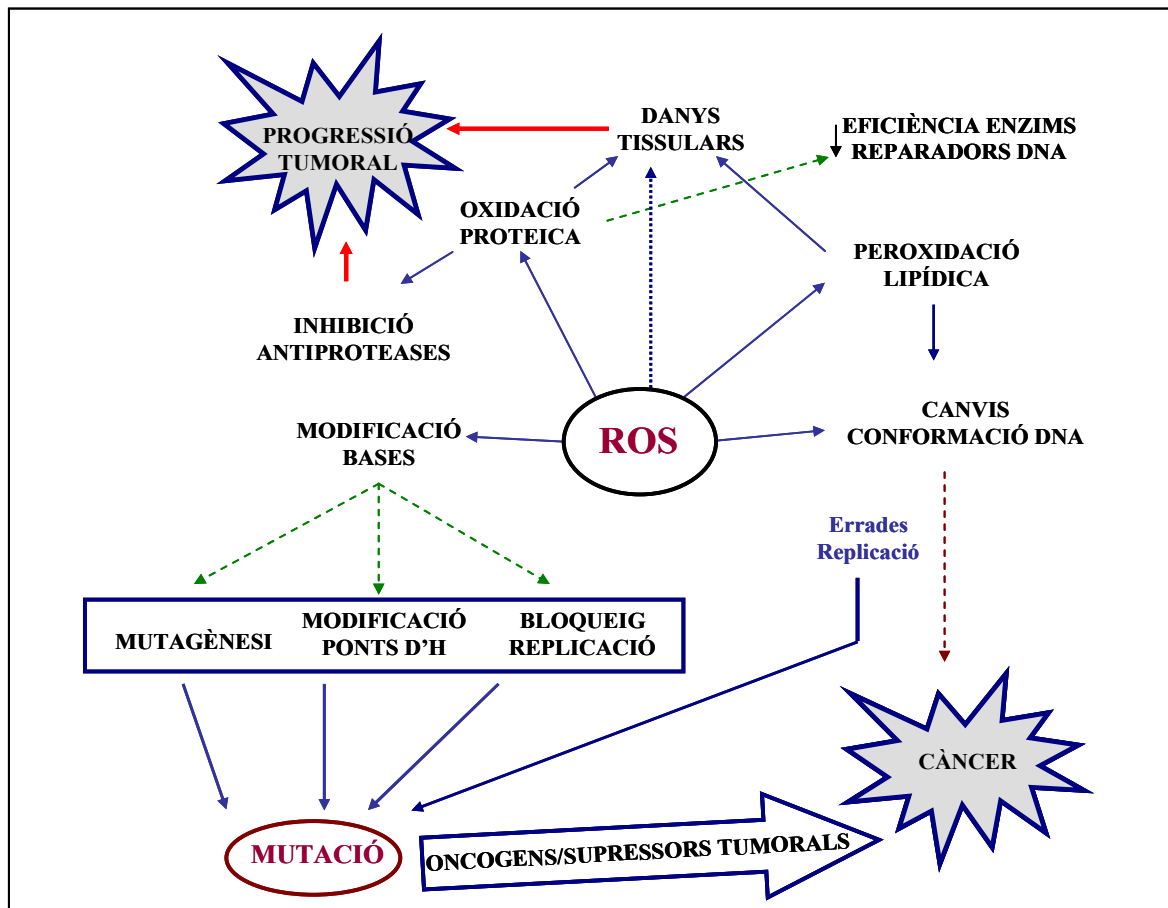
### 3. Dianes de les ROS.

Les ROS, altament nocives per als organismes vius, poden atacar gairebé qualsevol macromolècula i estructura cel·lular. Les espècies reactives derivades de l'oxigen molecular són beneficioses per a diferents processos en animals superiors, en insectes i en les plantes. No obstant això, la seva elevada reactivitat converteix aquests metabòlits actius en agents citotòxics induint la destrucció indiscriminada de macromolècules cel·lulars com fosfolípids, proteïnes i àcids nucleics mitjançant un procés ràpidament propagable de peroxidacions lipídiques que resulten en productes citotòxics i potencialment mutagènics [11,12]. En l'àmbit cel·lular, les ROS interfereixen amb els processos cel·lulars normals conduint a disfuncions mitocondrials, i a conseqüències cel·lulars més greus, com la mort programada (apoptosi), o la mort per necrosi [13,14].

La reactivitat de les ROS davant del DNA esdevé en la formació d'entrecreuaments DNA-proteïna, danys a l'enllaç desoxirribosa-fosfat i modificació química de les bases purines i pirimidines [15]. Aquestes bases modificades oxidativament poden resultar en mutacions al genoma, mentre que l'oxidació d'unitats desoxirribosa poden induir a l'alliberament de la base o a la fragmentació de les cadenes del DNA. En aquest sentit els biomarcadors més emprats per avaluar el dany oxidatiu al DNA inclouen la quantificació de la 8-oxo-7-hidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) i l'ús del denominat "Comet assay" [16]. Les lesions oxidatives al DNA són tant citotòxiques com mutagèniques, i contribueixen substancialment al procés d'envelliment, generació tumoral i malalties cardiovasculars [17,18] (Figura 4).

Les ROS també poden reaccionar amb les membranes cel·lulars i modificar la seva fluïdesa i permeabilitat per reacció amb els lípids que la conformen, en el que es coneix com reacció de peroxidació lipídica [19]. A més, els peròxids lipídics que en resulten poden descomposar-se fàcilment, seguint el patró d'una reacció en cadena, en diverses subespècies reactives, com els radicals alcoxil lipídics, aldehids (malondialdehid - MDA-), alquens, epòxids lipídics i alcohols. Aquests radicals són tòxics per si mateixos

i poden servir com a segons missatgers per induir i alhora augmentar la magnitud del dany oxidatiu original [20].



**Figura 4.** Sota condicions normals, la cèl·lula és capaç de detoxificar radicals però davant una situació d'acumulació de ROS es produeixen canvis en macromolècules i en l'ambient cel·lular, que resulten, en darrer terme a mutacions oncogèniques que contribueixen així a la patogènesi del càncer i a la progressió tumoral. Com es mostra a la figura, modificacions químiques del DNA cusen canvis en l'especificitat dels ponts d'hidrogen, productes derivats de l'apertura d'anells de les bases purines i fragmentació en pirimidines que bloquegen la replicació del DNA, i els canvis conformacionals del DNA disminueixen la precisió en la replicació per DNA polimerases. D'altra banda, el dany oxidatiu a proteases i l'insult oxidant als teixits pot produir progressió tumoral i metastasi.

Les proteïnes representen una altra diana clau per a les ROS. L'estructura, així com els grups funcionals de les proteïnes, es modifiquen a través d'interaccions amb ROS o productes de la peroxidació lipídica. Aquest dany oxidatiu no tan sols causa una pèrdua de la funcionalitat proteica, sinó que també contribueix a un dany secundari en processos cel·lulars que s'hi relacionen [21,22].

## 4. Estrès oxidatiu.

Quan es dona una acumulació excessiva de ROS, la pertorbació o debilitació dels sistemes de defensa antioxidants naturals de la cèl·lula, o ambdues, es crea una situació en la que el balanç redox, bàsic per a l'homeòstasi cel·lular normal, s'altera, esdevenint, així, "l'estrès oxidatiu". Aquest estat s'ha d'entendre com una alteració d'un fenomen en continu equilibri entre la seva indispensable funció en la regulació del metabolisme i el seu indiscutible potencial citotòxic pel seu excés.

Aquest estat d'estrès oxidatiu comporta danys a moltes estructures cel·lulars, cosa que afecta negativament els processos bioquímics i fisiològics i que comporten la disfunció de cèl·lules específiques, teixits i òrgans. No és sorprenent, doncs, pensar que l'estrès oxidatiu està associat a l'aparició de diverses patologies [23,24].

L'aspecte atractiu de la hipòtesi de l'estrès oxidatiu és que pot explicar el retard en l'aparició de danys. És a dir, que l'acumulació és progressiva amb el temps i això es tradueix en la naturalesa progressiva d'algunes malalties cròniques [25].

### 4.1. Estrès oxidatiu i malalties humanes.

L'estrès oxidatiu s'ha associat a un declivi general de les funcions cel·lulars, tissulars, orgàniques, correlacionades amb moltes patologies humanes com l'Alzheimer, l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS), el Parkinson, l'aterosclerosi, danys per isquèmia/reperfusió neuronal, formació de cataractes, degeneració macular, danys degeneratius retinals, artritis reumatoide, esclerosi múltiple, distròfia muscular, càncer, així com el procés d'envelliment en si mateix. Les evidències de l'associació entre l'estrès oxidatiu crònic i les patologies humanes, han portat a confirmar que la magnitud del dany oxidatiu al DNA està també fortament correlacionat a l'estrès oxidatiu. Per tant, és important gaudir de mètodes precisos i acurats per estimar el grau d'oxidació del DNA en cèl·lules estressades oxidativament [23,26-28]

## 5. Sistemes de defensa.

Com a sistemes de prevenció i per a protegir contra el dany oxidatiu, les cèl·lules han evolucionat una bateria de mecanismes de defensa que inclouen estratègies enzimàtiques i no enzimàtiques (Figura 5).

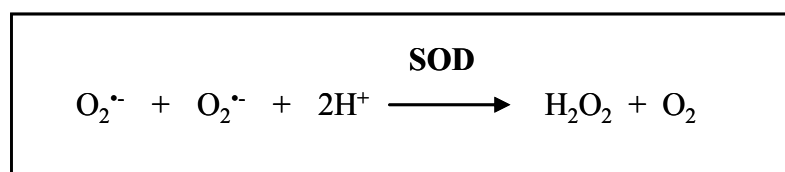
### 5.1. Sistemes de defensa enzimàtics.

Els eliminadors enzimàtics inclouen superòxid dismutasa (SOD), catalasa (CAT) i els enzims implicats en el cicle del glutatió: diverses glutatió peroxidases (GPx) [29], glutatió reductasa (GR) i glutatió S-transferasa (GST).

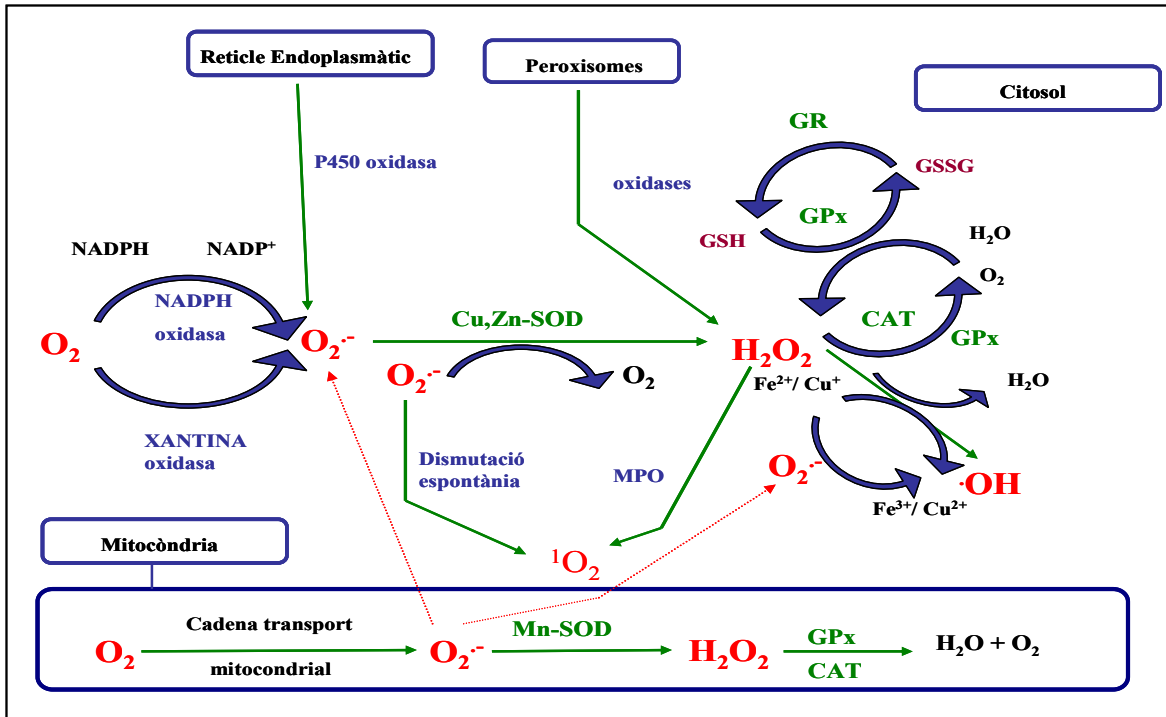
#### 5.1.1. Superòxid dismutasa.

Les superòxid dismutases (SODs) són metal·loenzims que catalitzen la dismutació de l'anió superòxid mitjançant la seva transformació en oxigen ( $O_2$ ) i peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) a velocitats  $10^4$  cops més ràpid que la dismutació espontània a pH fisiològic (reacció 1).

##### Reacció 1)



En cèl·lules eucariotes, la SOD existeix de tres formes: 1) Coure,Zinc-SOD (Cu,Zn-SOD o SOD1) localitzada al citoplasma; 2) Manganès-SOD (Mn-SOD, o SOD2) dins la mitocondria, i 3) una Cu,Zn-SOD (ECSOD) extracel·lular que conté la matriu.



**Figura 5.** Generació de ROS i principals mecanismes de defensa contra el dany oxidatiu produït per les ROS [30].

La Cu,Zn-SOD està constituïda per dues subunitats idèntiques (homodímer) de 32,5 kDa per subunitat. Cada subunitat conté un clúster metàl·lic constituït per un àtom de Cu i un altre de Zn que conformen el centre actiu de l'enzim. La Cu,Zn-SOD es localitza principalment al citosol, però també es pot trobar en el nucli i als peroxisomes, almenys pel que fa als humans.

Codificat per un sol gen localitzat el cromosoma 21, en cèl·lules humanes s'hi ha trobat dos transcrits d'mRNA (0.7 i 0.9 kb) [31]. Aquest enzim s'expressa en el conjunt de les cèl·lules de l'organisme però especialment en cèl·lules hepàtiques, renals i pulmonars.

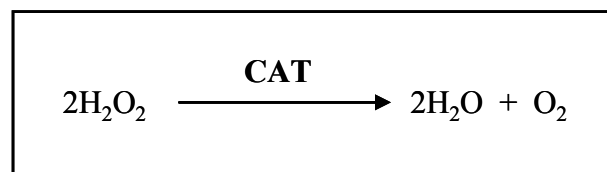
S'ha descrit que la hipòxia decreix l'expressió d'mRNA de Cu,Zn-SOD en les cèl·lules epitelials alveolars de tipus II i fibroblasts pulmonars *in vitro* [32]. En aquest sentit, estudis de sobreexpressió d'aquest enzim troben un efecte protector contra el dany per

isquèmia/reperfusió en el cervell [33], intestí [34] i miocardi [35], suggerint la implicació de la Cu, Zn-SOD en situacions d'estrès oxidatiu. Al contrari que la Mn-SOD, la Cu,Zn-SOD pot actuar també com una superòxid reductasa i una superòxid oxidasa [36]. Per això, la sobreexpressió de Cu,Zn-SOD pot també ser nociva per l'hoste, probablement per la seva activitat peroxidasa no específica [37]. Malgrat que es considera la Cu,Zn-SOD com a la primera línia de defensa *versus* el dany oxidatiu, estudis amb ratolins descriuen que la Cu,Zn-SOD no és requerida per al desenvolupament i supervivència, atès que els ratolins knock out de Cu,Zn-SOD es desenvolupen amb normalitat cap a l'edat adulta i no mostren símptomes aparents de dany oxidatiu [38]. Tanmateix, la sobreexpressió de Cu,Zn-SOD no pot compensar la deficiència de Mn-SOD *in vivo*, que sí resulta indispensable per el creixement i desenvolupament en les rates [37].

### 5.1.2. Catalasa.

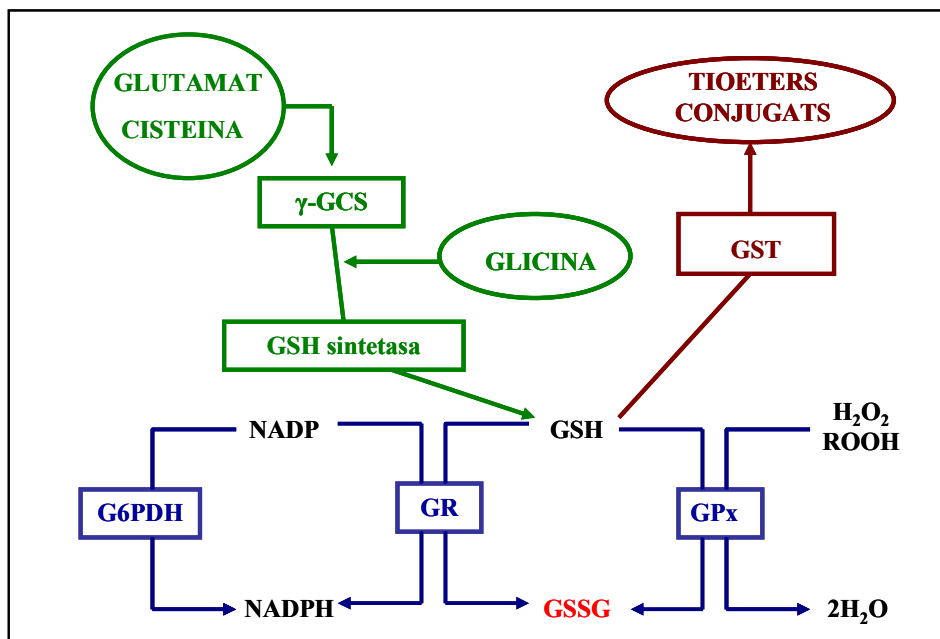
La catalasa (CAT) és un enzim tetramèric format de quatre subunitats idèntiques de 60 kDa disposades tetraèdricament i que conté quatre grups de ferro-protoporfirina per molècula. La seva funció, localitzada en l'interior dels peroxisomes, és descomposar el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) (reacció 2) generat en la reacció catalitzada per la SOD. La cèl·lula empra per a la reducció del  $H_2O_2$  els enzims GPx i la CAT. La CAT té una Km alta (25 mM) per al  $H_2O_2$  [39], per tant, el seu efecte és limitat i només pot exercir la seva funció sota condicions on el NADPH sigui un factor limitant o bé quan els nivells de  $H_2O_2$  són particularment elevats [40].

#### Reacció 2)



### 5.1.3. Cicle del Glutatió.

El cicle redox del glutatió (GSH) és un mecanisme que posseeix la funció d'eliminar peròxids lipídics (ROOH) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 6). Els enzims que inclou el cicle son la glutatió peroxidasa (GPx), glutatió reductasa (GR) i, indirectament, la glutatió S-transferasa (GST).



**Figura 6.** El cicle redox del glutatió (GSH).  $\gamma$ -GCS:  $\gamma$ -glutamilcisteina sintetasa, GST: glutatió S-transferasa, G6PDH: glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; GR: glutatió reductasa, GPX: glutatió peroxidasa.

La GPx és una selenoproteïna tetramèrica de 85 kDa [41], localitzada en el citosol i mitocondria. Es troba distribuïda en diferents teixits, principalment en fetge, ronyó, cervell i en plasma humà [42].

La GPx empra el glutatió (GSH) com a cosubstrat, donador de protons, per a metabolitzar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i peròxids lipídics (ROOH), amb la subsegüent oxidació del GSH a glutatió oxidat (GSSG). La regeneració de GSSG a GSH, que és el que es coneix com cicle del glutatió, requereix l'acció de la glutatió reductasa (GR) que empra NADPH com a cofactor [11]. La capacitat per reciclar el GSH fa del cicle del glutatió un mecanisme de defensa vital per les cèl·lules i les evita de la depleció cel·lular de tiols. Sota circumstàncies normals, no hi ha un pèrdua neta de GSH després de l'oxidació. Això no obstant, l'estrès oxidatiu sever pot afectar en gran mesura l'activitat enzimàtica



de GR o l'aport de NADPH, i resulta en darrer terme una acumulació de GSSG en el citosol [43,44]. Com a conseqüència d'aquesta acumulació, la ràtio GSH/GSSG disminueix, essent aquest un paràmetre cabdal i indicatiu de la modificació de l'equilibri redox cel·lular.

El cicle del GSH es considera més eficient que la catalasa en condicions fisiològiques per diverses raons: 1) els enzims que en formen part es distribueixen a través del citosol; 2) La baixa velocitat, en condicions normals, de producció cel·lular de  $H_2O_2$ ; i 3) el valor de la  $K_m$  és inferior per la GPx (0,24 mM) que per la catalasa (25 mM) [45] per al peròxid d'hidrogen com a substrat de la reacció. Tot això suggereix que la GPx en concret, i el cicle del GSH en general és la via preferencial per a la degradació de petites concentracions d' $H_2O_2$  que es donen en condicions fisiològiques.

## 5.2. Sistemes de defensa no enzimàtics.

A més dels antioxidants enzimàtics, una segona línia de defensa la proporcionen proteïnes i altres biomolècules antioxidants.

Les proteïnes antioxidants generalment poden tenir funcions duals, és a dir, com a proteïnes transportadores, i alhora magatzem de metalls, i també com a quelants d'aquests ions metàl·lics. Alguns exemples són la transferrina i ferritina per el ferro i la ceruloplasmina per al coure [46]. La metal·lotioneïna, una proteïna que conté zinc, també ha estat postulada per funcionar com a proteïna antioxidant [47,48] i, malgrat que els mecanismes de la seva activitat són encara desconeguts, es creu que es deu al seu contingut en cisteïnes i al grup sulfhidril, altament reductors que comprenen 1/3 del total de la proteïna [49].

Un altre component del sistema de defensa antioxidant inclou un ampli espectre de biomolècules, normalment obtingudes desde la dieta, que inclouen nutrients essencials com la vitamina E, C, metalls com el zinc o el seleni. Alguns components de la dieta no nutritius també mostren propietats antioxidants, incloent els carotenoids, i els flavonoides.

### 5.2.1. *Glutatió (GSH).*

Entre el sofisticat sistema de defensa cel·lular, el glutatió (GSH) és un dels antioxidants no enzimàtics més rellevants. Estructuralment, és un tripèptid de *L*-glutamat, *L*-cisteïna i glicina, que conté un inusual enllaç  $\gamma$ -pèptid entre el glutamat i la cisteïna, que evita que sigui hidrolitzat per peptidases intracel·lulars. En els mamífers, el GSH és l'antioxidant intracel·lular més concentrat (1-10 mM) i gairebé el 90% del GSH cel·lular està localitzat al citosol, un 10% a la mitocondria i un petit percentatge al reticle endoplasmàtic [50].

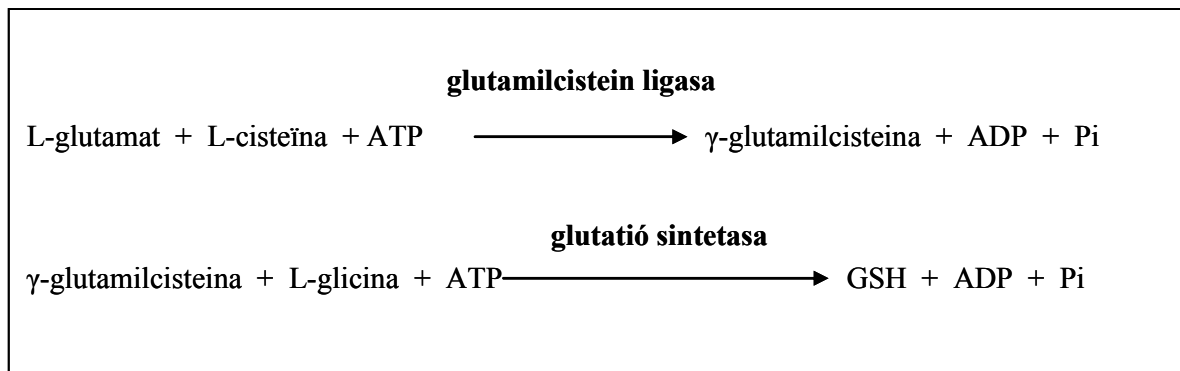
La seva funció com antioxidant no és eliminar directament les ROS, sinó mantenir l'estatus tiol de moltes proteïnes en la seva forma reduïda i participar en reaccions enzimàtiques antioxidants proporcionant els equivalents reductors. L'element clau d'aquesta funcionalitat és la unitat cisteïnica, que proporciona el grup tiol reactiu, i que li permet, per tant, participar en reaccions redox o conjugar-se a electròfils [51].

El GSH actua a través de tres reaccions: 1) reaccions de conjugació; 2) oxidació i 3) degradació (via de l'àcid mercaptúric).

Les glutatió *S*-transferases (GST) són una família d'enzims citosòlics enllaçats a membrana; formen part indirecta del sistema del cicle del GSH (Figura 6), catalitzant la conjugació de GSH amb electròfils exògens [43,52]. D'aquesta forma, constitueixen la principal via de detoxificació de fase II i metabolització de fàrmacs. Els compostos resultants de la conjugació són metabolitzats a través de la via de l'àcid mercaptúric i excretats de la cèl·lula per a ser eliminats per l'orina [52]. Com a resultat, la conjugació del GSH usualment finalitza amb un consum irreversible de GSH intracel·lular. Aquesta pèrdua de GSH només pot ser revertida amb la síntesi *de novo* de GSH.

El GSH és sintetitzat des dels seus aminoàcids precursors en el citosol [53,54], en dues etapes catalitzades per la glutamil cisteïn ligasa (GCL) i la GSH sintetasa (reaccions 3 i 4)

## Reaccions 3 i 4)



Com s'ha vist, el glutatió existeix en dues formes: la forma reduïda, GSH, i la forma oxidada disulfur, GSSG. La majoria de glutatió resideix en la cèl·lula com a GSH amb només una petita porció en forma GSSG. En el citoplasma i la mitocondria, aquesta relació excedeix el 10:1 [51], mentre que en el reticle endoplasmàtic, on el GSH està implicat en la formació d'enllaços proteics disulfur, la relació GSH/GSSG és 3:1 [55]. Sota condicions de estrès oxidatiu, aquestes relacions poden canviar dràsticament cap a acumulacions de GSSG i la corresponent disminució de la ràtio GSH/GSSG.

En aquestes condicions d'estrès oxidatiu, la depleció de GSH mitocondrial ha estat suggerida com un pas clau en el procés nociu que resulta en darrer terme en mort cel·lular [56-58]. Així, és lògic pensar que la mitocondria ha desenvolupat un sistema d'import efectiu que permet mantenir el contingut de GSH mitocondrial constant fins i tot quan els nivells citosòlics siguin baixos [50,59].

### 5.3. Integració dels sistemes antioxidants.

Juntes, les defenses antioxidants formen un entramat de treball que proporciona una barrera contra l'excés de ROS que es produeix durant el metabolisme aerobi. Així, el balanç entre la generació de ROS i les defenses antioxidants és el factor determinant en el desenvolupament del dany tissular mediat per les ROS. Un profund coneixement de l'antagonisme entre les defenses antioxidants i l'estrès oxidatiu té una significació clínica molt rellevant, particularment si tenim en compte el tractament dels símptomes

i condicions per les quals l'estrès oxidatiu s'estima que és un component crític a la patogènesi d'algunes malalties.

### 6. Estrès oxidatiu i enzims antioxidants.

Malgrat que la generació de ROS durant el metabolisme aerobi és indispensable en molts processos vitals de l'organisme, en els darrers anys ha augmentat el nombre de malalties en les quals, com a component de la seva etiologia, apareixen danys atribuïbles a productes de l'acció dels radicals lliures i, per tant, s'associen com a factor secundari a un estat d'estrès oxidatiu [60,61]. Una producció desequilibrada de ROS s'ha demostrat que desenvolupa un rol primordial en la patogènesis de diversos desordres fisiològics com l'isquèmia/reperfusió, l'aterosclerosi, malalties neurodegeneratives, al·lèrgies, càncer i, en definitiva compromet la viabilitat cel·lular i/o promou la proliferació de cèl·lules tumorals. També s'ha establert un alt grau de correlació entre l'estrès oxidatiu i altres patologies com l'Alzheimer, el Parkinson, la síndrome de Down, l'hepatitis, l'artritis, la infecció amb HIV, complicacions diabètiques, formació de cataractes, degeneració macular i úlceres [62].

Els enzims antioxidants, com a part fonamental del sistema de defensa de l'organisme contra la producció, prevenció i reparació dels danys moleculars generats per les ROS, tenen en la influència de la seva expressió gènica el nexa comú en nombrosos estudis enfocats a la relació entre l'estrès oxidatiu i patologies clíniques. De fet, estudis recents han implicat els enzims antioxidants en la resistència a la insulina, la síndrome de Down, l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS), etc...

Agents inductors d'estrès oxidatiu afecten en diferents graus a l'expressió i activitat dels enzims antioxidants en els diferents teixits de l'organisme [63,64]. Malgrat que en alguns casos s'ha descrit així [61], no sempre es dona l'expressió coordinada dels enzims antioxidants en resposta a aquests estímuls oxidants [65,66].

Sembla que la forma més comuna de regulació de l'expressió dels enzims antioxidants és transcripcional [66], i, en aquest sentit, diferents laboratoris estan investigant els elements genètics i mecanismes responsables d'aquesta regulació transcripcional. Sembla que aquesta regulació es produeix via seqüències de resposta a antioxidants (Antioxidant Responsive Elements, AREs), tot i que només se n'han identificat i caracteritzat en la GST [67], i seqüències similars en el cas de la GPx [68]. D'altra banda, sí que es detecta una possible coordinació en la resposta dels enzims del cicle del glutatió sota condicions d'estrès oxidatiu. L'acció concertada de la GPx, GR, GST i els conjugats de la GST, i el seu efecte antioxidant i de preservació o recuperació del contingut de GSH (que decreix en condicions d'estrès), permeten en el seu conjunt adaptar-se a aquestes condicions. Aquesta coordinació s'assoleix, almenys en part, a través d'aquests elements de resposta antioxidant (AREs), localitzats en els promotors de molts gens que són induïts per estressos oxidatius i químics. L'activació transcripcional sembla que es produeix a través de factors de transcripció com Nrf i petites proteïnes Maf. La naturalesa d'aquests sensors intracel·lulars de ROS que indueixen gens a través de l'activació d'AREs, sembla que donen resposta a la capacitat antioxidant estimulada i a una major capacitat de detoxificació de les cèl·lules normals, efectives per a molts agents quimiopreventius del càncer. A més, en certs casos, expliquen la resistència adquirida d'alguns tumors a fàrmacs quimioterapèutics. Per tant, està clar que determinar els mecanismes que involucren la regulació de l'expressió de gens conduïts per AREs té enormes implicacions mèdiques [69].

A més d'aquests controls transcripcionals, també s'han descrit altres tipus de controls sobre la regulació dels enzims antioxidants. Per exemple, controls posttranscripcionals a través de l'estabilització de l'mRNA de la CAT en pulmó de rata perinatal [70], múscul i fetge de rata [66]. Comparant les dades, no sempre coherents entre si, aquests estudis suggereixen que la complexitat dels factors intracel·lulars i senyals regulen l'expressió dels enzims antioxidants en diferents tipus cel·lulars en resposta a anomalies genètiques i metabòliques.

La repressió d'enzims que alliberen ROS és part també d'aquesta acció concertada de resposta antioxidant. Així doncs, sota condicions d'estrès oxidatiu, és important no tan

sols induir eliminadors de radicals sinó reprimir generadors de radicals. En aquest sentit, la resposta cel·lular a l'estrès oxidatiu consisteix en regulacions transcripcionals oposades però complementàries: la inducció d'enzims antioxidants i la inhibició d'alliberadors de ROS com les monooxigenases, i diversos estudis han descrit que la inhibició per oxidació de l'IRP (Iron-Regulatory Protein) per xantina oxidasa és revertida o previnguda per la SOD i CAT, mantenint regulada l'homeòstasi d'aquest metall [71].

Altres autors han comparat l'eficiència de Cu,Zn-SOD, GPx i CAT en fibroblasts humans, on les activitats d'aquests enzims han estat modulades en l'interior cel·lular i la repercussió d'aquests canvis, en diferents condicions d'estrès oxidatiu. Es va trobar que tots tres enzims protegien les cèl·lules, amb una notable eficiència de la GPx i emfatitzant el fet que cada enzim té una funció específica i insubstituïble. L'activitat de tots tres és necessària i la seva actuació és cooperativa o sinèrgica per a assegurar la supervivència cel·lular. No obstant això, la protecció òptima s'assoleix només si el balanç apropiat entre les activitats d'aquests enzims es manté en el temps. La interpretació de la severitat dels efectes nocius dels radicals lliures s'ha d'analitzar amb relació al grau d'eficiència de les activitats del sistema antioxidant, ja que el llindar de protecció pot variar dramàticament en funció de les activitats d'aquests enzims antioxidants [72].

Fent referència a patologies concretes i a la funció dels enzims antioxidants per a prevenir l'estat d'estrès oxidatiu que hi està associat, s'han descrit, per exemple, que mutacions en la Cu,Zn-SOD són responsables d'un 10-15% de casos de la disfunció neuronal en l'ALS [73]. Els pacients amb aquestes mutacions en el gen que codifica Cu,Zn-SOD citosòlica i múltiples evidències en experiments amb cultius cel·lulars i models transgènics indiquen que aquestes mutacions fan que Cu,Zn-SOD adquireixi un caràcter tòxic en certes condicions degeneratives.

La diabetis és una patologia en la qual el marc de l'estrès oxidatiu està inclòs en la seva etiologia, ja que es detecta un increment en el nombre de ROS. En estudis sobre l'efecte

dels enzims antioxidants en la diabetis en rates s'han trobat que les activitats de la Cu,Zn-SOD i la GR no estaven afectades en fetge, cor i ronyó, mentre que les activitats de la CAT i la GPX estaven augmentades en aquests teixits. Si a aquestes dades li afegim una depleció molt marcada dels nivells de GSH en rates diabètiques, s'ha pogut concloure que l'acció concertada dels enzims antioxidants per a mantenir baixos els nivells de radicals lliures i així evitar l'estrès oxidatiu, resulta inefectiva [74]. Rates no hiperglicèmiques resistents a la insulina han mostrat que l'expressió de la CAT està reprimida en fetge i cor, generant estrès oxidatiu [75].

L'estrès oxidatiu en la hipertensió contribueix al dany vascular en promoure la proliferació de cèl·lules vasculars musculars llises, disfunció endotelial i alteració del to vascular. Això indueix un remodelatge vascular i anormalitats en els processos de contracció-relaxació, que caracteritzen el dany vascular en el marc d'aquesta disfunció [76]. Les dades de modificacions en les activitats dels enzims antioxidants en teixits com el miocardi, endoteli vascular, fetge, ronyó o eritròcits són confosos i no sempre coherents. En alguns casos es va observar que nivells diferents d'enzims i l'estat redox depenien del *background* genètic o dels models d'animals hipertensos emprats [77-79]. Alguns dels canvis descrits, com la desregulació de sistemes enzimàtics com la NADPH oxidasa i també la SOD, que resulta en un increment de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  i  $\cdot OH$ , partien de l'observació de nivells ja incrementats d'anions superòxid en els teixits afectats [78], probablement responsables de modificacions en processos de senyalització, on els nivells de  $Ca^{2+}$  són cabdals, o en la pressió arterial. En aquests casos, conjuntament amb una disminució de la capacitat eliminadora de radicals lliures per antioxidants endògens, per exemple, el GSH i els enzims que el generen o reciclen (GCS i GR), és el que produeixen efectes perjudicials en l'estructura i funcions vasculars.

Estudis en l'estat final d'una fallada cardíaca han mostrat que la sobrerregulació de la CAT és un mecanisme de resposta compensatori a l'increment de l'estrès oxidatiu, malgrat que altres enzims antioxidants clau com la Cu,Zn-SOD o la GPx no estan sobrerregulats [80].

L'acumulació d'LDL oxidades (LDLox) en la paret arterial ha estat proposat com a pas clau en el desenvolupament de l'aterosclerosi. Diversos estudis han mostrat que un increment en l'activitat de la SOD és capaç de prevenir aquesta oxidació en cultius [81]. Per exemple, Heineke i col. van demostrar que l'addició de SOD al medi de cultiu inhibeix l'oxidació de les LDL induïda en SMC (cèl·lules musculars llises) humanes i de ratolí [82]. D'altra banda, Steinbrecher va observar que la SOD atenua l'oxidació de les LDL per EC (cèl·lules endotelials) de conill i SMC en cultius [83]. Més recentment, Fang i col. han demostrat que la transducció dels gens *Sod1* (Cu,Zn-SOD) o *Sod 2* (Mn-SOD) dins d'EC redueix l'oxidació de les LDL [84]. L'efecte dels enzims antioxidants en la mort cel·lular induïda per l'oxidació de les LDL també ha estat investigada. Per exemple, Galle i col. han observat que la presència de SOD i CAT exògenes en el medi de cultiu inhibeix l'apoptosi induïda per l'oxidació de les LDL en EC humanes i en segments d'aorta de conill [85].

La preservació de la induïbilitat de la SOD en leucòcits sembla ser que es correlaciona amb la longevitat en individus d'edat avançada i pot ser un valor per a predir la resistència a successos cardiovasculars fatals [86]. Les espècies d'oxigen són elements clau que participen en el dany provocat per isquèmia/reperfusió. Teixits coronaris i del cervell estan protegits d'aquest dany oxidatiu pels enzims antioxidants com la SOD o GPx. La sobreexpressió d'aquests enzims confereix protecció significativa tant contra l'infart i l'edema cerebral en micos transgènics [87]. Els resultats amb experiments amb aquests animals demostren que l'anió superòxid és un important mediador del dany postisquèmic i que l'increment intracel·lular de Cu,Zn-SOD protegeix dràsticament el cor d'aquest dany. Per tant, l'increment en l'expressió de la Cu,Zn-SOD com a part de la teràpia clínica pot ser una aproximació altament efectiva per a decreïxer el dany cel·lular provocat per la reperfusió de teixits isquèmics [88].

El pulmó és un òrgan que està més exposat que els altres teixits de l'organisme a alts nivells d'oxigen. Els nivells de ROS en pulmó s'incrementen marcadament per tabaquisme, inflamació, pol·lució, agents carcinògens, entre altres [89-92]. El



desequilibri entre l'estat redox cel·lular i els sistemes de defensa pulmonars juga, òbviament, un paper cabdal tant en la patogènesi com en la progressió de malalties pulmonars entre les que destaca el càncer de pulmó, on s'han detectat altes quantitats de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  i  $\bullet OH$ . L'efecte dels enzims antioxidants ha estat centre d'atenció en aquest tipus de malalties, tenint en compte que la Cu,Zn-SOD està altament expressat en l'epiteli bronquial [83], i malgrat que han estat caracteritzats un bon nombre de polimorfismes funcionals d'aquest enzim, no s'ha trobat associacions entre aquests i el desenvolupament de disfuncions pulmonars. Tampoc s'han detectat canvis en el missatger (mRNA) i nivells de proteïna en càncer de pulmó en humans [93,94].

En un estudi referent al dany oxidatiu pulmonar induït per inhalació de  $NO_2$ , el patró de regulació de la Cu,Zn-SOD respon de forma diferent al d'Mn-SOD. La inducció d'mRNA, com a conseqüència del tractament amb  $NO_2$ , només es reflecteix a nivells de proteïna en el cas de la Cu,Zn-SOD, tant en dany oxidatiu agut com en crònic, malgrat que l'activitat enzimàtica disminueix en el primer. La falta de coordinació observada en aquest cas entre els nivells d'mRNA, contingut proteic i activitat enzimàtica de la Cu,Zn-SOD i Mn-SOD en rates exposades a  $NO_2$  indica que l'expressió d'aquests gens està controlada a nivells transcripcionals, traduccionals i/o post-traduccionals, sense poder-ne extreure una idea més clara [95].

Una de les associacions més descrites entre condicions degeneratives i estrès oxidatiu és la que fa referència a l'envelliment. Sembla que la Cu,Zn-SOD és un enzim clau per a la prevenció de l'envelliment, les mutacions per estrès oxidatiu i els efectes nocius que comporten els danys mediambientals [96,97]. En l'actualitat s'està discutint els mecanismes d'inducció de la Cu,Zn-SOD per tòncics naturals (ginsenòsids), citoquines (interferó gamma), i factors ambientals fortament associats a l'estrès oxidatiu com la calor, metalls pesants (Cd, Cu, Zn), xenobiòtics, herbicides (paraquat) i peròxid d'hidrogen. D'altra banda, la relació que s'estableix entre la longevitat, l'envelliment i l'activitat dels enzims antioxidants continua sent una àrea de controvèrsia i de resultats confosos. En estudis amb humans, existeixen diferències associades amb l'edat en nivells d'expressió dels enzims antioxidants en eritròcits, amb una correlació negativa

entre la SOD i l'edat, i positiva amb les activitats CAT i GPx amb l'edat [30]. De tot això, se'n conclou que l'expressió dels enzims antioxidants esta pobrament connectada a la longevitat, malgrat que aquesta expressió pot ser un avantatge en situacions d'estrès agut. En contrast amb aquesta conclusió, altres estudis amb SOD i CAT sintètiques mostren un efecte de retràs en l'envelliment [98].

La pràctica de l'exercici físic és, potencialment, un model de causa d'estrès oxidatiu, atès que en els sistemes animals el consum incrementat d'oxigen molecular en la respiració pot generar quantitats incrementades de ROS, estimulant els mecanismes generadors d'aquestes espècies [99]. Aquests increments en la producció de radicals lliures es reflecteixen en increments en la circulació de substàncies reactives de l'àcid tiobarbitúric (TBARS) -indicador de peroxidació lipídica-, i nivells de GSSG [100]. Com a exemple, en eritròcits, hi ha un increment de les activitats SOD i GPx [101,102], malgrat que els nivells de activitat CAT restaven iguals. En les artèries coronàries només s'observa l'augment de Cu,Zn-SOD però no d'Mn-SOD, CAT ni de GPx [103], i en fetge s'han descrit augments i disminucions de la Cu,Zn-SOD, CAT i GPx, atribuint alguna d'aquestes diferències en la resposta a l'exercici a la hipertensió espontània que hi està relacionada [66]. Cal observar que el patró d'activitats en resposta a l'exercici esta influït pel grau d'entrenament, dels hàbits, localització, etc., i que malgrat que l'etiologia dels efectes nocius de l'exercici no està del tot caracteritzat, s'ha suggerit que els increments en les activitats dels enzims antioxidants són resposta a elevats nivells d'estrès oxidatiu en teixits musculars.

També s'han descrit els metalls com inductors d'estrès oxidatiu, resultant en una depleció dels nivells de GSH, i malgrat que s'activen els enzims responsables de la seva síntesi (GCS,GS), la seva recuperació no és completa. En aquest cas, l'actuació d'altres enzims antioxidants pot restaurar aquest desequilibri en funció de la severitat del dany oxidatiu. Tanmateix, la majoria d'aquests enzims esdevenen inactius també a causa de la unió del metall al centre actiu de l'enzim, si aquest conté grups sulfhidril [104], o en reemplaçar el metall que l'enzim emprava com a cofactor, com és el cas del Zn en la Cu,Zn-SOD [105].

Altres enzims antioxidants, encarregats d'eliminar peròxids i radicals superòxid incloent GPx, CAT i SOD, són també dianes potencials del plom. Atès que GPx requereix Se per a la seva activitat, quan el Pb forma un complex amb el Se, l'activitat de la GPx decreix [106,107]. La SOD requereix Cu i Zn per a la seva activitat. Els ions Cu sembla que tenen un rol funcional en la reacció per oxidacions alternades, mentre que el rol del Zn sembla el d'estabilitzar l'enzim [108] i sembla que el Pb decreix l'activitat Cu,Zn-SOD [109] pels mateixos motius.

Estudis de sobreexpressió de la Cu,Zn-SOD que es produeix com a resultat de la trisomia de la síndrome de Down suggereix un rol d'aquest enzim en la neuropatologia d'aquesta malaltia [110].

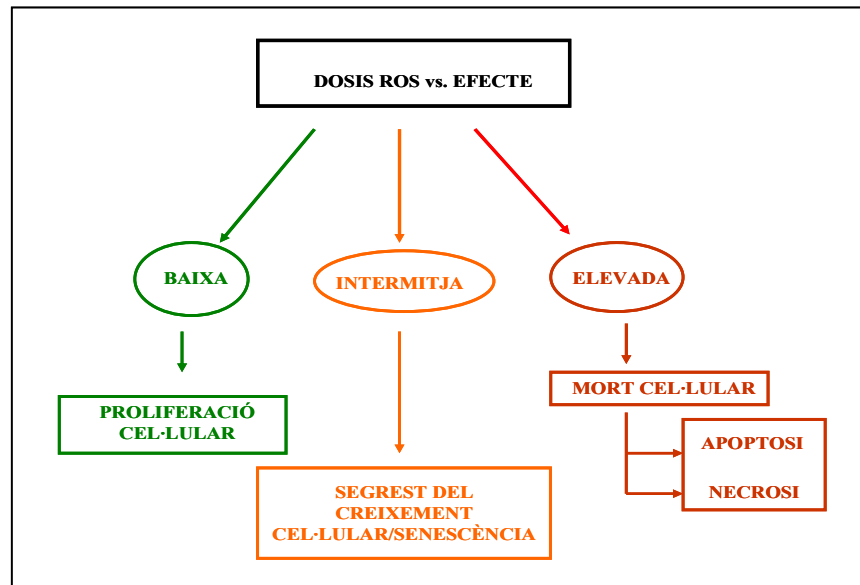
S'han realitzat experiments en els quals s'ha observat que una sobreexpressió d'algun dels enzims antioxidants resulta en un menor dany oxidatiu, per exemple, quan el DNA resulta danyat per radicals hidroxil es produeix l'espècie 8-oxo-2'-desoxiguanosina. Relatiu a això, la sobreexpressió de Cu,Zn-SOD i CAT causa un retard en l'acumulació d'aquesta espècie durant el creixement [111]. Existeix, també, una relació entre els nivells d'activitat dels enzims antioxidants i tres tipus de molècules missatgeres (factors de creixement, prostaglandines i òxid nítric) implicades en l'homeòstasi cel·lular, és a dir, un equilibri entre el manteniment de les condicions estàtiques o estacionàries en el medi intern cel·lular i els nivells de ROS [112].

## 7. ROS i senyalització cel·lular.

Tradicionalment, s'ha parlat de ROS, d'estrès oxidatiu i implícitament hom considerava el sistema de defensa i la seva resposta modulant la seva expressió, com a conseqüència directe i gairebé exclusiva de l'alteració del balanç redox cel·lular. En els darrers anys, però, han sorgit nombrosos estudis que han estat partida d'un ventall de possibilitat d'acció de les ROS.

En aquest sentit, en l'àmbit cel·lular, les respostes en condicions oxidatives abracen les vies de senyalització implicades en la proliferació, supervivència i/o mort cel·lular. Tanmateix, els efectes depenen de les circumstàncies en les quals es produeix el dany i, sobretot, de la magnitud i durada d'aquest [24] (Figura 7).

La resposta de l'organisme reflecteix el balanç entre les diferents vies de senyalització intracel·lulars activades en resposta a l'insult oxidatiu. De fet, els oxidants modulen les vies de senyalització modificant els receptors de superfície cel·lular, quinases i fosfatases. Aquesta modulació és fonamental en la regulació de factors de transcripció de gens implicats en el desenvolupament de diverses malalties i en les influències fenotípiques que se'n deriven. Aquests senyals afecten processos tan diversos com l'apoptosi, diferenciació, proliferació i canvis en la morfologia cel·lular [113,114].



**Figura 7.** Les conseqüències de l'acció de les espècies reactives d'oxigen (ROS) depenen de la severitat del dany, el qual també està afectat pel tipus cel·lular i la durada de l'exposició. Generalment, baixes dosis de ROS; particularment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, són mitogèniques i promouen la proliferació cel·lular, mentre que dosis intermitges esdevenen en un segrest transitori o permanent del creixement, o una replicació senescent. L'estrès oxidatiu molt sever, en darrera instància, causa la mort cel·lular per apoptosi o per mecanismes necròtics.

## 7.1. Vies MAPK.

Els diferents membres de la superfamília de proteïnes activades mitogèniques (MAP) són proteïnes quinases que participen en cascades de senyalització conservades en l'evolució, que regulen importants activitats biològiques. Aquest grup transfereix senyals generats per estímuls exògens i endògens cap a l'interior de la cèl·lula a través de successives fosforil·lacions de proteïnes mitjançant una determinada via de la qual en formen part [115].

Aquestes vies estan activades per cascades de senyalització independents (a vegades s'entrecreuen), d'entre les quals en destaquen tres:

- quinases regulades extracel·lulars (ERK),
  - c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal quinasa (JNK),
  - protein 38 (p38),
- } SAPK (Stress activated protein kinases)

Tenint en compte que les senyalitzacions són una sèrie de successives reaccions de fosforil·lació, que en darrer terme produeixen canvis en l'expressió gènica, les

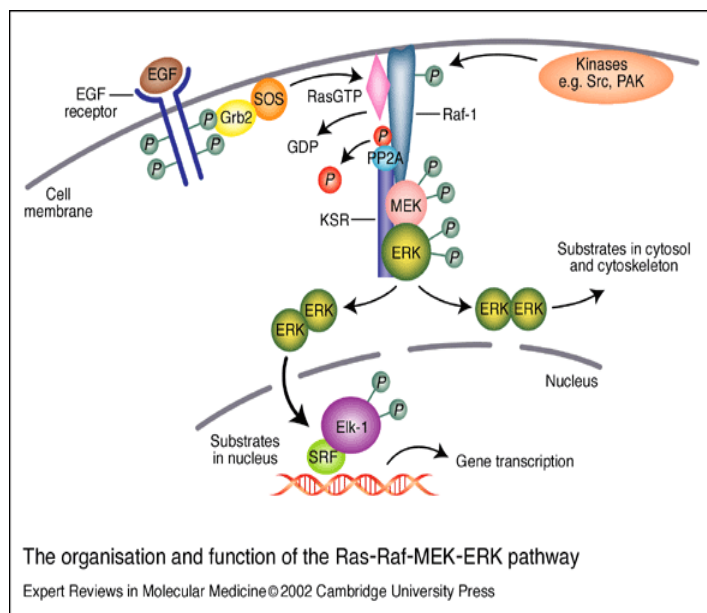
fosfatases (inactivadores de les quinases responsables de la fosforil·lació) prevenen la senyalització constitutiva. En aquest sentit, el peròxid d'hidrogen, s'ha demostrat que inhibeix transitòriament les fosfatases [116,117].

### 7.1.1. Via ERK.

La via ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinases) o també denominada p44/42 és un mecanisme de senyalització extracel·lular que consisteix en una cascada de proteïnes que lliga senyals de creixement i diferenciació amb la transcripció de gens dins el nucli (Figura 8).

En presència de peròxid d'hidrogen es fosforil·len factors de creixement (EGF, PDGF) [118], activant la via de senyalització. Això és consistent amb l'observació de que baixes concentracions de peròxid d'hidrogen són mitogèniques [119], afavorint així la proliferació cel·lular.

**Figura 8.** Organització de la via Ras-Raf-MEK-ERK pathway. L'enllaç del factor de creixement epidèrmic (EGF) al seu receptor porta a la formació del complex Grb2-SOS, que activa petites G-proteïnes Ras que canvien la conformació unint-se a Raf-1 i reclutant-lo cap a la membrana citosòlica on s'activa. La Raf-1 activada fosforil·la MEK (MAPKK), que activa la ERK. L'ERK activada té diversos substrats al citosol (proteïnes del citoesquelet, fosfolipasa A2, activadors de proteïnes de transcripció (STAT) i altres). L'ERK pot entrar al nucli per controlar l'expressió gènica per fosforil·lació de factors de transcripció com Elk-1 o Grb2 entre d'altres.



El mecanisme de com els oxidants inicien aquesta activació no està clar, tanmateix hi ha dues possibles explicacions:

- 1) imitant (mimetitzant) els efectes de la interacció lligand-receptor de forma directa donant pas a l'activació dels receptors dels factors de creixement i a la posterior cascada de senyalització [120].
- 2) inactivant fosfatases de membrana sensibles als nivells de glutatió (GSH), necessàries per a la desfosforil·lació del senyal del receptor del factor de creixement (EGFR) [121]. De fet, la fosforil·lació d'EGFR per peròxid d'hidrogen i altres agents inductors de l'estrès està precedit per una depleció dels nivells de GSH i una acumulació intracel·lular de peròxid d'hidrogen [122].

No obstant això, el caràcter de l'activació d'ERK com a factor de proliferació cel·lular en resposta al dany oxidatiu té el seu contrapunt en diversos estudis que demostren que l'activació d'ERK en resposta a oxidants esdevé en apoptosi [123,124].

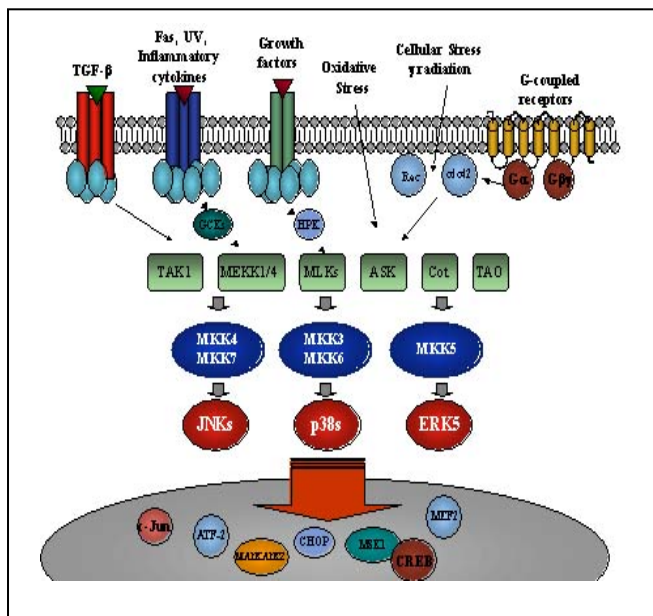
Què és el que determina, doncs, que l'activació d'ERK esdevingui en un procés anti- o proapoptòtic ?. És encara una qüestió que cal resoldre. Això no obstant, la cinètica i durada de la seva activació poden ser factors importants. Per exemple, en situacions on l'activació d'ERK estimula la supervivència cel·lular, l'activació és ràpida i és més transitòria [125], i en situacions on és apoptòtic, l'activació tendeix a donar-se amb retard i de forma sostinguda [126].

### ***7.1.2. Via SAPK (p38 & JNK).***

Les vies JNK i p38 estan lligades a estímuls associats a condicions d'estrès i sovint s'activen d'una forma coordinada. Per tant, JNK i p38 s'agrupen per a ser denominades SAPK (Stress Activated Protein Kinases) [127,128].

Aquestes vies (Figura 9) són sensibles a canvis en l'estat redox [129], i per tant, resulten modificades (activades) en condicions oxidants. De fet, proteïnes redox

reguladores s'uneixen, inhibint a ASK1 (quinasa proapoptòtica) i impedit l'activació de JNK i de p38 [130], reduint així l'apoptosi per estrès oxidatiu [131]. Tanmateix, en condicions oxidants severes es produeix la dissociació del complex Prot-ASK1 activant així les vies JNK i p38.



**Figura 9.** L'estrès oxidatiu activa una MAPKKK (ASK) que fosforil·la i activa MKK 3-7, que alhora pot esdevenir en l'activació de JNK i p38.

Aquestes vies, en ser susceptibles a variacions redox, poden estar afectades per l'acció del sistema d'enzims antioxidants. En condicions de no estrès, la glutatió S-transferasa (GST) es lliga a JNK i inhibeix la seva activació, lligam que es destrueix en condicions d'estrès oxidatiu [132].

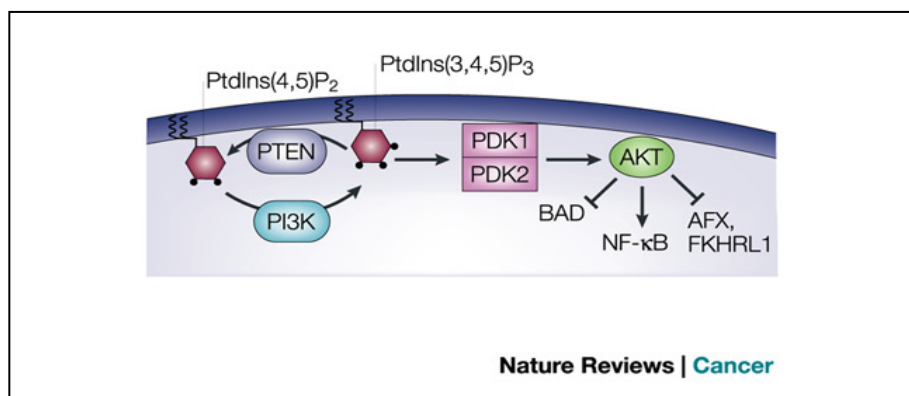
La influència de l'activació de JNK en la supervivència cel·lular sota estrès oxidatiu és força controvertida. D'una banda, l'activació de JNK està correlacionat amb la mort cel·lular o apoptosi induïda per agents que actuen, en part, per la generació de ROS [133]; d'altra banda, però, s'ha suggerit un efecte proliferatiu degut a JNK durant el dany oxidatiu. Per exemple, la delecció de MEKK1 (Figura 9) que també inhibeix l'activació de JNK en resposta a peròxid d'hidrogen en miòcits cardíacs, incrementa marcadament la seva sensibilitat a l'apoptosi induïda per oxidants [134].



La influència de p38 en apoptosi induïda per oxidants pot ser també específica d'agents. En aquest sentit, s'ha demostrat que p38 és requerit per a l'apoptosis induïda per oxigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ), però no ho és si és induïda per peròxid d'hidrogen [135], i que sota condicions de estrès oxidatiu moderat, on no es dona l'apoptosi, l'activació de p38 participa en l'arrest mitòtic [136].

### 7.1.3. PI3K i Akt.

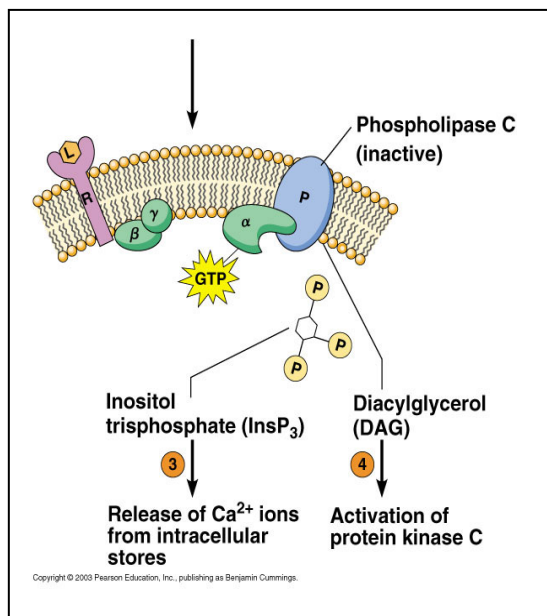
Tal i com es produeix en les vies MAPK, les reaccions de fosforil·lació són el centre de l'activació de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) i la seva diana cascada avall, Akt (Figura 10). De la mateixa manera que a la via ERK, l'activació d'Akt en resposta a danys oxidatius es produeix en gran part a través de receptors de factors de creixement (EGFR, VEGFR) [137]. Per exemple, el peròxid d'hidrogen i l'oxigen singlet activen PI3K de sistemes *in vitro* [138-141]. No obstant això, la fosforil·lació de ASK1 (veure 7.1.2.) per Akt prevé l'activació de JNK i la de la seva diana posterior en la cascada ATF-2, protegint les cèl·lules contra l'apoptosi induïda per peròxid d'hidrogen [142].



**Figura 10.** La via de senyalització PI3K i la seva diana cascada avall, Akt, activen el creixement per la supressió de factors apoptòtics com BAD, Caspasa 9 i IKK $\alpha$  [143]. Contràriament, la inhibició d'Akt pot provocar l'apoptosi cel·lular [144].

### 7.1.4. Fosfolipasa C- $\gamma$ 1.

La fosfolipasa C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) és un component citosòlic essencial de les vies de senyalització estimulades per receptors de factors de creixement que s'activen en resposta a danys oxidatius (Figura 11).



**Figura 11.** Via de senyalització de la PLC- $\gamma$ 1. Catalitza la hidròlisi de PI4,5-P2 cap a inositol 1,4,5-trifosfat i diacilglicerol, que actua com a segon missatger per provocar la mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  i l'activació de la proteïna quinasa C (PKC), respectivament [145,146].

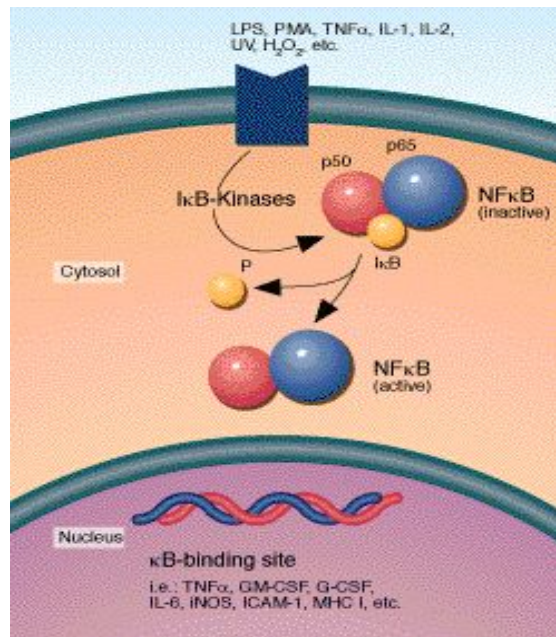
La PLC- $\gamma$ 1 s'activa (fosforil·la) en resposta a tractament amb peròxid d'hidrogen [147,148], aquesta activació suprimeix l'apoptosi induïda per UVC [149], malgrat que no s'ha trobat efecte protector per una sobreexpressió de PLC- $\gamma$ 1 en altres tipus cel·lulars davant de diferents agents oxidants [150].

### 7.1.5. Factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

L'NF- $\kappa$ B és el prototip de factor de transcripció nuclear eucariòtic sensible a variacions redox activat per diferents estímuls, entre ells l'estrès oxidatiu [151] (Figura 12).

Cada pas successiu en la cascada de senyalització de NF- $\kappa$ B comprèn proteïnes sensibles a canvis redox, l'activitat de les quals està modulada en funció de l'estat oxidatiu cel·lular [152,153]. Les ROS inhibeixen la unió de NF- $\kappa$ B al DNA al nucli per oxidació directe de residus Cys específics en el domini d'unió NF- $\kappa$ B-DNA [154,155].

**Figura 12.** El mecanisme d'activació de NF- $\kappa$ B passa per la fosforil·lació del I $\kappa$ B (inhibidor de NF- $\kappa$ B), que en condicions normals està unit a NF- $\kappa$ B i el manté inactiu al citoplasma, prevenint així el seu accés al nucli i al DNA. La fosforil·lació de I $\kappa$ B per IKK (I $\kappa$ -quinasa) o NIK (quinasa induïda per NF- $\kappa$ B) resulta en l'ubiquitació i degradació del complex, alliberant NF- $\kappa$ B que es transloca al nucli i activa factors de transcripció per unió a seqüències específiques del DNA [152,153].



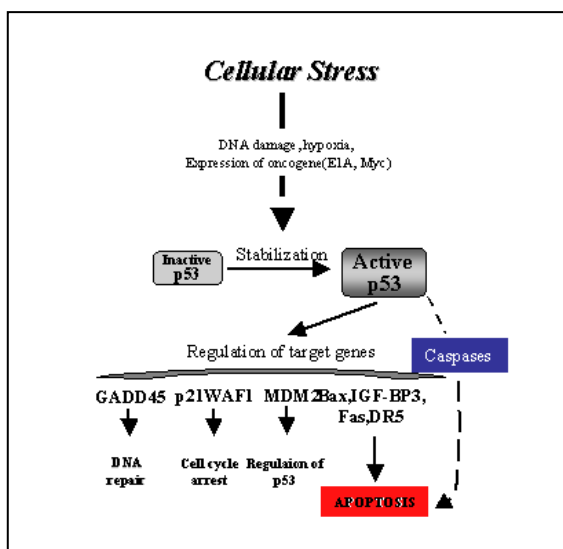
L'NF- $\kappa$ B ha de estar en la seva forma reduïda per exhibir la seva activitat enllaçant al DNA, per tant, la presència d'agents reductors estimulen la seva capacitat d'unio al DNA, mentre que agents oxidants inhibeixen aquesta capacitat. En resposta a condicions oxidants, l'activació de NF- $\kappa$ B porta a l'activació, entre altres, de la transcripció de gens com la ciclooxigenasa 2, GADD45, bcl-2 i c-myc [156-159].

L'efecte net resultant és generalment la inhibició de l'apoptosi i l'estimulació de la proliferació cel·lular. Tanmateix, l'NF- $\kappa$ B activat pot estar implicat en processos proapoptòtics, per associació a gens com el FasL i p53 [160-162].

### 7.1.6. p53

El supressor tumoral p53 és un dels factors de transcripció més sensibles a l'estrès oxidatiu [163], intervenint en la regulació de l'expressió de gens involucrats en el segrest del creixement i/o mort cel·lular [164,165] (Figura 13).

Les ROS, per exemple, el peròxid d'hidrogen, són potents activadores de la funció de p53 per dos possibles mecanismes : dany directe al DNA o per efecte creuat amb altres vies (SAPK i NF-κB) [166,167].



**Figura 13.** En condicions d'estrès cel·lular, s'activa el p53. L'activació del p53 afecta al cicle cel·lular o resulta en apoptosi a través de l'activació de gens com són Bax, membre proapoptòtic de la família Bcl-2 [168] p21 i GADD45 [169] i gens relacionats amb apoptosi des de les vies Fas, Killer/DR5 i PIDD [170,171]

Un altre via per la qual les ROS regulen l'activitat de p53 és modulant l'estat redox d'un residu de Cys crític en el domini d'unió al DNA [163]. Curiosament, l'activació de p53 provoca la generació de ROS, suggerint que una conseqüència important de l'activació de la p53 induïda per agents oxidatius contribueix, al mateix temps, a augmentar el nivell d'aquest estrès oxidatiu [172], possiblement per la modulació transcripcional de gens que estan involucrats en l'estat redox cel·lular [173]. Aquest *feedback* positiu pot ser important en aconseguir un valor llindar de ROS que vinculi a la cèl·lula a sofrir apoptosi.

De fet, hi ha un gran nombre de gens relacionats amb l'estrès oxidatiu que tenen l'expressió alterada després de l'activació de p53, entre els quals destaquen la Mn-SOD i la GPx -eliminadors de ROS-. La Mn-SOD és diana per a la repressió transcripcional per p53 [174], i la sobreexpressió de Mn-SOD estimula la resistència a l'apoptosi induïda per p53 [174,175]. La GPx, important en la regulació redox i en protegir la cèl·lula contra l'estrès oxidatiu, és transcripcionalment activada per p53 [176]. Encara que sembla paradoxal a causa dels efectes generadors de ROS de p53, la inducció de GPx es produeix en un estat molt pròxim a l'inici de l'activació de p53 [176,177], mentre que la generació de ROS esdevé més tard [177].

### **7.1.7. AP-1.**

El factor de transcripció nuclear AP1 és una proteïna complexa composta per heterodímers i homodímers de proteïnes oncogèniques de les famílies *jun* i *fos* (*c-Jun* i *c-fos*) que funcionen com a reguladors en processos de transducció del senyals que estimulen la proliferació cel·lular. L'activitat AP-1, la modulen diversos factors, incloent l'estat redox cel·lular [178]. Tant l'anió superòxid com el peròxid d'hidrogen són capaços d'induir l'activació d'AP-1 [179], malgrat que els mecanismes encara no estan del tot clars.

## **7.2. Fenòmens cel·lulars associats a l'efecte de l'estrès en les cascades de senyalització.**

Els receptors i gens prèviament descrits com a entitats afectades per les ROS interaccionen a través de les vies de transducció dels senyals en afectar, en diferent mesura i forma, importants paràmetres del metabolisme cel·lular, com és el cas del cicle de divisió cel·lular i mecanismes de mort programada o apoptosi.

### **7.2.1. *Cicle cel·lular.***

Les cèl·lules eucariotes es reproduïxen duplicant el seu contingut cel·lular i dividint-se en noves cèl·lules en un procés que consta de 4 fases: G<sub>1</sub> (preparació per a la síntesi de DNA), S (replicació DNA), G<sub>2</sub> (entre el creixement i la duplicació) i M (duplicació) [180]. Els mecanismes de control per a la supervivència, que assegurin que els passos inicials s'hagin donat completament i que verifiquen la integritat cel·lular abans de l'inici dels passos posteriors denominats punts de control "*checkpoints*" del cicle cel·lular, i poden causar un retard transitori. Aquest retard permet a la cèl·lula més temps per a reparar danys abans de progressar cap a la fase següent del cicle. Sota danys severos, les cèl·lules poden sofrir apoptosi o entrar en un estat de senescència que és irreversible.

Tenint en compte que les ROS poden causar danys al DNA, no és sorprenent pensar que tinguin la capacitat inherent de causar el segrest en el procés del cicle cel·lular. De fet, diferents estudis han demostrat que les ROS (sempre tenint present que la funció és dependent del tipus de ROS, de la magnitud i temps d'exposició) activen ERK i p38, que a la vegada sobrerregulen p21 i cdc2 i causen la degradació de cdc25, conduint al segrest del cicle cel·lular a la fase específica G<sub>2</sub>/M [23].

### **7.2.2. *Apoptosi.***

L'apoptosi és la mort cel·lular programada controlada per senyals de transducció cel·lular i que ve seguida del segrest del cicle cel·lular. Forma part del metabolisme i funció cel·lular normals [26,181]. Els mecanismes que controlen adequadament l'apoptosi són crucials per a l'eliminació de cèl·lules danyades i en la prevenció del desenvolupament del càncer.

En general, hi ha dues formes d'apoptosi: 1) via mitocondrial i 2) via receptors. La primera és induïda per estímuls que impliquen l'alliberament del citocrom *c* des de la mitocondria seguida per l'activació de la caspasa 9. La segona comença per la unió del lligand als denominats "receptors de mort" seguit del reclutament de proteïnes adaptadores per a l'apoptosi i la posterior activació de la caspasa 8. Les proteïnes senyalitzadores com el NF- $\kappa$ B, JNK, i p53 també són importants en aquest procés [26,181].

## 8. El vi.

Ja fa anys que ha agafat força l'interès per l'estudi dels hàbits en el comportament humà que poden esdevenir factors de risc o elements de prevenció i protecció amb relació al desenvolupament de certes patologies cròniques. En particular, molt d'aquest interès s'ha centrat en elucidar el rol de la dieta en la prevenció de malalties coronàries. La denominada "Dieta Mediterrània" ha adquirit fama pel seu rol en la prevenció de les malalties coronàries [182], i en menor mesura, també del càncer, com a conseqüència del seu elevat contingut en antioxidants, crucials en l'atenuació dels paràmetres oxidants (oxidació de les LDL) que es correlacionen amb diverses patologies. De forma similar, ha pres molt de cos la idea que el consum moderat de vi negre (inclòs en la Dieta Mediterrània) està associat a una disminució del risc de patir disfuncions coronàries [183-186].

### 8.1. La Paradoxa Francesa.

La premisa que el consum moderat de vi negre es beneficiós per a la prevenció de malalties cardiovasculars, basada en els resultats de diversos estudis epidemiològics, ha estat conceptualitzada en darrer terme com a "Paradoxa Francesa" [187-190]. La dieta de la població francesa inclou elevades quantitats de greixos, combinats amb exercici escàs, tabaquisme, i altres característiques comunes del món desenvolupat. Malgrat això, la taxa de mortalitat deguda a malalties cardiovasculars és molt menor que la dels Estats Units i altres societats occidentals en les quals la presència a la dieta

del contingut de greixos és similar a la de França amb l'excepció del consum moderat de vi, només present a la dieta francesa [187,190]. Això s'ha atribuït a la presència en el vi de compostos polifenòlics, i concretament, els flavonoids, que representen més del 85% del contingut fenòlic en els vins negres, mentre que en els blancs, normalment, consisteixen menys del 20% del contingut fenòlic total [191].

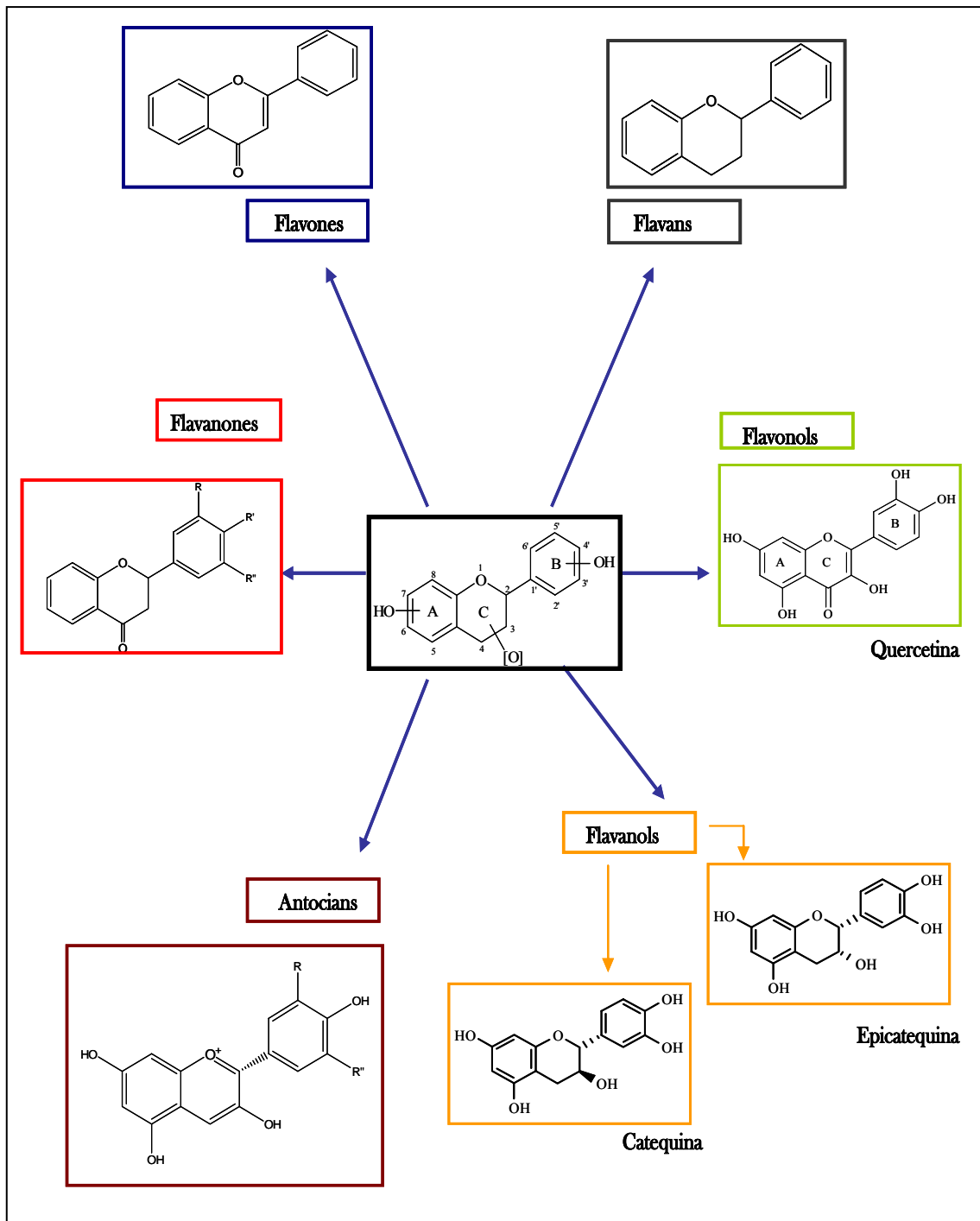
El vi negre representa una bona font de polifenols com els antocianòsids, les catequines, proantocianidines, els estilbens i altres compostos fenòlics com per exemple, els àcids fenòlics. Els antocianòsids són flavonoides força distribuïts en fruites i verdures, que proporcionen color al vi negre i a la pell del raïm [192]. Les proantocianidines són un altre classes de metabòlits fenòlics força presents en fruites com el raïm [193]. Els antocianòsids i les proantocianidines estan entre els compostos més importants en determinar la qualitat del vi negre, a causa de la seva gran influència en el color, l'amargor, l'astringència i l'estabilitat química enfront de l'oxidació [194]. A més de la seva activitat antioxidant/antirradical, els polifenols del vi negre s'ha demostrat que posseeixen nombroses propietats biològiques, com la inhibició de l'agregació plaquetària, l'activitat vasorelaxant, la modulació del metabolisme de lípids i inhibició de l'oxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) [183,184,195-198].

Així doncs, els beneficis sobre la salut del consum moderat de vi negre estan fonamentats en força accions.

## 9. Flavonoides.

Els flavonoides, principals responsables de la coloració de moltes fruites i verdures, són els principals polifenols presents a la dieta humana amb una estructura base de C6-C3-C6, dels quals se n'han identificat al voltant de 4.000 [199]. Els flavonoides poden ser classificats en diverses classes, basades en el grau d'oxidació en l'heterocicle oxigen pertanyent a l'estructura de l'anell C (Figura 14) [200].





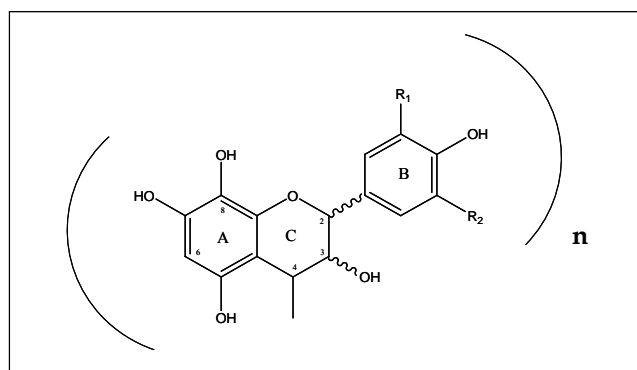
**Figura 14.** Classificació de les estructures monomèriques dels flavonoides. S'han posat com a exemples els monòmers de la procianidines (catequina ,epicatequina) i la quecetina, amb els que s'ha treballat en la present tesi doctoral.

Les característiques estructurals que contribueixen a l'eficàcia dels flavonoides com a antioxidants i, per tant, captadors de radicals lliures, són:

- L'estructura ortodihidroxil en l'anell B, que confereix més estabilitat a la forma radicalària del fenol i participa en la deslocalització dels electrons.
- El doble enllaç 2-3 conjugat amb la funció 4-oxo en l'anell C, responsable de la deslocalització dels electrons en l'anell B.
- Els grups 3- i 5-OH junt amb la funció 4-oxo en els anells A i C per a un potencial de captura de radicals màxim.

## 9.1. Proantocianidines.

Les proantocianidines (també denominats tanins condensats) són polímers d'elevat pes molecular, constituïts a base d'unitats flavan-3-ol (Figura 15), units per enllaços carboni-carboni i ocasionalment per enllaços C: O: C. Els tres anells es distingeixen per les lletres A, B i C i difereixen estructuralment d'acord al nombre de grups hidroxil tant en els anells aromàtics com en l'estereoquímica dels carbonis asimètrics de l'heterocicle [195].

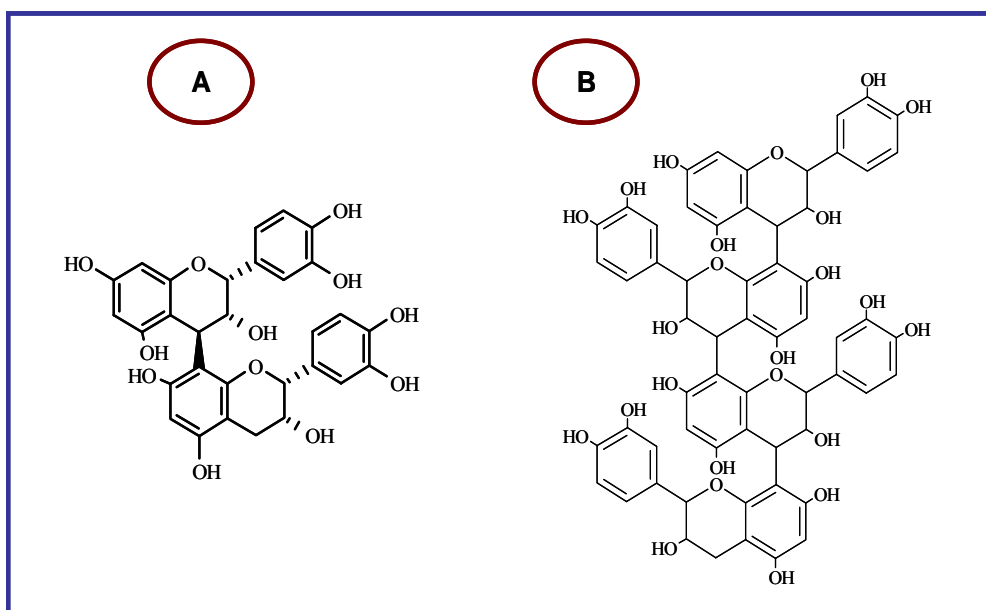


**Figura 15.** Estructura bàsica de les proantocianidines:  
R1=H, R2 = OH, procianidines; R1, R2 = OH, prodelfinidines.

La condensació oxidativa més usual es dona entre el carboni 4 (C4) de l'heterocicle i el C6 o C8 de les unitats adjacents, prenent el nom de procianidines tipus B (dímers) o tipus C (trímers) [195]. També s'han descrit de tipus A formades per dobles enllaços (C-C i C-O) en alguns aliments. En aquests, l'enllaç entre el C2 i C7 o C5 es produeix a més dels tradicionals C4-C8 o C4-C6. Les unitats flavan-3-ol- poden tenir una

substitució 3',4' dihidroxil en l'anell B (catequina i epicatequina) (Figura 16), i 3', 4', 5' trihidroxil (galocatequina i epigalocatequina) [186].

Ens referim a procianidines quan la unitat base és la catequina o l'epicatequina mentre que les prodelfinidines estan construïdes sobre la galocatequina i epigalocatequina. En el raïm, llavor, arrel i pell de *Vitis vinifera L.*, hi ha presents dímers, trimers (la procianidina C1 és la més abundant), tetràmers i oligòmers fins a 8 unitats en raïm, llavor, arrel i pell [193]. Els dímers B1-B4, caracteritzats per l'enllaç 4→8, són els més comuns en el raïm, malgrat que també es generen els seus isòmers B5-B8. Fins fa poc, la caracterització complerta de les proantocianidines en raïm i vins ha estat impedita per la dificultat en l'anàlisi de compostos d'elevat pes molecular. No obstant això, nous mètodes basats en HPLC acoblats amb espectrometria de masses han permès la seva caracterització [186,199].



**Figura 16.** A) Procianidina B2 (dímer); B) Tetràmer.

El contingut de procianidines que es troba en raïm, pomes i altres fruites està entre 0,3-0,9 g/Kg [201]. A més d'aquests flavonoides i els àcids fenòlics, hi ha altres classes de compostos polifenòlics com els antocians (que aporten coloració a fruites, verdures i al mateix vi negre, on hi són presents en 26 mg/L, aproximadament [202]).

Aquests tanins s'extreuen de la llavor o pell durant la fermentació del vi i, per tant, el procés emprat en la producció del vi té una gran influència, doncs, en el tipus i concentració dels compostos fenòlics que s'hi troben.

## 9.2. Ingesta i biodisponibilitat.

La ingesta de compostos polifenòlics depèn en gran mesura dels hàbits i preferències del consumidor. Els àcids fenòlics són 1/3 part dels fenols consumits mentre que la resta és en forma de flavonoides. Això no obstant, l'avaluació de la ingesta diària de flavonoides està usualment infravalorada a causa de les dades, sovint poc realistes en la mesura global de la quantitat d'aquests compostos presents en la dieta. Tot i això Peterson i col. van estimar que la ingesta diària de flavonoides pot arribar a 1g/dia [203].

Les propietats biològiques dels compostos polifenòlics depenen de la seva biodisponibilitat, és a dir, de la seva capacitat per assolir els compartiments interns i els òrgans. L'augment de la capacitat antioxidant del plasma pel consum d'aquests compostos esdevé una prova indirecte dels pas a través de la barrera intestinal. S'ha observat aquest efecte en una gran diversitat d'aliments entre els quals s'hi troba el vi negre [204-206]. Una forma més directa d'observar aquesta absorció dels compostos polifenòlics és la recerca en plasma i orina d'ells en la seva forma nadiua i els seus metabòlits després de la ingestió d'un aliment que conté els compostos o bé per ingestió d'aquests compostos aïllats.

L'estructura química dels compostos fenòlics influeix en gran mesura en la seva capacitat per a ser absorbit a l'intestí i en l'estructura i naturalesa dels metabòlits circulants. De fet, la quantitat de polifenols trobats intactes en orina varia en funció dels compostos estudiats, i són força baixos amb relació al contingut d'aquests compostos en els aliments d'origen. A més, existeix una gran variabilitat interindividual pel que fa a l'excreció per l'orina d'aquests compostos [207]. De fet, la major part (75-99%) dels polifenols ingerits no es retroba dins l'orina, suggerint que no

són absorbits per l'intestí, sinó que són absorbits i excretats per la bilis el que explica que siguin metabolitzats per la flora intestinal en els nostres propis teixits.

Els estudis de biodisponibilitat han mostrat que les concentracions plasmàtiques humanes dels flavonoides intactes rarament superen les concentracions micromolars per les dosis ingerides dins el marc d'una alimentació normal. Les concentracions plasmàtiques més elevades es donen generalment una o dues hores després de la ingestió dels compostos, excepte en el cas dels compostos que es degraden per la flora citosòlica abans de la seva absorció [208-209]. Així, per exemple, la rutina, un glicòsid de la quercetina, es troba en una concentració màxima de quercetina plasmàtica 9 hores després de la ingestió [210].

La concentració plasmàtica disminueix molt ràpidament després per la majoria dels flavonoides en un període d'1 o 2 hores. Aquesta excreció ràpida dels compostos és accelerada per les reaccions de conjugació, excepte casos com els de la quercetina, amb una velocitat molt més lenta d'excreció explicada parcialment per la seva gran afinitat per l'albumina plasmàtica [210,211]. La vida mitja dels compostos formats dins el còlon per la flora intestinal és més elevada. De fet, el temps d'estada dins el còlon prolonga el dels seus compostos metabòlits dins d'ell [212].

Certs grups de polifenols són generalment presents en les formes de glicòsids, essent la glucosa o ramnosa les unitats glúcid les més freqüents, encara que també es troben la galactosa, arabinosa, xilosa, entre altres. La glicosilació exerceix un impacte en les propietats físiques, químiques i biològiques dels compostos fenòlics per exemple, incrementant l'afinitat per medis aquosos [213].

Malgrat que certs compostos fenòlics glicosilats (delfinidina-3-rutòsid i cianidina-3-rutòsid) poden ser absorbits directament [214], la major part dels polifenols no pot ser absorbida d'aquesta forma per la barrera intestinal, sinó que hi ha d'haver necessàriament una etapa de desglicosil·lació. Aquesta primera etapa requereix l'acció de les glicosidases, que poden ser part de l'aliment, ser presents en l'interior de les

cèl·lules de la mucosa intestinal o bé ser secretades per la microflora. Cal remarcar que en l'organisme humà no es dona la desglicosil·lació no enzimàtica [215], per tant, s'ha suggerit que l'absorció d'aquests compostos ha d'estar controlada per l'especificitat i la distribució dels enzims. L'activitat intestinal, per exemple, de desglicosilació és en gran part causada per la lactasa plorizina hidrolasa (LPH), una  $\beta$ -glucosidasa localitzada a l'intestí que no requereix de l'absorció cel·lular dels compostos polifenòlics per a realitzar la seva activitat [216].

A més de la glicosilació, els compostos fenòlics poden tenir altres substitucions com l'acilació o l'esterificació. Els àcids fenòlics poden sofrir esterificació per reacció amb àcids orgànics o lípids. La major part d'aquests compostos hauran de sofrir la hidròlisi de les seves unitats éster abans de ser absorbits.

Finalment, les procianidines, d'elevat pes molecular difícilment s'absorbeixen. Són escassos els estudis que permeten tenir una visió completa en aquest àmbit, l'absorció dels oligòmers de procianidines resta incerta i les poques conclusions són divergents. Donovan i col. mostren que en rates, els dímers de procianidines no es retroben dins la sang i orina després de la ingestió [217]. Contràriament, Baba i col. identifiquen el dímer B2 en la sang i orina en rates després de l'administració oral del compost [218]. A més, els compostos no absorbits, podrien ser hidrolitzats per la flora en molècules d'inferior tamany com els àcids fenilvalèric o fenilacètic o, fins i tot, en monòmers de catequina que poden, aleshores, ser absorbits [219].

Dins l'organisme, els compostos polifenòlics sofreixen diverses conjugacions: metil·lació, glucoronidació i/o sulfonació. Aquestes transformacions depenen dels enzims.

La conjugació de l'àcid glucorònic amb els polifenols es deu a l'acció de l'UDP glucuronosil transferasa, que forma part d'una família d'enzims situats dins el reticle

endoplasmàtic. El fetge és l'òrgan que presenta la capacitat més elevada per glucoronidar els polifenols [220].

La catecol-O-metiltransferasa és responsable de la metil·lació dels polifenols i és present en un bon nombre de teixits. La posició dels substituents metil està determinada per l'especificitat de l'enzim així com del compost fenòlic.

Les sulfotransferases, són els enzims citosòlics que catalitzen la conjugació d'un grup sulfat amb els compostos polifenòlics.

Darrerament, però, s'ha enfortit la idea que totes aquestes reaccions formen part de les denominades reaccions de fase II, que tenen la finalitat de detoxificar compostos fenòlics gràcies a la seva solubilitat dins el medi aquós de la bilis, l'orina i el plasma. Així, després de l'administració de dosis fisiològiques, un gran nombre de polifenols circulants són glucoronids i/o sulfats i la resta és difícil de recuperar en forma aglicona lliure dins el plasma [221].

El coneixement i comprensió dels processos d'absorció, transport per la sang, distribució tissular, metabolisme i excreció dels flavonoides és un àmbit en el qual queda molt camí a recórrer. El nostre grup ha aportat dades en aquest sentit investigant el transport d'aquests compostos en sang i identificant les principals proteïnes plasmàtiques que es lliguen al monòmer catequina i a les procianidines del vi negre en experiments *ex vivo*. Amb els resultats van observar que la principal proteïna que es lliga a la catequina i a les procianidines tenia al voltant de 80 kDa de pes molecular i que corresponia a la apo A-I en humans i a la transferrina en rates. El fet que les procianidines del vi negre es lliguen a ambdues proteïnes suggereix que poden estar implicats en el transport revers de colesterol [222].

## 9.3. Flavonoides i malalties.

L'efecte dels flavonoides en l'arteriosclerosi, el càncer, la inflamació i els nivells de colesterol en plasma són centre en l'investigació de nombrosos grups de recerca. L'arteriosclerosi és un dels processos més importants en que està implicat l'estrès oxidatiu, ja que una de les seves conseqüències, la vasculopatia coronària, cerebral i perifèrica és responsable de les principals causes de mort en molts països. L'excés de radicals lliures pot iniciar el procés arterioscleròtic al danyar les parets dels vasos sanguinis. Al mateix temps, la peroxidació lipídica té diversos efectes biològics nocius que, en darrer terme, condueixen a la formació de cèl·lules escumoses i agregació plaquetària. Aquests efectes, en el seu conjunt, condueixen a la arteriosclerosi.

De fet, aquesta i altres patologies, com la diabetis, l'obesitat i els càncers estan associades a un estat d'estrès oxidatiu inherent a la etiologia d'aquestes. En aquest sentit, s'ha demostrat que els flavonoides juguen un rol important en la inhibició d'aquestes malalties. Aquest efecte dels flavonoides s'ha correlacionat i atribuït a les seves propietats antioxidants tant en models *in vitro* com *in vivo*. No obstant això, avui en dia els resultats que busquen establir una relació inversa entre la incidència del càncer i el consum diari de flavonoides en diversos estudis epidemiològics són contradictoris [223].

### 9.3.1. Capacitat antioxidant.

Com s'ha dit anteriorment, els efectes biològics dels flavonoides per a reduir el risc de diverses patologies, entre les quals hi ha les malalties cardiovasculars, estan associats a les seves propietats antioxidants. Aquests efectes inclouen protecció tissular contra l'atac dels radicals lliures i contra la peroxidació lipídica induïda per aquests.

Els flavonoides, a causa de la seva estructura, són capaços d'eliminar radicals lliures com l'hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), el peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ), el superòxid ( $\text{O}_2\cdot$ ), o l'òxid nítric ( $\text{NO}\cdot$ ). Per exemple, l'anió superòxid pot ser eliminat per la quercetina inhibint la generació d'aquesta espècie reactiva [224]. A més, també posseeixen activitats quelants de



metalls, bàsiques en la seves funcions com a antioxidants ja que poden segrestar ions  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  inhibint així les reaccions de Fenton i de Haber-Weiss, generadores de radicals lliures (Figura 3).

Entre els fruits, el raïm i els productes que en deriven, són bones fonts de flavonoides a la dieta, per tant, es pot dir que també són bona font d'antioxidants. Més enllà, components del fruit, com la llavor i la pell contenen compostos concrets com les procianidines, capaces d'eliminar radicals superòxid [225].

### 9.3.1.1. Flavonoides i peroxidació lipídica.

Ricardo da Silva i col. van demostrar que l'eficiència per eliminar radicals lliure és diferent entre monòmers com l'epicatequina, la catequina i les procianidines derivades del raïm ( $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_5$ ,  $\text{B}_2\text{-3-O-gallat}$ ,  $\text{B}_2\text{-3'-O-gallat}$ ,  $\text{C}_1$ , trímers). Mentre que les procianidines i l'epicatequina eliminen radicals hidroxil i anions superòxid, els monòmers de catequina eliminen específicament radicals hidroxil. L'efecte net, però, del conjunt dels processos condueix a inhibir la peroxidació lipídica [226]. D'altra banda l'epicatequina, l'àcid gàllic i altres polifenols del tè verd posseeixen activitat eliminadora de radicals peroxil, per la capacitat de cedir protons reduint la peroxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) induïda per agents oxidants [227] i la posterior reacció en cadena, la peroxidació lipídica. La catequina posseeix activitat antioxidant en plasma humà per retard en la degradació dels antioxidants endògens  $\alpha$ -tocoferol i  $\beta$ -carotè i per inhibició de l'oxidació dels lípids del plasma [228].

A partir del descobriment de l'activitat quelant de ions ferro que posseeixen els polifenols del tè, i concretament les unitats catecol, va augmentar l'interès pels flavonoides com a antioxidants i les conseqüències en la peroxidació lipídica [229,230]. Morel i col. van investigar l'efecte citoprotector de tres flavonoids (catequina, quercetina i diosmetina) en cultius d'hepatòcits exposats a ferro, considerant dos paràmetres: la prevenció de la peroxidació lipídica i la inhibició de l'alliberament d'enzims intracel·lulars, i van establir el seu poder antioxidant en

catequina>quercetina>diosmetina en base a la seva capacitat per inhibir la peroxidació lipídica [231].

### 9.3.1.2. Flavonoides i DNA.

Pel que fa a l'efecte antioxidant sobre el DNA, Ohshima i col. han demostrat que l'epicatequina gallat indueix talls en cadenes independents del DNA en presència d'òxid nítric (NO), mentre que monòmers com la catequina i l'epicatequina produeixen menys talls en cadenes del DNA que els anteriors compostos, en concret, la catequina i l'epicatequina (a concentracions de 0,5 mM) inhibien més del 90% de talls al DNA induïts per NO 0,5 mM [232].

Tanmateix, no tots els estudis que avaluen el poder antígenotòxic i anticarcinogènic dels flavonoides arriben a conclusions positives. De fet, Dhawan i col. descriuen que en les concentracions de 1-100 µM ni els flavanols monomèrics ni els dimèrics prevenen el dany al DNA a limfòcits induït per Trp-p-2. En canvi, les teaflavines i teafulvines, productes de la polimerització dels polifenols durant la fermentació del tè negre exerceixen un efecte protector contra al dany al DNA dosi-depenent [233].

### 9.3.1.3. Flavonoides i proteïnes

S'ha suggerit que el dany oxidatiu a les proteïnes juga un paper crucial en força patologies, entre les quals hi ha l'envelliment, perquè les proteïnes oxidades perden la seva funció catalítica i són hidrolitzades amb més facilitat. El dany oxidatiu a proteïnes específiques constitueix l'enllaç entre l'estrès oxidatiu i pèrdua de funcions fisiològiques associades amb l'edat [25]. La reducció de l'oxidació de grups tiol en residus específics de Cys pot ser un "interruptor" crític afectant a processos que comprometen la viabilitat cel·lular i de l'organisme. Els flavonoides s'han descrit en nombrosos estudis com a agents capaços d'evitar aquesta oxidació dels residus proteics [234,235].

### 9.3.2. Procianidines i activitat antioxidant.

Com s'ha comentat en la Paradoxa Francesa, els extractes de polifenols de la llavor del raïm redueixen els nivells de colesterol i d'LDL anormalment elevats en plasma en humans i s'ha trobat una relació inversa entre els nivells de flavonoides en la dieta humana i la mortalitat per malalties coronàries [236]. Un estudi *in vivo* en humans va demostrar que el consum de most (matriu no alcohòlica) conferia una protecció addicional en pacients contra l'oxidació de les LDL-colesterol atribuïnt als flavonoids, presents tant al most com en el vi negre, la capacitat d'inhibir l'inici de l'arteriosclerosi [237].

S'ha descrit també que un extracte de procianidines redueix l'oxidació d'àcids grassos poliinsaturats en microsomes hepàtics de ratolí [225] i que l'addició de 2 mg/L d'aquest extracte inhibeix significativament l'oxidació dels àcids araquidònic i docosahexanoic després de l'oxidació induïda amb radiació UV. Els monòmers epigallocatequina i epigallocatequina-gallat no resulten tan efectius en la protecció dels àcids grassos poliinsaturats contra l'oxidació en comparació amb les procianidines que contenen quantitats significatives de dímers i oligòmers superiors de flavanols a més de monòmers [225].

Aquest efecte positiu addicional de les procianidines en comparació amb els seus monòmers s'ha anat confirmant en base a diversos estudis. Per exemple, Sato i col., van observar reduccions significatives en la generació tant de ROS com en l'incidència d'apoptosi en cardiomiòcits en cors de rates isquèmiques/reperfusionades després de l'administració oral d'una dieta suplementada amb un extracte de procianidines (100mg/Kg dia) [238]. Bagchi i col. descriuen que un extracte de procianidines en una matriu aigua-etanol redueix la producció de radicals lliures en macròfags de ratolí, inhibeix la peroxidació lipídica en fetge i cervell i protegeix contra la fragmentació del DNA d'una forma dosi-depenent més efectiva que la vitamina C,  $\beta$ -carotè o la vitamina E a les mateixes concentracions [239].

Tebib i col. van estudiar els efectes dels flavonoides en una dieta deficient en vitamina E i rica en colesterol. Aquest tipus de dieta reduïa els nivells d'enzims antioxidants com la catalasa, superòxid dismutasa i glutatió peroxidasa, disminuïa el contingut de GSH en diferents teixits com aòrtic, hepàtic, cardíac, intestinal, muscular i teixits renals [240], i augmentava la peroxidació lipídica en plasma. Les procianidines restauraven els valors d'enzim antioxidants, del glutatió i minimitzava els efectes de la peroxidació lipídica. Aquesta restauració no era tant efectiva si es tractaven les rates amb els monòmers de partida.

En aquest sentit el nostre grup també té resultats precedents que abracen la capacitat antioxidant del vi negre i en concret de les procianidines. Així, Roig i col. descriuen que el consum moderat i prolongat de vi negre en un model *in vivo* de rates millora la capacitat antioxidant, i en un altre estudi es demostra que les procianidines són més efectives en contrarrestar els efectes nocius de la submissió d'hepatòcits a peròxid d'hidrogen que els monòmers de partida (catequina i epicatequina). Les procianidines disminueixen els nivells de peroxidació lipídica, recuperen les ràtios GSH/GSSG, alterades en condicions d'estrès oxidatiu, activant l'activitat dels enzims del cicle del glutatió [241,242].

## 9.4. Flavonoides i vies de senyalització.

La tradicional capacitat antioxidant que posseeixen els flavonoides exerceixen efectes moduladors sobre les cascades de senyalització descrites en l'apartat 7 a través d'accions selectives a diferents components pertanyents a aquestes [243,244].

Malgrat la poca informació disponible, se sap que la magnitud i el tipus d'efecte seran funció de la interacció entre el flavonoide i la membrana o la seva captació citosòlica, així com de la conseqüència que aquesta interacció tingui en les cascades de senyalització [245].

Els flavonoides, en funció de la seva estructura, tenen el potencial de lligar-se a llocs d'unió ATP d'un gran nombre de proteïnes (PKC, PI3K), inhibint-les [246-248] per modificació en l'estructura tridimensional i, per tant, inactivant-les. Els flavonoides poden interaccionar també amb la mitocondria, interferir amb vies del metabolisme intermediari i/o infrarregular l'expressió de molècules d'adhesió [249-251].

Sembla que el nombre de substituents (grups OH) en l'anell B i el grau d'insaturació de l'enllaç C2-C3 són importants paràmetres d'aquesta bioactivitat. Curiosament, la quercetina i algun dels seus metabòlits *in vivo* inhibeixen les vies de senyalització per a la supervivència Akt/PKB [244], un mecanisme d'acció consistent amb el fet que la quercetina i els seus metabòlits actuen inhibint la PI 3-quinasa.

Els flavonoides poden interaccionar amb vies de senyalització clau, inhibint l'apoptosi induïda per estrès oxidatiu. El mecanisme pot ser prevenint l'activació de JNK afectant a proteïnes anteriors en la seva cascada, pot ser mantenint l'homeòstasi de calci [252] o interaccionant directament amb la mitocondria, modulant el porus de transició mitocondrial (mPT), que controlen l'alliberament del citocrom *c* durant l'apoptosi [253,254] o modulant altres factors proapoptòtics associats a la mitocondria .



**hipòtesi i objectius**







Els flavonoides s'han descrit com a compostos que exerceixen efectes beneficiosos en diverses patologies cròniques com càncer, desordres degeneratius i malalties cardiovasculars, entre d'altres; en l'etiologia de les quals s'associa un estat inherent d'estrès oxidatiu. Moltes de les accions benefactores dels flavonoides s'han atribuït a les propietats antioxidants d'aquestes molècules, bàsicament per la seva capacitat reductora, però recentment també s'atribueixen a la influència que poden tenir com a controladors de l'homeòstasi redox cel·lular.

La hipòtesi que es planteja en aquest estudi és que els flavonoides, a més a més d'actuar com antioxidants des d'un punt de vista clàssic, també poden fer-ho com a agents antigenotòxics i com reguladors de l'expressió gènica de proteïnes intracel·lulars.

Així doncs, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és entendre de quina manera les procianidines, una classe de flavonoides abundants en el vi negre, modulen l'equilibri redox cel·lular, tant a nivell de DNA, com a nivell de l'expressió gènica d'enzims que formen part del sistema de defensa antioxidant. Per desenvolupar aquest objectiu general, es plantegen els objectius concrets següents:

1. Determinar la capacitat antigenotòxica d'un extracte de procianidines (GSPE), comparant-la amb la dels seus monòmers flavan-3-ols de partida (catequina, epicatequina) i la del flavonol quercetina *in vitro* en un model cel·lular tumoral hepàtic de rata (Fao) sotmès a estrès oxidatiu amb peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
2. Establir la relació entre la dosi i l'efecte de GSPE en l'expressió de la Cu,Zn-superòxid dismutasa (Cu,Zn-SOD), glutatió peroxidasa (GPx), glutatió reductasa (GR) i glutatió S-transferasa (GST) emprant un model *in vitro* d'hepatocarcinoma humà (HepG2). Avaluar l'efecte de la dosi òptima del GSPE sobre els mateixos enzims antioxidants en HepG2 induïdes a estrès oxidatiu amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

3. Estudiar l'efecte de l'administració de GSPE *in vivo*, en el patró de regulació de l'expressió gènica (mRNA, quantitat de proteïna i activitat enzimàtica) de la Cu,Zn-SOD, emprant rates Wistar a les quals s'ha induït a diabetis amb streptozotocina com a model d'estrès oxidatiu.

Els efectes del vi en la salut és el nucli central de l'estudi que el nostre grup desenvolupa. Els resultats previs obtinguts en el nostre laboratori han demostrat que el consum moderat de vi negre augmenta la capacitat antioxidant i disminueix la peroxidació lipídica tissular. Aquests efectes s'han atribuït als compostos no alcohòlics del vi, probablement als fenols, atès que el consum per part dels animals d'una matriu hidroalcohòlica sense la resta de components del vi no permet observar els mateixos efectes. A més, el paper antioxidant dels flavonoides del vi ha destacat en afegir-los a hepatòcits incubats amb aigua oxigenada, ja que contrarresten els danys en la integritat de la membrana cel·lular, nivells alterats de glutatió i l'augment de peroxidació lipídica, provocat per una situació d'estrès oxidatiu. La present tesi doctoral, vol ser, doncs, fruit de la lògica continuació en l'aprofundiment del coneixement, tant dels efectes com dels mecanismes d'acció, d'aquests components polifenòlics que, com s'ha comentat, depassen la seva tradicional acció com a antioxidants, mostrant recentment noves propietats que permeten ampliar el seu ventall d'actuació i de possibles aplicacions.

**resultats I**





---

**ANTIGENOTOXIC EFFECT OF GRAPE SEED PROCYANIDIN  
EXTRACT IN FAO CELLS SUBMITTED TO OXIDATIVE  
STRESS**

---

Llopiz, N.; Puiggròs, F.; Céspedes, E.; Arola, L.; Ardévol, A.; Bladé,  
C.; Salvadó, M. J.

(article publicat a *Journal of Agricultural and Food Chemistry*)

JOURNAL OF  
AGRICULTURAL AND  
FOOD CHEMISTRY

*J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1083–1087

**Antigenotoxic Effect of Grape Seed Procyanidin Extract in Fao  
Cells Submitted to Oxidative Stress<sup>§</sup>**

NIURKA LLÓPIZ,<sup>†</sup> FRANCESC PUIGGRÒS,<sup>‡</sup> ELA CÉSPEDES,<sup>†</sup> LLUÍS AROLA,<sup>‡</sup>  
ANNA ARDÉVOL,<sup>‡</sup> CINTA BLADÉ,<sup>‡</sup> AND M. JOSEPA SALVADÓ\*<sup>†,‡</sup>

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Unitat d'Enologia del Centre de Referència en  
Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya, Universitat Rovira i Virgili,  
Imperial Tàrraco 1, 43005 Tarragona, Spain



## Antigenotoxic Effect of Grape Seed Procyanidin Extract in Fao Cells Submitted to Oxidative Stress

NIURKA LLÓPIZ,<sup>†</sup> FRANCESC PUIGGRÒS,<sup>‡</sup> ELA CÉSPEDES,<sup>†</sup> LLUIS AROLA,<sup>‡</sup>  
ANNA ARDEVOL,<sup>‡</sup> CINTA BLADÉ,<sup>‡</sup> AND M. JOSEPA SALVADÓ<sup>\*,‡</sup>

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Unitat d'Enologia del Centre de Referència en  
Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya, Universitat Rovira i Virgili,  
Imperial Tàrraco 1, 43005 Tarragona, Spain

### ABSTRACT

The protective effects of grape seed procyanidin extract on the repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA lesions were tested using Fao cells. Cells were exposed to 600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 or 21 h. A procyanidin extract from grape seed (PE) was incubated or preincubated (1 h) during the exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The ability of procyanidins to protect against the genotoxicity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was compared with those of the monomeric flavanols (+)-catechin and (-)-epicatechin and the flavonol quercetin. After treatment, DNA damage was monitored using alkaline single-cell gel electrophoresis (the comet assay) (Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. *Nutr. Cancer* **1999**, 34, 160-166). At the end of the experiment, PE significantly decreased the damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results also showed that quercetin was the most effective of the flavonoids tested, which is consistent with its powerful antioxidant character. The results indicate that procyanidins are more effective than the corresponding individual monomers, catechin and epicatechin, at preventing DNA lesions in hepatocytes and that this protection is higher after preincubation than after co-incubation.

**KEYWORDS:** Procyanidins; quercetin; comet assay; DNA damage; oxidative stress; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; hepatocytes

## INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are produced in cells by cellular metabolism and by exogenous agents. These species react with biomolecules in cells, including DNA. ROS induce numerous lesions in DNA, which cause deletions, mutations, and other lethal genetic effects. If left unrepaired, this damage may contribute to a number of degenerative processes, including cancer and aging (2, 3). Characterization of this damage to DNA has indicated that both the sugar and the bases are susceptible to oxidation. About 100 different modifications have been identified, including the appearance of AP sites, cross-linking to protein, and single- and double-strand breakage (4). This last type of breakage is highly toxic and mutagenic and can cause chromosome aberrations, whereas single-strand breaks are repaired. Living organisms have evolved several systems that recognize and repair the various forms of DNA damage induced by oxidation. These DNA repair systems are key processes in the secondary defense system, which copes with damage caused by ROS and which is not destroyed by the primary defense mechanisms. Primary defense mechanisms include antioxidant enzymes, nonenzymatic endogenous antioxidants, and exogenous antioxidant molecules, which together are usually able to maintain ROS at nonharmful levels. Polyphenols are exogenous antioxidants, and this is the most studied property of these compounds. Experimental and epidemiological data have revealed that moderate red wine consumption prevents various types of cancer. This is largely due to the phenolic compounds in wine. The flavonoids present in red wine comprise, among others, flavonols and procyanidins (derivatives of flavan-3-ols), the distinct antioxidative potentials of which are of great importance for explaining their beneficial effects. The antioxidative effects of flavonoids involve mechanisms such as metalchelating, free-radical scavenging with the formation of less reactive flavonoid aroxyl radicals (5), inhibiting certain oxidative enzymes (6), and activating detoxifying/defensive proteins (7). The standard antioxidant capacity of flavonoids can be determined from their reduction potentials (700-450 mV), which are lower than those of alkylperoxyl and superoxide radicals (2300-1000 mV). Therefore, flavonoids may inactivate these damaging oxyl species and prevent their deleterious consequences.



In this study, we examined the antigenotoxic and protective effects of a procyanidin extract from grape seed, of their stable monomers the flavan-3-ols (+)-catechin and (-)-epicatechin, and of the flavonol quercetin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced genotoxicity in rat Fao cells. The DNA cleavage/repair was identified by alkaline single-cell electrophoresis, a very sensitive method for detecting strand breaks and measuring repair kinetics at the level of single cells.

## MATERIALS AND METHODS

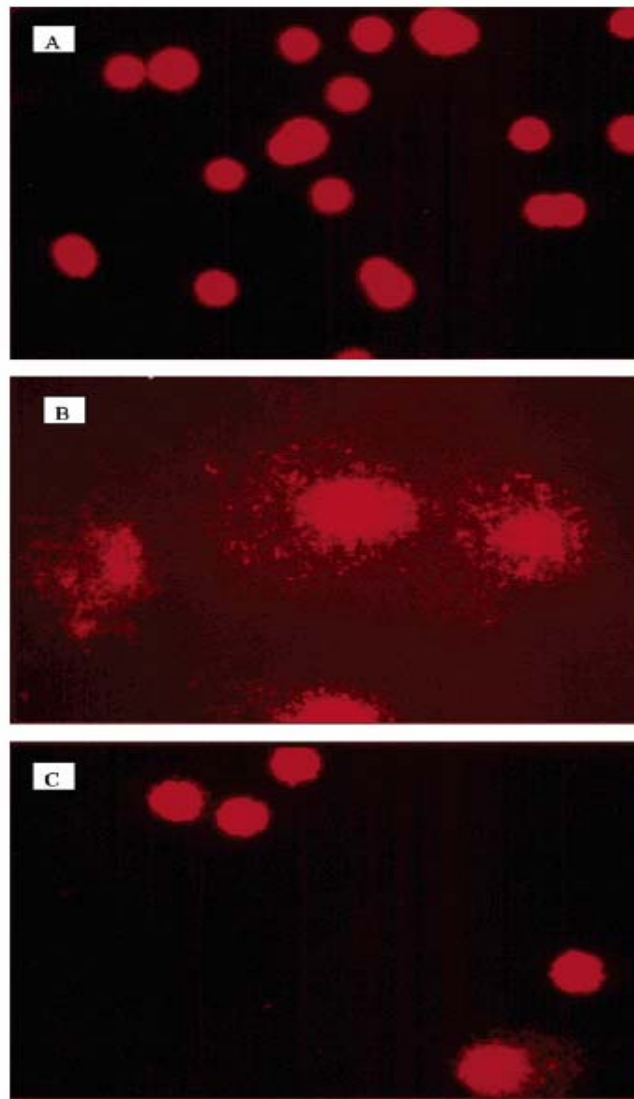
Fao cells were routinely cultured in F-12 Coon's Modification medium (Sigma), supplemented with 5% fetal bovine serum (BioWhittaker), 0.1% fungizone (BioWhittaker), and 1% penicillin/streptomycin (BioWhittaker). Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. They were seeded 4-5 days before use in six-well plates (Corning) at a density of (3-4) × 10<sup>5</sup> cells/well. Cells were incubated with 50-600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) so that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration which induced considerable DNA damage could be found. Cells were incubated with 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and at the same time or 1 h previously exposed to the flavonoids at the concentrations described below. Stock solutions were prepared by dissolving flavonoids in ethanol (Merck). The cultures were supplemented with (+)-catechin (Fluka) and (-)-epicatechin (Fluka) to a final concentration of 150 μM and then incubated for 3 or 21 h. In the case of quercetin (Fluka), cells were supplemented with a concentration of 150 μM for 3 h and a concentration of 25 μM for 21 h. For the procyanidin extract (Les Dérivés Résiniques et Terpéniques, Dax, France) obtained from grape seed and consisting of 21.3% monomers, 17.4% dimers, 16.3% trimers, 13.3% tetramers, and 31.7% higher polymers, cells were supplemented with a concentration of 75 μM for 3 h and a concentration of 25 μM for 21 h. The concentration of the procyanidin extract was calculated by taking a mean MW= 1399. The concentrations used were previously determined to be nontoxic (8). Controls with the equivalent ethanol content of flavonoid solutions (0.3% final concentration in the culture medium) were incubated without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under the same conditions.

At the end of each incubation period, the hepatocytes were washed once with phosphate buffer (pH 7) and then scraped in 1 mL of buffer containing 0.1% (v/v) Triton X-100 (Panreac). The comet assay was performed according to the method of Piperakis (9). Briefly, trypsinized cells were suspended in 80  $\mu$ L of 0.5% low-melting-point agarose in PBS and placed on a micro slide glass covered with 0.5% agarose in PBS. The slide was immersed in a lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) at 4 °C for 1 h. After lysis, the slide was placed in the electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 12) and electrophoresed for 20 min at 25 V, 250 mA, and 4 °C. After electrophoresis, the slide was neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with ethidium bromide (20  $\mu$ g/mL), and covered with coverslips. The “comet tail” was observed using a fluorescence microscope (Olympus) equipped with a 515- 560-nm excitation filter and a 590-nm barrier filter. Fifty nuclei on each slide were visually scored from 0 (undamaged nucleus) to 4 (severely damaged nucleus) (see **Figure 1**). Samples were scored blindly, and results were expressed as a percentage of arbitrary units.

All results are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). The statistical analysis consisted of the General Linear Model procedure of SPSS (2002) combined with Bonferroni’s multiple-range test. The level of statistical significance was taken as  $p < 0.05$ .

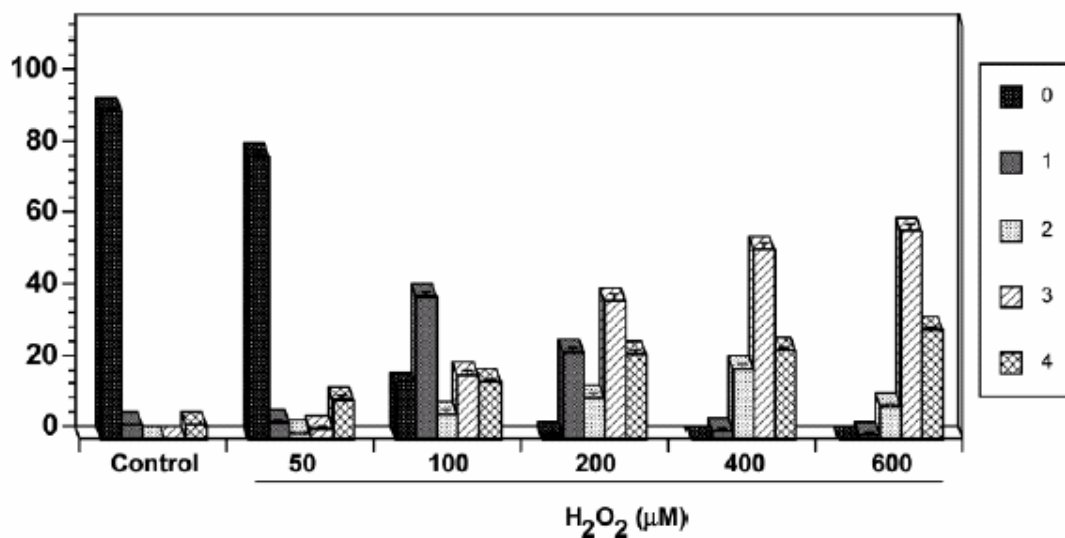
## RESULTS

The images of DNA damage were classified into five grades (0-4), as is shown in **Figure 1**. **Figure 1A** shows level 0 (undamaged nucleus), **Figure 1B** shows levels 3 and 4 (very and severely damaged nucleus), and **Figure 1C** shows levels 1 and 2 (slightly and moderately damaged nucleus)

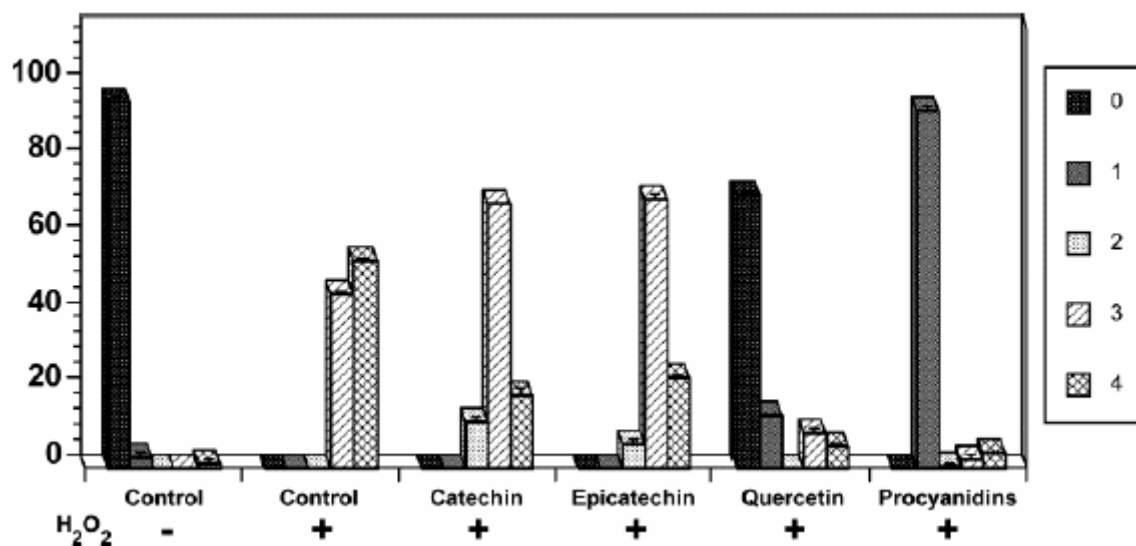


**Figure 1.** Representative comet images of Fao cells after treatment with flavonoids and/or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 h: (A) control (level 0); (B) 600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (levels 3 and 4); (C) 25  $\mu$ M quercetin and 600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (levels 1 and 2). Comet assay was carried out as described under Materials and Methods.

Incubating Fao cells with increasing quantities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50, 100, 200, 400, and 600 μM) for 3 h led to increasingly greater damage (Figure 2). At the lowest concentration, 50 μM, the results were similar to control cells (not treated with flavonoids or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 78.99 and 91.97%, respectively, of cells had a damage level of 0.



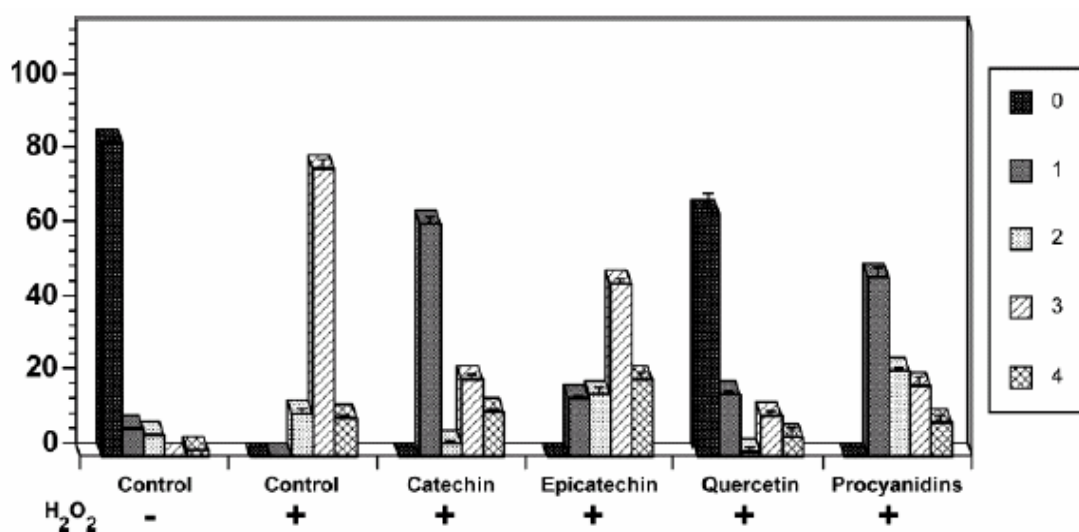
**Figure 2.** Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on DNA of Fao cells. DNA damage was scored from 0 (undamaged nucleus) to 4 (severely damaged nucleus), and results are expressed as a percentage of arbitrary units. Values are mean ± SEM of four independent experiments.



**Figure 3.** Effects of preincubation (1 h) with flavonoids on DNA damage in Fao cells induced by 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 h. DNA damage was scored from 0 (undamaged nucleus) to 4 (severely damaged nucleus), and results are expressed as a percentage of arbitrary units. Values are mean ± SEM of four independent experiments.

Above 200  $\mu\text{M}$ , there were no cells with a damage level of 0, and the percentage of cells at levels 3 and 4 increased to 90% at 600  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Preincubating cells with catechin, epicatechin, quercetin, or PE for 1 h before exposure to 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 3 h (**Figure 3**) showed that quercetin, with 71% of cells at level 0, and PE, with 93.6% of cells at level 1, were the compounds that best protected cells against DNA cleavage. Catechin and epicatechin, on the other hand, only slightly improved the DNA damage caused by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (the percentage of cells at level 4 was lower).

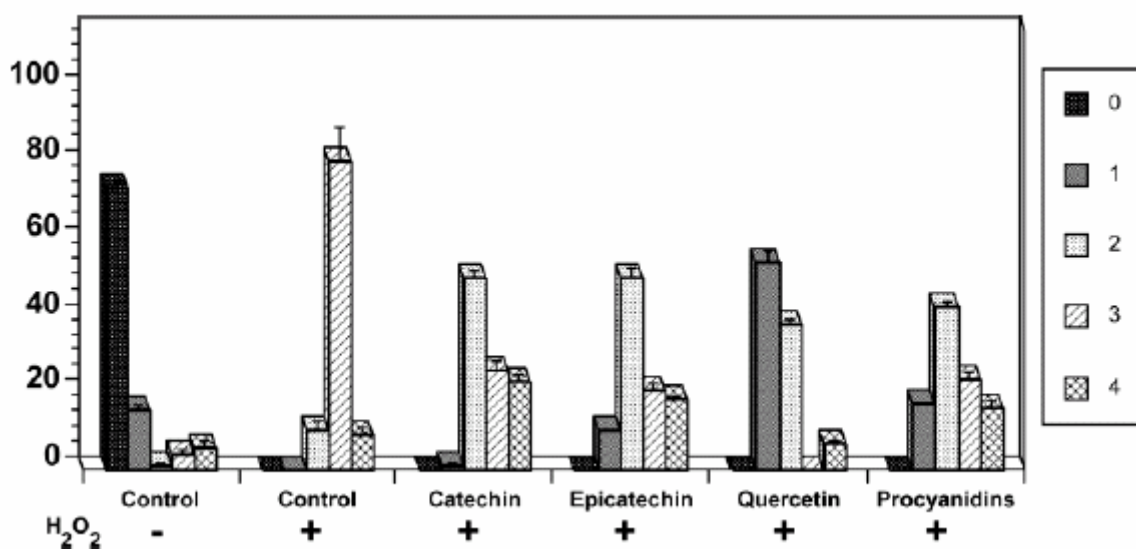
Although 50% of the cells incubated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 3 h were at level 3 and 50% at level 4 (**Figure 3**), after 21 h most (80%) were at level 3 (**Figure 4**). When cells pretreated with flavonoids were exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 21 h (**Figure 4**), quercetin again showed the best protective effects (66% of undamaged cells), followed by PE (71% at levels 1 and 2), catechin (67% at levels 1 and 2), and, finally, epicatechin (45% at level 3).



**Figure 4.** Effects of preincubation (1 h) with flavonoids on DNA damage in Fao cells induced by 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 21 h. DNA damage was scored from 0 (undamaged nucleus) to 4 (severely damaged nucleus), and results are expressed as a percentage of arbitrary units. Values are mean  $\pm$  SEM of four independent experiments.

If flavonoids and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were simultaneously added and incubated for 21 h (Figure 5), the protective effect was lower than when cells were preincubated. However, quercetin was yet again the best protector against DNA damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The results of using flavonoids to treat Fao cells incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed that quercetin provided greatest protection against DNA damage, followed by procyanidin extract, catechin, and epicatechin, in this order.



**Figure 5.** Effects of simultaneous incubation with flavonoids and 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 21 h on DNA damage in Fao cells. DNA damage was scored from 0 (undamaged nucleus) to 4 (severely damaged nucleus), and results are expressed as a percentage of arbitrary units. Values are mean ± SEM of four independent experiments.

## DISCUSSION

Excessive ROS generation in vivo may result in DNA damage. At least two major human problems, aging and carcinogenesis, involve DNA damage (2, 3). Quercetin (1, 10-18) and tea catechins (16, 19-23) have been at the center of several genetic toxicity and *in* significant amounts in red wine, have only recently attracted attention (24). A

diet enriched with red wine solids delayed the onset of tumors in transgenic mice that spontaneously develop externally visible tumors (25), and a polyphenolic fraction from grape seeds inhibited skin tumorigenesis in mice (26). A complex mixture of wine polyphenols protected against some types of chemically induced oxidative DNA damage in the rat (27). In a previous experiment, we exposed Fao cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under the same conditions as in the current study: PE protected the cell membrane and was the most powerful at protecting against lipid peroxidation and activating the glutathione cycle (8). Our present aim was to determine whether grape seed procyanidin extract had this powerful antigenotoxic effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage.

The protective effects of flavonoids against oxidative DNA damage shown here are in accordance with the structure-activity relationships of these compounds. All flavonoids ha

at least two phenyl rings (A and B rings) in their chemical structure separated by a pyran ring (C ring). Quercetin is a flavonol that satisfies all of the determinants of antioxidant flavonoids given by Bors *et al.* for maximal radical scavenging potential (28), whereas catechin and epicatechin have only a catechol structure in the B ring. As well as having the best free radical scavenging properties, quercetin has three potential metal-binding sites (29), which could have chelated the iron ions present in the cells and, hence, depressed the Fenton reaction. Catechins, on the other hand, have only one. Therefore, the fact that quercetin has the highest protective effect against oxidative DNA damage agrees with its structural characteristics: it is a more effective radical scavenger and metal chelator than flavan-3-ols, catechin, and epicatechin.

On the other hand, the fact that oligomer procyanidins have a greater protective effect than the monomer components catechin and epicatechin agrees with the experiments of Bors and co-workers, who used pulse radiolysis to show that an increase in the reactivity of procyanidins correlates linearly with the number of reactive sites, defined as the catechol groups in the individual molecules (30). This correlation was also shown when the Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay (31, 32) or the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) assay (33) was used to determine the

antioxidant potential. Ursini and co-workers also concluded that polymeric procyanidins are better antioxidants than the corresponding monomers, catechin, and epicatechin, because if the catechol moieties are very close, their oxidation potentials are much lower than those of catechins (34). It is more difficult to find an explanation based on molecular structure for the different protective effects of catechin and epicatechin on damaged DNA, after incubations for 21 h. The only distinction between these two stereoisomers is the different spatial distributions of the OH substituent in the C3: the 3-hydroxy group is closer to the 2'-hydrogen atom in catechin than in epicatechin, which seems to cause repulsion between the 2'-H and 3-OH groups (35).

The recovery of the damage was more marked in the cells treated with the flavonoids tested before the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubation, which suggests that simple scavenging of ROS by flavonoids was not the only cause of DNA damage protection, although the scavenger activity of these compounds has been shown elsewhere. There is no clear evidence of the intracellular location of polyphenols and even less evidence in the case of procyanidins, although some studies suggest that they interact with cell membranes and intracellular proteins. In vivo and in vitro we have shown that grape seed procyanidin extract activates antioxidative enzymes and the glutathione cycle (8, 36), so these compounds enhance cellular antioxidant potential during preincubation.

The protective action of the flavonoids studied here on DNA damage may be a contribution to the putative antitumorigenic potential of red wine.



## LITERATURE CITED

- (1) Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. Protection by the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr. Cancer* **1999**, *34*, 160-166.
- (2) Ceruti, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **1985**, *227*, 375-381.
- (3) Wiseman, H.; Kaur, H.; Halliwell, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* **1995**, *93*, 113-120.
- (4) Cadet, J.; Ravanat, J. L.; Buchko, G. W.; Yeo, H. C.; Ames, B. N. Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol.* **1994**, *234*, 79-88.
- (5) Van Acker, S. A. B. E.; Van den Berg, D. J. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 331-342.
- (6) Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Vanpoel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Vanderberghe, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 71-76.
- (7) Matés, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **2000**, *153*, 83-104.
- (8) Roig, R.; Cascón, E.; Arola, L.; Bladé, C.; Salvadó, M. J. Procyanidins protect Fao cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 25-30.
- (9) Piperakis, S. M.; Visvardis, E. E.; Tassiou, A. M. Comet assay for nuclear damage. In *Oxidants and Antioxidants*; Packer, L., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, 1998; pp 184-193.
- (10) Akagi, K.; Hirose, M.; Hoshiya, T.; Mizoguchi, Y.; Ito, N.; Shirai, T. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett.* **1995**, *94*, 113-121.
- (11) Balasubramanian, S.; Govindasamy, S. Inhibitory effect of dietary flavonol quercetin on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 877-879.

- (12) Musonda, C. A.; Chipman, J. K. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced NF- $\kappa$ B DNA binding activity and DNA damage in Hep G2 cells. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 1583-1589.
- (13) O'Brien, N. M.; Woods, J. A.; Aherne, S. A.; O'Callaghan, Y. C. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cellculture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 22-26.
- (14) Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Virgata, G.; Barcellona, M. L.; Vanella, A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol. Toxicol.* **2000**, *16*, 91-98.
- (15) Romanová, D.; Vachálková, A.; Cipák, L.; Ovesná, Z.; Rauko, P. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. *Neoplasma* **2001**, *48*, 104-107.
- (16) Yang, C. S.; Landau, J. M.; Huang, M. T.; Newmark, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 381-406.
- (17) Basiak, J.; Trzeciak, A.; Gasiorowska, A.; Drzewoski, J.; Maecka-Panas, E. Vitamin C and quercetin modulate DNAdamaging effect of N-methyl-N $\epsilon$ -nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *Plant Foods Hum. Nutr.* **2002**, *57*, 53-61.
- (18) Szeto, Y. T.; Collins, A. R.; Benzie, I. F. F. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutat. Res.* **2002**, *500*, 31-38.
- (19) Jankun, J.; Selman, S. H.; Swiercz, R.; Skrzypczak, J. E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* **1997**, *387*, 561.
- (20) Naasani, I.; Seimiya, H.; Tsuruo, T. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *249*, 391-396.
- (21) Cao, Y.; Cao, R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* **1999**, *398*, 381.
- (22) Uesato, S.; Kitagawa, Y.; Kamishimoto, M.; Kumagai, A.; Hori, H.; Nagasawa, H. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett.* **2001**, *170*, 41-44.
- (23) Feng, Q.; Torii, Y.; Uchida, K.; Nakamura, Y.; Hara, Y.; Osawa, T. Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress

and suppressing cytochrome P450 1A1 in cell cultures. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 213-220.

(24) Dauer, A.; Hensel, A.; Lhoste, E.; Knasmüller, S.; Mersch-Sundermann, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis Virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 199-207.

(25) Clifford, A. J.; Ebeler, S. E.; Ebeler, J. D.; Bills, N., D.; Hinrichs, S. H.; Teissedre, P. L.; Waterhouse, A. L. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *64*, 748-756.

(26) Zhao, J. R.; Mukherjee, P.; Gugger, E. T.; Tanaka, T.; Blackburn, G. L.; Clinton, S. K. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1737-1745.

(27) Casalini, C.; Lodovici, M.; Briani, C.; Paganelli, G.; Remy, S.; Cheynier, V.; Dolara, P. Effect of complex polyphenols and tannins from red wine (WCPT) on chemically induced oxidative DNA damage in the rat. *Eur. J. Nutr.* **1999**, *38*, 190-195.

(28) Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. *Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies*; Academic Press: San Diego, CA, 1990; pp 343-355.

(29) Hider, R. C.; Liu, Z. D.; Khodr, H. H. Metal chelation of polyphenols. In *Flavonoids and Other Polyphenols*; Packer, L., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2001; pp 190-203.

(30) Bors, W.; Michel, C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 1413-1426.

(31) Salah, N.; Miller, N. J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *322*, 339-346.

(32) Plumb, G. W.; de Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Cheynier, V.; Williamson, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Res.* **1998**, *29*, 351-358.

(33) Yokozawa, T.; Chen, C. P.; Dong, E.; Tanaka, T.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 213-222.

(34) Ursini, F.; Rapuzzi, I.; Toniolo, R.; Tubaro, F.; Bontempelli, G. Characterization of antioxidant effect of procyanidins. In *Flavonoids and Other Polyphenols*; Packer, L., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2001; pp 338-350.

(35) Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *374*, 347-355.

(36) Roig, R.; Cascón, E.; Arola, L.; Bladé, C.; Salvadó, M. J. Moderate wine consumption protects the rat against oxidation in vivo. *Life Sci.* **1999**, *64*, 1517-1524.

**resultats II**





---

**GRAPE SEED PROCYANIDINS PREVENT OXIDATIVE  
INJURY BY MODULATING THE EXPRESSION OF  
ANTIOXIDANT ENZYME SYSTEMS**

---

**Puiggròs, F.; Llopiz, N.; Ardévol, A.; Bladé, C.; Arola, L.;  
Salvadó, M. J.**

**(article en consideració)**





# Grape Seed Procyanidins Prevent Oxidative Injury by Modulating the Expression of Antioxidant Enzyme Systems.

Puiggròs, F.; Llopiz, N.; Ardévol, A.; Bladé C.; Arola, L. and Salvadó, M. J.

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Unitat d'Enologia del Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya, Universitat Rovira i Virgili, c/Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

## ABSTRACT

In the present paper we report the effect of a grape seed procyanidin extract (GSPE) on an antioxidant enzyme systems (AOEs). Gene expression was tested using the hepatocarcinoma cell line HepG2 by exposing to several GSPE doses between 0 and 100 mg/L for 24h. We evaluated mRNA expression and enzyme activity levels using real time RT-PCR and spectrophotometry. The results suggested a transcriptional GSPE regulation of glutathione related enzymes caused by an increase both in mRNA and enzyme activity levels overall at 15 mg/L.

We also assessed the GSPE effect on AOEs in cells submitted to oxidative stress. Under oxidative conditions (1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1h) we found a decrease in GSH content and an increase in MDA; and we suggested a post-translational regulation of GPx/GR mRNAs and a transcriptional enhancement of GST mRNA. The GSPE pre-treatment (15mg/L, 23h) before HepG2 submission to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM, 1h) showed an increase of the mRNA of GPx/GR respect the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group whereas the GSH content was similar to control group. However, the GPx/GR enzyme activities were not increased. We hypothesize that GSPE probably improves the cellular redox status via glutathione synthesis pathways instead of regulation of the GPx and/or GR activities protecting against oxidative damage.

---

**Keywords:** Grape seed procyanidins extract, AOE gene expression, oxidative stress, HepG2

## INTRODUCTION

Increased free-radical production or reduced antioxidant defence responses may give rise to increased oxidative stress. The consequences of these processes include oxidative damage to membrane lipids, DNA molecules, and proteins (12). To help biodefense, a number of phytochemical antioxidants such as flavonoid compounds scavenge free radicals after they have been formed or prevent them from overproducing. Many of these agents have shown various effects on the activities of such antioxidant enzymes as Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) (18,27,28).

Procyanidins in red wine are flavonoids that are comprised of oligomers of catechin units. It has been reported that they exert antibacterial, antiallergic and antigenotoxic activities (6,17,23,24), and that they inhibit platelet aggregation and capillary permeability (32). Structurally, they consist of one or more aromatic rings with one or more hydroxyl groups, which can readily combine with free radicals to form resonance-stabilized phenoxyl radicals. Moreover, the catechol structure of procyanidins enables them to chelate transition metals such as copper and iron, which play an important role in oxygen metabolism (3). This structure confers strong antioxidant properties (26) and therefore, procyanidins exhibit antioxidant activity, and can thus help to prevent peroxidation and cellular oxidant damage.

Recently, it has been shown that procyanidins modulate the activity of such regulatory enzymes as cyclooxygenase, lipoxygenase, angiotensin-converting enzyme, hyaluronidase, in order to limit free radical production. On the other hand, procyanidins also modulate various forms of cytochrome P450 and gene expression of CYP1A in order to chelating metals involved in ROS generation. So procyanidins are most frequently cited as key active flavonoid compounds in some functional foods (13). However, there is little data on natural phytochemicals that modulate the expression of ROS- metabolising enzymes and their mechanisms (35).

In previous studies we observed that hepatic antioxidant enzymes were activated in rats that consumed moderate amounts of red wine (27), and we also showed that a grape-seed procyanidin extract (GSPE) improved the rat's hepatic oxidative metabolism *in vitro* (28).

The purpose of the present study was to determine whether GSPE modulates the gene expression of the antioxidant enzyme systems (AOE systems) and its adaptive response under oxidative stress conditions.

Thus, we treated the human hepatoma cell line (HepG2) with GSPE at concentrations between 0 and 100 mg/L and focused on the antioxidant response and the induction or not of Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD), and glutathione related enzymes: glutathione peroxidase (GPx) glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST). In addition, we established an oxidative condition by exposing cells to 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1h to evaluate the extent to which GSPE can protect liver antioxidant enzymes expression from an oxidative insult.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

Human hepatoblastoma cells (HepG2) (HB8065; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated Foetal Bovine Serum (FBS) and 1% of 2mM L-glutamine, 1% non-essential aminoacids (NEAA) and 1% of Pennicillin/Streptomycin, (all of which were provided by BioWhittaker) in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The cells were sub-cultured every 5-7 days at 1:5 split ratios. The medium was changed every 2 days.

### Experimental design

Using HepG2 cells, we studied the GSPE (Les Dérives Résiniques et Térpeniques, Dax, France), effect on antioxidant enzyme systems expression. GSPE consisted of 16.5%

monomers, 18.7% dimers, 16.0% trimers, 9.3% tetramers, 4.2% phenilic acids and 35.7% higher polymers. For this purpose, we incubated the cells under several doses between 0-100 mg/L for 24h, and then we analyzed the mRNA levels and the enzyme activities of Cu,Zn-SOD, GPx, GR and GST.

In the oxidative stress assay, we established the control group (untreated), the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group by incubating cells with 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Panreac) for 1h, the GSPE group (15mg/L GSPE for 24h) and in the group GSPE plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the cells were pre-incubated with GSPE (15 mg/L for 23 h), the medium was removed and then the cells were incubated with 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1h. We analyzed the GSH content, and the same parameters as above.

### Cell viability

We used the LDH assay to evaluate the cytotoxicity of grape seed procyanidin extract (GSPE). It was determined spectrophotometrically by the rate of NADH utilization in the enzyme-catalysed back reaction of pyruvate conversion to lactate using the LDH Kit (QCA, Barcelona, Spain). By relating LDH leakage to total LDH activity after the hepatocytes had been lysed, we evaluated the effect that GSPE had on cell viability.

The viability of cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was evaluated as mitochondrial activity by using the MTT quantitative colorimetric assay to quantize the dehydrogenase activity retained in the culture cells. This method is based on the ability of living cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) to insoluble purple formazan. The amount of formazan produced is proportional to the number of living cells. The cells were plated at 3x10<sup>5</sup> in 6-well plates. After H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, the cells were incubated with 0.3 mg/mL MTT in DMEM for 3h at 37°C. Then the MTT-containing medium was removed and the intracellular formazan product was dissolved in isopropanol for absorbance quantification at 570 nm.

#### *Determination of lipid peroxidation. MDA content*

Lipid peroxidation was measured as thiobarbituric acid reactive products (TBARS). Briefly, 0.5mL aliquots of fresh cell incubate ( $10^6$  cells/mL) or medium were added to 0.5mL of 30% (w/v) trichloroacetic acid (Sigma) containing 1mM butylated hydroxitoluene (Sigma) (31). The amount of TBARS formed was determined by absorbance at 535nm using with an extinction coefficient of  $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### *Determination of GSH content*

The content of reduced glutathione in cell lysates was measured using a Glutathione Assay Kit (Calbiochem). This validated method is based on the thioethers formation between 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethyl-quinolinium methyl sulfate and mercaptan. A  $\beta$ -elimination takes place under alkaline conditions, which specifically transforms the thioether obtained with GSH into chromophoric thione, the maximal absorbance wavelength of which is 400nm. A standard curve of GSH was established using an original GSH concentration of 0.5mM.

#### Enzyme activities

Cells cultured in 6-well plates were washed twice with cold PBS, scraped and lysed in 0.1% Triton X-100, homogenized and centrifuged at  $10000g \times 10 \text{ min}$  at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatants were used for enzyme activity assays and protein determination.

#### Glutathione peroxidase assay (GPx)

Glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9.) was quantified spectrophotometrically by measuring the loss of NADPH at 340 nm with  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a substrate as described in Paglia and Valentine's modified procedure (1). The reaction mixture for measuring the enzyme activity contained the following constituents at the final concentrations indicated: 1.5mM NADPH in 0.1%  $\text{NaHCO}_3$ , 19mM  $\text{NaN}_3$ , 25mM GSH, 30U/mL GSH reductase,  $70\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $200 \mu\text{L}$  cellular extract. The extinction coefficient for evaluating the specific activity was  $6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and the reaction was monitored for 2 min.

### Glutathione reductase assay (GR)

Glutathione reductase (GR) (EC 1.6.4.2.) was also measured by following NADPH absorbance at 340 nm (1). The reaction mixture contained 300 $\mu$ L of supernatant, 0.2M KCl, 1mM EDTA, 1mM GSSG in PBS, 0.1M pH 7.0 and 0.1M NADPH, which initiated the reaction. An extinction coefficient of 6.3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> was used to evaluate the specific enzyme activity and the reaction was monitored for 2 min.

### Glutathione S-transferase (GST)

Glutathione S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18) was assayed by measuring the rate of GSH conjugation to 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm (11). The reaction mixture contained 50 $\mu$ L cellular extract, 710 $\mu$ L PBS pH 6.5, 5mM GSH and 25mM CDNB. A millimolar extinction coefficient of 9.6 was used to evaluate the specific enzyme activity.

### Superoxide dismutase (SOD)

Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1.) activity was determined by measuring, at 480 nm and 37°C, the extent to which epinephrine autoxidation caused by the superoxide anion had been inhibited (7). The reaction mixture contained 50mM carbonate buffer pH 10.2, 1mM EDTA, 50 $\mu$ L cellular extract and 5mM epinephrine. The reaction was monitored for 4 min.

### Determination of total protein content

The total protein content in the homogenate was measured by the Bradford method (2). Bovine serum albumin was used as standard and the absorbance was measured at 595 nm.

### RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was isolated from HepG2 cells using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche). The amount of total RNA was estimated by optical density at 260nm. 1 $\mu$ g of RNA was transcribed into cDNA with SuperScript-II (Life Technologies). The genes studied and the internal reference glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were analysed by amplifying of the reversibly transcribed RNAs using specific primer pairs (from Applied Biosystems), as follows:

Genes	Sequence	Primers
GPx	5'- TGC GAG GTG AAT GGT GAG AA - 3'	SENSE
	5'- GGT GCT GGC AAG GCA TTC - 3'	ANTISENSE
GR	5'- TTA GGA ATA ACC AGC GAT GGA TTT - 3'	SENSE
	5'- AAT GTA ACC TGC ACC AAC AAT GA - 3'	ANTISENSE
GST	5'- AGA GAC AGA GGA GGA GCG GAT T - 3'	SENSE
	5'- CTG CAT GCG GTT GTC CAT - 3'	ANTISENSE
Cu,Zn-SOD	5'- AGC GGA TGA AGA GAG GCA TGT- 3'	SENSE
	5'- CAC ACG ATC TTC AAT GGA CAA T -3'	ANTISENSE
GAPDH	5'- TGC CAA GTA TGA TGA CAT CAA GAA G - 3'	SENSE
	5' - AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT - 3'	ANTISENSE

Primers were added at a final concentration of 0.3 $\mu$ M to a 25 $\mu$ l reaction mixture containing 10 ng cDNA and 5X Sybr Green. In accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Warrington, UK), the mixture was incubated at 50°C for 2 min and activated at 95°C for 2 min. Then the thermal cycler subjected all genes to 40 cycles of initial melting (15s at 95°C) and annealing/extension (2min at 60°C). The mRNA levels of all the genes were measured in a fluorescent thermal cycler (GeneAmp 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). The mRNA levels of the analysed genes were normalized to the level of GAPDH mRNA detected in each sample.

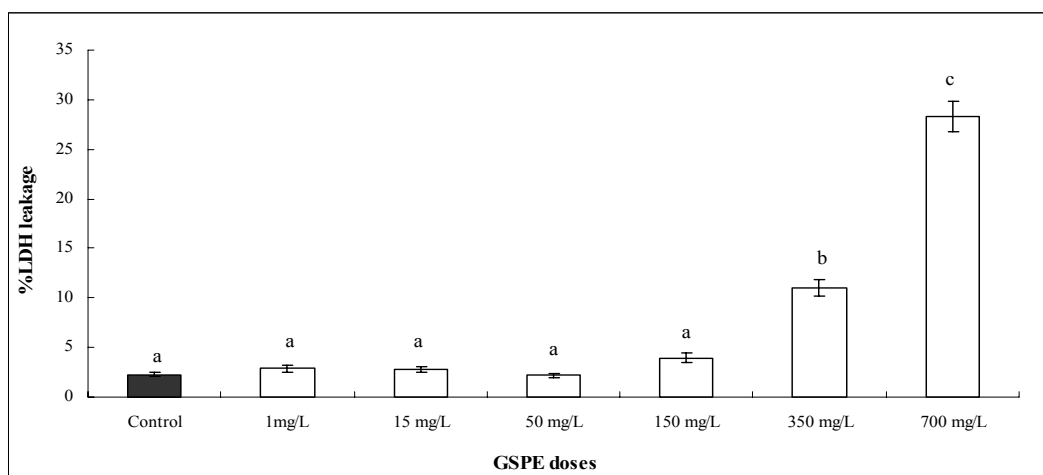
#### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To analyse the differences within treatments significance was tested by Student's t-test or one-way analysis of variance (SigmaStat Version 10.0 for Windows, SPSS, Richmond, CA) followed by Scheffe's test. P values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### *Cytotoxicity*

Figure 1 shows LDH leakage into the extracellular media of the HepG2 cells, which were incubated with several doses of grape seed procyanidin extract (GSPE) for 24h. GSPE concentrations as high as 350 mg/L exhibited high toxicity to HepG2, but when GSPE exposure was lower than 350 mg/L no cytotoxicity was found. Taking into account the cell viability, then, the maximal non-toxic GSPE concentration used for subsequent experiments was 100 mg/L.



**Figure 1. Viability of HepG2 cells after treatment with different doses of GSPE**

Cell viability was assayed by % LDH leakage. Values are expressed as the percentage of % LDH leakage. Experimental values are the means  $\pm$  SEM of three different experiments in triplicate. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were obtained with a t-test and are indicated with different superscripts.

### *Effect of GSPE on AOE expression in HepG2 cells*

Tables 1-2 show the changes in mRNA and AOE activity in HepG2 cells exposed concentrations between 0 and 100 mg/L of GSPE for 24h.

Table 1 illustrates the effect of GSPE exposure on mRNA of antioxidant enzymes studied. The mRNA of GSH-related enzymes was significantly higher at 50mg/L of GSPE (GPx +88.6%, GR +66.2%, GST +104.6%) while the level of Cu,Zn-SOD mRNA



was increased only slightly by 23.8% at the same dose. On the other hand, there was also a significant enhancement of GPx and GST mRNA levels at 15 mg/L of GSPE (+25%, +17% respectively) whereas the Cu,Zn-SOD and GR mRNAs did not change

GSPE doses	GPx	GR	GST	Cu,Zn-SOD
No GSPE	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
1 mg/L	1.12 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.11 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.17 <sup>a</sup>
5 mg/L	1.26 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.13 <sup>a</sup>
15 mg/L	1.25 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.10 <sup>ab</sup>	1.17 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.15 <sup>a</sup>
50 mg/L	1.88 ± 0.26 <sup>c</sup>	1.66 ± 0.21 <sup>c</sup>	2.04 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.13 <sup>a</sup>
100 mg/L	1.15 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.92 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.10 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.06 <sup>b</sup>

**Table 1. Effect of different GSPE doses on antioxidant enzyme system mRNA levels.**

Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and Cu/Zn- superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) mRNA levels in HepG2 cells after different doses of GSPE exposure. Relative quantification by real time PCR of GPx, GR, GST and Cu,Zn-SOD with respect to GAPDH after reverse transcription. Values are expressed as a percentage of control values (means ± SEM of five different experiments in triplicate). Significant differences (p<0.05) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).

Table 2 shows the enzyme activities. It was observed that GPx, GR, GST and Cu,Zn-SOD increase with respect to the control value at doses under 50 mg/L. GPx, GST and Cu,Zn-SOD had the greatest effect (+41%, +19% and +25% respectively) at doses between 5 and 15 mg/L. The GSPE dose, however, did not have a significant effect on GR activity. So, on the basis of these results we decided to use 15 mg/L to assess the effect of GSPE on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress

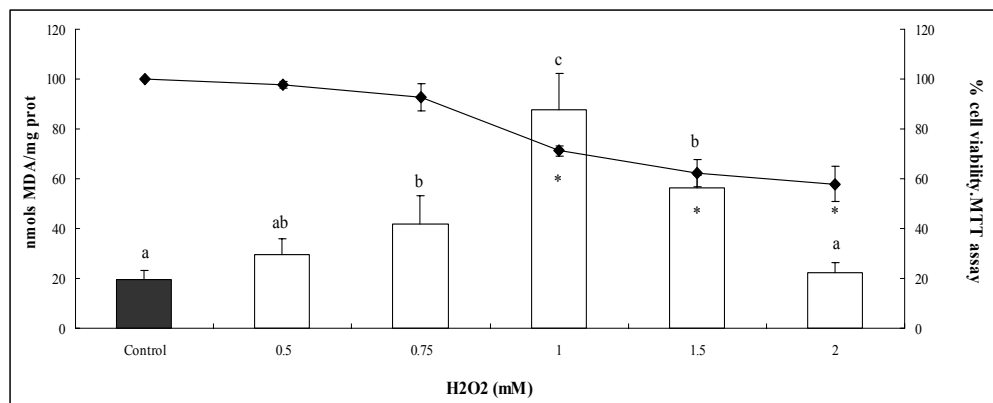
Oxidative stress

Figure 2 shows the cell viability and MDA levels of hepatocytes submitted to different doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We observed a dose-dependent decrease in cell viability after the MTT test, which was significant at 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Likewise, we observed an increase in MDA levels, which was also significant at 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (87.8 ± 14.2 nmols MDA/mg prot) relative to the control value (19.7 ± 3.5 nmols MDA/mg prot). The MDA values of cells exposed to doses higher than 1mM decreased.

GSPE doses	GPx	<u>GR</u>	GST	Cu,Zn-SOD
No GSPE	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
1 mg/L	111.10 ± 13.29 <sup>a</sup>	87.29 ± 4.30 <sup>a</sup>	129.18 ± 6.59 <sup>b</sup>	104.62 ± 14.26 <sup>ab</sup>
5 mg/L	104.21 ± 9.82 <sup>a</sup>	119.54 ± 3.93 <sup>b</sup>	117.08 ± 8.06 <sup>ab</sup>	125.39 ± 5.98 <sup>b</sup>
15 mg/L	141.02 ± 13.86 <sup>b</sup>	102.89 ± 8.36 <sup>a</sup>	123.96 ± 12.22 <sup>b</sup>	121.47 ± 7.74 <sup>b</sup>
50 mg/L	94.10 ± 10.49 <sup>a</sup>	89.08 ± 7.41 <sup>a</sup>	130.49 ± 12.93 <sup>b</sup>	86.13 ± 8.44 <sup>a</sup>
100 mg/L	89.79 ± 7.44 <sup>a</sup>	111.66 ± 4.74 <sup>a</sup>	113.21 ± 16.49 <sup>ab</sup>	89.61 ± 14.34 <sup>a</sup>

**Table 2. Effect of different GSPE doses on antioxidant enzyme system activities.**

Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and Cu/Zn- superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) activity in HepG2 cells after different GSPE exposures. Values are expressed as a percentage of control values (means ± SEM of four different experiments in triplicate). Significant differences (p<0.05) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).

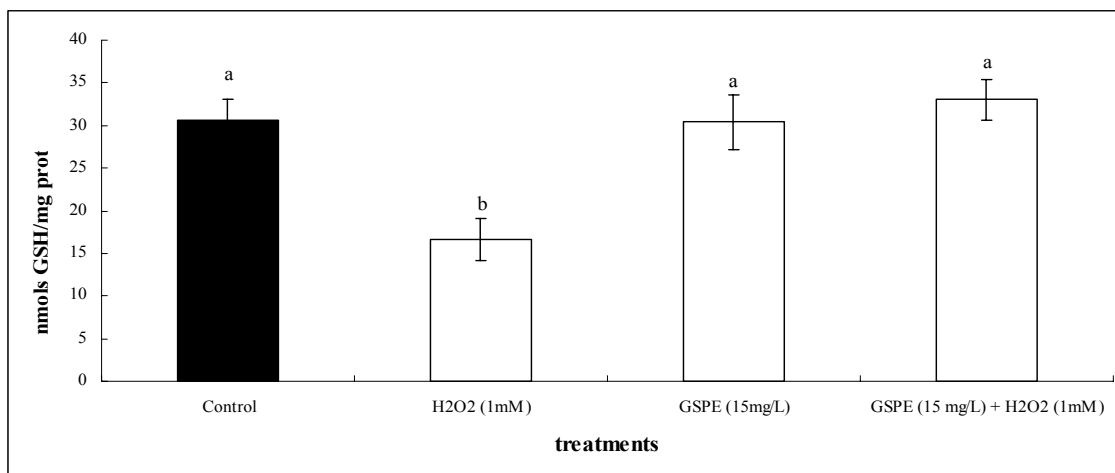


**Figure 2. Dose-response effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability and MDA levels.**

Bars represent the MDA concentration in HepG2 cells incubated with different doses of hydrogen peroxide and curve illustrates the HepG2 cytotoxicity as a result of MTT assay. The results are expressed in nmols MDA/mg prot and the percentage of cell viability relative to control and are  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  of three different experiments in triplicate. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were obtained with a t-test and are indicated with different superscripts. \*  $P < 0.05$  vs cell viability control in MTT assay.

The effect on their viability was excessive and they probably became necrotic. On the basis of these results we decided to use 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the following experiments under oxidative stress conditions.

Figure 3 shows that when hepatocytes were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> there was a decrease in the total GSH level ( $16.6 \pm 2.4$  nmols GSH/mg prot) in comparison to the control value ( $30.6 \pm 2.3$  nmols GSH/mg prot). However, pre-incubating the cells with GSPE (15mg/L) for 23h followed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM for 1h led to a GSH content ( $33.0 \pm 2.3$  nmols GSH/mg prot), that was similar to the control value. Likewise, incubating cells with GSPE (15 mg/L) for 23h did not change ( $30.4 \pm 3.1$  nmols GSH/mg prot) respect the control value.



**Figure 3. Intracellular GSH content under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and/or GSPE treated cells.**

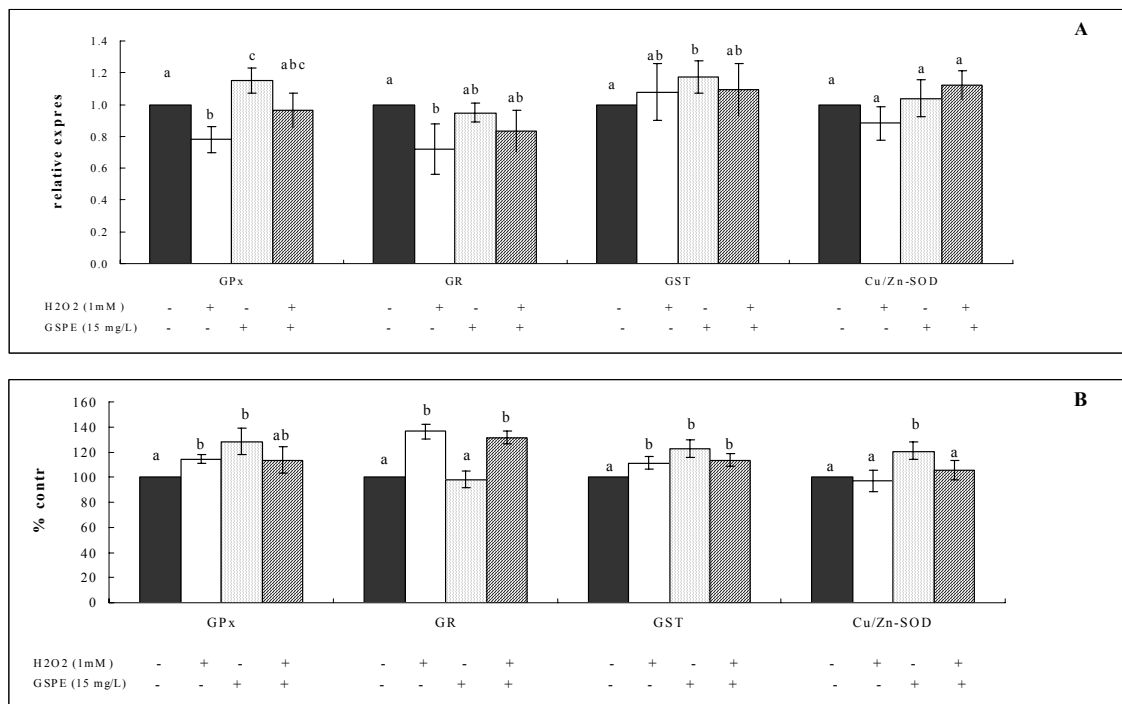
GSH content in human hepatoma cells (HepG2) incubated with 1mM hydrogen peroxide (t=1h), GSPE (15 mg/L, t= 24h), and pre-treated stressed cells with GSPE (15 mg/L; t=23h) and then 1h with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM). Results are shown as means ± SEM of three different experiments in triplicate. Significant differences (p<0.05) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).

Effect of GSPE on AOE expression in HepG2 cells with oxidative stress

Figure 4 shows the effect of GSPE on mRNA and the activity levels of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and Cu,Zn- superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) under hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2.

Figure 4A shows the significant decrease in the GPx and GR mRNAs (-22% and -29% respectively) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. GST and Cu,Zn-SOD mRNAs, however, did not change. On the other hand, the GSPE pre-incubation plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prevents the decrease in GPx and GR mRNAs observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells.

Figure 4B shows a significant increase in GR activity (+36%) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells but GPx and GST activities increased only slightly (+14% and +11%, respectively) and Cu,Zn-SOD activity did not change. The GSPE pre-incubation plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not modify the enzyme activities profile that we observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells.



**Figure 4.**

**A) Effect of GSPE pre-incubation on GPx, GR, GST and Cu,Zn-SOD mRNA levels in cells submitted to oxidative stress.**

Relative quantification by real time PCR GPx, GR, GST, Cu,Zn-SOD with respect to GAPDH after reverse transcription. Values are expressed as a ratio of their control values (means ± SEM of four different experiments in triplicate). Significant differences (p<0.05) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).

**B) Effect of GSPE pre-incubation on GPx, GR, GST and Cu,Zn-SOD activities in cells submitted to oxidative stress.**

Values are expressed as a percentage of control values (means ± SEM of four different experiments in triplicate). Significant differences (p<0.05) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).

**DISCUSSION**

Our group reported previously that flavonoids in red wine increase the enzymatic activity in the antioxidant enzyme systems (AOE system) in rat hepatocytes (Fao cells) both in vivo and in vitro (27,28). We also reported the antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract (GSPE) on Fao cells submitted to oxidative stress (17). Now

we have studied the effect of a grape seed procyanidin extract (GSPE) on the activity and mRNA expression of AOE systems in human hepatocarcinoma HepG2 cells and also the response of AOE under GSPE exposure in cells submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress.

Skibola et al. reported that the antioxidant/pro-oxidant effects of flavonoids depend on the dose, the cell type and the time of flavonoid exposure (34), so, before the experiments, we used the LDH assay to test how the GSPE affected HepG2 viability. We used doses between 0 and 100 mg/L. Although in our previous studies, GSPE showed cytotoxic effects at doses equal to or higher than 100 mg/L in Fao cells (28), the GSPE cytotoxicity assay showed that HepG2 cells were more resistant than Fao cells even though the two highest doses (350 and 700 mg/L GSPE) were not used to evaluate of AOE mRNA levels and activity.

The dose-response analysis of GSPE treatment showed a significant increase in the GR and GST mRNA levels at 15 and 50mg/L, respectively, while GPx mRNA was stimulated at all the doses studied. At 15 mg/L, the increase in GPx and GST mRNA expression correlated positively with their activities, suggesting that these genes were transcriptionally regulated at this dose. These results match our expectations since the AOE system was probably up-regulated by GSPE, thus contributing to its antioxidant properties. Moreover it has recently been demonstrated that flavonoid naringin up-regulates GPx gene expression (14) probably because of the element promoter in the 5'-flanking region of the human GPx gene. This promoter is important for gene regulation because it protects against an oxidative environment, as reported by Cowan et al. (4). The GST transcriptional regulation that we found supports that a dietary intake of procyanidins can induce the transcription of phase II enzymes such as GST, as reported by Gohil et al. (9). On the other hand, Cu,Zn-SOD mRNA levels were not affected by any of the GSPE doses but activity increased at 15 mg/L, which suggests a post-translational regulation. In this regard, Jeon et al. demonstrated that naringin also increases SOD activity but not its mRNA expression (14). It is known, that the mRNA expression pattern of Cu,Zn-SOD is often stable despite changes in the other AOE after they have been exposed to different oxidants (5,29,30,38).

Considering all the results of the GSPE analysis on mRNA levels and activities, we decided to use a dose of 15 mg/L GSPE for our H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress study because of the overall effects on enzyme activity and because data from our previous studies showed that the glucose uptake in L6E9 myotubes (25), the antigenotoxic effects in Fao cells (17) and the activation of AOE activities in Fao cells were stimulated at the same GSPE dose (28).

The MTT viability assay, the peroxidation levels (MDA) and the assessment of GSH content enabled us to establish an oxidative stress situation by incubating HepG2 cells for 1 h with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In order to determine whether GSPE prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage from modifying AOE activities and mRNA levels, we pre-incubated cells with 15 mg/L of GSPE for 23h before we induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidative stress.

Our results show that treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> led to GSH depletion associated with an increase in lipid peroxidation (TBARS), thus altering the cellular redox status by overproduction of ROS and free radicals. However, as expected, pre-incubation with 15 mg/L GSPE prevents the decline of GSH observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cells and maintains its content at the same level as in controls. These data led to the conclusion that GSPE protects against such oxidative injury by inhibiting the modification of the redox cell status.

The glutathione redox cycle provides cellular protection against free radicals and ROS. GPx uses GSH as a co-substrate to reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (or lipid hydroperoxides), and the enzymatic reaction product, GSSG, is recycled to GSH by GR, or exits from the cells (8,33). GSH levels are also modified by conjugation reactions with electrophilic compounds that are catalysed by glutathione S-transferase (36) and therefore they help the detoxifying metabolism. In fact, elevated levels of intracellular GSH and/or GST activity are thought to play a significant role in resistance to chemotherapeutic agents (22). Under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, GPx and GR mRNAs decreased significantly but their enzyme activities were unexpectedly enhanced. The accumulation of intracellular organic hydroperoxides, due to high MDA levels, and GSH depletion may stimulate GPx and GR enzyme activities although mRNA levels decreased. This suggests that GSSG accumulation leads to a post-translational modification or a feedback

transcriptional inhibition by product (GSSG) because the increase in GR activity is not enough to restore the intracellular GSH content. In this regard, many reports show changes in GSH levels and in the GR and GPx activities in tissues under physiological and pathological conditions (19), but because of the complexity of the biochemical pathways that regulate the cellular redox balance it is not clear whether these changes are due to post-translational modifications, suppression of the gene transcription of the enzyme, or both (10,15,19).

Under oxidative stress there was an increment in both mRNA levels and GST activity. This suggests that redox alterations mediate part of the activation of the transcriptional complex since GST has been shown to protect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death *via* the coordination of stress kinases (37). So, it is known that the transcription of phase II enzymes such as GST is controlled by antioxidants (or electrophilic) response elements, and by compounds such as hydroperoxides. On the other hand, many reports have shown that ROS and free radicals induce the activation of such transcription factors as nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), activator protein-1 (AP-1), specificity protein (Sp1), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and other members of the nuclear receptor superfamily (16). Morceau et al. have demonstrated that GST gene expression can be induced by the tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) signalling cascade leading to NF- $\kappa$ B-activated GST promoter (20).

GSPE pre-incubation plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment maintained the GSH content, significantly increased the mRNAs of GPx and GR, and slightly increased the mRNAs of GST and Cu,Zn-SOD in comparison with the values of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. The stable GSH content in GSPE pre-incubated cells may be due to the homeostatic mechanisms, which allow cells to be viable before the AOE's have been induced even though GSSG and MDA levels are high. Roig et al. reported that GST-catalyzed conjugation to GSH is the primary detoxification pathway for reactive lipid peroxidation products, so its activation by procyanidins may make a significant contribution to decreasing MDA levels in stressed cells after they have been subjected to prolonged treatment with the procyanidin extract (28). From another point of view, procyanidins may stimulate the activation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) - the rate-limiting enzyme for GSH synthesis- thus stimulating *de novo* synthesis of GSH (21). So we conclude that although



mRNA GPx and GR levels are higher than in stressed conditions, their activities are not increased because the cellular redox status is not altered when GSH levels are normal.

In conclusion, our experiments confirm that GSPE not only acts as an antioxidant but also affects AOE gene expression. This indicates that there are complementary protective mechanisms that protect the cell from oxidative injury. However, further research in vivo is needed and studies must also be made on AOE transcription factors-related to the oxidative metabolism pathways.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Mr Santiago Moreno for technical assistance and Mr John Bates for advice on the English. Grant AGL2002-00078 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) and Grant CO3/CO8 of the Fondo de Investigación Sanitaria of the Spanish Government supported this work.

## REFERENCES

1. Babson JR, Abell NS. Protective role of the glutathione redox cycle against adriamycin-mediated toxicity in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2299-2304, 1981.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
3. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidants behaviour of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 749-776, 1997.
4. Cowan DB, Weisel RD, Williams WG, Mickle DAG. Identification of oxygen responsive elements in the 5'- flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J. Biol. Chem.* 268: 26904-26910, 1993.
5. Dougall WC, Nick HS. Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 129: 2376-2384, 1991.
6. Fitzpatrick DF, Bing B, Rohdenwald P. Endothelium dependent vascular effects of pycnogenol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32: 509-515, 1998.
7. Fridovich I, Misra HP. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175, 1972.
8. Gerard-Monnier D, Chaudiere J. Metabolism and antioxidant functions of glutathione. *Pathol. Biol.* 4: 77-85, 1996.

9. Gohil K, Moy RK, Farzin S, Maguire JJ, Packer L. mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to *Gingko biloba extract*: Induction of antioxidant response and the Golgi system. *Free Rad. Res.* 33: 831-849, 2001.
10. González de Mejía E, Ramírez-Mares MV. Leaf extract from *Ardisia compressa* protects against 1-nitropyrene-induced cytotoxicity and its antioxidant defense disruption in cultured rat hepatocytes. *Toxicology* 179: 151-162, 2002.
11. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem.* 249: 7130-7139, 1974.
12. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytical metal ions in human disease:An overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85, 1990.
13. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67-202, 2002.
14. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, Rhee SJ, Choi MS. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol –fed rabbits. *Life Sci.* 69: 2855-2866, 2001.
15. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruits: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (Suppl.): 475S-490S, 1999.
16. Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, Roy AK. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging, and age-related diseases. *Exp. Gerontol.* 35: 521-532, 2000.
17. Llópiz N, Puiggròs F, Céspedes E, Arola L, Ardévol A, Bladé C, Salvadó MJ. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *J. Agric. Food. Chem.* 52: 1083-1087, 2004.

18. Maritim A, Sanders RA, Watkins JBIII. Oxidative stress and diabetic complications: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17: 24-38, 2003.
19. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-477, 1983.
20. Morceau F, Duvoix A, Delhalle S, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumour necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1227-1238, 2004.
21. Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskoug JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 386-393, 2002.
22. O'Brien ML, Tew KD. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur. J. Cancer* 32A: 967-978, 1996.
23. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biological properties of procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 704-724, 1999.
24. Pellegrini N, Pareti FL, Stabile F, Brusamolino A, Simonetti P. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50: 209-213, 1996.
25. Pinent M, Blay M, Bladé C, Salvadó MJ, Arola L, Ardévol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines *Endocrinology* 145: 4985-4990, 2004.

- 
26. Rice–Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956, 1996.
  27. Roig R, Cascón E, Arola L, Bladé C, Salvadó MJ. Moderate red wine consumption protects the rat against the oxidation in vivo. *Life Sci.* 64: 1517-1524, 1999.
  28. Roig R, Cascón E, Arola L, Bladé C, Salvadó MJ. Procyanidins protect Fao cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 25-30, 2002.
  29. Röhrdanz E, Kahl R. Alteration of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 27-38, 1998.
  30. Röhrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. The phytoestrogen diadzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *J. Nutr.* 132: 370-375, 2002.
  31. Sandy MS. Role of redox cycling and lipid peroxidation in bipyridyl herbicide cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 35: 3095-3101, 1986.
  32. Schwenke DD. Antioxidants and atherogenesis. *J.Nutr.Biochem.* 9: 424-445, 1998.
  33. Sies H. (Eds). *Oxidative Stress*. London: Academic Press; 1985.
  34. Skibola CF, Smith M. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 375-383, 2000.
  35. Toyokuni S, Tanaka T, Kawaguchi W, Lai-Fang NR, Ozeki M, Akatsuka S, Hiai H, Aruoma O, Bahorun T. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plants extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radic. Res.* 37: 1215-1224, 2003.
  36. van Bladeren P. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact.* 129: 61-76, 2000.

37. Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, Ronai Z. Glutathione S-transferase elicits protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res.* 60: 4053-7, 2000.
38. Yoshioka T, Homma T, Meyrick B, Takeda M, Moore-Jarett T, Kon V, Ichikawa I. Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney Int.* 46: 405-413, 1994.

**resultats III**

---

---





---

**POST-TRANSLATIONAL Cu,Zn-SUPEROXIDE  
DISMUTASE REGULATION BY GRAPE SEED  
PROCYANIDINS *IN VIVO* (DIABETIC RAT AS AN  
OXIDATIVE STRESS MODEL) AND *IN VITRO* (FAO  
CELLS)**

---

**Puiggròs, F.;** Fernández-Larrea, J.; Gracia, J.; Blay,  
M.; Ardévol, A.; Bladé, C.; Arola, L.; Salvadó, M. J.

( article en consideració)



Post-translational Cu,Zn-Superoxide Dismutase Regulation by  
Grape Seed Procyanidins *In Vivo* (Diabetic Rat as an Oxidative Stress  
Model) and *In Vitro* (Fao Cells)

**Puiggròs, F.;** Ardévol, A.; Blay, M.; Gracia, J.; Fernández-Larrea, J.; Arola, L.;  
Bladé, C.; and Salvadó, M. J.

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Unitat d'Enologia del Centre de Referència en  
Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya, Universitat Rovira i Virgili,  
C/Marcel·lí Domingo s/n 43007 Tarragona, Spain

ABSTRACT

The flavonoids have aroused considerable interest because of their potential beneficial effects on human health that have been principally attributed to their antioxidant activities. Recently studies have speculated that besides of their antioxidant roles, flavonoids can act as secondary messengers by modulating cell signalling pathways and/or gene expression. We studied the grape seed procyanidin extract (GSPE) effect in Cu,Zn-SOD gene expression. In streptozotocin-induced diabetic rats as an oxidative stress model, we evaluated mRNA, protein amount and enzyme activity using relative quantitative RT-PCR, Western Blotting and spectrophotometry. The expression profile of Cu,Zn-SOD in diabetic rats was similar to that of non-diabetic rats. The administration of GSPE caused a post-translational regulation of Cu,Zn-SOD both in diabetic and non-diabetic rats, recruiting antioxidant defences of healthy and sick animals, which can contribute to improve diabetic situation.

To evaluate whether the post-translational regulation of Cu,Zn-SOD was dose-dependent we also studied the effect of GSPE in Cu,Zn-SOD expression using in vitro model (hepatocarcinoma Fao cells). The cells were exposed to different GSPE doses between 0 and 150 mg/L for 24h. The results showed an enhancement only at enzyme activity which suggest, as in vivo results, a post-translational regulation of Cu,Zn-SOD that is reflected mainly at 15 mg/L.

---

Keywords: Grape seed procyanidins extract, Cu,Zn-SOD gene expression, diabetes hepatocytes, oxidative stress.

## INTRODUCTION

Flavonoids are a family of antioxidants found in fruits, vegetables, and popular beverages such as red wine [1] in which they are mostly present as procyanidins, which are complex mixtures of catechin oligomers whose average degree of polymerisation is between 4 and 11 [2]. Various claims have been made for the beneficial effects of procyanidins: they are said to have anti-inflammatory and cardiovascular effects, and also vasorelaxant activity [3]. More specifically, the health-protective properties of procyanidins have mainly been attributed to their antioxidant activity, which involves mechanisms such as metal chelating and free radical scavenging [4-6]. However, it has recently been reported that flavonoids do not act only as conventional hydrogen-donating antioxidants but also that they may have a modulatory action in cells by acting on protein kinase and lipid kinase signaling pathways [7]. In particular, procyanidins have been shown to modulate the activity of such regulatory enzymes as cyclooxygenase, lipoxygenase, protein kinase C, angiotensin-converting enzyme, hyaluronidase, various forms of cytochrome P450, and gene expression of CYP1A at concentrations that are achievable in plasma [8].

It is widely accepted that increased oxidative stress takes part in the development and progression of diabetes and its complications [9-11]. Diabetes is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycaemia, which is the results of defects in insulin secretion, action or both. Induced hyperglycaemia increases glucose autoxidation, protein glycation, and the subsequent oxidative degradation of glycated protein leads to an enhanced production of reactive oxygen species (ROS) [12] but the mechanisms by which increased oxidative stress is involved in the diabetic complications are only partly known. These mechanisms include the activation of transcription factors, protein kinase C and advanced glycated end products (AGEs) [13]. Oxidative stress may be both a cause and an effect of tissue damage and a primary and a secondary source of diabetic pathology [10], since it not only damages receptors, enzymes, signal transduction pathways and transport proteins but also gives rise to secondary messengers that can damage to other biomolecules. There have been contradictory reports in the literature on how diabetes-induced hyperglycaemia affects antioxidant enzymes. For example, they have been reported to decrease, increase or remain

unaltered in diabetic animals with wide variations that depend on the age of the animal, the duration of diabetes [12,14,15] or the tissues examined [16].

Superoxide anion radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) are the major reactive oxygen species (ROS) generated in mitochondria, and they are involved in the production of several potentially damaging species (i.e., hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and peroxyxynitrite), which can damage cells by causing lipid peroxidation, and oxidative damage in DNA and proteins [17]. Therefore, the generation and/or removal of superoxide has been observed to play significant roles in a variety of critical homeostatic mechanisms both at cellular and organism level. Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) catalyses the dismutation of the superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) into oxygen and hydrogen peroxide [18]. Since biological macromolecules are a target for the damaging action of ROS, it would be very useful to understand how procyanidins affect the regulation of the antioxidant Cu,Zn-SOD expression because little work has been done to directly assess how procyanidins affect this enzyme [19].

In previous studies we observed that moderate red wine consumption resulted in higher hepatic Cu,Zn-SOD activity in rats [20], and that a grape seed procyanidin extract (GSPE) improved the hepatic oxidative metabolism *in vitro* [21]. In this study, we assessed the effect of GSPE on Cu,Zn-SOD antioxidant expression *in vivo* using livers from streptozotocin-induced diabetic rats as an oxidative stress model. We also investigated how different doses of GSPE modulate *in vitro* mRNA expression, protein abundance and the specific activity of Cu,Zn-SOD in rat hepatoma Fao cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal experimental procedures**

Male Wistar rats weighing 250 g were purchased from Charles River (Barcelona, Spain). The animals were housed in animal quarters at 22°C with a 12-h light/dark cycle and were fed *ad libitum*. The Animal Ethics Committee of our University approved all procedures. Type-1 diabetes mellitus was induced by intraperitoneal injection of a freshly prepared solution of streptozotocin (STZ) 70 mg/Kg in 50 mM

citrate buffer, pH 4.5. The only diabetic animals used were those with polyuria, glycosuria and hyperglycaemia ( $\approx 20$  mM) 2-3 days post-induction. All studies were carried out 1 week after STZ had been injected.

Rats were divided into four groups of 6-7 rats each. 1) Non-diabetic group: Rats were fed an oral gavage with vehicle (tap water). 2) Non-diabetic GSPE group: Rats were given an oral gavage of procyanidin extract (GSPE) from grape seed (Les Dérives Résiniques et Térpeniques, Dax, France) consisting of 16.5% monomers, 18.7% dimmers, 16% trimers, 9.3% tetramers, 4.2% phenolic acids and 35.5% higher polymers (Molecular Weight = 1575 g/mol) in aqueous solution (250 mg/Kg body weight). 3) Diabetic Group: Rats were fed an oral gavage with vehicle (tap water) and the last group were 4) Diabetic GSPE group: Rats were fed an oral GSPE gavage (250 mg/Kg body weight). The used procyanidin dose is one-fifth of the NOAEL (no-observed-adverse-effect level) described for GSPE and male rats [22].

After 5h of GSPE treatment, the rats were beheaded and their livers were excised and frozen immediately in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Cell line and culture

Fao cells were routinely cultured in F-12 Coon's Modification medium (Sigma), supplemented with 5% Foetal Bovine Serum and 1% Penicillin/Streptomycin (all of which were provided by BioWhittaker). Cells were grown at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . They were seeded 3-4 days before use in 6-well plates (Corning) at a density of  $4-5 \times 10^5$  cells/well.

Cells were incubated with GSPE at concentrations between 0 and 150 mg/L for 24h.

#### Cytotoxicity

The cytotoxicity of GSPE was evaluated with the LDH assay. It was determined spectrophotometrically by the rate of NADH utilization in the enzyme-catalysed back reaction of pyruvate conversion to lactate using the LDH Kit (QCA, Barcelona, Spain). By relating LDH leakage to total LDH activity after the hepatocytes had been lysed, we evaluated the effect that GSPE had on cell viability.

#### *Superoxide dismutase enzyme activity*

Liver tissue was homogenized in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 (1:10 wt/vol) centrifuged at 20000g for 10 minutes and supernatant was collected. All these steps were performed at 4°C. After saving an aliquot for protein assay, supernatant was used for Cu, Zn-superoxide dismutase -Cu,Zn-SOD- (E.C.1.15.1.1). The Cu,Zn-SOD activity was measured by quantifying the inhibition of pyrogallol autooxidation [23] at 420 nm for 3 min.

Hepatocytes were scraped into 50mM of phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 containing 0.1% Triton X-100, and then disrupted by sonication for 15 s. After centrifugation at 10.000g for 10min. at 4°C, the supernatant was collected for protein determination and the analysis of superoxide dismutase (SOD) activity. The SOD activity was determined by measuring, at 480 nm and 37°C, the extent to which the epinephrine autoxidation caused by the superoxide anion had been inhibited [24]. The reaction mixture contained 50mM carbonate buffer pH 10.2, 1mM EDTA, 50µL cellular extract and 5mM epinephrine. The reaction was monitored for 4 min.

#### *Determination of total protein content*

The total protein content in the homogenate was measured by the Bradford method [25]. Bovine serum albumin was used as standard and the absorbance was measured at 595 nm.

#### *Western Blot analysis*

After GSPE treatment, liver homogenized and hepatocytes were resuspended and lysed in 1 mL of the following buffer: 1X PBS, 1% nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS. To inhibit proteases, 5 mL of the buffer contained 25 µL Leupeptine 2mM (Sigma); 25 µL Pepstatine B 2 mM (Sigma) and 100 µL PMSF 0.1 M (Sigma).

Samples containing 7.5 µg of total protein were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel (12%), using the Laemmli method [26]. At the same time, molecular weight standards were loaded in separate lanes. The proteins were transferred onto a

nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher&Schuell, Germany). Blots were then probed with rabbit Cu,Zn-SOD polyclonal antibody, with beta-actin antibody as internal standard (Stressgen Biotechnologies), and then with peroxidase-labelled secondary antibody and the chemiluminescent substrate luminol (ECL Western Blotting, Amersham Pharmacia Biotech). Chemiluminescent detection of specifically labelled protein was quantified by measuring the density of the detected bands using Quantity One software (Bio-Rad).

#### RNA isolation and real time RT-PCR

Total RNA was isolated from rat's liver or Fao cells using the High Pure Isolation Kit (Roche). The amount of total RNA was estimated by optical density at 260 nm. 1 µg of RNA was transcribed into cDNA with SuperScript-II (Life Technologies). Cu,Zn-SOD and glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were studied by amplifying the reversibly transcribed RNAs with specific primer pairs (from Applied Biosystems), as follows: Cu,Zn-SOD sense primer, 5'- AGC GGA TGA AGA GAG GCA TGT - 3'; antisense primer, 5'- CAC ACG ATC TTC AAT GGA CAA T - 3'; GAPDH sense primer, 5'- TGC CAA GTA TGA TGA CAT CAA GAA - 3'; antisense primer, 5'- AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT - 3'. Primers were added at a final concentration of 0.3 µM to a 25 µL reaction mixture containing 10 ng cDNA and 5X Sybr Green (Applied Biosystems).

In accordance with manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Warrington, UK), the mixture was incubated at 50°C for 2min. and activated for 2 min at 95°C. Then both genes were subjected to 40 cycles of sequential steps in a thermal cycler for initial melting (15 s at 95°C) and an annealing/extension at 60°C for 2min.

Cu,Zn-SOD and GAPDH mRNA levels were measured in a fluorescent thermal cycler (GeneAmp 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). The level of Cu,Zn-SOD mRNA was normalized to the level of GAPDH mRNA detected in each sample.



Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Significance was tested by a t-test or one-way ANOVA (SigmaStat Version 10.0 for Windows, SPSS, Richmond, CA). We used Scheffe’s test of honestly significant differences to make pairwise comparisons (P<0.05 were considered statistically significant).

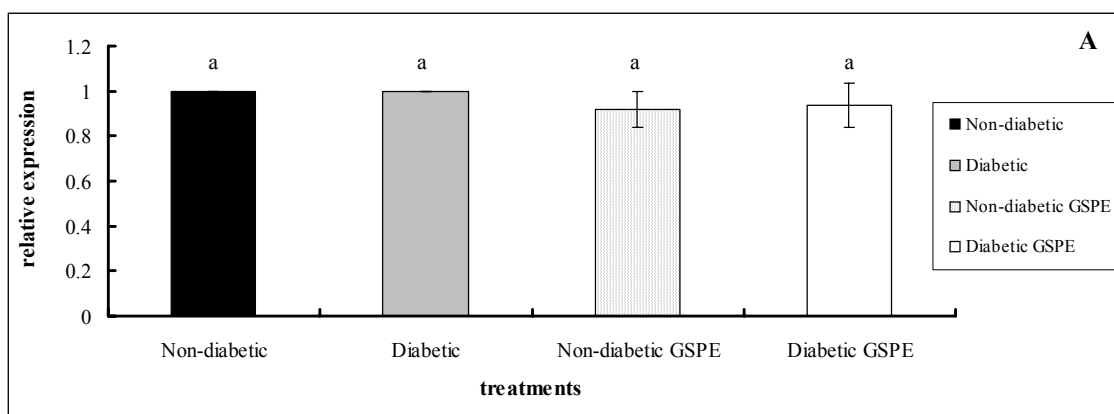
**RESULTS**

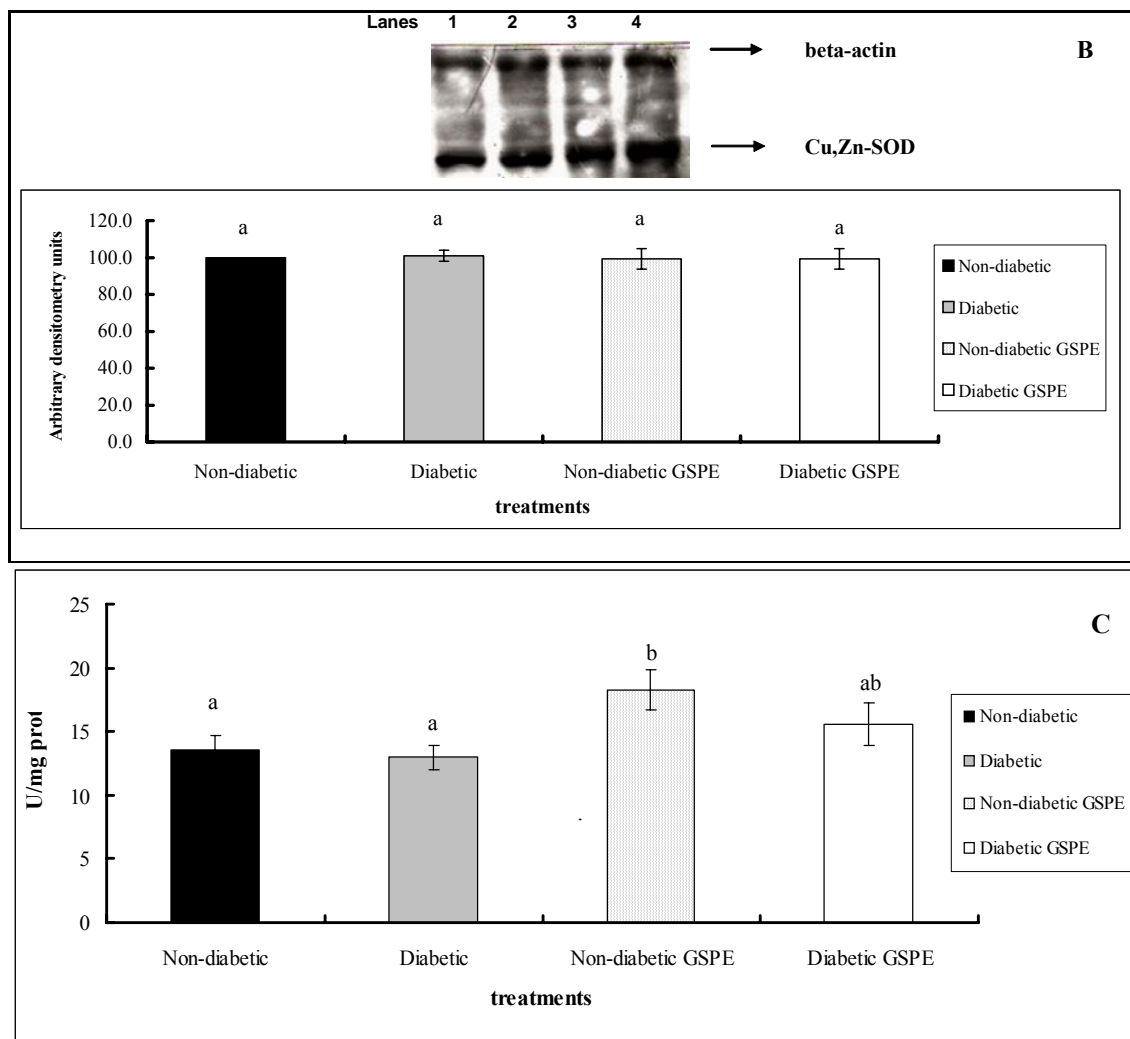
Expression profile of Cu,Zn-SOD. Effect of GSPE on liver from streptozotocin-induced diabetic rats

Figures 1A-C show the effect of GSPE on mRNA levels, the amount of protein and the enzyme activity of Cu,Zn-SOD in both diabetic and non-diabetic rats.

Figure 1A shows mRNA levels and Figure 1B shows Western Blot and the densitometric data relative to beta-actin. We did not find any differences in Cu,Zn-SOD mRNA levels and amount of protein among the different treatments. However, as can be seen in Figure 1C, the non-diabetic GSPE group presented a significant increase in Cu,Zn-SOD activity (+20%) whereas the diabetic GSPE group showed only a slight increase in Cu,Zn-SOD activity. We did not find statistical differences between diabetic or non-diabetic rats.

As illustrated in Table 1, the activity/protein and protein/mRNA ratio values were different only under GSPE exposure.





**Figure 1. Analysis of the effect of GSPE on the Cu,Zn-SOD expression in streptozotocin-induced diabetic rats**

- (a) Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) mRNA expression in vivo. Relative quantification by real-time PCR using GAPDH as internal standard. Values are expressed as a percentage of control (means  $\pm$  SEM of four different experiments in triplicate). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).
- (b) Western analysis of Cu,Zn-SOD in rat's liver. Lanes: 1. Non-diabetic rats; 2. Diabetic Rats; 3. Non-diabetic GSPE rats and 4. Diabetic GSPE rats. Bars represent the arbitrary relative abundance of hepatic Cu,Zn-SOD vs. beta-actin as internal standard. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).
- (c) Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) enzyme activity in vivo. Values are expressed as a percentage of control (means  $\pm$  SEM of four different experiments in triplicate). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).

Groups	Activity / protein	Protein / mRNA
Non-diabetic	100.00	100.00
Diabetic	98.93	100.00
Non-diabetic GSPE	133.00	109.95
Diabetic GSPE	115.35	106.21

Table 1. In vivo analysis of Cu,Zn-superoxide dismutase gene expression ratios. Gene expression in Cu,Zn- superoxide dismutase under different doses of GSPE. mRNA, protein and activity levels found in control animals are regarded as 100%. The values of treatments are presented as percentages of control value

In vitro cytotoxicity

Figure 2 shows LDH leakage into the extracellular media of the Fao cells, which were incubated with several doses of GSPE for 24h. The LDH leakage increased in a dose-dependent manner. Doses above 150 mg/L presented a high percentage of LDH leakage (> 40%) in culture medium, so they were not used for subsequent experiments. Taking into account the cell viability, we considered 150 mg/L GSPE as a negative control to verify the effect of an excessive GSPE dose on Cu, Zn-SOD expression.

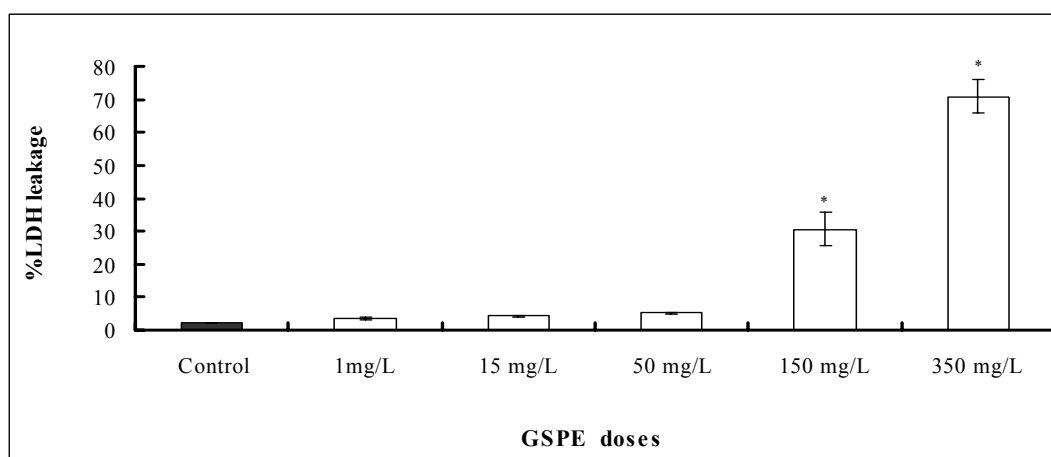


Figure 2. Viability of Fao cells after treatment with different doses of GSPE for 24h.

Cell viability was assessed by LDH assay. Values are expressed as the percentage of LDH leakage. Experimental values are the mean ± SEM of three different experiments in triplicate. \* Significant differences (P< 0.05) versus control value were determined using a t-test.

#### *Expression profile of Cu,Zn-SOD in Fao cells. Effect of GSPE treatments.*

Figures 3A-C show the effect of GSPE on mRNA levels, the amount of protein and the enzyme activities of Cu,Zn-SOD in Fao cells

Figure 3A shows that Cu,Zn-SOD mRNA levels were not affected by GSPE exposure except at 150 mg/L where its expression decreased significantly (-30%) in relation to the control value.

Figure 3B shows Western Blot detection for Cu,Zn-SOD and the densitometric data relative to beta-actin. The pattern was the same as for mRNA levels, so the amount of protein did not present significant changes except at 150 mg/L, where the relative Cu,Zn-SOD abundance was also significantly diminished (- 50% approximately).

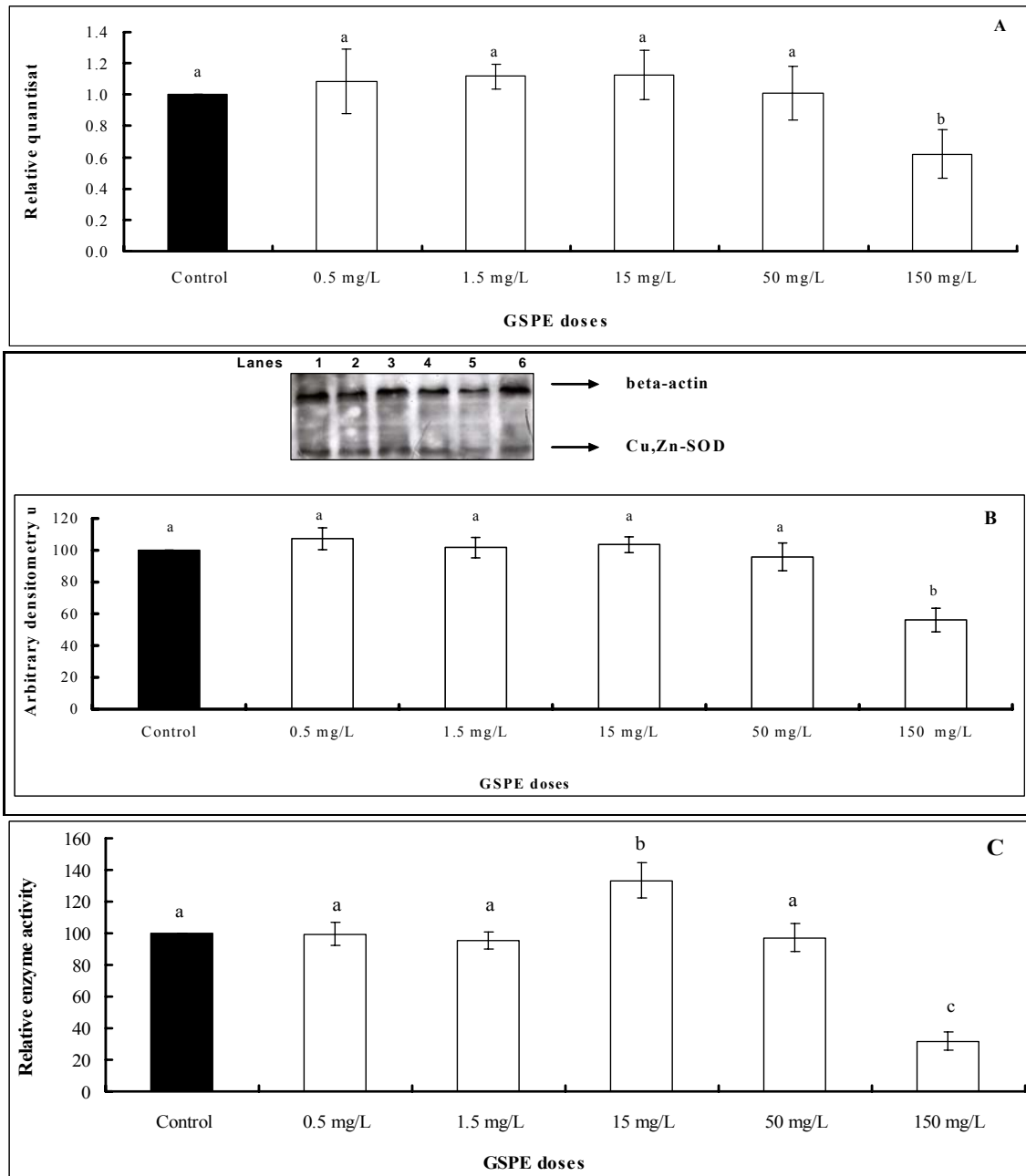
It is interesting to see that the enzyme activity determinations in Figure 3C show that the levels of Cu,Zn-SOD were significantly enhanced at 15 mg/L (+ 33%) which was not observed in either mRNA or protein amount profiles. At 150 mg/L, however the enzyme activity decreased (- 70%) just as it did in the mRNA and protein profiles.

To determine the regulatory step and dose of GSPE at which the Cu,Zn-SOD regulation was greatest we studied the protein/mRNA and activity/protein ratios (Table 2). We observed differences at both 15 mg/L and 150 mg/L GSPE.

## DISCUSSION

The pathology of diabetes involves high oxidative stress because hyperglycaemia depletes the activity of the antioxidative defense systems and thus promotes the generation of free radicals [27]. In many diseases correlated with a cellular oxidative stress status, the concerted actions of antioxidant enzymes, which keep the concentration of free radicals in cells relatively low, are overwhelmed.

We focused our report on procyanidins because our group had previously shown that the administration of procyanidins has an antihyperglycemic effect on streptozotocin-induced diabetic rats. We also reported that procyanidins stimulate glucose uptake in L6E9 myotubes and 3T3L1 adipocytes by shearing such insulin signaling pathways as PI3K and p38 MAPK, thus stimulating GLUT-4 translocation to the plasma membrane [28]. In addition, our group reported an improvement in the plasma lipid profile correlated to an increment in CYP7A1 and an up-regulation of SHP (NR0B2) in the



**Figure 3 Analysis of the effect of GSPE on Cu/Zn-SOD expression**

- (a) Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) mRNA expression in Fao cells under different doses of GSPE exposure. Relative quantification by real time PCR using GAPDH as internal standard after reverse transcription. Values are expressed as a percentage of control (means  $\pm$  SEM of four different experiments in triplicate) and significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).
- (b) Western analysis of Cu,Zn-SOD. Lanes: 1. Control; 2. 0.5 mg/L; 3. 1.5 mg/L; 4. 15 mg/L; 5. 50 mg/L; 6. 150 mg/L. Bars represent the arbitrary densitometry abundance of Cu,Zn-SOD for each treatment condition. Results are shown as mean  $\pm$  sem ( $n=4$ ). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).
- (c) Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) enzyme activity. Values are expressed as a percentage of control (means  $\pm$  SEM of four different experiments in triplicate).

Significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained with ANOVA and are indicated with superscripts (Scheffe's test).

liver of Wistar rats [29]. All this suggests that procyanidins are fundamental in the mediation of the activity of other transcription factors involved in the maintenance of lipid homeostasis [29]. These data strongly support the idea reported by Williams that procyanidins, as flavonoid compounds, can act as signaling molecules [7]. These properties must be added to their known antioxidant procyanidin activity. In this regard we reported an activation of hepatic antioxidant enzymes in rats that consume moderate amounts of red wine [20], an improvement in the hepatic oxidative metabolism and antigenotoxic effects on Fao cells submitted to  $H_2O_2$  [21,30].

In the current study we examined the effect of a grape seed procyanidin extract (GSPE) on the mRNA level, amount of protein and activity of Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) in two models: 1) streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats as an *in vivo* model for oxidative stress; and 2) hepatocarcinoma Fao cells - as *in vitro* model - to find whether the Cu,Zn-SOD regulation observed *in vivo* due to GSPE was dose-dependent.

In diabetic animals, we found no differences in Cu,Zn-SOD expression. In this respect, there are discrepancies in the literature about the regulation of Cu,Zn-SOD in diabetes. Our results showed a slight but not significant decrease in Cu,Zn-SOD activity in diabetic rats, which is in agreement with Reddi *et al.* and Godin *et al.*, [31,16], who reported that Cu,Zn-SOD activity decreased in the kidney, heart and liver of diabetic rats (they did not examine the mRNA and protein levels), Kakkar and Hammers *et al.*, however, reported an increase in Cu,Zn-SOD activity in the liver, heart and pancreas and no change in the activity in the kidney of diabetic rats [12,32].

The increased Cu,Zn-SOD activity in diabetic GSPE rats that we observed is not statistically different from the activity in diabetic rats although it is at the limit of the significance level. In this regard, Maritim *et al.* reported that diabetes did not affect Cu,Zn-SOD activity in any tissue but that there was a slight increase when treated with

pycnogonol (a procyanidin extract from maritime pine bark) in the liver of diabetic rats. Similar observations have been reported with melatonin and gemfibrozil [33,34].

The results on *in vivo* enzyme activity/protein and protein/mRNA ratios confirm the Cu,Zn-SOD post-translational regulation due to GSPE intake both in non-diabetic and diabetic rats. In this regard, Lehman *et al.* suggested that Cu,Zn-SOD overexpression is correlated with NF- $\kappa$ B inactivation [35]. On the other hand, Halliwell reported that activation of the NF- $\kappa$ B was involved in oxidative stress in the cardiac tissues of diabetic rats [36]. Taking into account that flavonoids can act as signaling molecules (see Williams *et al* [7]), we hypothesize that GSPE acts by modulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway, thus improving diabetes oxidative parameters. This is in agreement with Mackenzie *et al.* who reported that dimeric procyanidins regulate NF- $\kappa$ B in both at the early stages (IKK activation) and later stages (DNA binding) in Jurkat T cells [37].

To assess how GSPE treatment can modulate Cu,Zn-SOD gene expression and determine the specificity of its response *in vitro*, we incubated Fao cells under different GSPE doses in order to confirm the Cu,Zn-SOD sort of regulation that was observed *in vivo*, and also to, find whether the GSPE effect was dose-dependent or at which dose its effect could be more pronounced.

It is known that the liver and the small intestine are the main organs where flavonoids undergo extensive phase II metabolism. Therefore, the fact that Fao cells have the enzymatic machinery necessary to derivatize flavonoids, allow us to assess the effect of procyanidins by addition of their native form in the culture medium [38,39].

The exposure of cells to GSPE did not alter the Cu,Zn-SOD mRNA levels or the amount of protein. However, the enzyme activity is significantly enhanced at 15mg/L, so we concluded that GSPE has no dose-dependent effect on the Cu,Zn-SOD activity.

Many authors have reported that the differences in the basal and inducible mRNA expression levels of Cu,Zn-SOD may depend on the type of cell investigated [40-42]. This is in accordance with Kameoka *et al.* [43] who reported no changes in the Cu,Zn-SOD expression pattern after isoflavonoid daidzein treatment in Caco-2 cells. However, the literature has attributed other beneficial effects to a dose of 15 mg/L

GSPE. For example, Pinent *et al.* reported that 15mg/L GSPE significantly stimulates the glucose uptake in L6E9 [26], and Roig *et al.* and Llopiz *et al.* showed an improvement in the hepatic enzyme metabolism and antigenotoxic effects under oxidative stress [21,28]. In terms of molar concentration, having account the average molecular weight of GSPE (see Mat. and Met), this amount (15 mg/L) is equivalent to a 9-10 $\mu$ M, which is a concentration physiologically achievable in plasma according to Kroon [38]. When we compared the Cu,Zn-SOD expression profile, both in vivo and in vitro (at 15

<b>GSPE doses</b>	<b>Activity/protein</b>	<b>Protein /mRNA</b>
<b>Control</b>	100.00	100.00
<b>0.5 mg/L</b>	92.92	98.85
<b>1.5 mg/L</b>	94.02	106.36
<b>15 mg/L</b>	128.81	91.78
<b>50 mg/L</b>	101.52	94.85
<b>150 mg/L</b>	56.53	90.51

**Table 2.** In vitro analysis of Cu,Zn-superoxide dismutase gene expression ratios under different doses of GSPE

Gene expression in Cu,Zn- superoxide dismutase under different doses of GSPE. mRNA, protein and activity levels found in control cells are regarded as 100%. The values of treatments are presented as percentages of control value

mg/LGSPE) we found that the enzyme activity/protein ratios were similar in both models because the enzyme activities are increased under GSPE treatments. This common profile reinforces a probably post-translational Cu,Zn-SOD regulation by GSPE that must be added to its ability to scavenge free radicals and ROS.

The considerable decrease in Cu,Zn-SOD expression at 150 mg/L GSPE made it possible for us to take this dose as the negative control for evaluating GSPE effects on Cu,Zn-SOD expression. Since LDH results (Fig.1) showed an increase in cellular toxicity, the mRNA levels, amount of protein and enzyme activity decreased significantly. This is probably due to protein oxidation [44] and mRNA fragility, and



confirms Skibola's findings that a slightly pro-oxidant effect at high doses of flavonoids are able to modify the redox status of the cell by altering the antioxidant mRNA binding protein, or affecting the mRNA stability and thus, indirectly, the enzyme synthesis and its activity [45].

To sum up, although mRNA and protein levels did not increase, the Cu,Zn-SOD activity was significantly stimulated at 15mg/L of GSPE treatment, which strongly suggests a post-translational regulation of Cu,Zn-SOD under GSPE exposure that confirms our *in vivo* results in an oxidative stress model, such as diabetes. Nevertheless, further experiments will be necessary if the role of GSPE in the molecular mechanisms underlying this regulation is to be determined. It will also be necessary to provide evidence that flavonoids, such as procyanidins, may exert beneficial effects and/or cytotoxic actions by modulating signaling pathways.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Mr Santiago Moreno for technical assistance and Mr John Bates for advice on the English. This work was supported by Grant AGL2002-00078 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) and Grant CO3/CO8 of the Fondo de Investigación Sanitaria of the Spanish Government.

## REFERENCES

- [1] Kumiko, I.; Schubert, D.; Yutaka, S. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanism. *Free Rad. Biol. Med.* **30**:433-446; 2001.
- [2] Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Am. Soc. Nutr. Sci.* **130**:2073S-2085S; 2000.
- [3] Fitzpatrick, D. F.; Bing, B.; Rohdewald, P. Endothelium-dependent vascular effects of pycnogenol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**:509-515; 1998.
- [4] Afanas'ev, I. B.; Dorozhko, A. I.; Brodskii, A. V.; Koctyuk, V. A. Chelating and free radical mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **38**:1763-1769; 1989.
- [5] Cotellet, N.; Bernier, J. L.; Henichart, J. P. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radic. Biol. Med.* **13**:211-219; 1992.
- [6] Van Acker, S. A. B. E.; van den Berg, D. J. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**:331-342; 1996.
- [7] Williams, R. J.; Spencer, J. P.E.; Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?. *Free Radic. Biol. Med.* **36**:838-849; 2004.
- [8] Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**:67-202; 2002.
- [9] Ceriello, A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* **49** (2, Suppl 1):27-29; 2000.
- [10] Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**:1-9; 1999.

- 
- [11] Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**:405-412; 1991.
- [12] Kakkar, R.; Mantha, S. V.; Radhi, J.; Prasad, K.; Kalra, J. Antioxidant defense system in diabetic rats: A time course study. *Life Sci.* **60**:667-679; 1997.
- [13] Maritim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins III, J. B. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**:24-38; 2003.
- [14] Wohaieh, S. A.; Godin, D. V. Alterations in free radicals tissue-defense mechanism in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effect of insulin treatment. *Diabetes* **36**:1014-1018; 1987. responsable
- [15] McDermott, B. M.; Flatt, P. R.; Strain, J. J. Effects of cooper deficiency and experimental diabetes in tissue antioxidant enzyme levels in rats. *Ann. Nutr. Metab.* **38**:263-269; 1994.
- [16] Godin, D. V.; Wohaieh, S. A.; Gasrnett, M. E.; Goumeniouk, A. D. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol. Cell Biochem.* **84**:223-231; 1988.
- [17] Kazzuz, J. A.; Xu, J.; Palaia, T. A.; Mantell, L.; Fein, A. M.; Horowitz, S. Cellular oxygen toxicity. *J. Biol. Chem.* **271**:15182-15186; 1996.
- [18] Kim, Y. H.; Park, K. H.; Hyne, M. R. Transcriptional activation of the Cu,Zn-superoxide dismutase gene thought the AP2 site by Ginsenoside Rb<sub>2</sub> extracted from a medicinal plant, *Panax ginseng*. *J. Biol. Chem.* **271**:24539-24543; 1996.
- [19] Fujii, J.; Taniguchi, N. Downregulation of superoxide dismutase and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Rad. Biol. Med.* **31**:301-308; 1999.

- [20] Roig, R.; Cascón, E.; Arola, L.; Bladé, C.; Salvadó, M. J. Moderate red wine consumption protects the rat against the oxidation in vivo. *Life Sci.* **64**:1517-15124; 1999.
- [21] Roig R.; Cascón, E.; Arola L.; Bladé, C.; Salvadó, M. J. Procyanidins protect Fao cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**:25-30; 2002.
- [22] Yamakoshi, J.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kituchi, M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology* **40**:599-607; 2002.
- [23] Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474; 1974.
- [24] Fridovich, I.; Misra, H. P. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**:3170-3175; 1972.
- [25] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254; 1976.
- [26] Laemmli, U. K. Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685; 1970.
- [27] Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**:933-956; 1996.

- 
- [28] Pinent, M.; Blay, M.; Bladé, M. C.; Salvadó, M. J.; Arola, L.; Ardévol, A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines *Endocrinology* **145**:4985-4990; 2004.
- [29] del Bas, J. M.; Fernánadez-Larrea, J.; Blay, M.; Ardévol, A.; Salvadó, M. J.; Arola, L.; Bladé, C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expresión in healthy rats. IN PRESS. *FASEB J.*; 2004.
- [30] Llopiz, N.; Puiggròs, F.; Céspedes, E.; Arola, L.; Ardévol, A.; Bladé, C.; Salvadó, M.J. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* **52**:1083-1088; 2004.
- [31] Reddi, A. S.; Bollineni, J. S. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF- $\beta$ 1 in normal and diabetic rats. *Kidney Int.* **59**:1342-1353; 2001.
- [32] Hammers, H. D.; Martin, S.; Federslin, K.; Geisen, K.; Brownle, M. Aminoguanidine treatment inhibit the development of experimental diabetic renopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:11555-11558; 1991.
- [33] Maritim, A. C.; Moore, B. H.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B. Effects of melatonin on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Toxicol.* **18**:161-166; 1999.
- [34] Ozansoy, G.; Akin, B.; Aktan, F.; Karasu, C. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profiles and peroxidation but dose not alter blood glucose and

- tissue autoxidation enzyme in chronically diabetic rats. *Molec. Cell Biochem.* **256**:59-63; 2001.
- [35] Lehmann, T. G.; Wheeler, M. D.; Schwabe, R. F.; Connor, H. D.; Schoonhoven, R.; Bunzendahl, H.; Brenner, D. A.; Samulski, R. J.; Zhong, Z.; Thurman, R. G. Gene delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase improves graft functions after transplantation of fatty livers in the rat. *Hepatology* **32**:1255-1264; 2000.
- [36] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Ltd. Oxford; 1999.
- [37] Mackenzie, G. G.; Carrasquedo, F.; Delfino, J. M.; Keen, C. L.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. (2004). Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.* **18**:167-169; 2004.
- [38] Kroon, P. A.; Clifford, M. N.; Crozier, A.; Day, A. J.; Donovan, J. L.; Manach, C.; Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin. Nutr.* **80**:15-21; 2004.
- [39] Manach, C.; Donovan, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Rad. Res.* **38**:771-785; 2004.
- [40] Tate, D. J. Jr.; Micelli, M. V.; Newsome, D. A. Phagocytosis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**:2856-2864; 1990.
- [41] Wong, G. H. W.; Goeddel, D. V. Induction of manganous superoxide dismutase by tumour necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**:941-944; 1988.

- [42] Yoo, J. H.; Erzurum, S. C.; Hay, J. G.; Lemarchand, P.; Crystal, R. G. Vulnerability of the human airway epithelium to hyperoxia. *J. Clin. Investig.* **93**:297-302; 1994.
- [43] Kameoka, S.; Leavitt, P.; Chang, C.; Kuo, S. M. Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids. *Cancer Lett.* **146**:161-167; 1999.
- [44] Clerch, L. B.; Massaro, D. Tolerance of rats to hyperoxia: lung antioxidant enzyme gene expression. *J. Clin. Investig.* **91**:499-508; 1993.
- [45] Skibola, C. F.; Smith, M. T. Potential health impact of excessive flavonoids intake. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:375-383; 2000.





**conclusions**

---

---



1. Els flavonoides exerceixen un efecte marcadament preventiu del dany oxidatiu sobre el DNA en un model d'estrès oxidatiu *in vitro*. Aquest efecte es correlaciona íntimament amb l'estructura del flavonoide. Així, el monòmer quercetina, estructuralment òptim per a posseir propietats antioxidants, és el més efectiu i l'extracte de procianidines (GSPE), atesa la seva naturalesa polimèrica amb la presència de molts més centres reactius, resulta més efectiu que els seus monòmers de partida, catequina i epicatequina.
2. La prevenció del dany genotòxic en cèl·lules Fao resulta més rellevant si, prèviament a sotmetre el model d'estudi a estrès oxidatiu, incubem els flavonoides al medi de cultiu. Això suggereix que el mecanisme d'eliminació de ROS dels flavonoides no és la via exclusiva de prevenció de danys al DNA sinó que s'estimulen els mecanismes d'adaptació cel·lulars a situacions potencialment oxidants.
3. L'extracte de procianidines exerceix una activació transcripcional dels enzims que formen part del cicle del glutatió en cèl·lules HepG2. Aquesta estimulació, però, només es reflecteix a nivell d'activitat enzimàtica de la GPx i la GST a 15 mg/L de GSPE. D'altra banda, també a 15 mg/L sembla que el GSPE regula posttraduccionalment la Cu,Zn-SOD, tenint en compte que els nivells de missatger no varien però l'activitat enzimàtica s'incrementa notablement.

4. L'estrès oxidatiu no dona lloc a una resposta coordinada en el patró d'expressió dels enzims antioxidants en cèl·lules HepG2. Tanmateix, s'estimulen els enzims del cicle del glutatió a nivell d'activitat enzimàtica.
5. La preincubació d'HepG2 amb extracte de procianidines prevé la depleció de glutatió, mantenint l'estat redox estable en hepatòcits sotmesos a estrès oxidatiu. Les activitats dels enzims del cicle del glutatió estan incrementades possiblement per a preparar les cèl·lules a una situació d'estrès oxidatiu i a causa, probablement, del fet que també hi estiguin implicats els enzims responsables de la síntesi del glutatió.
6. L'extracte de procianidines regula posttraduccionalment la Cu,Zn-SOD *in vivo*, atès que mentre que els nivells de missatger i quantitat de proteïna es mantenen invariables, sí que es detecta un augment significatiu en l'activitat enzimàtica.
7. La regulació posttraduccional de la Cu,Zn-SOD per l'extracte de procianidines *in vivo* es confirma també *in vitro* emprant cèl·lules Fao. Cal destacar que, com en l'apartat 3, aquesta regulació *in vitro* s'accentua a la dosi de 15 mg/L de GSPE.
8. L'extracte de procianidines no exerceix cap efecte modulador significatiu sobre el patró d'expressió gènica de la Cu,Zn-SOD *in vivo*, emprant rates induïdes a diabetis, ja que no es detecten canvis ni a nivell de missatger (mRNA), quantitat de proteïna, tot i que s'observa un lleuger increment en l'activitat enzimàtica.

**referències**

---





1. Bernard, J. S.; Trumpower, L. Superoxide generation by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *Arch. Bioch. Bioph.* **419**:198-206; 2003.
2. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:97-112; 1995.
3. Halliwell, B.; Gutteridge, J. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University press; pp. 36-104; 1999.
4. Haber, F.; Weiss, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc.R. Soc. London.Ser. A.* **147**:332-351; 1934.
5. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**:1-85; 1990.
6. Davies, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* **61**:1-31; 1995.
7. Mackaness, G. B. The monocyte in cellular immunity. *Semin. Hematol.* **7**:172-184; 1970.
8. Adams, D. O.; Johnson, W. J.; Marino, P. A. Mechanisms of target recognition and destruction in macrophage-mediated tumor cytotoxicity. *Fed. Proc.* **41**:2212-2221; 1982.
9. Stone, K.; Pryor, W. A. Cigarettes: then and now. *J. Lab. Clin. Med.* **124**:313-314; 1994.
10. Pollycove, M.; Feinendegen, L. E. Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage. *Human Exp. Toxicol.* **22**:290-306; 2003.
11. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1989) Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Halliwell, B.and Gutteridge, J.M.C. eds. ) pp. 86-187. Clarendon Press Oxford. UK.
12. Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**:105-1071; 1986.

13. de Zwart, L. L.; Meerman, J. H.; Commandeur, J. N.; Vermeulen, N. P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:202-226; 1999.
14. Chandra, J.; Samali, A.; Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:323-333; 2000.
15. Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:1102-1115; 2002.
16. Møller, P.; Loft, S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutat. Res.* **551**:79-89; 2004.
17. Ames, B. N.; Gold, L. S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.* **250**:3-16; 1991.
18. Lee, S. H.; Blair, I. A. Oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**:148-155; 2001.
19. Richter, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* **44**:175-189; 1987.
20. Romero, F. J.; Bosch-Morell, F.; Romero, M. J.; Jareno, E. J.; Romero, B.; Marin, N.; Roma, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.* **106 Suppl 5**:1229-1234; 1998.
21. Linton, S.; Davies, M. J.; Dean, R. T. Protein oxidation and ageing. *Exp. Gerontol.* **36**:1503-1518; 2001.
22. Squier, T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* **36**:1539-1550; 2001.
23. Boonstra, J.; Post, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* **337**:1-13; 2004.
24. Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* **192**:1-15; 2002.
25. Sohal, R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:37-44; 2002].
26. Rando, T. A.; Disatnik, M. H.; Yu, Y.; Franco, A. Efficiency study of the annular balloon catheter a new local drug delivery device. *Neurom. Dis.* **8**:14-21; 1998.



27. Beatty, S.; Koh, H.; Henson, D.; Boulton, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **45**:115-134; 2000.
28. Martinat, C.; Shendelmann, S.; Jonason, A.; Leete, T.; Beal, M. F.; Yang, L.; Floss, T.; Abeliovich, A. Sensitivity to oxidative stress in DJ-1 deficient dopamine neurons: an ES-derived cell model of primary Parkinsonism. *Plos Biology* **2**:1754-1763; 2004.
29. Matés, J. M.; Sánchez-Jiménez, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implication for cancer therapy. *Int. Journal of Bioch. & Cell Biol.* **32**:157-170; 2000.
30. Matés, M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**:83-104; 2000.
31. Kira, Y.; Sato, E.; Inoue, M. Association of Cu,Zn-Superoxide Dismutase with mitochondria and peroxisomes. *Arch. Bioch. Bioph.* **399**:96-102; 2002.
32. Jackson, R. M.; Parish, G.; Ho, Y. S. Effects of hypoxia on expression of superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts. *Am. J. Physiol.* **271**:955-962; 1996.
33. Yrjänheikki, J. Spreading depression-induced expression of c-fos and cyclooxygenase-2 in transgenic mice that overexpress human Cooper/Zinc-Superoxide Dismutase. *J. Neurot.* **17**:713-718; 2000.
34. Deshmukh, D. R.; Mirochnitchenko, O.; Ghole, V. S.; Agnese, D.; Shah, P. C.; Redell, M.; Brolin, R. E.; Inouye, M. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing cooper-zinc superoxide dismutase. *Am. J. Cell Physiol.* **273**:1130-1135; 1997.
35. Morikawa, K.; Shimokawa, H.; Matoba, T.; Kubota, H.; Akaika, T.; Talukder, M. A. H.; Hatanaka, M.; Fujiki, T.; Maeda, H.; Takahashi, S.; Takeshita, A. Pivotal role of Cu,Zn-Superoxide Dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J. Clin. Invest.* **112**:1871-1879; 2003.

36. Liochev, S. I.; Fridovich, I. Cooper, Zinc Superoxide Dismutase as a univalent NO<sup>•</sup> oxidoreductase and as a dichlorofluorescein peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**: 35253-35257; 2001.
37. Montalto, M. C.; Hart, M. L.; Jordan, J. E.; Wacla, K.; Stahl, G. L. Role for complement in mediating intestinal nitric oxid synthase-2 and superoxide dismutase expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**:197-206; 2003.
38. Tsan, M. F. Superoxide Dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice. *Int. J. Mol. Med.* **7**:13-19; 2001.
39. Mozaffar, S.; Ueda, M.; Kitatsuji, K.; Shimizu, S.; Osumi, M.; Tanaka, A. . Properties of catalase purified from a methanol-grown yeast, *Kloeckera* sp. 2201. *Eur. J. Bioch.* **155**: 527-531; 1986.
40. Nakamura, T.; Imamura, K.; Takebe, K.; Machida, K.; Ishii, M. Diabetic retinopathy in Japanese patients with long-standing pancreatic diabetes due to calcifying pancreatitis. *Tohoku. J. Exp. Med* **174**: 49-58; 1994.
41. Mbemba, A.; Houbion, M.; Remacle, J. Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **838**:211-220; 1985.
42. Lin, J.; Kao, C. H. Effect of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on leaf senescence. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **39**: 161-165; 1998.
43. DeLeve, L. D.; Kaplowitz, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* **52**:287-305; 1991.
44. Griffith, O. W.; Mulcahy, R. T. The enzymes of glutathione synthesis: gammaglutamylcysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* **73**:209-67, xii; 1999.
45. Shigeoka, S.; Takeda, T.; Hanaoka, T. Characterization and immunological properties of selenium-containing glutathione peroxidase induce by selenite in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. J.* **275**:623-627; 1991.
46. Yeldandi, A. V.; Rao, M. S.; Reddy, J. K. Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat. Res.* **448**:159-177; 2000.

47. Puntarulo, S.; Cederbaum, A. I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **24**:1324-1330; 1998.
48. Nebert, D. W.; Roe, A. L.; Dieter, M. Z.; Solis, W. A.; Yang, Y.; Dalton, T. P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**:65-85; 2000.
49. Saito, M.; Thomas, C. E.; Aust, S. D. Paraquat and ferritin-dependent lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**:179-185; 1985.
50. Anderson, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* **111-112**:1-14; 1998.
51. Smith, C. V.; Jones, D. P.; Guenther, T. M.; Lash, L. H.; Lauterburg, B. H. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140**:1-12; 1996.
52. Meister, A.; Anderson, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**:711-760; 1983.
53. Meister, A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* **251**:3-7; 1995.
54. Lu, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* **13**:1169-1183; 1999.
55. Hwang, C.; Sinskey, A. J.; Lodish, H. F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**:1496-1502; 1992.
56. Meister, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**:35-42; 1995.
57. Colell, A.; Garcia-Ruiz, C.; Miranda, M.; Ardite, E.; Mari, M.; Morales, A.; Corrales, F.; Kaplowitz, N.; Fernandez-Checa, J. C. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* **115**:1541-1551; 1998.
58. Roychowdhury, S.; Wolf, G.; Keilhoff, G.; Horn, T. F. Cytosolic and mitochondrial glutathione in microglial cells are differentially affected by oxidative/nitrosative stress. *Nitric. Oxide.* **8**:39-47; 2003.

59. Kaplowitz, N.; Fernandez-Checa, J. C.; Kannan, R.; Garcia-Ruiz, C.; Ookhtens, M.; Yi, J. R. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **377**:267-273; 1996.
60. Goth, L. A new type of inherited catalase deficiencies: Its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia. *Blood Cells Mol.* **27**:512-517; 2001.
61. Johnson, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp. Bioch. and Phys. Part C* **133**:493-505; 2002.
62. Matés, J. M.; Sánchez-Jiménez, F. Antioxidant enzymes and their implication in pathophysiologic processes. *Front. In Biosci.* **4**:339-345; 1999.
63. Allen, R. G.; Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:463-499; 2000.
64. Otieno, M. A.; Kensler, T. W.; Guyton, K. Z. Chemoprotective 3H-1,2-dithiole-3-thione induces against genes in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:944-952; 2000.
65. Röhrdanz, E.; Obertriffter, B.; Ohler, S.; Tran-Thi, Q. H.; Kahl, R. Influence of adriamycin and paraquat on antioxidant enzyme expression in primary rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **74**:231-237; 2000.
66. Wilson, D. O.; Johnson, P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. *J. Appl. Physiol.* **88**:1791-1796; 2000.
67. Nguyen, T.; Pickett, C. B. Regulation of glutathione-S-transferase Ya subunit gene expression: DNA-protein interaction at the antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* **267**:13535-13539; 1992.
68. Ho, Y. S.; Howard, A. J. Cloning and characterization of the rat glutathione peroxidase gene. *FEBS Lett.* **301**:5-9; 1992.
69. Hayes, J. D.; McLellan, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* **31**:273-300; 1999.
70. Clerch, L. B.; Massaro, D.; Berkovich, A. Molecular mechanisms of antioxidant enzyme expression in lung during exposure to and recovery from hyperoxia. *Am. J. Physiol.* **274**:313-319; 1998.

71. Morel, Y.; Barouki, R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* **342**:481-496; 1999.
72. Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O.; Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **17**:235-248; 1994.
73. Leah, R. .; Casareno, D. W.; Gitlin, J. D. The cooper chaperone CCS directly interacts with cooper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **273**:23625-23628; 1998.
74. Maritim, A.; Dene, A.; Sanders, A.; Watkins III, J. B. Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**:193-199; 2003.
75. Cavarape, A.; Feletto, F.; Mercuri, F.; Quagliaro, L.; Daman, G.; Ceriello, A. High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *J. Endocrinol. Invest.* **24**:838-845; 2001.
76. Rhian, M.; Touyz, M. D. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Sci.* **2**:98-105; 2000.
77. De Craemer, D.; Lobe, E.; Pauwels, M.; Verbeelen, D.; Van den Branden, C. Angiotensin II administration causes enhanced expression of glomerulosclerosis-related markers and decreased renal antioxidant enzyme activities in rats. *Exp. Nephrol.* **9**:125-132; 2001.
78. Pogan, L.; Garneau, L.; Bissonnette, P.; Wu, L.; Sauve, R. Abnormal Ca<sup>2+</sup> signaling in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats: role of free radicals. *J. Hypertens.* **19**:721-730; 2001.
79. Blinda, D.; Nicod, L.; Viollon-Abadie, C. Strain difference (WKY, SPRD) in the hepatic antioxidant status in rat and effect of hypertension (SHR, DOCA). Ex vivo and in vitro data. *Mol. Cell Biochem.* **218**:139-146; 2001.
80. Dieterich, S.; Bielick, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart-increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* **101**:33-39; 2000.

81. Guo, Z. M.; Van Remmen, H.; Yang, H.; Chen, X.; Mele, J.; Vijg, J.; Epstein, C. J.; Ho, Y. S.; Richardson, A. Changes in Expression of Antioxidant Enzymes Affect Cell-Mediated LDL Oxidation and Oxidized LDL-Induced Apoptosis in Mouse Aortic Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21**:1131-1138; 2001.
82. Heinecke J.W.; Baker, L.; Rosen, H.; Chait, A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest.* **77**:757-761; 1986
83. Steinbrecher U.P.; Parthasarathy, A.; Leake, D.S.; Witztum, J.L.; Steinberg, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **81**:3883-3887; 1984.
84. Fang, X.; Weintraub, N.L.; Rios, C.D.; Chappell, D.A.; Zwacka, R.M.; Engelhardt, J.F.; Oberley, L.W.; Yan, T.; Heistad, D.D.; Spector, A.A. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res.* **82**:1289-1297; 1998.
85. Galle, J.; Schneider, R.; Heinloth, A.; Wanner, C.; Galle, P.R.; Conzelmann, E.; Dimmeler, S.; Heermeier, K. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int.* **55**:1450-1461; 1999.
86. Niwa, Y.; Ishimoto, T.; Kanoh, T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood* **76**:835-841; 1990.
87. Wang, P.; Chen, H.; Qin, H.; Sankarapandi, S.; Becher, M. W.; Wong, P. C.; Zweier, J. L. Overexpression of human copper,zinc-superoxide dismutase (SOD-1) prevents postischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:4556-4560; 1998.
88. Vogt, M.; Bauer, K.; Ferrari, D.; Schulze-Osthoff, K. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett.* **429**:67-72; 1998.
89. Ames, B. N. *Science* **221**:1256-1264; 1983. Inal, M. E.; Kanbak, G.; Sunal, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin. Chim. Acta* **305**:75-80; 2001.

90. Church, D. F.; Pryor, W. A. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health. Perspect.* **64**:111-126; 1985.
91. Osada, H.; Takahashi, T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* **21**:7421-7434; 2002
92. Kinnula, V. L.; Pääkkö, P.; Soini, Y. Antioxidant enzymes and redox thiol proteins in malignances of human lung. *FEBS Lett.* **569**:1-6; 2004.
93. Coursin, D. B.; Chila, H. P.; Sempf, J.; Oberley, T. D.; Oberley, L. W. An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histol. Histopath.* **11**:851-860; 1996.
94. Chung-man, H. J.; Zheng, S.; Comhair, S. A.; Farver, C.; Erzurum, S. C. Differential Expression of Manganese Superoxide Dismutase and Catalase in Lung Cancer *Cancer. Res.* **61**:8578-8585; 2001.
95. Hochscheid, R.; Heinrichs, S.; Kranz, S.; Garn, H.; Müller, B. Differences in mRNA expression, protein content and enzyme activity of superoxide dismutase in type II pneumocytes of acute and chronic lung injury. *Free Rad. Res.* **36**:759-767; 2002.
96. Seo, S. J.; Kang, S. S.; Cho, G.; Rho, H. M.; Jung, G. C/EBP alpha and C/EBP beta play similar rolen in the transcription of the human Cu/Zn-SOD gene. *Gene* **203**:11-15; 1997.
97. Inal, M. E.; Kanbak, G.; Sunal, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to ageing. *Clin. Chim. Acta* **305**:75-80; 2001.
98. Melov, S.; Ravenscroft, J.; Malik, S. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289**:1567-1569; 2000.
99. Viña, J.; Gimeno, A.; Sastre, J. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; Role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *Mol. Biol. Int.* **49**:539-544; 2000.

100. Laaksonen, D. E.; Atalay, M.; Niskanen, L.; Uusitupa, M.; Hanninen, O.; Sen, C. K. Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. *Redox. Rep.* **4**:53-59; 1999.
101. Selamoglu, S.; Turgay, F.; Kayatekin, B. M.; Gonenc, S.; Yslegen, C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiol. Hung.* **87**:267-273; 2000.
102. Miyazaki, H.; Oh-ishi, S.; Ookawara, T. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **84**:1-6; 2001.
103. Rush, J. W.; Laughlin, M. H.; Woodman, C. R.; Price, E. M. SOD-1 expression in pig coronary arterioles is increased by exercise training. *Am. J. Physiol.* **279**:2068-2076; 2000.
104. Quig, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Alter. Med. Rev.* **3**:262-270; 1998.
105. Donaldson, W. E. Interactions of dietary lead with fish oil and antioxidant in chicks. *Biol. Trace Elem. Res.* **31**:215-222; 1991.
106. Howard, J. K. Humans erythrocyte glutathione reductase and glucose 6-phosphate dehydrogenase activities in normal subjects and in persons exposed to lead. *Clin. Sci. Molec. Med.* **47**:515-520; 1974.
107. Whanger, P. D. Slenium in the treatment of heavy metals poisoning and chemical carcinogenesis. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **6**:209-221; 1992.
108. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. eds. Free Radical in Biology and Medicine. 2nd edition. Oxford: Clarendon Press; 1989.
109. Ercal, N.; Gurer-Orhan, H.; Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. In Med. Chem.* **1**:529-539; 2001.
110. Iannello, R. C.; Crack, P. J.; De Haan, J. B.; Kola, I. Oxidative stress and neuronal dysfunction in Down Syndrome. *J. Neural Transm.* **57**:257-267; 1999.
111. Takabayashi, F.; Tahara, S.; Kaneko, T.; Miyoshi, Y.; Harada, N. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine (as a biomarker of oxidative DNA damage) in the tissues of aged hamsters and change in antioxidant enzyme activities after



- single administration of N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine. *Gerontology* **50**:57-63; 2004.
- 112.** Carmody, R.J.; Cotter, T.G. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Report*. **6**: 77-90; 2001.
- 113.** Schaeffer, H. J.; Weber, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2435-2444; 1999.
- 114.** Gibson, S.; Widmann, C.; Johnson, G. L. Differential involvement of MEK kinase 1 (MEKK1) in the induction of apoptosis in response to microtubule-targeted drugs versus DNA damaging agents. *J. Biol. Chem.* **274**:10916-10922; 1999.
- 115.** Leonidas, C.; Plataniias Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **101**:4667-4679; 2003.
- 116.** Kim, H. S.; Song, M. C.; Kwak, I. H.; Park, T. J.; Lim, I. K. Constitutive induction of p-ERK1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence. *J. Biol. Chem.* **278**:37497-37510; 2003.
- 117.** Rhee, S. G.; Bae, Y. S.; Lee, S. R.; Kwon, J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science's STKE [Electronic Resource]: Signal Transduction Knowledge Environ.* **2000**:PE1; 2000.
- 118.** Huang, R. P.; Wu, J. X.; Fan, Y.; Adamson, E. D. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J. Cell Biol.* **133**:211-220; 1996.
- 119.** Burdon, R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cells proliferation. *Free Rad. Biol. Med.* **18**:775-794; 1995.
- 120.** Zhang, J.; Johnston, G.; Stebler, B.; Keller, E. T. Hydrogen peroxide activates NFkappaB-inducing kinase. *Antioxid. Redox Signal* **3**:493-504; 2001.
- 121.** Lee, S. R.; Kwon, K. S.; Kim, S. R.; Rhee, S. G. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **273**:15366-15372; 1998.

122. Meves, A.; Stock, S. N.; Beyerle, A.; Pittelkow, M. R.; Peus, D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Toxicol. Lett.* **122**:205-214; 2001.
123. Petrache, I.; Choi, M. E.; Otterbein, L. E.; Chin, B. Y.; Mantell, L. L.; Horowitz, S.; Choi, A. M. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates hiperòxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells. *Am. J. Physiol* **277**:L589-L595; 1999.
124. Brand, A.; Gil, S.; Seger, R.; Yavin, E. Lipid constituents in oligodendroglial cells alter susceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptotic cell death via ERK activation. *J. Neurochem.* **76**:910-918; 2001.
125. Ikeyama, S.; Kokkonen, G.; Schack, S.; Wang, X.; Holbrook, N. J. Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *FASEB J.* **16**:114-116; 2001.
126. Wang, X.; Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**:39435-39443; 2000.
127. Chang, L.; Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40; 2001.
128. Kyriakis, J. M.; Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**:807-869; 2001.
129. Adler, V.; Yin, Z.; Fuchs, S. Y.; Tew, K. D.; Ronai, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signalling. *Oncogene* **18**:6104-6111; 1999.
130. Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Ichijo, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**:2596-2606; 1998.
131. Zou, X.; Tsutsui, T.; Ray, D.; Blamquist, J. F.; Ichijo, H.; Ucker, D. S.; Kiyokawa, H. The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **21**:4818-4828; 2001.

- 
132. Adler, V.; Yin, Z.; Fuchs, S. Y.; Benezra, M.; Rosario, L.; Tew, K. D.; Pincus, M. R.; Sardana, M.; Henderson, C. J.; Wolf, C. R.; Davis, R. J.; Ronai, Z. Regulation of JNK signalling by GSTp. *EMBO J.* **18**:1321-1334; 1999.
133. Chen, K.; Vita, J. A.; Berk, B. C.; Keaney, J. F. Jr.; c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J. Biol. Chem.* **276**:16045-16050; 2001.
134. Minamino, T.; Yujiri, T.; Papst, P. J.; Chan, E. D.; Jonson, G. L.; Terada, N. MEKK1 supresses oxidative stress-induced apoptosis of ambryonic system cell-derived cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:15127-15132; 1999.
135. Zhuang, S.; Demirs, J.T.; Kochevar, I. E. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **275**:25939-25948; 2000.
136. Kurata, S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **275**:23413-23416; 2000.
137. Zhuang, S.; Kochevar, I. E. Singlet oxygen-induced activation of PI3K/protein kinase B is independent of growth factors receptors. *Photochem. Photobiol.* **78**:361-371; 2003.
138. Huang, C.; Li, J.; Ding, M.; Leonard, S. S.; Wang, L.; Castranova, V.; Vallyathan, V.; Shi, X. UV induces phosphorylation of protein kinase B (Akt) at Ser473 and Thr308 in mouse epidermal Cl 41 cells through hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **276**:40234-40240; 2001.
139. Chen, E. Y.; Mazure, N. M.; Cooper, J. A.; Giaccia, A. J. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.* **61**:2429-2433; 2001.
140. Jin, K. L.; Mao, X. O.; Nagayama, T.; Goldsmith, P. C.; Greenberg, D. A. Induction of vascular endothelial growth factor receptors and

- phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signalling by global cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* **100**:713-717; 2000.
- 141.** Wang, H. Q.; Quan, T.; He, T.; Franke, T. F.; Voorhees, J. J.; Fisher, G. J. Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases 3-, -8, and -9 in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **278**:45737-45745; 2003.
- 142.** Kim, A. H.; Khursigara, G.; Sun, X.; Franke, T. F.; Chao, M. V. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **21**:893-901; 2001.
- 143.** Franke, T. F.; Hornik, C. P.; Segev, L.; Shostak, G. A.; Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**:8983-8998; 2002.
- 144.** Sabbatini, P.; McCormick, F. Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**:24263-24269; 1999.
- 145.** Rhee, S. G.; Bae, Y. S. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**:15045-15048; 1997.
- 146.** Carpenter, G.; Ji, Q. Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp. Cell. Res.* **253**:15-24; 1999.
- 147.** Blake, R. A.; Walker, T. R.; Watson, S. P. Activation of human platelets by peroxovanadate is associated with tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma and formation of inositol phosphates. *Biochem. J.* **290(Pt2)**:471-475; 1993.
- 148.** Qin, S.; Inazu, T.; Yamamura, H. Activation and tyrosine phosphorylation of p72syk as well as calcium mobilization after hydrogen peroxide stimulation in peripheral blood lymphocytes. *Biochem. J.* **308(Pt1)**:347-352; 1995.
- 149.** Lee Y. H.; Kim, S.; Kim, J.; Young, K. K.; Kim, M. J.; Ryu, S. H.; Suh, P. Overexpression of phospholipase C-gamma1 suppresses UVC-induced apoptosis through inhibition of c-fos accumulation and c-Jun- N-terminal kinase activation in PC12 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1440**:235-243; 1999.

- 
150. Lee, Y. H.; Kim, S. Y.; Kim, J. R.; Yoh, K. T.; Baek, S. H.; Kim, M. J.; Ryu, S. H.; Suh, P. G.; Kim, J. H. Overexpression of phospholipase C $\beta$ -1 protects NIH3T3 cells from oxidative stress-induced cell death. *Life Sci.* **67**:827-837; 2000.
151. Chen, F.; Demers, L. M.; Shi, X. Upstream signal transduction of NF- $\kappa$ B activation. *Curr. Drug Targets-Inflamm. All.* **1**:137-149; 2002.
152. Schoonbroodt, S.; Piette, J. Oxidative stress interference with the nuclear factor- $\kappa$ B activation pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**:1075-1083; 2000.
153. Janssen-Heininger, Y. M.; Poynter, M. E.; Baeuerle, P. A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Free Rad. Biol. Med.* **28**:1317-1327; 2000.
154. Tsukamoto, H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid. Redox. Signal.* **4**:405-414; 2002.
155. Toledano, M. B.; Leonard, W. J. Modulation of transcription factor NF- $\kappa$ B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4328-4332; 1991.
156. Jin, R.; De Smaele, E.; Zazzeroni, F.; Nguyen, D. U.; Papa, S.; Jones, J.; Cox, C.; Gelinas, C.; Franzoso, G. Regulation of the gadd45 $\beta$  promoter by NF- $\kappa$ B. *DNA Cell Biol.* **21**:491-503; 2002.
157. Heckman, C. A.; Mehew, J. W.; Boxer, L. M. NF- $\kappa$ B activates Bcl-2 expression in (14;18)lymphoma cells. *Oncogene* **21**:3898-3908; 2002.
158. Yamamoto, K.; Arakawa, T.; Ueda, N.; Yamamoto, S. Transcriptional roles of nuclear factor  $\kappa$ B and nuclear factor interleukin-6 in the tumor necrosis factor  $\alpha$ -dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* **270**:3135-31320; 1995.
159. La Rosa, F. A.; Pierce, J. W.; Sonenshein, G. E. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF- $\kappa$ B rel family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **14**:1039-1044; 1994.
160. Mayo, M. W.; Norris, J. L.; Baldwin, A. S. Ras regulation of NF- $\kappa$ B and apoptosis. *Methods Enzymol.* **333**:73-87; 2001.

161. Matsui, K.; Fine, A.; Zhu, B.; Marshak-Rothstein, A.; Ju, S. T. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J. Immunol.* **61**:3469-3473; 1998.
162. Wu, H.; Lozano, G. NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J. Biol. Chem.* **269**:20067-20074; 1994.
163. Meplan, C.; Richard, M. J.; Hainaut, P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem. Pharmacol.* **59**:25-33; 2000.
164. Burns, T. F.; El Deiry, W. S. The p53 pathway and apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **181**:231-239; 1999.
165. Sionov, R. V.; Haupt, Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**:6145-6157; 1999.
166. Miyashita, T.; Krajewski, S.; Krajewska, M.; Wang, H. G.; Lin, H. K.; Liebermann, D. A.; Hoffmann, B.; Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**:1799-1805; 1994.
167. Fresno Vara, J. A.; Casado, E.; de Castro, J.; Cejas, P.; Belda-Iniesta, C.; González-Baron, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **30**:193-204; 2004.
168. Lin, Y.; Ma, W.; Benchimol, S. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat. Genet.* **26**:122-127; 2000.
169. Wu, G. S.; Kim, K.; El Deiry, W. S. KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor supresor to caspase activation and apoptotic death. *Adv. Exp. Med. Biol.* **465**:143-151; 2000.
170. Buschmann, T.; Potapova, O.; Bar-Shira, A.; Ivanov, V. N.; Fuchs, S. Y.; Henderson, S.; Fried, V. A.; Minamoto, T.; Alarcon-Vargas, D.; Pincus, M. R.; Gaarde, W. A.; Holbrook, N. J.; Shiloh, Y.; Ronai, Z. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol. Cell Biol.* **21**:2743-2754; 2001.
171. Dumont, A.; Hehner, S. P.; Hofmann, T. G.; Ueffing, M.; Droge, W.; Schmitz, M.L. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CDC95-independent, requires

- the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* **18**:747-757; 1999.
- 172.** Johnson, T. M.; Yu, Z. X.; Ferrans, V. J.; Lowenstein, R. A.; Finkel, T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:1184-11852; 1996.
- 173.** Polyak, K.; Xia, Y.; Zweier, J. L.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**:300-305; 1997.
- 174.** Drane, P.; Bravard, A.; Bouvard, V.; May, E. Reciprocal downregulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* **20**:430-439; 2001.
- 175.** Pani, G.; Bodogni, B.; Anzevino, R.; Colavitti, R.; Palazzotti, B.; Borrello, S.; Galeotti, T. Deregulated manganese superoxid dismutase expresión and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res.* **60**:4654-4660; 2000.
- 176.** Tan, M.; Li, S.; Swaroop, M.; Guan, K.; Oberley, L. W.; Sun, Y. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J. Biol. Chem.* **274**:12061-12066; 1999.
- 177.** Flatt, P. M.; Polyak, K.; Tang, L. J.; Scatena, C. D.; Westfall, M. D.; Rubinstein, L. A.; Yu, J.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Hill, D. E.; Pietenpol, J. A. p53-dependent expression of PIG3 during proliferation, genotoxic stress, and reversible growth arrest. *Cancer Lett.* **156**:63-72; 2000.
- 178.** Lavrovsky, Y.; Batterjee, B.; Clark, R. A.; Ray, A. K. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp. Gerontol.* **35**:521-532; 2000.
- 179.** Ding, M.; Li, J. J.; Leonard, S. S.; Ye, J. P.; Shi, X.; Colburn, N. H.; Castranova, V.; Vallyathan, V. Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis* **20**:663-668; 1999.
- 180.** Schreck, R.; Rieber, P.; Beauerle, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**:2247-2258; 1991.

181. Strasser, A.; O'Connor, L.; Dixit, V. M. Apoptosis signalling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:217-245; 2000.
182. Ulbright, T. L. V.; Southgate, D. A. T. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* **338**:985-992; 1991.
183. Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**:454-457; 1993.
184. Maxwell, S.; Cruickshank, A.; Thorpe, G. Red wine antioxidant activity in serum. *Lancet* **344**:454-457; 1993.
185. Aviram, M.; Fuhrman, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci* **957**:146-161; 2002.
186. Dell'Agli, M.; Busicalà, A.; Bosisio, E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research* **63**:593-602; 2004.
187. Renaud, S.; De Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**:1523-1526; 1992.
188. Belleville, J. The French Paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition* **18**:173-177; 2002.
189. Sun, A. Y.; Simonyi, G. Y. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effect of polyphenols (1,2) *Free Rad. Biol. Med.* **15**:314-318; 2002.
190. Lopez, F. A.; Casado, S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension* **38**:1400-1405; 2001.
191. Lairon, D.; Amiot, M.J. Flavonoids in food and natural antioxidants in wine, *Current Opinion in Lipidology* **10**: 23-28; 1999.
192. Francis, F. J. Food colorants: anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **28**:273-314; 1989.
193. Bombardelli, E.; Morazzoni, P. *Vitis Vinifera L. Fitoterapia.* **66**:291-317; 1995.
194. Mattivi, F.; Zulian, C.; Nicolini, G.; Valenti, N. Wine, biodiversity, technology and antioxidants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **957**:37-56; 2002.
195. Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence-nature, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **80**:1094-1117; 2000.



- 
196. Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**:317-333; 1998.
197. Demrow, H. S.; Slane, P. R.; Folts, J. D. Coronary artery disease/platelets: administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* **91**:1182-1188; 1995.
198. Tedesco II.; Russo, M.; Russo, P. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J. Nutr. Biochem.* **11**:114-119; 2000.
199. Bloor, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods in Enzymology.* **335**:3-14; 2001.
200. Seigler, D. S. Flavonoids. In *Plant secondary metabolism*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publisher; 1995.
201. Wilska-Jeszka, J. Proanthocyanidins: Content in fruits and influence on health. *Food Chemistry* **57**:57-59; 1996.
202. Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Teissedre, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **43**:890-894; 1995.
203. Peterson J.; Dwyer, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* **18**:1995-2018; 1998.
204. Duthie, G.G.; Pedersen, M. W.; Gardner, P. T.; Morrice, P. C.; Jenkinson, A. M.; McPhail, D. B.; Steele, G. M. The effect of whiskey and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52**:733-736; 1998.
205. Serafini, M.; Maiani, G.; Ferro-Luzzi, A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* **128**:1003-1007; 1998.
206. Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**:549-554; 1995.
207. Fuhr, U.; Kumert, A. L. The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin. Pharmacol. Ther.* **58**:365-373; 1995.

208. Azziz, A. A.; Edwards, C. A.; Lean, M. E. J.; Croizier, A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O- $\beta$ -glucoside and isorhamnetin-4'-O- $\beta$ -glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Rad. Res.* **29**:257-269; 1998.
209. Hollman, P. C. H.; van der Gaag, M.; Mengelers, M. J. B.; van Trijp, J. M. P.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic. Biol. Med.* **21**:703-707; 1996.
210. Hollman, P. C. H.; van Trijp, J. M. P.; Buysman, M. N. C. P.; van der Gaag, M. S.; Mengelers, M. J. B.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* **418**:152-156; 1997.
211. Dangles, O.; Dufour, C.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C. Binding of flavonoids to plasma proteins. In: *Bioflavonoids and Polyphenols*. Orlando: Packer, L. Eds. Academic Press Orlando, FL; 2000.
212. Nesbitt, P. D.; Lam, Y.; Thompson, L. U. Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**:549-555; 1999.
213. Harborne, J. B. *The flavonoids: Advances in Research since 1986*. Londres: Harborne J. B. Ed. Chapman & Hall London, U. K., 1994.
214. Matsumo, H.; Inaba, H.; Kishi, M.; Tominaga, S.; Hyrayama, M.; Takanori, Y. Orally administered delphinidin 3-rutoid and cyanidin 3-rutoid are directly absorbed in rats and humans appear in the blood as the intact forms. *J. Agric. Food Chem.* **49**:1546-1551; 2001.
215. Gee, J.M.; Dupont, M. S.; Rhodes, M. J. C.; Johnson, I. T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:19-25; 1998.
216. Walle, T.; Otake, Y.; Walle, K.; Wilson, F. A. Quercetin glucosides are completely hydrolysed in ileostomy patients before absorption. *J. Nutr.* **130**:2658-2661; 2000.

217. Donovan, J. L.; Manach, C.; Rios, L.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract of the procyanidin dimer B3. *J. Nutr.* **87**:299-306; 2002.
218. Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Muto, Y.; Takizawa, T.; Terao, J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B<sub>2</sub> [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:142-148; 2002.
219. Gonthier, M. P.; Donovan, J. L.; Texier, O.; Felgines, C.; Remezy, C.; Scalbert, A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **35**:837-844; 2003.
220. Mojarrabi, B.; Mackenzie, P. I. Characterization of two UDP glucuronyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:704-709; 1998.
221. Bell, J. R.; Donovan, J. L.; Wong, R.; Warehouse, A. L.; German, J. B.; Walzem, R. L.; Kasim-Karakas, S. E. (+)- Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**:103-108; 2000.
222. Brunet, M. J.; Bladé, C.; Salvadó, M. J.; Arola, L. Human Apo A-I and rat transferrin are the principal plasma proteins that bind wine catechins. *J. Agric. Food Chem.* **50**:2708-2712; 2002
223. Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Dietary flavonoids, intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* **37**:937-942; 1999.
224. Robak, J.; Gryglewski, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology* **37**:837-841; 1988.
225. Blouhamidi, R.; Prevost, V.; Nouvelot, A. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *Life Sciences* **321**:31-38; 1998.
226. Ricardo da Silva, J. M.; Darmon, N.; Fernandez, Y.; Mitjavilla, S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agric. Food Chem.* **39**:1549-1552; 1991.
227. Liu, Z. Q.; Ma, L. P.; Zhou, B.; Yang, L.; Liu, Z. L. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of

- human low density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids* **106**:53-63; 2000.
- 228.** Lotito, S. B.; Fraga, C. G. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Rad. Biol. Med.* **24**:435-441; 1997.
- 229.** Grinberg, L. N.; Newmark, H.; Kitrosski, N.; Rahamin, E.; Chevion, M.; Rachmilewitz, E. A. Protective effect of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochemical Pharmacology* **54**:973-978; 1997.
- 230.** Hider, R. C.; Liu, Z. D.; Khodr, H. H. Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology* **335**:190-203; 2001.
- 231.** Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P.; Cillard, J. Antioxidant and iron chelating activities of flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes culture. *Biochemical Pharmacology* **45**:13-19; 1993.
- 232.** Ohshima, H.; Yoshie, Y.; Auriol, S.; Gilbert, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Rad. Biol. Med.* **25**:1057-1065; 1998.
- 233.** Dhawan, A.; Anderson, D.; Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Clifford, M. N.; Ioannides, C. Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay. *Mut. Res.* **515**:39-56; 2002.
- 234.** Fremont, L.; Belguendouz, L.; Delpal, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* **64**:2511-21; 1999.
- 235.** O'Byrne, D. J.; Devaraj, S.; Grundy, S. M.; Jialal, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**:1367-1374; 2002.
- 236.** Palomino, O.; Gomez-Serranillos, M. P.; Slowing, E.; Carretero, E.; Villar, A. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase-high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **870**:449-451; 2000.

- 
237. Folts, J. D. Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Advances in Experimental Medicine in Biology* **505**:95-111; 2002.
238. Sato, M.; Bagchi, D.; Tosaki, A.; Das, D. K. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Rad. Biol. Med.* **31**:729-737; 2001.
239. Bagchi, D.; Garg, A.; Krohn, R. L.; Bachi, M.; Bagchi, D. J.; Balmoori, J.; Stohs, S. J. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology* **30**:771-776; 1998.
240. Tebib, K.; Rouanet, J. M.; Besancon, P. Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamina E-deficient diet. *Food Chemistry* **59**:135-141; 1997.
241. Roig, R.; Cascón, E.; Arola, L.; Bladé, C.; Salvadó, M. J. . Moderat red wine consumption protects the rat aginast oxidation in vivo. *Life Sci.* **64**:1517-1524; 1999.
242. Roig, R.; Cascón, E.; Arola, L.; Bladé, C.; Salvadó, M. J. Procyanidins protect Fao cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Bioch. Bioph. Acta.* **1572**:25-30; 2002
243. Williams, R. J.; Spencer, J. P.E.; Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radic. Biol. Med.* **36**:838-849; 2004.
244. Spencer, J. P.E.; Rice-Evans, C.; Williams, R. J. Modulation of pro-survival Akt/PKB and ERK1/2 signalling cascades by quecetin and its in vivo metabolites under their action on neuronal viability. *J. Biol. Med.* ; 2003.
245. Spencer, J. P.E.; Kuhule, G. G.; Williams, R. J.; Rice-Evans, C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.* **372**:173-181; 2003.
246. Fischer, P. M.; Lane, D.P. Inhibition of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **7**:1213-1245; 1999.

247. Huang, Y. T.; Hwang, J.J.; Lee, P. P.; Ke, F. C.; Huang, J. H.; Huang, C. J.; Kandaswami, C.; Middleton, E. Jr.; Lee, M. T. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br. J. Pharmacol.* **128**:999-1010; 1999.
248. So, F.; Guthrie, N.; Chambers, A. F.; Moussa, M.; Carroll, K. K. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. Cancer.* **26**:167-181; 1996.
249. Panes, J.; Gerritsen, M. E.; Anderson, D. C.; Miyasaka, M.; Granger, D. N. Apigenin inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation in vivo. *Microcirculation* **3**:279-286; 1996.
250. Gerritsen, M. E.; Carley, W. W.; Rangers, G. E.; Shen, C. P.; Phan, S. A.; Ligon, G. F.; Perry, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cells adhesion protein gene expression. *Am. J. Pathol.* **147**:278-292; 1995.
251. Soriani, M.; Rice-Evams, C.; Tyrell, R. M. Modulation of the UVA activation of haem oxygenase, collagenase and cytoooxygenasem gene expression by epigallocatechin in human skin cells. *FEBS Lett.* **49**:253-257; 1998.
252. Zippel, R.; Balestrini, M.; Lomazzi, M. M.; Sturani, E. Calcium and calmodulin are essential for Ras pathway by lysophosphatidic acid. *Exp. Cell. Res.* **258**:403-408; 2000.
253. Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**:1309-1312; 1998.
254. Tatton, W. G.; Olanow, C. W. Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**:195-213; 1999.

