UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos do polifenol resveratrol na síntese de fatores
vasoativos do endotélio em células endoteliais
humanas da linhagem ECV304**

Mirian Mendonça Salvador

RIBEIRÃO PRETO

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Mirian Mendonça Salvador

Orientadora: Maria Regina Torqueti

RIBEIRÃO PRETO

2009

<p>SALVADOR, M. M.</p>	<p>Efeitos do polifenol resveratrol na síntese de fatores vasoativos do endotélio em células endoteliais humanas da linhagem ECV304</p>		<p>MESTRADO FCFRP-USP 2009</p>
----------------------------	--	--	--

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Salvador, Mirian Mendonça

Efeitos do polifenol resveratrol na síntese de fatores vasoativos do endotélio em células endoteliais humanas da linhagem ECV304. Ribeirão Preto, 2009.
95 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: Torqueti, Maria Regina

1. Resveratrol. 2. Células endoteliais. 3. Óxido nítrico. 4. Prostaglandina. 5. Antioxidante

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Mirian Mendonça Salvador

Título do trabalho: Efeitos do polifenol resveratrol na síntese de fatores vasoativos do endotélio em células endoteliais humanas da linhagem ECV304

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Maria Regina Torqueti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida:

Deus - Por sempre me iluminar e me manter forte para conseguir contornar as pedras do caminho.

Minha família - Meus pais, extraordinários exemplos para minha jornada, me proporcionam o maior amor do mundo e me dão apoio incondicional, sempre. Meu irmão, ser humano ímpar, alegre, engraçado, carinhoso. Você é a alegria da nossa família. Amo todos vocês sem mensuração.

Meu amor - É difícil expressar o que temos juntos. Você é o Sol da minha vida! Obrigada por me fazer tão feliz.

Agradecimientos

À orientadora Professora Doutora Maria Regina Torqueti

Obrigada pela disponibilidade com que me recebeu em seu laboratório, pela orientação, pela atenção e pelo carinho. Muito obrigada pela oportunidade de aprender, de crescer e de me tornar alguém melhor!

À especialista de laboratório Marlise Bonetti Agostinho Montes

Sou eternamente grata por todo o tempo dedicado a mim e aos meus experimentos. Seu apoio foi fundamental para a conclusão deste trabalho, nos aspectos profissionais e pessoais.

À colega de pós-graduação Michele Paulo

Sua ajuda foi essencial para o desenvolvimento do meu mestrado. Você me mostrou os caminhos a seguir, as questões a serem respondidas e como enfrentar certos desafios. Seu carinho e sua dedicação comigo não tem medida e não tem preço. Sou eternamente grata pela sua atenção.

Aos técnicos de laboratório Marcella Daruge Grando e Rubens Eduardo da Silva

Muitas vezes não percebemos a importância que certos profissionais têm em nosso ambiente de trabalho, mas a ajuda de vocês foi fundamental para que eu pudesse finalizar meu projeto. Obrigada pela amizade e pela ajuda diária na manutenção do laboratório.

Aos colegas do laboratório de Citologia Clínica e Glicoimunobiologia da FCFRP/USP

Thalita B. Riul, Camillo Del Cistia, Willian A. da Silveira, Camila M. Andrade, Helen F. Fumagalli, Bianca Stocco, pelo constante companheirismo, pela palavra amiga, pela ajuda diária. É muito bom conviver com pessoas adoráveis como vocês!

Aos pós-graduandos Daniel R. Callejon, Karina, Lilian C. Rodrigues, Mayra Beraldo Andozia e Natália S. Koyama

Sempre dispostos a me ajudar, a contribuição de vocês foi ativa na minha dissertação. Obrigada pela disposição em me ajudar quando vocês não tinham obrigação de fazê-lo. O desprendimento de vocês sempre me surpreendeu e sou muito grata a vocês por isso.

Às amigas Raquel Tognon, Tathiane M. Malta, Marcella D. Grando e Roberta M. Mile

Amigas queridas que vou levar no coração por toda a minha vida. Obrigada pelo carinho, pela palavra de apoio em momentos em que eu precisei, pelas muitas risadas que demos juntas. Pessoas especiais como vocês fazem a vida muito melhor!

*“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco,
que em conformidade viver.”*

Martin Luther King

RESUMO

MIRIAN, M.S. **Efeitos do polifenol resveratrol na síntese de fatores vasoativos do endotélio em células endoteliais humanas da linhagem ECV304**. 2009. 95f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A grande procura da humanidade por meios que favoreçam uma vida saudável tem impulsionado as pesquisas por novas substâncias capazes de satisfazer tais necessidades, e entre estas substâncias encontram-se os fitoestrógenos. Processos biológicos relacionados a Doenças Cardiovasculares (DCV) e outras doenças podem ser afetados por essas substâncias presentes em plantas. O fitoestrógeno resveratrol é um polifenol especialmente encontrado na uva e seus derivados, e sua ingestão tem sido associada à baixa taxa de mortalidade por câncer e DCV. Os fitoestrógenos das plantas possuem semelhança estrutural e funcional com o estrógeno, com propriedades que beneficiam o metabolismo celular através de ação antioxidante e antiagregante plaquetária. O endotélio é o principal alvo da ação dos estrógenos. Eles promovem a redução do engrossamento da parede vascular, aceleram o processo de reconstrução do endotélio após injúria vascular e favorecem a angiogênese. Os estrógenos diminuem a expressão de moléculas de adesão em resposta à citocinas e possuem efeito anti-apoptótico nas células endoteliais. Polifenóis são fitoestrógenos com alto potencial antioxidante presentes em frutas, grãos, vegetais, nozes e raízes. Estes compostos vêm sendo amplamente estudados por seus efeitos na supressão de tumores e na prevenção de DCV em modelos animais.

Neste estudo, temos como objetivo geral avaliar a ação do resveratrol na produção de óxido nítrico e prostaglandina E₂ em modelo “*in vitro*” de células endoteliais da linhagem ECV 304, bem como atividade antioxidante. O objetivo específico é determinar a melhor concentração do resveratrol em que se observa uma potente liberação de substâncias vasoativas e maior proteção contra radicais livres, conferindo proteção e prevenção de DCV.

Palavras Chave: Resveratrol, Células Endoteliais, Óxido Nítrico, Prostaglandina e Antioxidante.

ABSTRACT

MIRIAN, M.S. **Polyphenol resveratrol effects on endothelium vasoactive factor synthesis in human endothelial cells of ECV304 line.** 2009. 95f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The vast search of humanity for ways that favors a healthy life has driven the researches for substances capable of meeting such needs, and among these substances there are the phytoestrogens. Biological processes related to Cardiovascular Disease (CVD) and other illness can be affected by these substances present in plants. The phytoestrogen resveratrol is a polyphenol specially found in grapes and derivatives, and its ingestion has been associated to low mortality rates by cancer and CVD. The plants phytoestrogens are similar structurally and functionally with estrogens, with properties that benefit cellular metabolism through their antioxidant and antiplatelet action. The endothelium is estrogen's major target. They reduce thickening of the vascular wall, accelerate the reconstruction process of vascular endothelial after injury and promote angiogenesis. The estrogens decrease the expression of adhesion molecules in response to cytokines and have anti-apoptotic effect on endothelial cells, and promotes raising in nitric oxide (NO) production. Polyphenols are phytoestrogens with high antioxidant effect present in fruits, grains, vegetables, nuts and roots. These compounds have been extensively studied due to their effect on tumors suppression and CVD prevention in animal models.

In this study, we evaluated resveratrol's action in nitric oxide production and prostaglandin E2 in *in vitro* model of endothelial cells ECV304, as well as its antioxidant activity. The specific objective is to determine the best concentration of resveratrol in which observes a potent liberation of vasoactive factors and the best anti free radical activity, leading to protection and prevention of CVD.

Key-words: Resveratrol, Endothelial Cells, Nitric oxide, Prostaglandin and Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Síntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico.....	07
Figura 2.	Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol.....	17
Figura 3.	Adesão de neutrófilos sobre células ECV304 tratadas ou não com diversas concentrações de resveratrol por 24 horas.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Viabilidade das culturas de ECV304 após 24 horas de incubação com DMSO.....	34
Gráfico 2 -	Viabilidade das culturas de ECV304 após 24 horas de tratamento com as diversas concentrações de resveratrol.....	36
Gráfico 3 -	Efeito protetor do resveratrol contra o dano celular induzido por H ₂ O ₂	37
Gráfico 4 -	Ação do polifenol resveratrol no aumento de NO em células ECV304.....	39
Gráfico 5 -	Dosagem de prostaglandina E ₂ pelo método ELISA após 24 horas de tratamento com as diversas concentrações de resveratrol.....	40
Gráfico 6 -	Porcentagem de DNA íntegro de ECV304 por citometria de fluxo com iodeto de propídio.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito do resveratrol no dano celular provocado pelo H_2O_2	37
Tabela 2 -	Efeito do resveratrol na produção intracelular de NO pelas ECV304.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	=Análise de variância entre grupos
ATP	=Adenosina trifosfato
Ca ⁺⁺	=Cálcio 2+
CE	=Célula endotelial
CHD	=Doença arterial coronariana
CO ₂	=Dióxido de carbono
COX	=Cicloxigenase
COX1	=Cicloxigenase-1
COX2	=Cicloxigenase-2
Cu-SOD	=Cobre superóxido dismutase
DAF-2	=4,5 diaminofluoresceína
DAF-2DA	=4,5 diaminofluoresceína diacetato
DAF-2T	=4,5 diaminofluoresceína triazol
DMSO	=Dimetilsulfóxido
DCV	=Doença cardiovascular
ECV304	=Células endoteliais de linhagem 304
EDHF	=Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (endothelium-derived hyperpolarizing factor)
eNOs	=Óxido nítrico sintase endotelial (endothelial nitric oxide synthase)
ET-1	=Endotelina-1
ET-2	=Endotelina-2
ET-3	=Endotelina-3

ETA	=Receptores de endotelina
FADH ₂	=Flavina adenina dinucleotídeo
FBS	=Soro bovino fetal (fetal bovine serum)
GC	=Guanilato ciclase
GCa	=Guanilato ciclase ativada
GMP _c	=Guanina monofosfato cíclica
GTP	=Guanosina Trifosfato
H ₂ O	=Monóxido de di-hidrogênio – água
H ₂ O ₂	=Peróxido de hidrogênio
LDL	=Lipoproteína de baixa densidade (low density lipoprotein)
LPS	=Lipopolissacáride
MIF	=Mediana da intensidade de fluorescência
Mn-SOD	=Manganês superóxido dismutase
MTT	=3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide
NADH	=Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH oxidase	=Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P oxidase
NO	=Óxido Nítrico (nitric oxide)
•NO –	=Radical livre NO
OH –	=Radical hidroxila
•O ₂ –	=Superóxido
O ₂	=Molécula de oxigênio
ONOO –	=Peroxinitrito
PBS	=Solução tampão fosfato (phosphate buffer solution)
PGE ₂	=Prostaglandina E ₂
PGF ₂	=Prostaglandina F ₂

PGG ₂	=Prostaglandina G ₂
PGH ₂	=Prostaglandina H ₂
PGI ₂	=Prostaglandina I ₂
PGIS	=Prostaciclina sintase
PGs	=Prostaglandinas
PG sintetase	=Prostaglandina endoperóxido sintetase
RNS	=Espécies reativas do nitrogênio (reactive nitrogen species)
ROS	=Espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species)
RWPs	=Polifenóis do vinho tinto (red wine polyphenols)
SOD	=Superóxido dismutase
TXA ₂	=Tromboxano A ₂

1. Introdução

A grande procura da humanidade por meios que favoreçam uma vida saudável tem impulsionado as pesquisas por novas substâncias capazes de satisfazer tais necessidades (SAUTTER et al., 2005), e diversas substâncias presentes em plantas podem afetar processos biológicos relacionados às Doenças Cardiovasculares (DCV) e outras doenças humanas comuns. Entretanto, poucas dessas milhares de moléculas bioativas foram bem estudadas em células ou animais, e ainda menos em humanos (SACKS, 2005).

Os fitoestrógenos são compostos de plantas que possuem semelhança estrutural e funcional com os estrógenos (ANDERSON; GARNER, 1997).

Os estrógenos são essenciais na prevenção de DCV, uma vez que possuem uma ação direta na reatividade vascular, modificando o estado funcional do endotélio. O endotélio é o principal alvo da ação dos estrógenos, que promovem a redução do engrossamento da parede vascular, aceleram o processo de reconstrução do endotélio após injúria vascular e favorecem a angiogênese (LOSORDO; ISNER, 2001).

Durante a menopausa, com a falência ovariana, ocorre uma deficiência crônica de estrógeno fisiológica que está relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre outros fatores, pela perda do efeito protetor do estrógeno no endotélio vascular (SQUADRITO et al., 2003).

Polifenóis são fitoestrógenos com alto potencial antioxidante presentes em frutas, grãos, vegetais, nozes e raízes. Estes compostos vêm sendo amplamente estudados por seus efeitos na supressão de tumores e na prevenção de DCV em modelos animais (CAO et al., 2002). Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias e

melhoras na disfunção endotelial e no perfil lipídico têm sido reportadas em dietas polifenólicas (ZERN; FERNANDEZ, 2005).

O polifenol resveratrol é um fitoestrógeno estilbeno presente especialmente na uva e que promove benefícios à saúde através das atividades antiangiogênica, antiinflamatória e antiviral (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005). Polifenóis presentes no vinho tinto foram reportados como redutores da incidência de DCV através da proteção contra danos do estresse oxidativo e redução da expressão de fatores transcricionais responsáveis pela ativação, indução ou controle de genes envolvidos na vasoconstrição (NICHOLSON et al., 2008). Além do resveratrol, outros polifenóis como catequina e quercetina são amplamente estudados quanto ao seu potencial contra DCV (CURIN; ANDRIANTSITOHAINA, 2005).

O resveratrol relaxa o músculo liso vascular através da síntese e liberação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio e da inibição do influxo de cálcio e liberação do cálcio armazenado intracelularmente (LI et al., 2006) com efeitos similares aos do 17 β -estradiol (LI et al., 2002), podendo ser clinicamente útil como um substituto seguro para estrógenos femininos na prevenção de doenças cardiovasculares (LI et al., 2006).

Neste estudo, temos como objetivo geral avaliar a ação do resveratrol na produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em modelo “*in vitro*” de células endoteliais humanas da linhagem ECV 304, bem como a mobilização de cálcio intracelular. O objetivo específico é determinar a melhor concentração do resveratrol em que se observa uma potente liberação de substâncias vasoativas, conferindo proteção e prevenção a DCV.

2. Revisão da Literatura

2.1 ENDOTÉLIO VASCULAR

Células endoteliais (CE) vasculares são células achatadas e alongadas que contém um único núcleo, sendo o único tipo de células conhecidas que contém os corpos de Weibel Palade, sítio de armazenamento do fator de Von Willebrand envolvido na coagulação e de P-seletina. O endotélio é composto por uma única camada de CE justapostas por junções intercelulares diversas, determinadas pela distância entre as células adjacentes (NICHOLSON et al., 2008).

As funções do endotélio incluem agir como barreira semipermeável para troca de macromoléculas, fluidos e eletrólitos entre os espaços intra e extracelulares (KLABUNDE, 2005); local de síntese de substâncias vasoativas como NO, PGI₂ e ET-1, os dois primeiros levando ao relaxamento e o último à contração das células de músculo liso, acarretando na regulação da pressão sanguínea; manter coagulação sanguínea e resposta inflamatória através do transporte do fator de coagulação VII e secreção do Fator Hiperpolarizante Derivado de Endotélio (EDHF), em resposta a alterações na taxa de fluxo sanguíneo. É também o sítio de produção de moléculas de adesão para capturar e transportar leucócitos circulantes para tecidos afetados (NICHOLSON et al., 2008); local de formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), requeridos no crescimento normal do tecido e no reparo de feridas (KLABUNDE, 2005).

O tecido endotelial é capaz de inibir a proliferação do músculo liso vascular, prevenindo a migração das células da musculatura vascular lisa através de mecanismos diretos, como a síntese de óxido nítrico. Além disso, desempenha papel crucial na homeostasia vascular e na prevenção do início e progresso da

doença cardiovascular, atuando na modulação do tônus vascular através do balanço na liberação de substâncias vasoativas (MAHMOUDI et al., 2007).

O endotélio é um órgão metabólico dinâmico que atualmente é reconhecido não somente como barreira física entre o sangue e a parede vascular, mas também como órgão estrategicamente localizado com múltiplas funções, tornando-o um verdadeiro sensor para sinais químicos e hemodinâmicos. Estes sinais são traduzidos em mensagens através de mecanismos intracelulares de transcrição (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004; COIMBRA; LUZ, 2004).

As CE exercem múltiplas funções fisiológicas, mantendo a integridade da parede vascular e representando uma barreira através da qual ocorrem difusão e transporte ativo de diversas substâncias. Elas constituem uma superfície altamente trombo resistente ao sangue circulante e atuam no tônus vascular através da produção de fatores derivados do endotélio (COIMBRA; LUZ, 2004). Os fatores que promovem vasoconstrição são endotelina-1 (ET-1), prostaglandina H_2 (PGH_2) e tromboxano A_2 (TXA_2). Os fatores que promovem vasodilatação são a prostaglandina I_2 (PGI_2) e o NO, que é o principal mediador do tônus vascular, promovendo vasodilatação (STANKEVICIUS et al., 2003).

2.2 FATORES DERIVADOS DO ENDOTÉLIO

2.2.1. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A partir do estudo de Furchgott e Zawadzky em 1980, ficou estabelecida a importância do endotélio para o controle do tônus vascular. Neste estudo os

pesquisadores demonstraram que o efeito vasodilatador da acetilcolina dependia da liberação de um fator relaxante derivado do endotélio. Sete anos depois, Palmer e colaboradores demonstraram que culturas de células endoteliais da aorta liberavam NO em concentrações suficientes para promover vasodilatação, mostrando que o fator relaxante derivado do endotélio era o NO.

Normalmente, o NO na circulação sanguínea inibe a adesão e a ativação das plaquetas, assim como a adesão e a migração de monócitos e de neutrófilos para o espaço subendotelial (VOETSCH et al., 2004).

Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores de membrana das células endoteliais são ativados (por acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato e outras), estimulando a formação do complexo cálcio-calmodulina que leva à ativação da enzima óxido nítrico sintase (*eNOs*) presente nestas células e à produção de NO. A *eNOs* está ancorada à membrana da célula endotelial, o que favorece a liberação do NO próximo à camada muscular do vaso (BUSCONI; MICHAEL, 1994).

No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), resultando em uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento desta célula (ALDERTON et al., 2001).

O NO também é um potente inibidor da agregação plaquetária e, ao deixar a célula endotelial em direção à corrente sangüínea, pode penetrar nas plaquetas,

especialmente nas que se encontram justapostas à parede dos vasos. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o NO promove um aumento do GMPc e conseqüente diminuição do Ca^{2+} livre. Como o Ca^{2+} é essencial para o processo de agregação plaquetária, esse processo também será inibido (WOLIN, 1996).

2.2.2. PROSTAGLANDINA

As prostaglandinas (PGs) são ácidos graxos que apresentam na sua estrutura básica o ácido prostanóico (PARKINGTON et al., 2004).

As PGs são sintetizadas a partir de um precursor primário, o ácido araquidônico. Este ácido é liberado dos fosfolipídios das membranas celulares pela ação da fosfolipase A_2 , através de um processo controlado por hormônios e outros estímulos. As duas vias principais para síntese de PGs a partir do ácido araquidônico são a via da lipoxigenase e a via da cicloxigenase (CAMPBELL; FALCK, 2007) (figura 1).

Pela via da cicloxigenase, as prostaglandinas são obtidas através da ação catalítica das enzimas cicloxigenases (HARVEY; CHAMPE, 1998). Esta via do metabolismo do ácido araquidônico foi a primeira a ser descoberta, e tem envolvida a enzima denominada prostaglandina endoperóxido sintetase (PGsintetase) ou cicloxigenase (COX). Esta enzima catalisa a endoperoxidação do ácido araquidônico em intermediários muito instáveis, as prostaglandinas endoperóxidos como a prostaglandina G_2 (PGG_2) e a prostaglandina H_2 (PGH_2). Por isomerização são formadas algumas prostaglandinas como PGD_2 , PDE_2 , PGF_2 . As enzimas cicloxigenase e tromboxano sintase promovem a síntese de PGE_2 e tromboxano A_2 ,

respectivamente (REILLY; FITZGERALD, 1993). Trabalhos mostraram a existência de duas isoformas: uma constitutiva, a cicloxigenase-1(COX₁) e uma induzível, a cicloxigenase-2 (COX₂) (WU, 1995).

Figura 1 - Síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (Farmacologia Ilustrada 2a edição – HARVEY; CHAMPE, 1998)

A COX₁ está presente em tecidos como estômago intestino ou rins, locais onde catalisa a biossíntese de PGs citoprotetoras no endotélio vascular, mantendo a homeostase celular (HARA et al., 1995). É a única isoforma presente nas plaquetas, em que leva à formação de TXA₂. A COX₂ ocorre principalmente em processos inflamatórios, e nas células endoteliais converte o ácido araquidônico na prostaglandina PGH₂, que é convertida em PGI₂ através da prostaciclina sintase (PGIS) (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2005).

Desde sua descoberta em 1979 por Salvador Moncada e John Vane, a elucidação do papel das PGs na hemostasia e nas doenças cardiovasculares vem se tornando cada vez mais importante, especialmente o chamado balanço entre prostaciclina e tromboxano. Sob condições normais, quando estimulado pela COX₂

as células endoteliais formam PGE_2 e posteriormente PGI_2 , que é vasodilatadora e possui efeito antitrombogênico por inibir adesão e agregação plaquetária. Porém, em situação de disfunção endotelial, o estímulo da COX_2 resulta na formação de maior concentração de TXA_2 e menor concentração de PGI_2 . O TXA_2 tem se mostrado indutor da condição de disfunção endotelial (DAÍ; KLONER, 2004).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um estado em que o excesso de formação de moléculas altamente reativas como as espécies reativas do oxigênio (*ROS*) e as espécies reativas do nitrogênio (*RNS*) saturam os mecanismos naturais de defesa antioxidante (MARITIM et al., 2003), o que resulta em danos oxidativos. As espécies reativas são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado na sua órbita externa e caracterizam-se por ser altamente instáveis e por ter tempo de vida muito curto (HALLIWEL, 1992).

ROS incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é normalmente produzido pelas reações catalisadas pela superóxido dismutase (SOD) e por oxidases (ALMEIDA et al., 2008). Além disso, o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) estão entre as *ROS* mais estudadas (EVANS et al., 2002).

As *RNS* mais comuns incluem o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^-) (EVANS et al., 2002). O NO, principal vasodilatador endotélio-dependente, é normalmente produzido da L-arginina pela *eNOS* na parede do vaso. Porém, em condições patológicas, especialmente onde há excesso de $\cdot\text{O}_2^-$, o radical livre $\cdot\text{NO}$ rapidamente reage com o $\cdot\text{O}_2^-$, gerando uma molécula altamente reativa, o peróxido

de nitrito (ONOO^-), que ocasiona nitratação protéica e peroxidação lipídica, sendo ambos indicadores de disfunção vascular, assim como são pró-ateroscleróticos. $\cdot\text{O}_2^-$ é produzido pela redução de um elétron do oxigênio por diversas enzimas como NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclooxygenase e citocromo P450 (TURKO et al., 2001).

Uma importante fonte não enzimática de *ROS* é a mitocôndria. Conforme os elétrons são carregados por nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂) durante a fosforilação oxidativa, adenosina trifosfato (ATP) e $\cdot\text{O}_2^-$ são gerados. Sob condições normais, $\cdot\text{O}_2^-$ é rapidamente dismutado a H_2O_2 pela manganês superóxido dismutase (Mn-SOD) na mitocôndria e pelo cobre superóxido dismutase (Cu-SOD) no citosol (EVANS et al., 2002). H_2O_2 é então convertida a H_2O e O_2 pela glutathione peroxidase na mitocôndria ou pela catalase nos lisossomos. Em contraste, H_2O_2 pode também ser convertida ao radical altamente reativo $\cdot\text{OH}$ na presença de elementos como o ferro e o cobre. Esses radicais livres em concentrações fisiológicas são parte de vias de sinalização, mas quando produzidos em excesso se tornam patológicos (SACHIDANANDAM et al., 2005).

O excesso de geração de *ROS* pode estimular oxidação de LDL que faz parte da placa aterosclerótica (BOULLIER et al., 2001). Portanto, a ocorrência de um dano oxidativo depende do desequilíbrio entre a produção de *ROS* e a atividade das defesas antioxidantes (DAWSON; DAWSON, 1998). A disfunção endotelial induzida pelas *ROS* pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose e outras DCV (WANG et al., 2007).

2.4 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCV) referem-se a um grupo de doenças que afetam o coração e/ou os vasos sanguíneos. Essas doenças geralmente resultam de dano arterial, entretanto os sintomas e o tratamento dessas doenças dependem das artérias afetadas. Os três tipos de artérias predominantemente afetadas por DCV incluem artérias coronarianas, artérias cerebrais (derrame) e artérias periféricas (morte tecidual e gangrena). O início ocorre com uma inflamação nos vasos sanguíneos, que posteriormente afunilam-se, levando à angina. Nos estágios mais tardios dessa doença, coágulos sanguíneos obstruem artérias e a isquemia severa do miocárdio resulta em infarto do miocárdio (ataque cardíaco). Em casos extremos de CHD, falência cardíaca pode ocorrer como resultado da diminuição da força do músculo cardíaco em bombear o sangue através do corpo (NICHOLSON et al., 2008). Existem também outras patologias que podem se desenvolver em associação com essas três principais DCV como hipertensão, cardiomegalia e cardiomiopatia (ALLENDER et al., 2007).

Há numerosos riscos que predis põem indivíduos à DCV que incluem obesidade, alta pressão sanguínea, idade, sexo, tabaco, diabetes mellitus e menopausa (DE BACKER et al., 2003). Doenças cardiovasculares são uma das maiores causas de morte em várias nações economicamente desenvolvidas assim como em economias emergentes. Apesar de alguns dos maiores fatores de risco para DCV não serem modificáveis – idade, sexo, predisposição genética – as questões da dieta e do estilo de vida são reconhecidas como os principais fatores de risco modificáveis (LEIFERT; ABEYWARDENA, 2008).

Os tratamentos para DCV dependem do tipo da doença, mas tratamentos efetivos sempre incluem prevenção dos fatores de risco como dietas com baixo teor de gordura, com restrição calórica e com pouco sódio, redução na ingestão de álcool e exercícios cardiovasculares regulares (DE BACKER et al., 2003).

2.5 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A disfunção endotelial é caracterizada por alterações no endotélio vascular, como a redução da vasodilatação e o estado pró-inflamatório, e está associada a várias formas de doença cardiovascular como a aterosclerose (ENDEMANN; SCHIFRIN, 2004), bem como com diversas condições como menopausa, dislipidemia, aumento da pressão sangüínea e diabetes mellitus (CHING et al., 2003).

Os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial são muitos, entre eles a diminuição da liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (NO e PGI_2); diminuição da biodisponibilidade desses fatores, principalmente o NO, por inativação oxidativa; disfunção nas vias de transdução dos sinais dos fatores de relaxamento endoteliais; diminuição da sensibilidade da musculatura lisa vascular aos fatores de relaxamento; aumento da produção de fatores de contração produzidos pelo endotélio (ET-1, PGH_2 , e TXA_2) (DEANFIELD et al., 2007); desequilíbrio entre a produção de ROS e a atividade das defesas antioxidantes (DAWSON; DAWSON, 1998).

Em condições fisiológicas normais, o NO na luz do vaso inibe a adesão e a ativação das plaquetas, assim como a adesão e a migração de monócitos e de

neutrófilos para o espaço subendotelial. Ao realizar a diapedese, monócitos se transformam em macrófagos e, subseqüentemente, em células espumosas cheia de lipídeos no espaço subendotelial, e essa é uma etapa crítica para o desenvolvimento da aterosclerose. O NO modula a oxidação do LDL (Low density lipoprotein) enquanto o superóxido produzido pelo complexo NADH/NADPH oxidase nos neutrófilos ativados, promove o acúmulo de LDL oxidado (oxLDL) no espaço subendotelial. A glutathione peroxidase plasmático (GPx-3) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do lipídio peróxido em água e lipídio álcool, respectivamente, protegendo a biodisponibilidade do NO (VOETSCH et al, 2004).

A avaliação da função endotelial é importante para o entendimento da etiopatogenia da aterosclerose e para avaliação dos resultados de intervenções preventivas e terapêuticas. A existência da resposta vasodilatadora é um indicador importante da saúde do endotélio, sendo o NO, a endotelina-1 e as prostaglandinas as substâncias vasoativas mais importantes na determinação de doenças cardiovasculares (SQUADRITO et al., 2002).

2.6 OS ESTRÓGENOS E O ENDOTÉLIO VASCULAR

Pesquisas mostram que os estrógenos apresentam efeitos protetores no sistema vascular, nos tecidos reprodutivos e nos ossos. No sistema vascular, os estrógenos apresentam efeitos de rápida e de longa duração. Os efeitos de longa duração ocorrem de horas a dias após a exposição a estrógenos, envolvendo mecanismos genômicos (dependentes de sinalização transcricional das células vasculares), e está relacionado aos efeitos positivos do estrógeno na proliferação

celular durante a resposta à injúria vascular, reduzindo os riscos de aterosclerose. Os efeitos de rápida duração se estabelecem entre 5 a 20 minutos, não envolvem mecanismos genômicos e estão relacionados à vasodilatação e síntese do NO (MENDELSON, 2000).

O endotélio vascular de indivíduos saudáveis possui propriedades anticoagulantes e vasodilatadoras devido à ação de fatores que derivam do endotélio, entre eles o NO e prostaglandinas (PGI_2) (RAHIMIAN et al., 2004).

Os estrógenos possuem uma ação direta na reatividade vascular, modificando o estado funcional do endotélio. A disfunção endotelial tem sido considerada como o ponto de partida para o desenvolvimento da aterosclerose. O endotélio é o principal alvo da ação dos estrógenos. Eles promovem a redução do engrossamento da parede vascular, aceleram o processo de reconstrução do endotélio após injúria vascular e favorecem a angiogênese (LOSORDO; ISNER, 2001). Os estrógenos diminuem a expressão de moléculas de adesão em resposta à citocinas e possuem efeito anti-apoptótico nas células endoteliais. Outra potente ação dos estrógenos é promover aumento da produção de NO pela eNOs (FLORIAN et al., 2004).

Durante a menopausa ocorre a falência ovariana provocando um estado de hipoestrogenismo. A deficiência crônica de estrógeno está relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre outros fatores, pela perda do efeito protetor do estrógeno no endotélio vascular (SQUADRITO et al., 2003). Estudos têm demonstrado que culturas de células endoteliais aumentam a síntese de NO quando expostas a estrógenos (FLORIAN et al., 2004). A incidência de DVC em mulheres aumenta significativamente com a menopausa, devido à diminuição da

proteção cardiovascular atribuída à deficiência de estrógeno. O estrógeno possui ação vasodilatadora e de redução do colesterol, reduzindo a aterogênese, a incidência de infarto do miocárdio e outras complicações de DCV. Colesterol, triglicérides e LDL aumentam com a idade da mulher, enquanto que o HDL diminui (VYAS et al., 2008).

2.7 POLIFENÓIS

A inclusão de produtos como frutas, vegetais, nozes e raízes na dieta têm sido há muito tempo associada a numerosos efeitos benéficos, o que levou o Departamento de Saúde da Inglaterra a recomendar a ingestão de cinco porções de frutas e vegetais diariamente (DEPARTMENT OF HEALTH, 2007). Estudos anteriores abordando a questão dos métodos preventivos para DCV mostraram que o consumo de frutas e vegetais desempenham importante papel na prevenção da instalação de DCV como a aterosclerose (BRAT et al., 2006; HERTOOG et al., 1995).

Numerosos compostos presentes em plantas como, por exemplo, vitaminas, aminoácidos, polifenóis e alcalóides mostraram ter propriedades benéficas à saúde. Os polifenóis são fitoestrógenos, compostos encontrados em plantas que possuem semelhança estrutural e funcional com o estrógeno, com propriedades que beneficiam o metabolismo celular através de ação antioxidante e antiagregante plaquetária (ANDERSON; GARNER, 1997) e, assim, competem com os estrógenos pela ligação com os seus receptores, mimetizando o efeito dos mesmos sobre as células (XU et al., 2000). Os fitoestrógenos possuem um par de grupos hidroxila separados por distâncias similares aos estrógenos (MIKSICEK, 1995) e também

contam com a presença de anel fenólico, pré-requisito para a ligação no receptor estrogênico (METZGER, 1995).

Polifenóis são definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático com grupos hidroxila, incluindo ésteres e glicosídeos (derivados funcionais) (D'ARCHIVIO et al., 2007). Entretanto, decorrente da diversa gama de estruturas, polifenóis são agrupados em diferentes classes dependendo do número de anéis fenólicos e do tipo e número de elementos estruturais que ligam os anéis fenólicos (MANACH, 2004). As classes incluem estilbenos, ácidos fenólicos simples, chalconas e flavonóides.

Os principais compostos de plantas sugeridos como responsáveis pelos efeitos benéficos cardiovasculares conferidos por frutas e vegetais são os polifenóis, inicialmente devido às suas propriedades antioxidantes. Estudos mostram que o consumo de polifenóis limita o desenvolvimento de lesões ateromatosas por inibir a oxidação de LDL, que é considerado mecanismo chave em lesões endoteliais que ocorrem na aterosclerose (D'ARCHIVIO et al., 2007). Estudos posteriores demonstraram que, em adição à sua propriedade antioxidante, polifenóis possuem atividade antiangiogênica e anti-proliferativa, inibem mediadores inflamatórios e diminuem a expressão de fatores de transcrição e genes envolvidos na hipertensão (NICHOLSON et al., 2008).

Muita atenção tem sido dada para fitoquímicos antioxidantes naturais como potencial terapia na prevenção de doenças cardiovasculares. Um dos compostos mais reconhecidos e estudados é o resveratrol, membro de uma das classes de polifenóis denominada estilbeno (DAS; DAS, 2007).

2.8 RESVERATROL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

O resveratrol (RSV) é um polifenol estilbeno presente especialmente na uva que promove benefícios à saúde através de atividade antiangiogênica, antiinflamatória e antiviral (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005). O resveratrol é especialmente encontrado na uva e seus derivados, foi primeiramente isolado das raízes do heléboro branco (planta *Veratum grandiflorum* O. Loes) em 1940, e em 1963 das raízes da planta *Polygonum cuspidatum*, utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa. Inicialmente caracterizada como uma fitoalexina, o resveratrol atraiu pouca atenção até 1992, quando foi postulado como explicação para alguns dos efeitos cardioprotetores do vinho tinto. Desde então, dúzias de relatos demonstraram que resveratrol pode prevenir ou diminuir a progressão de várias doenças incluindo câncer, doenças cardiovasculares e doenças isquêmicas, assim como aumentar a resistência ao estresse e a longevidade de vários organismos, de leveduras a vertebrados (BAUR; SINCLAIR, 2006).

Na uva esta fitoalexina é sintetizada na casca como resposta ao stress causado por ataque fúngico, dano mecânico, irradiação de luz ultravioleta. O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Figura 2). O isômero trans-resveratrol é convertido para cis-resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável (SAUTTER et al., 2005).

Figura 2 - Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol.

O resveratrol tem meia vida curta no organismo, aproximadamente 8 a 14 minutos, e sua molécula primária é extensivamente metabolizada pelo organismo, sendo convertida a outros compostos secundários. A meia vida desses metabólitos é cerca de 9.2 horas, como o sulfato conjugado. Porém, outros compostos do vinho e da dieta podem modificar a disponibilidade e até agir sinergicamente ao RSV, o que explicaria o fato de doses relativamente baixas do RSV obtidas a partir do consumo de vinho tinto podem produzir efeitos benéficos mensuráveis *in vivo* (BAUR; SINCLAIR, 2006).

Polifenóis presentes no vinho tinto foram reportados como redutores da incidência de DCV através da proteção contra danos provocados pelo estresse oxidativo e pela redução da expressão de fatores transcricionais responsáveis pela ativação, indução ou controle de genes envolvidos na vasoconstrição. Uma característica bastante conhecida do vinho tinto é seu alto conteúdo de antioxidantes, dentre os quais o resveratrol foi o mais estudado nos anos recentes. Resveratrol é um fitoestrógeno com efeitos celulares específicos, encontrado em concentrações relativamente altas em vários alimentos, como nozes e uvas. A quantidade de resveratrol varia entre os diversos tipos de uvas e nas áreas geográficas em que são encontradas. Uma vez que o resveratrol exerce efeitos

protetores nas plantas, altas concentrações de resveratrol podem ser encontradas na casca de uvas de locais com clima frio intenso (WALLENBORG et al., 2009).

Estudos epidemiológicos mostraram uma associação entre consumo moderado de vinho e proteção contra doenças cardiovasculares. Também foi observado que o vinho possui atividade antioxidante, antiinflamatória e anti proliferativa *in vitro* e *in vivo* (MANACH et al., 2005). Na França, consumidores moderados de vinho tinto têm uma menor taxa de mortalidade decorrente de doenças coronarianas quando comparados com quem não consome vinho (BELQUENDOUZ et al., 1997).

No ano de 2005, Oak e colaboradores demonstraram que polifenóis do vinho possuem não apenas efeito antioxidante, mas efeito antiinflamatório. Também foi sugerido que esses polifenóis previnem a peroxidação lipídica mediada por radicais livres de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) através da quelação do cobre (CÍŽ et al., 2007) e esta peroxidação está associada ao envelhecimento celular e a doenças crônicas como a aterosclerose (DELL'AGLI et al., 2004; COOK; SAMMAN, 1996; OAK et al., 2005; RAJDL et al., 2006; BELQUENDOUZ et al., 1997). Em modelos animais, extratos de polifenóis de vinho tinto demonstraram prevenir o desenvolvimento de hipertensão (CAROLLO et al., 2007). Vinho tinto e uvas induzem relaxamento de vasos sanguíneos de forma endotélio-dependente, via aumento da geração e/ou aumento da atividade biológica do NO, levando a uma aumento de níveis de cGMP. Em estudos com ratos, polifenóis do vinho tinto (*Red Wine Polyphenols* - *RWPs*) demonstraram reduzir a pressão sanguínea em ratos normais e hipertensos. *RWPs*, nas células endoteliais, aumentam o cálcio livre do

citosol por aumentar o influxo de cálcio e a mobilização dos estoques de cálcio intracelulares (DELL'AGLI et al., 2004).

Segundo Baur e Sinclair, 2006, a agregação plaquetária excessiva ou inapropriada pode levar à formação de trombos e subsequente bloqueio nos vasos sanguíneos que resultam em isquemia, infarto do miocárdio ou derrame. Interessantemente, o resveratrol previne a agregação plaquetária in vitro, e a administração sistêmica do resveratrol bloqueia o aumento da agregação plaquetária induzida em coelhos através de dieta hipercolesterolêmica, além de reduzir a área aterosclerótica e o tamanho do trombo gerado por laser no endotélio de ratos que são geneticamente hipercolesterolêmicos. O mecanismo de efeito protetor do resveratrol pode envolver a inibição preferencial da atividade da COX1 e/ou redução do RNA mensageiro da COX2, uma vez que o balanço das prostaglandinas sintetizadas pelas duas isoformas da COX regula a homeostasia vascular. O tromboxano A₂, sintetizado pela COX1 em plaquetas, é um potente indutor da agregação plaquetária e um vasoconstritor, enquanto a prostaciclina, sintetizada pela COX2 nas células endoteliais, é um antiagregante plaquetário e vasodilatador. A inibição preferencial da COX1 promove aumento do fluxo sanguíneo e diminui formação de coágulo, enquanto drogas que inibem seletivamente COX2 podem criar um ambiente favorável à formação de trombo e aumento do risco de complicações cardiovasculares (BAUR; SINCLAIR, 2006). Em 1997, Jang e colaboradores originalmente propuseram que o RSV seria um agente quimiopreventivo efetivo por inibir a atividade enzimática das duas formas de ciclooxigenases. Evidências epidemiológicas mostram que inibição em longo prazo da COX reduz significativamente o desenvolvimento de diversos tipos de cânceres e a deleção do gene que codifica a COX-2 é protetora para modelos de ratos com câncer colo-retal.

O resveratrol reduz a atividade total da ciclooxygenase em tumores e tecidos normais *in vivo* através da inibição da atividade da COX-1 e/ou redução da COX-2 em nível de RNAm (BAUR; SINCLAIR, 2006).

Chen e colaboradores (2007) realizaram estudos em que se pode observar o efeito protetor do resveratrol sobre células endoteliais na redução da atividade trombogênica induzida por LDL oxidada, confirmando o trabalho de Bertelli e colaboradores (1995), que afirma que o resveratrol inibe a ativação e a agregação plaquetária.

O resveratrol relaxa o músculo liso vascular através da síntese e liberação de NO pelo endotélio e da inibição do influxo de cálcio e liberação do cálcio armazenado no interior da célula de músculo liso (LI et al., 2006), com efeitos similares aos do 17 β -estradiol (LI et al., 2002), podendo ser clinicamente útil como um substituto seguro para estrógenos femininos na prevenção de doenças cardiovasculares (LI et al., 2006), sendo assim também indicado nas dietas preventivas para mulheres em pós menopausa. A atividade vasodilatadora do resveratrol foi atribuída à sua habilidade de aumentar a sinalização de óxido nítrico no endotélio. *In vivo*, o resveratrol mostrou aumentar a expressão da óxido nítrico sintase endotelial e induzível (BAUR; SINCLAIR, 2006). Nas células endoteliais, o resveratrol reforça o estímulo agonista do aumento do cálcio livre intracelular que pode acionar a síntese de óxido nítrico pelas mesmas (BULUC; DEMIREL-YILMAZ, 2006).

2.9 AÇÃO ANTIOXIDANTE DO RESVERATROL

A cada dia cresce a utilização de compostos antioxidantes, principalmente de origem dietética, na busca da prevenção das DCV (AVIRAM; FUHRMAN, 1998), uma vez que a inibição da formação das *ROS* ou o seqüestro dessas moléculas previne o estresse oxidativo (HERMANN et al. 1997).

Espécies reativas do oxigênio mostraram ter papel na iniciação e progressão do câncer através de dano direto ao DNA e outras moléculas. Em adição à sua possível modulação de enzimas antioxidantes envolvidas na resposta de fase 2, o resveratrol tem uma capacidade antioxidante intrínseca que pode estar relacionada a seus efeitos quimio-preventivos (BAUR; SINCLAIR, 2006).

O resveratrol é bastante conhecido por sua forte atividade anti radicalar, que se deve à presença de uma dupla ligação conjugada, fazendo com que os elétrons fiquem mais deslocalizados (KHANDUJA; BHARDWAJ, 2003). A inibição da oxidação de LDL por polifenóis como o resveratrol que está presente no vinho tinto, pode desempenhar importante papel na diminuição da taxa de mortalidade de pessoas que consomem essa bebida (BELQUENDOZ et al., 1997). O resveratrol previne a oxidação do LDL *in vitro* através da quelatação do cobre, bem como por seqüestrar radicais livres. Em ratos hipertensos propensos ao infarto, resveratrol significativamente reduz marcadores do estresse oxidativo como albumina glicada no soro e 8-hidroxiguanosina na urina (BAUR; SINCLAIR, 2006).

Robb e colaboradores (2008) realizaram estudos em que o resveratrol promove o aumento da expressão da Mn-SOD, sendo esta enzima responsável por reduzir o estresse oxidativo intracelular. Vários mecanismos são postulados para explicar as atividades antioxidantes do resveratrol. Primeiramente, é dito que o resveratrol compete com a coenzima Q e reduz o complexo III da cadeia oxidativa, o

sítio de geração de *ROS*, para exercer sua atividade antioxidante. Segundo, aumentando o receptor de radicais livres glutathione, o resveratrol mantém a viabilidade celular e inibe a oxidação (FAN et al., 2008). Terceiro, resveratrol, quando adicionado à cultura de cardiomiócitos em baixas concentrações, mostrou induzir várias enzimas antioxidantes e de fase 2, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutathione, catalase, glutathione redutase, glutathione S-transferase e NAD(P)-H:quinone oxidoreductase 1 (TATLIDEDE et al., 2009) e essas defesas celulares aumentadas promovem proteção contra injúria oxidativa (FAN et al., 2008).

Uma vez que o resveratrol é um fitoestrógeno, o mesmo é substância promissora para tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares que, dentre inúmeros fatores, surgem na menopausa, quando ocorre um estado de hipoestrogenismo em que se perde o efeito protetor do estrógeno sobre o endotélio vascular (SQUADRITO et al., 2003). O estilbeno resveratrol têm atraído muita atenção dos pesquisadores pelos seus efeitos benéficos atribuídos à sua capacidade antioxidante, papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares (ROBB et al., 2008), bastante comuns na pós-menopausa.

O envelhecimento da população mundial leva ao aumento de patologias associadas à velhice como DCV (GOIATO et al., 2006). Estima-se que no ano de 2025, 10% da população mundial seja composta por pessoas com idade acima dos 65 anos, e dessa população 60% serão mulheres. Um dos maiores desafios para a Saúde Pública é a melhor maneira de prevenir doenças e manter a saúde da população idosa (PALACIOS et al., 2005). O resveratrol tem mostrado prolongar o tempo de vida de diversas espécies, implicando no potencial do resveratrol como agente antienvhecimento no tratamento de doenças humanas relacionadas à idade

(DE LA LASTRA; VILLEGAS, 2005). Polifenóis da uva demonstraram exercer efeito cardioprotetor em mulheres pós-menopausa através da redução do estresse oxidativo (ZERN et al., 2005). O resveratrol também pode combater células cancerosas através da indução do ciclo celular e apoptose. Os efeitos anti-proliferativos e pró apoptóticos do resveratrol em células tumorais foram extensivamente documentados *in vitro* e foram sustentados pela regulação negativa de proteínas do ciclo celular e aumento na apoptose de modelos tumorais *in vivo*. A eficácia de baixas doses diárias de RSV em modelos de ratos com carcinogênese de cólon sugerem que, mesmo concentrações de RSV obtidas de fontes dietéticas, como o vinho tinto, podem ser terapêuticas em alguns casos. Em concentrações mais altas, alcançadas farmacologicamente, efeitos protetores do RSV são observados com maior frequência e são mais drásticos, mas isso não se aplica a todos os casos. Porém, deve-se considerar a dose, o método de administração, a origem do tumor e outros componentes da dieta, tudo isso afetando a eficácia do tratamento com RSV. Estudos *in vivo* mostram claramente o RSV como grande promissor no tratamento de câncer (BAUR and SINCLAIR, 2006).

Uma vez que o estresse oxidativo desempenha papel importante no processo de envelhecimento e nas doenças que mais causam mortalidade na população, há um interesse considerável na influência dos fatores da dieta nos processos patológicos e na longevidade em relação à modificação do estresse oxidativo (MATSSON, 2007).

Diante deste cenário, é de extrema importância a realização de estudos adicionais sobre esses compostos de plantas, tanto em modelos experimentais *in vitro* quanto *in vivo*. Também há a necessidade de se desenvolver um consenso a

respeito das recomendações de consumo do alimento propriamente dito e de suplementos alimentares (MATSSON, 2007).

3. Objetivos

Gerais

O objetivo geral deste estudo é avaliar a ação do resveratrol:

- na produção de substâncias vasoativas como o óxido nítrico
- na prevenção do estresse oxidativo
- na integridade do DNA celular

Utilizando-se, para este propósito, o modelo “*in vitro*” de células endoteliais humanas da linhagem ECV304.

Específicos

O objetivo específico é determinar a melhor concentração do resveratrol em que se observa:

- a maior liberação de óxido nítrico
- a maior produção de PGE_2
- o menor dano e/ou maior proteção ao DNA celular
- a diminuição mais significativa na adesão dos neutrófilos às células endoteliais ECV304 ativadas

Com isso, estabelecer uma concentração de resveratrol que confira proteção e prevenção de DCV.

4. *Materiais e métodos*

a. SISTEMA DE CULTURA DE CÉLULAS

i. Linhagem Celular:

Neste estudo, foram utilizadas células endoteliais da linhagem ECV304, procedentes da American Type Culture Collection (ATCC® CLR-1998™), cedidas pelo Professor responsável pelo Laboratório de Glicoimunobiologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

ii. Cultura de Células:

O cultivo das células foi iniciado após descongelamento rápido a 37°C em banho-maria de uma alíquota contendo 1×10^6 células. Após o descongelamento, as células foram submetidas à centrifugação de 300g durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o sedimento celular lavado duas vezes com PBS estéril para retirar qualquer resíduo de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado na etapa de congelamento. Finalmente, o material foi centrifugado nas mesmas condições acima citadas e suspenso em 3 mL de meio de crescimento [Meio199 com fenol red (Invitrogen), suplementado com HEPES (25mmol/l - Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico / antimicótico (1% - Sigma), e 20% de soro bovino fetal (FBS) (Invitrogen) inativado por 30 minutos a 56 °C].

As células foram distribuídas em garrafas plásticas de cultura (25cm²). Estas foram incubadas em estufa de 5% de gás carbônico (CO₂) a 37°C. O meio de cultivo foi trocado de dois em dois dias até as culturas atingirem confluência de 90 a 100% de células aderidas.

b. GRUPO EXPERIMENTAL

	Tratamento
1	Controle (meio de cultura)
2	1,0 µg/mL lipopolissacáride (LPS)
3	1,0 µM 17β-estradiol
4	100,00 µM resveratrol
5	50,00 µM resveratrol
6	25,00 µM resveratrol
7	5,00 µM resveratrol
8	1,00 µM resveratrol
9	0,50 µM resveratrol
10	0,10 µM resveratrol

O resveratrol utilizado (3, 4', 5– trihydroxy– *trans*– stilbene; 5– [(1E)– 2– (4– Hydroxyphenyl) ethenyl]– 1,3– benzenediol) foi o isômero *trans* (Sigma-Aldrich) comercializado em pó, e as concentrações utilizadas estão de acordo com trabalho de Wallerath e colaboradores (2002). As soluções de resveratrol foram preparadas a partir da diluição do pó em dimetilsulfóxido (DMSO).

Também foram utilizados como controle o LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4 purified by phenol extraction) e o 17β-estradiol (Sigma-Aldrich), que foram diluídos em meio 199 incompleto.

c. PARÂMETROS INVESTIGADOS PROPOSTOS

Efeitos do fitoestrógeno resveratrol na síntese de NO e PGE₂, bem como na proteção da célula contra o dano oxidativo promovido pelo H₂O₂ em células endoteliais humanas da linhagem ECV304, e seu efeito sobre o DNA celular.

i. Medida da Viabilidade Celular

Para avaliar a citotoxicidade das diversas concentrações do resveratrol, do seu veículo de diluição e dos controles na linhagem em estudo foi utilizado o método de análise colorimétrica através do ensaio MTT: 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide. O corante Thiazolyl blue, em sua forma oxidada, possui coloração amarela, mas adquire coloração azul em sua forma reduzida, conversão feita pelas desidrogenases mitocondriais, ou seja, ocorre apenas em células viáveis. Partindo deste princípio, medindo por espectrofotometria a coloração obtida ao fim da reação, pode-se inferir a viabilidade celular das culturas tratadas (MOSNANN, 1983) com as diversas concentrações de resveratrol (100, 50, 25, 5, 1, 0.5 e 0.1 μ M), com o veículo de diluição (DMSO) nas concentrações de 10%, 5%, 1% e 0.5%, bem como com o 17 β -estradiol na concentração 1 μ M/mL e com o LPS na concentração 1 μ g/mL, todos comparados com o grupo controle (células não tratadas).

As células foram cultivadas em placa de 96 poços ($1,0 \times 10^4$ células/poço) em 200 μ L de meio de crescimento e incubadas em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C. Após 48 horas observou-se confluência. O meio de crescimento foi retirado, os poços foram lavados duas vezes com PBS e colocou-se meio de tratamento [Meio 199 livre de fenol red (Invitrogen), suplementado com HEPES (25mmol/l - Sigma), heparina (50 U/ml - Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico antimicótico (1% Sigma)].

As culturas foram estimuladas com o veículo de diluição da drogas (DMSO), o 17 β -estradiol, o LPS e diversas concentrações de resveratrol acima citadas por 24 horas. O controle de viabilidade continha apenas o meio de tratamento e o controle de morte celular, uma solução de meio de tratamento com 1% de Triton X 100. Após esses períodos, foi retirado o meio de cultura e os poços foram lavados com PBS,

depois foram adicionados 180µL de meio de tratamento, mais 20 µL de MTT (1mg/mL) foram adicionados em cada poço. Após incubação por 4 horas, foi retirada a solução de MTT e foi adicionado 200 µL/poço de solução solubilizadora. Após 24 horas, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O branco da reação foi feito com meio de tratamento. A absorbância obtida das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSNANN, 1983).

ii. Proteção do resveratrol contra o dano oxidativo do H₂O₂ pelo ensaio de MTT

Para avaliar a capacidade protetora do resveratrol sobre o estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas células ECV304, utilizou-se o método de análise colorimétrica através do ensaio MTT descrito acima (MOSNANN, 1983). Após estimulação das células em placas de 96 poços (1,0 x 10⁴ células/poço) com as diversas concentrações de resveratrol em meio de tratamento por 24 horas, foi retirado o meio dos poços e foi adicionado 1mM de H₂O₂ por 1 hora.

Após esses períodos, foi retirado o meio de cultura e os poços foram lavados com PBS, depois foram adicionados 180µL de meio de tratamento, mais 20 µL de MTT (1mg/mL) foram adicionados em cada poço. Após incubação por 4 horas, foi retirada a solução de MTT e foram adicionados 200 µL/poço de solução solubilizadora. Após 24 horas, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O branco da reação foi feito com meio de tratamento sem solução de MTT e solução solubilizadora. O controle de viabilidade continha apenas o meio de tratamento e o controle de morte celular

apenas H_2O_2 sem pré-tratamento com resveratrol. A absorbância obtida das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSNANN, 1983).

iii. Dosagem da quantidade de NO produzida por citometria de fluxo

As células cultivadas, ao atingirem confluência de 90 a 100% de células aderidas, foram lavadas com PBS e removidas dos frascos de cultura com uma solução de tripsina/EDTA (0,2% / 0,02%) (Gibco BRL, Life Technologies, Garithesburb, MD), deixando a solução agir por 5 minutos em estufa de CO_2 (5%) a 37°C . A solução foi aspirada e colocada em tubo cônico. Foi neutralizada a ação da tripsina pela adição de 10 mL de meio de crescimento. As células foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 300g e o sedimento celular suspenso em PBS. O número de células foi contado com o corante Azul de Trypan e as mesmas distribuídas em tubo de citometria em uma densidade de 1×10^6 células por tubo em 500 μL de PBS. Nesses tubos foi adicionado 5mM de DAF-2DA (4,5 diaminofluoresceína diacetato) e foi incubado por 20 minutos em estufa de CO_2 (5%) a 37°C .

O DAF-2DA é uma sonda permeável a membranas celulares. Uma vez dentro da célula, o grupo diacetato é hidrolisado pelas esterases do citosol, liberando o composto não fluorescente DAF-2. A produção intracelular de NO converte o DAF-2 no composto fluorescente DAF-2T. Assim a produção intracelular de NO pode ser medida por citometria de fluxo (LEIKERT et al., 2001).

Após a incubação com DAF-2DA, as células foram estimuladas com resveratrol e controles nas concentrações acima citadas. Foi realizada uma curva dose-resposta de produção de NO sob estímulo de $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS.

As quantidades de NO produzidas foram analisadas por citometria de fluxo (FACs Canto, BD programa FACs DIVA). Os resultados foram expressos pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI).

iv. Dosagem de prostaglandina E₂ (PGE₂) pelo método ELISA

As células foram cultivadas em placas de 6 poços numa densidade de 1×10^6 células e, ao atingirem confluência de 90 a 100% de células aderidas, as mesmas foram tratadas com diversas concentrações de resveratrol e dos controles em meio de tratamento. Os níveis de PGE₂ foram determinados no sobrenadante dessas culturas por um imunoensaio competitivo em poços do kit PGE₂ Assay – R&D Systems, seguindo as instruções do fabricante. As amostras e os padrões foram incubados por 18 horas a 4°C com 50µL de PGE₂ conjugada a fosfatase alcalina e 50µL de anticorpo monoclonal de rato contra PGE₂. Os poços foram então lavados 4 vezes com o tampão de lavagem, então foram adicionados 200µL da solução substrato (p-nitrofenilfosfato) em cada poço, com incubação de 20 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. Foram adicionados 50µL da solução fosfato trissódico em cada poço e realizada a leitura em no máximo 30 minutos. A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405nm, com correção do comprimento de onda entre 570 e 590nm. Foi realizada uma curva de calibração com soluções de PGE₂ entre 1250 e 19.6pg/mL.

v. Análise da alteração do conteúdo do DNA em ECV304 por citometria de fluxo

Este ensaio foi realizado conforme descrito em NICOLLETI et al. (1991). As células (4×10^5 células/poço placa de 12 poços) em meio 199 cultivadas (37°C,

5%CO₂) foram tratadas por 24 horas com diversas concentrações de resveratrol, Camptotecina (10µM - indutor de apoptose) e PBS (controle negativo).

Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (1000rpm, 10 minutos, 4°C) e o *pellet* foi ressuspenso cuidadosamente com 750µL de tampão citrato-triton-IP (0.1% citrato de sódio, 0.1% Triton X-100, iodeto de propídio 50µg/mL) e incubado por até 16-18 horas no escuro a 4°C. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (citômetro FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA).

vi. Ensaio de adesão de neutrófilos a monocamadas de células ECV304 pré-tratadas ou não com RSV

Os ensaios de adesão foram realizados em placas de cultura de 24 poços contendo em seu interior lamínulas de vidro estéreis. Células ECV304 foram cultivadas sobre as lamínulas de vidro até atingirem confluência na presença de meio 199. As monocamadas foram ou não pré-tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de RSV (1-25 µM) e, em seguida, receberam PMA (10 ng/ml) para estímulo de 5 horas.

Neutrófilos humanos do sangue periférico foram isolados utilizando Mono-Poly Resolving Medium (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA), conforme instruções do fabricante. Foram coletados 10 ml de sangue, de voluntários sadios, em seringa heparinizada (20 UL/ml; Lique mine, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Amostras de 5 ml foram cuidadosamente colocadas sobre 4 ml de meio de separação. As amostras foram centrifugadas a 400 x g, durante 50 minutos, à 25° C. O plasma e o anel de

mononucleares foram desprezados e o anel de neutrófilos foi lavado com 50 ml de meio 199 a 500 $\times g$ por 10 minutos, por duas vezes. O sedimento de células foi ressuspensionado em 1 ml de meio 199. Contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, Loptik Labor, Germany), partindo da suspensão diluída 20 vezes em solução de Turk (20ml ácido acético glacial, 0.5g azul de metileno e água para 1L). A preparação de neutrófilos foi analisada quanto à viabilidade, através do método de exclusão por azul de Tripán, e pureza por análise de tamanho e granulosidade através de citometria de fluxo em FacSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), tratados pelos programas Cell Quest e WinMDI.

Finalmente, foi permitida a adesão de 3×10^5 neutrófilos/poço nas células ECV304 durante um período de 45 minutos, a 37°C. Terminado o período de adesão, os neutrófilos não aderentes foram lavados com PBS. Neutrófilos aderentes e células endoteliais foram submetidos à coloração com HEMA3 (Biochemical Sciences, Inc., Swedesboro, NJ, USA). A análise dos resultados foi realizada através da contagem do número de neutrófilos aderidos/campo, em 12 campos diferentes e aleatórios na objetiva de 40x. As condições experimentais foram testadas em triplicada.

d. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa Graph Pad Prism (versão 4 Prism, Graph Pad, USA). Utilizamos a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way”, e o teste complementar de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$.

5. Resultados

a. Viabilidade celular das ECV304 perante a substância diluente do resveratrol – DMSO

Foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide) para avaliar a citotoxicidade da substância utilizada para diluir o resveratrol, o composto dimetilsufóxido (DMSO), no cultivo de células da linhagem ECV304 por 24 horas.

Conforme consta no gráfico 1, os tratamentos com 0,5% de DMSO (concentração de DMSO presente nos tratamentos de resveratrol utilizados neste estudo) e 1% de DMSO mantiveram as células viáveis por não promoverem citotoxicidade, enquanto que as concentrações de 5% e 10% de DMSO diminuíram significativamente a viabilidade das células. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas).

Gráfico 1 - Viabilidade das culturas de ECV304 após 24 horas de incubação com DMSO

1×10^4 células ECV304 por poço foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com variadas concentrações de DMSO: 0,5%, 1%, 5% e 10%. Como controles de viabilidade celular foram utilizadas células apenas em meio de cultura (não tratadas) e como controle de morte celular foram utilizadas células incubadas com triton 1% em meio de cultura. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ vs controle de viabilidade.

Com esses resultados pudemos definir a concentração de DMSO utilizada para diluir o resveratrol nos testes de viabilidade das células ECV304. A concentração utilizada a partir destes experimentos foi de 0,5% de DMSO.

b. Viabilidade celular das ECV304 perante as drogas de tratamento

O ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade dos tratamentos com as diversas concentrações do fitoestrógeno resveratrol, com LPS e com 17 β -estradiol na linhagem ECV304 por 24 horas, com o intuito de verificar um possível efeito dos tratamentos na viabilidade das células utilizadas neste estudo.

Tratamentos com resveratrol nas concentrações de 50, 25, 5, 1, 0.5 e 0.1 μ M, com LPS (1 μ g/mL) e com 17 β -estradiol (1 μ g/mL) por 24 horas mantiveram as células viáveis por não promoverem citotoxicidade nas doses e condições analisadas, exceto a concentração de 100 μ M de resveratrol que diminuiu significativamente a viabilidade das células, conforme mostra o gráfico 2. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas).

Gráfico 2 - Viabilidade das culturas de ECV304 após 24 horas de tratamento com as diversas concentrações de resveratrol

1×10^4 células ECV304 por poço foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol (concentrações de 100, 50, 25, 5, 1 0.5 e $0.1 \mu\text{M}$), LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) e 17β -estradiol ($1 \mu\text{M}$). Como controle de viabilidade celular foram utilizadas células apenas em meio de cultura (não tratadas) e como controle de morte celular foram utilizadas células incubadas com triton 1% em meio de cultura. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ vs controle de viabilidade.

c. Efeito protetor do resveratrol contra o estresse oxidativo do H_2O_2 através do ensaio de MTT

Para avaliar o efeito do resveratrol como agente protetor contra o estresse oxidativo provocado por solução de H_2O_2 1mM , foi utilizado o teste colorimétrico MTT em placa de 96 poços. Após pré-incubação por 24 horas com as diversas concentrações de resveratrol, adicionou-se H_2O_2 por 1 hora. No poço controle de H_2O_2 foi colocado apenas meio de tratamento durante as 24 horas.

A exposição das células a 1mM de H_2O_2 por 1 hora causou diminuição da viabilidade celular para menos de 15% em relação ao controle de viabilidade, conforme tabela 1. As células tratadas com resveratrol nas diversas concentrações e

posteriormente incubadas com 1mM de H_2O_2 por 1 hora tiveram viabilidade maior que as células não tratadas com o estilbeno.

Como mostra o gráfico 3, todas as concentrações de resveratrol testadas promoveram grande proteção contra o dano oxidativo provocado pelo H_2O_2 , o que mostra o alto potencial antioxidante do resveratrol.

Gráfico 3 - Efeito protetor do resveratrol contra o dano celular induzido por H_2O_2

1×10^4 células ECV304 por poço foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de tratamento e pré-incubadas por 24 horas com resveratrol (concentrações de 50, 25, 5, 1 0,5 e 0,1µM), LPS (1 µg/mL) e 17β-estradiol (1µM) e posteriormente incubadas com H_2O_2 1mM por 1 hora. Como controle de viabilidade celular foram utilizadas células apenas em meio de cultura (não tratadas) e como controle de morte celular foram utilizadas células incubadas apenas com H_2O_2 1mM em meio de tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle de H_2O_2 , ** $p < 0,01$ vs controle de H_2O_2 .

A diferença entre as proteções promovidas pelas diversas concentrações de resveratrol não é significativa, portanto não se pode estipular uma concentração que melhor protege as células contra o dano oxidativo promovido pelo H_2O_2 .

Tabela 1 – Efeito do resveratrol no dano celular provocado pelo H_2O_2

Grupo	% de viabilidade
Controle de Viabilidade	100
H_2O_2 1Mm	14,3
Resveratrol 50 µM + H_2O_2 1mM	50,2**

Resveratrol 25 μ M + H ₂ O ₂ 1mM	42,4**
Resveratrol 5 μ M + H ₂ O ₂ 1mM	53,0**
Resveratrol 1 μ M + H ₂ O ₂ 1mM	45,8**
Resveratrol 0,5 μ M + H ₂ O ₂ 1mM	37,9*
Resveratrol 0,1 μ M + H ₂ O ₂ 1mM	38,9*

Valores expressos em porcentagem em relação ao controle de H₂O₂. Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicata. *p<0,05 vs controle de H₂O₂, **p<0,01 vs controle de H₂O₂.

d. Dosagem da produção de NO por citometria de fluxo

A produção de óxido nítrico pelas células ECV304 foi aumentada em decorrência do estímulo das diversas concentrações de resveratrol. As porcentagens foram comparadas à produção basal de NO em células não estimuladas, consideradas como 0% de produção de NO. Foi utilizada a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) detectada por citometria de fluxo, fluorescência emitida pela ligação da sonda DAF-2DA com o NO produzido pela célula.

Tabela 2 - Efeito do resveratrol na produção intracelular de NO pelas ECV304

Grupo	DAF Fluorescence (MIF x 10 ³)		
	20 minutos	40 minutos	60 minutos
DAF	2,708 $\pm$ 0,035	2,736 $\pm$ 0,038	3,072 $\pm$ 0,052
LPS	*3,431 $\pm$ 0,146	**3,439 $\pm$ 0,059	*3,436 $\pm$ 0,061
17beta	* 3,386 $\pm$ 0,111	**3,367 $\pm$ 0,057	*3,364 $\pm$ 0,137
50 μ M RSV	3,245 $\pm$ 0,104	**3,408 $\pm$ 0,003	*3,791 $\pm$ 0,091
25 μ M RSV	*3,434 $\pm$ 0,010	**3,602 $\pm$ 0,085	*3,897 $\pm$ 0,026
5 μ M RSV	*3,373 $\pm$ 0,055	**3,668 $\pm$ 0,056	**4,072 $\pm$ 0,071
1 μ M RSV	**3,538 $\pm$ 0,157	**3,687 $\pm$ 0,159	**4,057 $\pm$ 0,055
0.5 μ M RSV	*3,423 $\pm$ 0,070	**3,587 $\pm$ 0,081	**3,993 $\pm$ 0,170
0.1 μ M RSV	*3,390 $\pm$ 0,164	**3,496 $\pm$ 0,046	*3,895 $\pm$ 0,207

Células cultivadas em garrafas foram tripsinizadas e transferidas para tubos de citometria na concentração de 1×10^6 células ECV304 com 500 μ L de PBS. Foi adicionado 5mM da sonda DAF-2DA a cada tubo, e então foi incubado por 20 minutos. Após este período, foi adicionado resveratrol (concentrações de 50, 25, 5, 1, 0.5 e 0.1 μ M), 1 μ g/mL LPS e 1 μ M 17 β -estradiol. Como controle foram utilizadas células sem a sonda e com a sonda, mas sem tratamento. Os resultados foram expressos

como mediana da intensidade de fluorescência (MIF) $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs células não tratadas, ** $p < 0,01$ vs células não tratadas.

Gráfico 4 – Ação do polifenol resveratrol no aumento de NO em células ECV304

1×10^6 células ECV304 adicionadas de 5mM da sonda DAF-2DA receberam tratamentos de resveratrol (concentrações de 50, 25, 5, 1, 0.5 e 0.1 μ M), 1 μ g/mL LPS e 1 μ M 17 β -estradiol. NT = células não tratadas. **A)** incubação de 20 minutos; **B)** incubação de 40 minutos; **C)** incubação de 60 minutos. Como controle foram utilizadas células com a sonda, mas sem tratamento. Os resultados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MIF) $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs células não tratadas e ** $p < 0.01$ vs células não tratadas.

e. Dosagem da produção da Prostaglandina E₂ pelo método ELISA

A produção de prostaglandina E₂ pelas células ECV304 não sofreu alteração com os estímulos das diversas concentrações de resveratrol (50, 25, 5, 1, 0.5 e 0.1 μ M), por 24 horas. O controle positivo utilizado foi o LPS (1 μ g/mL), em que se observa um aumento na produção de PGE₂ em relação às células não tratadas, uma vez que o LPS estimula a ciclooxigenase, enzima responsável pela síntese das prostaglandinas (MARTINS et al., 2008).

Gráfico 5 – Produção da Prostaglandina E₂ pelo método ELISA após 24 horas de tratamento com as diversas concentrações de resveratrol

1×10^6 células ECV304 por poço foram cultivadas em placas de 6 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol (concentrações de 50, 25, 5, 1 0.5 e 0.1 μ M) e LPS (1 μ g/mL). NT = células não tratadas. Como controle foram utilizadas células apenas em meio de cultura (não tratadas). Foram utilizados os sobrenadantes dos tratamentos para a realização do ELISA. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,001$ vs células não tratadas.

f. Ensaio de adesão de neutrófilos a monocamadas de células endoteliais ECV304 pré-tratadas ou não com resveratrol

A quantidade de neutrófilos aderidos às ECV304 não apresentou diferença significativa quanto às células tratadas ou não com resveratrol, conforme figura 2. As células endoteliais não estimuladas, tratadas ou não, apresentam pouca aderência de neutrófilos, mas sem diferença significativa entre células tratadas com resveratrol e células não tratadas. As células estimuladas com PMA apresentaram grande quantidade de neutrófilos aderidos, mas a diferença entre as células tratadas ou não com resveratrol não foi estatisticamente significativa.

Figura 3 – Adesão de neutrófilos sobre células ECV304 tratadas ou não com diversas concentrações de RSV por 24 horas. Células ECV304 foram cultivadas em placas de 24 poços com meio de tratamento e incubadas (B, C e D) ou não (A) com resveratrol. Como controle foram utilizadas células apenas em meio de cultura (A - não tratadas). Foram adicionados neutrófilos não ativados (sem estímulo) e neutrófilos ativados com PMA às ECV304. As células foram coradas com HEMA3 e a análise dos resultados foi feita com a contagem do número de neutrófilos aderidos/campo em 12 campos diferentes. Os elementos circulados em branco nos campos não estimulados são os neutrófilos aderidos.

g. Análise da alteração do conteúdo do DNA em ECV304 por citometria de fluxo

As células de linhagem ECV304 foram submetidas a tratamento com resveratrol por 24 horas. Observa-se que o resveratrol não promoveu dano ao DNA da célula em nenhuma das concentrações testadas. O controle positivo camptotecina (CPT) promoveu alteração significativa na integridade do DNA da ECV304. A medida utilizada para análise da integridade do DNA foi a porcentagem de DNA íntegro, através da utilização do iodeto de propídio (IP). O IP tem a capacidade de se ligar ao DNA danificado, que então emitirá fluorescência, e esta será analisada por citometria de fluxo (citômetro FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA).

Gráfico 6 – Alteração no DNA de ECV304 por citometria de fluxo com iodeto de propídio

4×10^5 células ECV304 por poço foram cultivadas em placas de 12 poços com meio de cultura e incubadas ou não com resveratrol (concentrações de 50, 5 e $0.5 \mu\text{M}$). NT = células não tratadas. Como controle de não dano foram utilizadas células apenas em meio de cultura (não tratadas) e como controle de dano ao DNA utilizou-se CPT $105 \mu\text{M}$). As células foram então tripsinizadas e tratadas com tampão contendo IP por 18 horas no escuro, posteriormente foi realizada a análise por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ vs células não tratadas.

6. *Discussão*

6.1 Efeito protetor do resveratrol contra o estresse oxidativo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato. Os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, pois eles são estáveis em ambas as formas. Antioxidantes são importantes na prevenção de doenças, inibindo ou atrasando a oxidação das biomoléculas por meio da prevenção da iniciação ou propagação da cadeia de reações de oxidação (KAUR; KAPOOR, 2001).

As doenças cardiovasculares como a hipertensão, a doença coronariana e a aterosclerose, estão associadas com o aumento do stress oxidativo e são mais comuns em homens do que em mulheres na pré-menopausa em idade similar (FORTE et al.; 1998).

O estresse oxidativo provocado por todos os peróxidos pode danificar diretamente células e tecidos. O resveratrol age como antioxidante e anti-mutagênico, induz enzimas de fase 2 na metabolização de drogas, tem atividade anti-inflamatória e inibe a função da COX. Além disso, o estilbeno inibe eventos celulares associados à iniciação, promoção e progressão tumoral (YEN et al., 2007).

KAINDL e colaboradores (2008) mostraram que o resveratrol é efetivo contra os danos do estresse oxidativo nutricional no epitélio colo-retal, mas que pode não ser útil para proteger contra o estresse oxidativo endógeno.

O resveratrol é seqüestrador de radicais livres e ao mesmo tempo um potente antioxidante, uma vez que possui habilidade de promover atividade de uma variedade de enzimas antioxidantes (DE LA LASTRA; VILLEGAS, 2005).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido normalmente em tecidos pela SOD e por oxidases, sendo removido predominantemente por enzimas antioxidantes como a catalase e a glutathione peroxidase, agindo também como regulador de vias de sinalização, uma vez que tem a habilidade de atravessar a membrana plasmática. Durante a última década, vários estudos demonstraram que o resveratrol é um potente antioxidante e protege contra diferentes *ROS*. Estudos atestam a habilidade do resveratrol de evitar o dano oxidativo causado pelo H_2O_2 (VIEIRA DE ALMEIDA et al., 2008), o que vai ao encontro dos resultados obtidos nestes experimentos.

No presente trabalho, as diversas concentrações do resveratrol reverteram o dano celular causado pelo oxidante H_2O_2 , porém não houve diferença estatisticamente significativa entre a proteção causada pelas várias concentrações de resveratrol. Com isso não se pode estabelecer uma concentração exata que promove a proteção contra o dano oxidativo provocado pelo H_2O_2 , mas a faixa estudada (50 a $0.1\mu M$ de resveratrol) promove proteção às células neste estudo *in vitro*.

6.2 Efeitos do resveratrol na produção de NO

Nos vasos sanguíneos o NO exerce função na modulação do diâmetro e da resistência vascular pela sua habilidade em relaxar o músculo liso vascular. O NO

inibe interações de elementos sangüíneos circulatórios com a parede do vaso (CERQUEIRA et al., 2002).

Em condições basais, em indivíduos sadios, há tônus vasodilatador moderado e constante, causado pelo NO endotelial se difundindo para as células da musculatura lisa vascular; se a formação basal de NO cessa, aparecerá vasoconstrição (CERQUEIRA et al., 2002). A reação de Griess era muito utilizada para detectar a produção de NO, porém o teste não era muito sensitivo e houve a necessidade de se desenvolver nova técnica mais satisfatória (NAKATSUBO, et al., 1998). Desenvolveu-se então o DAF-2DA, uma sonda amplamente utilizada para detectar o NO intra e extracelular, sendo bastante adequada e de ampla sensibilidade se usada em baixas concentrações (LEIKERT, et al., 2001). Por ser de alta sensibilidade, baixíssimas concentrações de NO geradas por CE são detectadas com o uso desta determinação fluorimétrica (NAKATSUBO, et al., 1998).

O DAF-2DA é uma sonda permeável a membranas celulares que, após sofrer hidrólise, liga-se ao NO produzido intracelularmente, convertendo-se no composto fluorescente DAF-2T. Assim a produção intracelular de NO pode ser medida por citometria de fluxo (LEIKERT et al., 2001).

Quando o estrógeno se liga ao receptor estrogênico alfa (ER α), há ativação da fosfatidilinositol 3 - quinase (PI3K), subunidade regulatória do ER α . Essa interação promove um aumento na atividade da proteína quinase B (Akt), responsável pela fosforilação da eNOS. Este estado fosforilado da eNOS leva ao aumento da produção do óxido nítrico (BOROUJERDI, 2003). O resveratrol, por possuir semelhança estrutural ao estrógeno, liga-se e ativa a transcrição gênica através dos receptores estrogênicos α e β em tecidos e linhagens celulares

sensíveis a estrógeno (WALLERATH et al., 2002), apesar de outros estudos terem demonstrado resultados contrários (DAS; MAULIK, 2006).

Wallerath e colaboradores (2002) concluíram em seus estudos que o resveratrol pode estimular a expressão do gene da *eNOS*, levando a um aumento na produção de NO. A literatura aponta outros fitoestrógenos como as isoflavonas como sendo os responsáveis pela proteção contra doenças cardiovasculares em populações asiáticas que possuem dieta rica em soja, e essa proteção deve ser decorrente do aumento da biodisponibilidade de NO (SIOW et al., 2007). Paulo e colaboradores também citam que isoflavonas da soja *Glycine Max* aumentam a produção de NO, além de proteger células endoteliais contra dano promovido pelo H₂O₂ (PAULO et al., 2009).

Uma vez que o NO contribui significativamente com a manutenção da hemostasia vascular por relaxar o músculo liso vascular, proteger a camada íntima da agregação plaquetária e da adesão leucocitária, e por inibir proliferação da célula vascular de músculo liso, uma diminuição na biodisponibilidade de NO no sistema cardiovascular é associada ao envelhecimento e a doenças cardiovasculares. Vários nutrientes e seus metabólitos demonstraram influenciar positivamente a produção de NO, assim como polifenóis do vinho tinto, isoflavonas e ginseng (SCHIMITT et al., 2007), o que confirma os resultados obtidos neste estudo, em que o resveratrol aumenta significativamente a produção de NO pelas células endoteliais. Novamente não encontramos uma concentração exata que promove maior aumento na produção de NO, mas podemos relatar que a faixa de concentração utilizada promoveu aumento significativo na produção de óxido nítrico em células ECV304 nos tempo de tratamento de 20, 40 e 60 minutos.

A diferença entre os aumentos na produção de NO promovidas pelas diversas concentrações de resveratrol não foi significativa em nosso trabalho, portanto não se pode estipular uma concentração que promova um maior aumento na produção de NO, mas pode-se dizer que na faixa de concentração de 50µM a 0.1µM de resveratrol foi detectado uma maior dessa substância quando comparado à célula não tratada.

6.3 Produção de PGE₂ – efeitos do resveratrol

O mecanismo de efeito protetor do resveratrol pode envolver a inibição preferencial da atividade da COX1 e/ou redução do RNA mensageiro da COX2, uma vez que o balanço das prostaglandinas sintetizadas pelas duas isoformas da COX regula a homeostasia vascular (BAUR; SINCLAIR, 2006).

O resveratrol inibe a COX, responsável pela produção das prostaglandinas que participam da regulação da homeostasia vascular. O tromboxano A₂, sintetizado pela COX1 em plaquetas, é um potente indutor da agregação plaquetária e um vasoconstritor, enquanto a prostaciclina, sintetizada pela COX2 nas células endoteliais, é um antiagregante plaquetário e vasodilatador. Inibição preferencial da COX1, entretanto, promove fluxo sanguíneo e diminui formação de coágulo, enquanto drogas que inibem seletivamente COX2 podem criar um ambiente favorável à formação de trombo e aumento do risco de complicações cardiovasculares (BAUR; SINCLAIR, 2006). Um dos possíveis meios pelos quais o resveratrol promove proteção é através da regulação negativa das respostas inflamatórias, incluindo a inibição da síntese e liberação de mediadores pró-

inflamatórios como PGE_2 produzidos a partir do ácido aracdônico (CASTRO et al., 2008). Efeitos primários do PGE_2 e PGI_1 induzem, de forma independente, o aumento do fluxo sanguíneo, mas que conseqüentemente aumenta a permeabilidade vascular e o edema em sinergia com mediadores como histamina, bradicinina e IL-1.

A diminuição da produção da COX-2 mostrou coincidir com a produção de PGE_2 , sugestão do mecanismo das propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas do resveratrol (PIROLA; FROJDO, 2008). Conforme observado em nossos resultados, resveratrol não aumentou a produção de PGE_2 , ao contrário do LPS, substância pró-inflamatória. O LPS aumentou significativamente a produção da prostaglandina E_2 , mas o resveratrol não diminuiu a quantidade de PGE_2 , resultado que não confirma o relato de CASTRO e colaboradores (2008).

6.4 Ação do polifenol resveratrol nas moléculas de adesão de células endoteliais

O recrutamento de leucócitos para a parede do vaso é o primeiro passo da aterogênese, sendo amplamente explicado pela indução da ativação endotelial, caracterizando no aumento da expressão de moléculas endoteliais de adesão leucocitária como VCAM-1, ICAM-1 e E-seletina. Essas moléculas de adesão endotelial mediam a adesão e a transmigração dos leucócitos para a parede do vaso e também podem promover instabilidade plaquetária. VCAM-1, em particular, desempenha papel dominante no desenvolvimento e na progressão das lesões ateroscleróticas. Sua expressão é regulada por mecanismos pró-oxidantes através

da ativação de fatores como o NF- κ B. Este, em particular, tem papel bastante importante no aumento de genes endoteliais pró inflamatórios (CARLUCCIO et al., 2007).

Estudos recentes *in vitro* mostraram que o resveratrol inibe ativação endotelial e adesão de monócitos, protege células endoteliais da apoptose induzida por estresse oxidativo e atenua expressão de genes pró-inflamatórios pela inibição da ativação do NF- κ B em células endoteliais da artéria coronariana (CSISZAR et al., 2008). Pesquisas observaram que o RSV reduz expressão de VCAM-1 e ativação endotelial induzida por LPS ou citocinas através da inibição do NF- κ B (CARLUCCIO et al., 2007).

Alguns compostos polifenólicos mostraram suprimir ativação do NF- κ B e a expressão de ICAM-1. Estudos mostram que o RSV bloqueia ativação induzida pelo NF- κ B da molécula TNF- α , e consequentemente inibe expressão gênica de NF- κ B. Estudos mostram que o resveratrol pode bloquear a expressão de ICAM-1, diminuindo, assim, a adesão celular (PARK et al., 2009).

O resveratrol está sendo notavelmente considerado como terapia para humanos em diversos tipos de patologias (CSISZAR et al., 2008).

As células deste estudo tratadas anteriormente com RSV não mostraram uma diminuição significativa na adesão dos neutrófilos quando comparadas às células não tratadas, conforme observado na figura 2. Também não é possível estipular uma concentração de RSV que possua diferente influência na adesão celular, uma vez que todas as concentrações estudadas mostraram não modificar a

quantidade de neutrófilos aderidos às células ECV304, em relação às células não tratadas com RSV.

6.5 Alteração no conteúdo do DNA

Existe uma ligação direta entre modificação no DNA e o processo de envelhecimento. O resveratrol protegeu significativamente células endoteliais contra injúria ao DNA provocada por fumaça de cigarro, conforme estudo de CSISZAR e colaboradores (2008), que também observou que o resveratrol atenua o dano ao DNA provocado por radiação ultravioleta em células endoteliais.

Os compostos polifenólicos também vêm sendo amplamente estudados por seus efeitos na supressão de tumores e na prevenção de DCV em modelos animais (CAO et al., 2002). A ingestão de polifenóis tem sido associada à baixa taxa de mortalidade de câncer e DCV (HERTOG et al., 1995). Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias e melhoras na disfunção endotelial e no perfil lipídico têm sido reportadas em dietas polifenólicas (ZERN; FERNANDEZ, 2005).

Este mesmo grupo pressupõe que as ações antioxidantes, antiinflamatórias e citoprotetoras do resveratrol inibem a formação da placa aterosclerótica, diminuindo a morbidade por derrame e infarto do miocárdio em condições patofisiológicas associadas com o envelhecimento vascular acelerado (CSISZAR et al., 2008). Em nossa pesquisa, não observamos o potencial do resveratrol como protetor contra o dano no DNA, mas constatamos que o resveratrol não promove dano ao material genético da célula ECV304 quando submetida a tratamento de 24 horas com o fitoestrógeno.

O resveratrol tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que, interessantemente, participa de mecanismos celulares pró-sobrevivência e pró-morte, favorecendo a preservação do status funcional das células. Possivelmente aumenta o tempo de vida da célula sadia e induz a morte de células que tem condições fisiológicas desbalanceadas (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Existem evidencias consideráveis que radicais livres induzem dano oxidativo no DNA contribuindo, assim, com a formação de tumores. Frutas e vegetais possuem quantidades substanciais de compostos naturais com propriedades antioxidantes, que são associadas com baixa incidência de vários tipos de câncer. Porém, ainda é bastante intrigante a ação diferencial desses antioxidantes perante células normais e tumorais em termos de sinalização, expressão gênica e efeitos farmacológicos. Em células normais, o antioxidante resveratrol protege contra danos ao DNA, enquanto que em células tumorais, o mesmo composto é pró-apoptótico (QIAN et al., 2009).

Portanto, são necessários estudos mais aprofundados sobre a ação do resveratrol sobre o ciclo celular de células normais e de células tumorais, bem como é necessário estabelecer exatamente as concentrações que induzem efeitos benéficos ou não às células, em modelos *in vitro* e *in vivo*.

7. Conclusão

Segundo os resultados obtidos em nosso trabalho, podemos concluir que o resveratrol:

1. Estimula de fato o aumento da produção de óxido nítrico em células endoteliais de linhagem ECV304 com os tempos de tratamento 20, 40 e 60 minutos, na faixa de concentração de 0.1 μ M a 50 μ M;
2. Protege as células endoteliais do dano oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio em todas as concentrações testadas;
3. Não promove aumento da produção de PGE₂, uma vez que o mesmo é antiinflamatório e diminui a ação da COX;
4. Não aumenta a adesão de neutrófilos a células endoteliais ECV304 após 24 horas de tratamento com as concentrações 25, 5 e 1 μ M;
5. Não promove dano ao DNA da célula endotelial após tratamento por 24 horas com as concentrações 50, 5 e 0.5 μ M.

Durante nossas investigações não pudemos estabelecer uma concentração de resveratrol que gera uma maior proteção ou maior estímulo a favor da prevenção de DCV, uma vez que os resultados obtidos das concentrações testadas não tiveram diferença significativa entre elas.

A suplementação da alimentação com semente de uva, casca de uva ou produtos de vinho tinto podem ser um adjunto útil a considerar para uma abordagem dietética na prevenção de DCV (LEIFERT; ABEYWARDENA, 2008), apesar de serem necessárias mais pesquisas com diferentes parâmetros, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para suportar tal estratégia e para se estabelecer mais claramente a quantidade de ingestão diária de resveratrol para se obter de fato sua ação anti aterosclerótica.

8. Referências Bibliográficas

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, London, v.1, p.593-615, Aug. 2001.

ALLENDER, S.; PETO, V.; SCARBOROUGH, P.; BOXER, A.; RAYNER, M. Coronary Heart Disease Statistics. **British Heart Foundation**, London, July 2007.

ALMEIDA, L. M. V.; PINHEIRO, C. C.; LEITE, M. C.; BROLESE, G.; LEAL, R. B.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C. A. Protective Effects of Resveratrol on Hydrogen Peroxide Induced Toxicity in Primary Cortical Astrocyte Cultures. **Neurochemistry Research**, New York, v.33, p.8-15, Jan. 2008.

ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. Phytoestrogens and human function. **Nutrition Today**, Hagerstown, v.32, n.6, p.232-238, Dec. 1997.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 137, p. 45-50, Apr. 1998.

BARNES, S.; KIM, H. Soy isoflavones, estrogens, and growth factor signaling. **Soy Connection**, v. 6, p. 1-5, Mar.1995.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 5, issue 6, p.493-506, May 2006.

BELQUENDOUZ, L.; FREMONT, L.; LINARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low density lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**, Kansas City, v.53, p.1347–1355, May 1997.

BERTELLI, A. A. E.; GIOVANNINI, L.; GIANNESSI, D.; MIGLIORI, M.; BERNINI, W.; FREGONI, M.; BERTELLI, A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. **International Journal of Tissue Reactions**, Geneva, v.17(1), p.1–3, 1995.

BOROUJERDI, A. Estrogen Exposure Rapidly Elevates Nitric Oxide Production in Cerebral Vessels. **The UCI Undergraduate Research Journal**, Irvine, vol.6, p.1-6, 2003.

BOULLIER, A.; BIRD, D. A.; CHANG, M. K. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.947, p.214-222, Nov. 2001.

BRAT, P.; GEORGÉ, S.; BELLAMY, A.; DU CHAFFAUT, L.; SCALBERT, A.; MENNEN, L.; ARNAULT, N.; AMIOT, M. J. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.136, p. 2368–2373, Sep. 2006.

BULUC, M.; DEMIREL-YILMAZ, E. Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium. **Vascular Pharmacology**, Augusta, vol.44, s.4, p.231-237, April 2006.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase membrane targeting. Evidence against involvement of a specific myristate receptor. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.7, p.25016-2520, Oct. 1994.

CAMPBELL, W. B.; FALCK, J. R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Hypertension**, Dallas, v.49, p.590-596, Jan. 2007.

CAO, Y.; CAO, R.; BRAKENHIELM, E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v.13, p.380-390, July 2002.

CARLUCCIO, M. A., ANCORA, M. A., MASSARO, M., CARLUCCIO, M. SCODITTI, E., DISTANTE, A., STORELLI, C., DE CATERINA, R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF- κ B and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v.293, p.2344-2354, Jun. 2007.

CAROLLO, C.; LO PRESTI, R.; CAIMI, G. Wine, Diet, and Arterial Hypertension, **Angiology**, Thousand Oaks, v.58, n.1, p.92-96, Feb. 2007.

CASTRO, R.; LAMAS, J.; MORAIS, P.; SANMARTIN, M. L.; ORALLO, F.; LEIRO, J. Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v.126, issues 1-2, p.9-19, Nov. 2008.

CERQUEIRA, N. F.; HUSSNI, C. A.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, issue 6, p.417-423, Nov. 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; SIMMONS, D. L. The cyclooxygenases. **Genome biology**, London, v.5, p.241-246, Aug. 2005.

CHEN, Y. Z.; WANG, J. S.; CHOW, S. E. Resveratrol protects vascular endothelial cell from ox-LDL-induced reduction in antithrombotic activity. **The Chinese Journal of Physiology**, Taiwan, v. 50, s.1, p.22-28, Feb. 2007.

CHING, H. L.; WATTS, G. F.; DHALIWAL, S. S.; BARRETT, P. H.; STUCKEY, B. G. Vascular function of forearm microcirculation in postmenopausal women with type 2 diabetes: potential benefit of hormone replacement therapy? **Climacteric: the journal of the International Menopause Society**, New York, v.6, p.31-37, Mar. 2003.

CÍŽ, M.; PAVELKOVÁ, M. ; GALLOVÁ, L.; KRÁLOVÁ, J.; KUBALA, L.; LOJEK, A. The influence of wine polyphenols on reactive oxygen and nitrogen species production by rat macrophages RAW 264.7. **Physiological Research Pre-Press Article**, Prague, Apr. 2007.

COIMBRA, S. R.; LUZ, P. L. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, p.1275-1295, May 2004.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v.7, p. 66-76, Feb. 1996.

CSISZAR, A.; LABINSKY, N.; PODLUTSKY, A.; KAMINSKI, P. M.; WOLIN, M. S.; ZHANG, C.; MUKHOPADHYAY, P.; PACHER, P.; HU, P.; DE CABO, R.; BALLABH, P.; UNGVARI, Z. Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v.294, p. H2721–H2735, Jun. 2008.

CURIN, Y.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. **Pharmacological Reports**, Poland, v.57, Supplement, p.108-119, Jun. 2005.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, Roma, v.43, n.4, p.348-361, Oct. 2007.

DAÍ, W.; KLONER, R. A. Relationship between cyclooxygenase-2 inhibition and thrombogenesis. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, Naperville, v.9, p.51-59, Mar. 2004.

DAS, D. K.; MAULIK, N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. **Molecular interventions**, Bethesda, v.6, issue 1, p.36-47, Feb. 2006.

DAS, S.; DAS, D. K. Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular disease. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, San Francisco, v.2, issue 2, p.133-138, Jun. 2007.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Progress in brain research**, Amsterdam, v. 118, p.118-215, Sep. 1998.

DE BACKER, G.; AMBROSIONI, E.; BORCH-JOHNSEN, K.; BROTONS, C.; CIFKOVA, R.; DALLONGEVILLE, J.; EBRAHIM, S.; FAERGEMAN, O.; GRAHAM, I.; MANCIA, G.; CATS, V. M.; ORTH-GOME'Z, K.; PERK, J.; PYÖRÄ-LA, K.; RODICIO, J. L.; SANS, S.; SANZOY, V.; SECHTEM, U.; SILBER, S.; THOMSEN, T.; WOOD, D. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. **European Heart Journal**, Oxford, v. 24, p. 1601–1610, Sep. 2003.

DE LA LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I.; Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent. Mechanisms and clinical implications. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v.49, issue 5, p.405-430, May 2005.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, Dallas, v.115, p.1258-1295, Mar. 2007.

DELL'AGLI, M.; BUSCIALA, A.; BOSISIO, E. Vascular effects of wine polyphenols. **Cardiovascular Research**, Giessen, v. 63, p.593-602, Sep. 2004.

DEPARTMENT OF HEALTH. **5 A DAY health benefits**. Oct. 2007. http://www.dh.gov.uk/en/Publichealth/Healthimprovement/FiveADay/FiveADaygeneralinformation/DH_4002343

ENDEMANN, D.; SCHIFFRIN, E. Endothelial Dysfunction. **The American Society of Nephrology**, Washington , v.15, p.1983-1992, Aug. 2004.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. **Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes**. Endocrinology Reviews, Chevy Chase, v.23, p.599–622, Oct. 2002.

FAN, E.; ZHANG, L.; JIANG, S.; BAI, Y. Review: Beneficial Effects of Resveratrol on Atherosclerosis. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v.11, issue 4, p.610-614, Dec. 2008.

FLORIAN, M.; FREIMAN, A.; MAGDER, S. Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. **Steroids**, New York, v.13, p.779-787, Dec. 2004.

FORTE, P.; KNEALE, B. J.; MILNE, E.; CHOWIENCZYK, P. J.; JOHNSTON, A.; BENJAMIN, N.; RITTER, J. M. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. **Hypertension**, Dallas, v. 32, p.730-734, Oct. 1998.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, London, v.6, p.288-373, Nov. 1980.

GOIATO, M. C.; DOS SANTOS, D. M.; BARÃO, V. A. R.; PESQUEIRA, A. A.; GENNARI FILHO, H. Odontogeriatrics and the Disease of Alzheimer. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, João Pessoa, v.6, n.2, p.207-212, Mai. 2006.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v.59, p.1609–1623, 1992.

HARA, S.; MORISHITA, R.; TONE, Y.; YOKOYAMA, C.; INOUE, H.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T.; TANABE, T. Overexpression of prostacyclin synthase inhibits growth of vascular smooth muscle cells. **Biochemistry Biophysical Research Communications**, Gulf Breeze, v.216, issue 3, p.862-867, Nov. 1995.

HARVEY R. A., CHAMPE, P. C. **Farmacologia Ilustrada**. 2º Edição, Porto Alegre: Artmed, p. 470, 1998.

HERMANN, C.; ZEIHNER, A. M. S.; DIMMELER, S. Shear stress inhibits H₂O₂ induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Baltimore, v.17, p.3588–3592, Dec. 1997.

HERTOG, M. G. J.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B. S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of internal medicine**, Chicago, v.155, p. 381-386, Feb. 1995.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M.; Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, New York, v.275, p.218–220, Jan. 1997.

KAINDL, U.; EYBERG, I.; ROHR-UDILOVA, N.; HEINZLE, C.; MARIAN, B. The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage, **Food and Chemical Toxicology**, New York, v.46, issue 4, p.1320-1326, April 2008.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C.; Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, Chester, v.36, n.7, p.703-725, Oct. 2001.

KHANDUJA, K.; BHARDWAJ, A. Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v.40, p.416-422, Dec. 2003.

KLABUNDE, R. E. Cardiovascular Physiology Concepts. Philadelphia, **Published by Lippencott Williams and Wilkins**, 2005.

LEIFERT, W. R., ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, New York, v.28, p.729-737, 2008.

LEIKERT, J. F.; RÄTHEL, T. R.; VOLLMAR, A. M.; DIRSCH, V. M. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. **FEBS letters**, Amsterdam, v.5, p.131-134, Oct. 2001.

LI, H. F.; LI, W.; ZHENG, T. Z.; QU, S. Y.; ZHANG, C. L. A study of the mechanisms involved in relaxation induced by 17 β -estradiol in the isolated rabbit aorta. **Archives of Gynecological Obstetricity**, Berlin, v. 266, p.101-104, Apr. 2002.

LI, H. F.; TIAN, Z. F.; QIU, X. Q.; WU, J. X.; ZHANG, P.; JIA, Z. J. A study of mechanisms involved in vasodilatation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery. **Physiological Research**, Praha, v.55, p.365–372, Oct. 2006.

LOSORDO, D. W.; ISNER, J. M. Estrogen and angiogenesis: A review. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v.1, p. 6-12, Jan. 2001.

MAHMOUDI, M.; CURZEN, N.; GALLAGHER, P. J. Atherosclerosis: the role of inflammation and infection. **Histopathology**, Oxford, v.50, p.534-546, April. 2007.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, Dallas, v.16, Issue 1, p.77–84, Feb. 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.79, p.727–747, May 2004.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, Hoboken, v.17, Issue 1, p.24-38, Feb. 2003.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S. Insulin Suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 Expression and NF- κ B Activation in Alveolar Macrophages. **Cell Physiology Biochemistry**, Tübingen, v. 22, p.279-286, March 2008.

MATTSON, M. P. Dietary factors, hormesis and health. **Ageing Research Reviews**, Oxford, v.7, p.43-48, Sep. 2007.

MENDELSON, M. E. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, New York, v. 5, p. 337-343, Nov. 2000.

METZGER, D.A. Nontraditional Sites of Estrogen Action. **Environmental Health Perspectives**, Cary, v.103, s.7, Oct. 1995.

MIKSICEK, R.J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 208, Issue 1, p. 44-50, Jan. 1995.

MONCADA, S.; VANE, J.R. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.300, p.1142–1147, May 1979.

MOSNANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.16, p.55-56, Dec. 1983.

NAKATSUBO, N.; KOJIAMA, H.; KIKUCHI, K.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; MAEDA, D.; IMAI, Y.; IRIMURA, T.; NAGANO, T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: Diaminofluoresceins. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.427, issue 2, p.263–266, 1998.

NICHOLSON, S. K.; TUCKER, G. A.; BRAMELD, J. M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells, **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.67, Issue 1, p. 42–47, Feb. 2008.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v.139, issue 2, p.271-279, Jun. 1991.

OAK, M.H.; EL BEDOUI, J.; SCHINI-KERTH, V.B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v.16, p.1-8, Jan. 2005.

PALACIOS, S.; BORREGA, R. S.; FORTEZA, A. The importance of preventive health care in post-menopausal women. **Maturitas**, New York, v. 52, supplement 1, p.53-60, Nov. 2005.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. NO release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, London, v.327, p.524–526. Sep. 1987.

PARK, J. S.; KIM, K. M.; KIM, M. H.; CHANG, H. J.; BAEK, M. K.; KIM, S. M.; DO JUNG, Y. Resveratrol Inhibits Tumor Cell Adhesion to Endothelial Cells by Blocking ICAM-1 Expression. **Anticancer Research**, Greece, v.29, n.1, p.355-362, Jan. 2009.

PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A.; TARE, M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, London, v.49, p.509-514, Jun. 2004.

PAULO, M.; SALVADOR, M. M., FILHO, M. A. N., MONTES, M. B. A., FRANCESCHINI, S. A., TOLOI, M. R. T. Effect of isoflavone extracts from Glycine max on human endothelial cell damage and on nitric oxide production. **Menopause**, New York, v.16, issue 3, p.539-544, May 2009.

PIROLA, L.; FROJDO, S. Resveratrol: one molecule, many targets. **Life**, Chicago, v.60, issue 5, p.323-332, May 2008.

QIAN, Y. P., CAI, Y., FAN, G. J., WEI, Q. Y., YANG, J., ZHENG, L. F., LI, X. Z., FANG, J. G., ZHOU, B. Antioxidant-Based Lead Discovery for Cancer Chemoprevention: The Case of Resveratrol. **Journal of Medical Chemistry**, v.52, issue 7, p.1963-1974, 2009.

RAHIMIAN, R.; CHAN, L.; GOEL, A.; POBURKO, D.; VAN BREEMEN, C. Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Gulf Breeze, v.322, s. 2, p.373–379, Sep. 2004.

RAJDL, D.; RACEK, J.; TREFIL, L.; SIALA, K. Effect of white wine consumption on oxidative stress markers and homocysteine levels. **Physiological Research**, Prague, v.56, s.2, p.203-212, Mar. 2006.

REILLY, M.; FITZGERALD, G.A. Cellular activation by thromboxane A₂ and other eicosanoids. **European heart journal**, London, v.K, p.88-93, Dec. 1993.

ROBB, E. L.; PAGE, M. M.; WIENS, B. E.; STUART, J. A. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 367, p.406-412, Mar. 2008.

SACHIDANANDAM, K.; FAGAN, S. C. Y.; ERGUL, A. Oxidative Stress and Cardiovascular Disease: Antioxidants and Unresolved Issues. **Cardiovascular Drug Reviews**, Brandford, v.23, s.2, p.115-132, Jun. 2005.

SACKS, F. M. Dietary Phytoestrogens to Prevent Cardiovascular Disease: Early Promise Unfulfilled. **Circulation**, Dallas, v.111, Issue 4, p.465-471, Feb. 2005.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, A.; ALVES, O. C.; MALLMANN, A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de Resveratrol em Sucos de Uva no Brasil, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol.25(3), p.437-442, Sep. 2005.

SCHMITT, C. A.; HANDLER, N.; HEISS, E.H.; ERKER, T.; DIRSCH, V. M. No evidence for modulation of endothelial nitric oxide synthase by the olive oil polyphenol hydroxytyrosol in human endothelial cells. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.195, issue 1, p.e58-e64, Nov. 2007.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v.16, n. 8, p.449–466, Aug. 2005.

SLOW, R. C. M.; LI, F. Y. L.; ROWLANDS, D. J.; DE WINTER, P.; MANN, G. E. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: Transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. **Free Radical Biology & Medicine**, Tarrytown, v.42, n.7, p.909–925, Apr. 2007.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; MORABITO, N.; CRISAFULLI, A.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; RUGGERI, P.; CAMPO, G. M.; CALAPAI, G.; CAPUTI, A. P.; SQUADRITO, G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.2, p. 339-347, Aug. 2002.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; CRISAFULLI, A.; SAITTA, A.; CUCINOTTA, D. Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. **The American journal of medicine**, New York, v.11, p.470-476, Apr. 2003.

STANKEVICIUS, E.; KEVELAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina**, Kaunas, v.39, p.333-341, Jun. 2003.

TATLIDEDE, E.; SEHIRLI, O.; VELIOĞLU-OĞÜNC, A.; CETINEL, S.; YEĞEN, B. C.; YARAT, A.; SÜLEYMANOĞLU, S.; SENER, G. Resveratrol treatment protects

against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. **Free Radical Research**, Yverdon, v.43, issue 3, p.195-205, Mar. 2009.

TURKO, I.V.; MARCONDES, S.; MURAD, F. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase. **American Journal of Physiological Heart Circulation Physiology**, v.281, Issue 6, p.2289-2294, Dec. 2001.

VIEIRA DE ALMEIDA, L. M.; PIÑEIRO, C. C.; LEITE, M. C.; BROTESE, G.; LEAL, R. B.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C. A. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocytes cultures. **Neurochemistry Research**, New York, v.33, issue 1, p.8-15, Jan. 2008.

VOETSCH, B.; JIN, R. C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. **Histochemistry and cell biology**, Berlin, v.122, p.353-367, Aug. 2004.

VYAS, R.; RAVAL, K. V.; DIKSHIT, N. EFFECT OF RAJA YOGA MEDITATION ON THE LIPID PROFILE OF POST-MENOPAUSAL WOMEN, **Indian Journal of Physiology & Pharmacology**, New Delhi , v.52, n.4, p. 420–424, Oct. 2008.

WALLENBORG, K., VLACHOSB, P., ERIKSSONC, S., HUIJBREGTSA, L., ARNÉRC, E. S. J., JOSEPHB, B., HERMANSONA, O. Red wine triggers cell death and thioredoxin reductase inhibition: Effects beyond resveratrol and SIRT1. **Experimental Cell Research**, v.315, issue 8, p.1360-1371, May 2009.

WALLERATH, T.; DECKERT, G.; TERNES, T.; ANDERSON, H.; LI, H.; WITTE, K.; FÖRSTERMANN, U. Resveratrol, a Polyphenolic Phytoalexin Present in Red Wine, Enhances Expression and Activity of Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Circulation**, Dallas, v.106, issue 13, p.1652-1658, Sep. 2002.

WANG, B.; PENG, L.; ZHU, L.; REN, P. Protective effect of total flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid on human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, New York, v.60, p.36-40, Oct. 2007.

WOLIN, M. S. Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. **Microcirculation**, New York, v.3, p.1-17, Mar. 1996.

WU, K.K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. **Advanced Pharmacology**, Kentucky, v.33, p.179–207, 1995.

XU, X.; DUNCAN, A. M.; WANGEN, K. E.; KURZER, M. S. Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, Philadelphia, v. 8, p. 781-786, Aug. 2000.

YEN, G-C.; DUH, P-D.; LIN, C-W. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radical Research**, Yverdon, v.37, issue 5, p.509-514, May 2007.

ZERN, T.L.; FERNANDEZ, M.L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.135, p. 2291-2294, Oct. 2005.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE GRÁFICOS	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 ENDOTÉLIO VASCULAR.....	3
2.2 FATORES DERIVADOS DO ENDOTÉLIO.....	4
2.2.1. ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	4
2.2.2. PROSTAGLANDINA.....	6
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	8
2.4 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	10
2.5 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	11
2.6 OS ESTRÓGENOS E O ENDOTÉLIO VASCULAR.....	12
2.7 POLIFENÓIS.....	14
2.8 RESVERATROL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	16
2.9 AÇÃO ANTIOXIDANTE DO RESVERATROL.....	20
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.a. SISTEMA DE CULTURA DE CÉLULAS	26
4.a.i. LINHAGEM CELULAR	26
4.a.ii. CULTURA DE CÉLULAS.....	26
4.b. GRUPO EXPERIMENTAL	27
4.c. PARÂMETROS INVESTIGADOS PROPOSTOS	27
4.c.i. MEDIDA DA VIABILIDADE CELULAR	27
4.c.ii. PROTEÇÃO DO RESVERATROL CONTRA O DANO OXIDATIVO DO H₂O₂ PELO ENSAIO MTT	29
4.c.iii. DOSAGEM DA QUANTIDADE DE NO PRODUZIDA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	30

4.c.iv. DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) PELO MÉTODO ELISA	31
4.c.v. ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO CONTEÚDO DO DNA EM ECV304 POR CITOMETRIA DE FLUXO	31
4.c.vi. ENSAIO DE ADESÃO DE NEUTRÓFILOS A MONOCAMADAS DE CÉLULAS ECV304 PRÉ-TRATADAS OU NÃO COM RSV	32
4.d. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS.....	34
5.a. VIABILIDADE CELULAR DAS ECV304 PERANTE A SUBSTANCIA DILUENTE DO RESVERATROL – DMSO	34
5.b. VIABILIDADE CELULAR DAS ECV304 PERANTE AS DROGAS DE TRATAMENTO.....	35
5.c. EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO DO H2O2 ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT..	36
5.d. DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE NO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	38
5.e. DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA E2 PELO MÉTODO ELISA	40
5.f. ENSAIO DE ADESÃO DE NEUTRÓFILOS À MONOCAMADA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS ECV304 PRÉ-TRATADAS OU NÃO COM RESVERATROL	41
5.g. ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO CONTEÚDO DO DNA EM ECV304 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
6. DISCUSSÃO	44
6.1 EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H2O2) ..	44
6.2 EFEITOS DO RESVERATROL NA PRODUÇÃO DE NO.....	45
6.3 PRODUÇÃO DE PGE2 – EFEITO DO RESVERATROL.....	48
6.4 AÇÃO DO POLIFENOL RESVERATROL NAS MOLÉCULAS DE ADESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS	49
6.5 ALTERAÇÃO NO CONTEÚDO DO DNA	51

7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ERRATA

Dissertação: **SALVADOR, M.M. Efeitos do polifenol resveratrol na síntese de fatores vasoativos derivados do endotélio em células endoteliais humanas da linhagem ECV304**

Página 08 – Na primeira linha, onde se lê PGE₂ leia-se PGH₂

Página 37 – No gráfico 3, faltou a explicação da significância representada pelos três asteriscos: ***p<0,001

Página 50 – No quarto parágrafo, terceira linha, onde se lê Figura 2 leia-se Figura 3.

PMA – *phorbol myristate acetate* (potente ativador de endotélio)