

# Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutathione e sugli enzimi ad esso correlati

Claudio Giovannini, Carmela Filesi, Massimo D'Archivio,  
Beatrice Scazzocchio, Carmela Santangelo e Roberta Masella

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** I polifenoli comprendono una grande varietà di composti, presenti in alimenti di origine vegetale, con evidenti proprietà antiossidanti *in vitro*. La maggior parte delle loro attività biologiche sono state, finora, attribuite alla capacità di agire da riducenti, ma si stanno accumulando evidenze che i polifenoli possono esercitare molti altri effetti specifici, ancora non del tutto conosciuti. È altresì nota l'esistenza di una stretta correlazione tra antiossidanti endogeni ed esogeni che agiscono in modo strettamente coordinato. In questa rassegna abbiamo raccolto i dati più recenti sugli effetti che i polifenoli esercitano sul glutathione e sugli enzimi ad esso correlati. Dati sperimentali dimostrano che i polifenoli determinano un rafforzamento delle difese antiossidanti endogene e che questo potenziamento si ottiene attraverso l'attivazione degli elementi di risposta antiossidante (*antioxidant responsive elements*, ARE), coinvolti nella induzione di enzimi antiossidanti e detossificanti.

*Parole chiave:* polifenoli, glutathione, antiossidanti, fattori di trascrizione.

**Summary** (*Polyphenols and endogenous antioxidant defences: effects on glutathione and glutathione-related enzymes*). Among diet antioxidants, polyphenols, naturally occurring in vegetables, fruits and plant-derived beverages such as tea, red wine, and extra virgin olive oil, are the most abundant ones. *In vitro* cell culture experiments have shown that polyphenols possess antioxidant properties, and it is thought that these activities can contribute to the prevention of several oxidative stress-associated diseases. It has however become clear that the mechanisms of action of polyphenols go beyond their intrinsic reducing capabilities, being able to exert other additional effects that are as yet poorly understood. This article gives an overview of the most recent data on the subject and describe the additional functions that polyphenols can have in biological systems, focusing on their effects on glutathione and its related enzymes. Evidence is provided of a tight connection between exogenous and endogenous antioxidants that appear to act in a coordinated fashion. Experimental data indicate that polyphenols may offer an indirect protection by activating endogenous defense systems. It is reasonable to hypothesize that this is achieved, at least in part, through antioxidant responsive elements (ARE) present in the promoter regions of many of the genes inducible by oxidative and chemical stress. The latest studies strongly suggest that dietary polyphenols can stimulate antioxidant enzyme transcription through ARE.

*Key words:* polyphenols, glutathione, antioxidants, transcription factors.

## INTRODUZIONE

Le reazioni di ossidazione fanno parte delle reazioni del metabolismo cellulare aerobico, essendo l'ossigeno l'accettore finale nella catena di trasporto di elettroni che porta alla formazione di ATP a livello del mitocondrio [1]. Durante il flusso di elettroni lungo la catena di trasporto mitocondriale alcuni elettroni possono reagire direttamente con l'ossigeno dando origine alle cosiddette specie reattive dell'ossigeno (ROS) [2]. In condizioni normali le ROS si formano all'interno delle cellule sia durante tale processo che

per azione d'enzimi come la xantina ossidasi, le lipossigenasi e le ciclossigenasi [3]. La loro formazione può anche essere conseguenza della biotrasformazione di composti estranei, tossine o farmaci, per opera della citocromo P-450 monoossigenasi, o può avvenire in seguito all'esposizione a fattori ambientali come alte concentrazioni di sali di ferro o radiazioni UV, che porta alla perossidazione lipidica [4]. Un'altra fonte di ROS sono i macrofagi e i granulociti neutrofili, cellule specializzate nell'eliminazione di microrganismi estranei, le quali contengono enzimi, come il sistema

enzimatico della NADPH-ossidasi, capaci di generare il radicale superossido e il perossido d'idrogeno [5]. Le ROS possono risultare molto dannose, infatti sono in grado di ossidare le macromolecole biologiche, come i lipidi, le proteine e il DNA, determinando alterazioni delle membrane, inattivazione d'enzimi e recettori, modificazione di proteine del citoscheletro e danni al genoma [6, 7]. Quando la concentrazione cellulare delle ROS eccede le capacità antiossidanti della cellula stessa, l'equilibrio redox intracellulare viene alterato e s'instaura una condizione di stress ossidativo [8]. Lo stress ossidativo sembra avere un ruolo centrale nella patogenesi dell'invecchiamento e di diverse malattie degenerative come l'arteriosclerosi, le malattie cardiovascolari, il diabete di tipo 2 e il cancro [9-11].

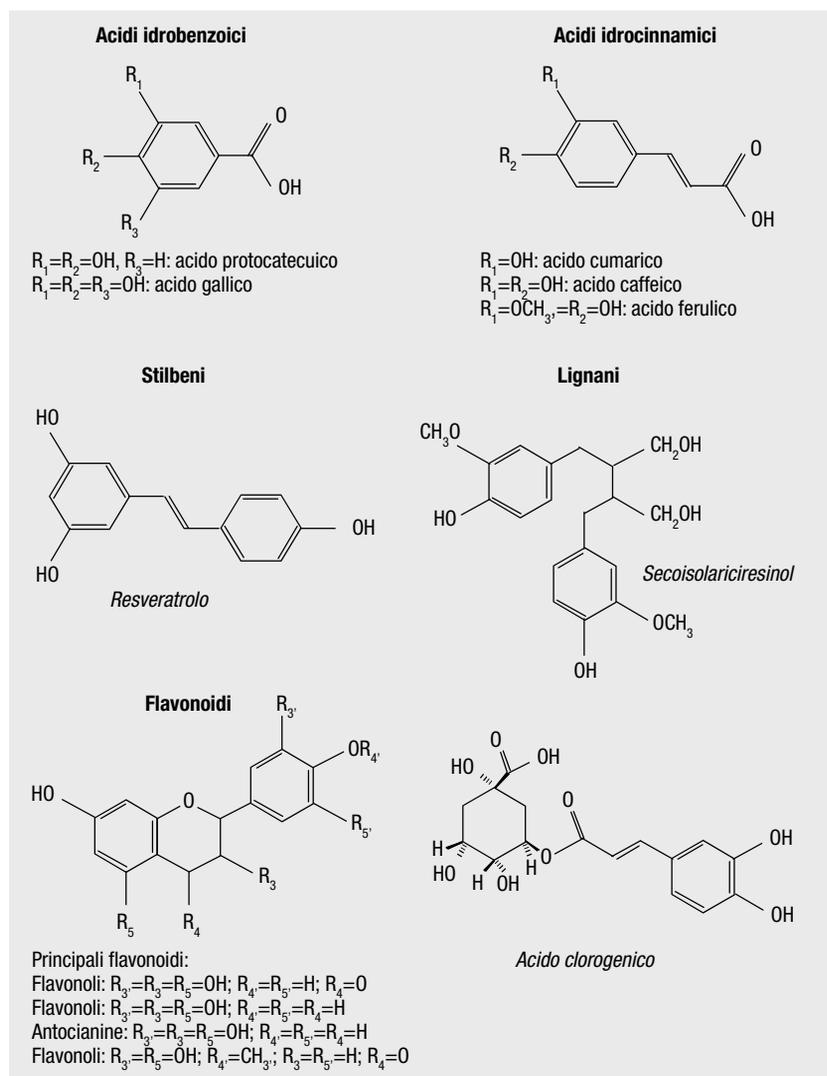
Per far fronte ad un eccesso di produzione di radicali liberi, l'organismo umano ha sviluppato sofisticati meccanismi allo scopo di mantenere l'omeostasi redox, aumentando l'eliminazione dei radicali o bloccandone la produzione. Essi comprendono difese antiossidanti endogene, enzimatiche e non, alle quali si affiancano difese esogene, per lo più rappresentate da antiossidanti

assunti con la dieta [12-14]. Tra questi ultimi, i polifenoli naturali sono stati largamente oggetto di studio, non solo per le loro forti capacità antiossidanti ma anche, recentemente, per altre proprietà che conferiscono loro la capacità di modulare diverse attività cellulari. In questa sede si prenderanno in rassegna gli studi più recenti sull'argomento, focalizzando l'attenzione sui rapporti fra polifenoli e difese antiossidanti endogene rappresentate dal glutazione e dagli enzimi ad esso correlati.

## ANTIOSSIDANTI ESOGENI

Molte sostanze presenti in natura nei vegetali hanno la capacità di reagire con i radicali liberi. Alcune di esse interrompono le reazioni a catena che portano alla formazione di ulteriori radicali, impedendo così la propagazione del danno cellulare; altre svolgono una funzione di *scavenger* delle ROS, ossidandosi a loro volta e richiedendo di essere rigenerate per riacquistare la loro funzione [15-22].

I polifenoli, presenti in alimenti di origine vegetale, quali frutta verdura, olio, vino, tè, cioccolato ed altri prodotti



**Fig. 1** | Struttura chimica dei polifenoli.

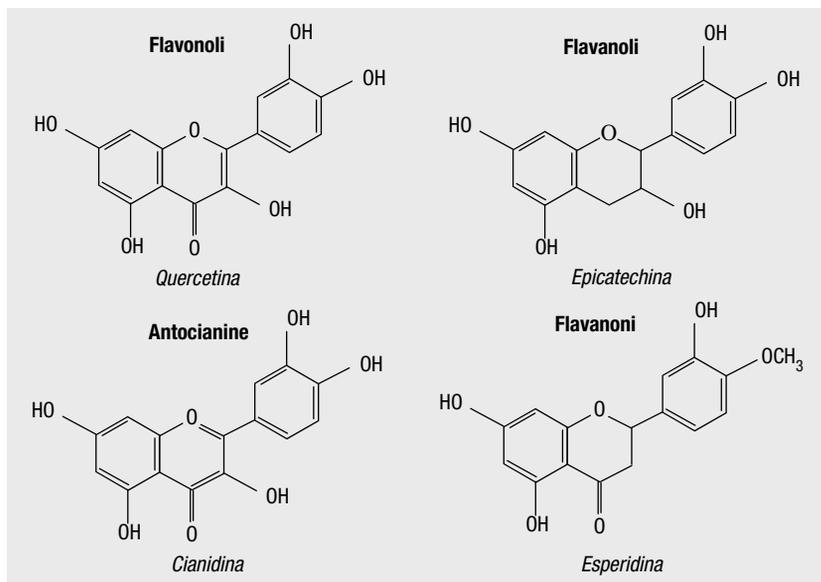


Fig. 2 | Esempi di struttura chimica dei principali flavonoidi.

a base di cacao [23], costituiscono un gruppo molto ampio ed eterogeneo di composti suddivisi in classi (Figura 1), quali acidi idrossibenzoici, acidi idrossicinnamici, stilbeni, lignani e flavonoidi, questi ultimi a loro volta, suddivisi in antocianine, flavonoli, flavoni, flavanoli, flavanoni ed isoflavoni (Figura 2). Sebbene la biodisponibilità di questi composti rappresenti un problema che ancora non ha trovato una risposta univoca e convincente, studi epidemiologici hanno evidenziato che, all'aumento del consumo di polifenoli, si associa una riduzione del rischio di malattie cardiovascolari, di tumori e di disordini neurodegenerativi [24-29], suggerendo che gli effetti benefici siano da attribuirsi, soprattutto, alla capacità dei polifenoli di combattere lo stress ossidativo che caratterizza e accomuna queste patologie.

Il loro potere antiossidante dipende dal numero di anelli fenolici, dal numero e posizione di gruppi idrossilici e di doppi legami presenti nella molecola, ed è determinato in particolare dalla presenza di un anello-B diidrossilato (gruppo catecolico), di un'insaturazione in posizione 2,3 associata ad una funzione 4-carbonilica nell'anello -C e di gruppi funzionali capaci di chelare i metalli di transizione [30, 31]. Inoltre, le differenze strutturali determinano differenze nella biodisponibilità di questi composti, sia in termini di diverso assorbimento nel tratto gastroenterico che di metabolismo e di capacità di distribuzione in tessuti e organi. In base alla loro maggiore o minore capacità di proteggere dal danno ossidativo le macromolecole, all'interno di ogni classe di polifenoli è stata stabilita una gerarchia tra i vari composti [32-37]. Oltre alla classica azione antiossidante sono state descritte anche azioni proossidanti dei polifenoli [38], che possono, quindi, avere effetti opposti sui processi fisiologici cellulari di base. Infatti, se da un lato, come antiossidanti, possono migliorare la sopravvivenza cellulare, dall'altro, come proossidanti, possono indurre apoptosi, necrosi o arresto della proliferazione [39]. Le proprietà antiossidanti sono state considerate per molto tempo la principale

funzione dei polifenoli [40], ma, alla luce di nuovi dati sperimentali, questo sembra essere un modo troppo semplice e riduttivo di considerare la loro attività [41].

Nei sistemi biologici complessi, i polifenoli possono avere una serie di effetti non ascrivibili alla sola attività antiossidante [42-44]. Questa argomentazione è sostenuta per lo meno da due osservazioni. Innanzi tutto essi vengono metabolizzati *in vivo* originando spesso sostanze che perdono il potenziale antiossidante originale. Inoltre le loro concentrazioni e quelle dei loro metaboliti, nel plasma o nei tessuti, sono molto basse rispetto a quelle di altri antiossidanti, come l'acido ascorbico e l' $\alpha$ -tocoferolo, rendendo improbabile che i polifenoli possano competere con essi [45-48]. Viceversa tali concentrazioni potrebbero consentire loro di avere attività farmacologiche e di modulare varie funzioni cellulari. È stato infatti dimostrato che i polifenoli sono in grado di modulare l'espressione e/o l'attività di enzimi come telomerasi [49], ciclossigenasi [50-52], lipossigenasi [53, 54], xantina ossidasi [55], metalloproteinasi [56, 57], enzima di conversione dell'angiotensina [58], protein chinasi [59, 60]; di interagire con le vie di trasduzione del segnale [61-63], con i recettori cellulari [64, 65], con le vie apoptotiche caspasi-dipendenti [66-68], con la regolazione del ciclo cellulare [69], e con l'induzione di enzimi detossificanti [70]. Essi inoltre sono in grado di aumentare la produzione di vasodilatatori, come l'ossido nitrico [71, 72]; influenzare la funzione delle piastrine [73] e competere con il glucosio nel trasporto attraverso la membrana [74].

#### DIFESA ANTIOSSIDANTI ENDOGENE: GLUTATIONE ED ENZIMI AD ESSO CORRELATI

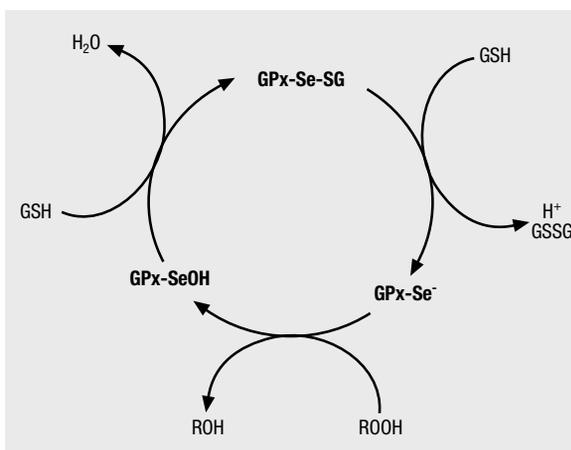
Enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi, la tioredoxina riduttasi e la perossiredoxina, convertono le ROS in composti meno dannosi [75-79]. Questi enzimi, nel loro com-

plesso, rappresentano una prima linea di difesa che ha un'enorme importanza nel limitare i danni prodotti dalle ROS, sia a carico dei fosfolipidi di membrana che delle macromolecole biologiche. Questi stessi enzimi, però, nello svolgere la loro azione protettiva, non garantiscono una completa copertura dal danno, perché alcuni composti generati dall'interazione con le ROS sono altamente reattivi. È, quindi, necessaria un'azione di detossificazione di tali prodotti per impedire ulteriori danni intracellulari. Questa seconda linea di difesa è rappresentata da enzimi come la glutazione perossidasi (GPx), la glutazione S-transferasi (GST), la aldo-cheto-reduttasi e l'aldeide deidrogenasi [80-82]. I metaboliti prodotti da questi enzimi nell'azione di detossificazione vengono eliminati dalla cellula nel liquido extracellulare attraverso pompe di efflusso, come ad esempio il trasportatore del glutazione S-coniugato [83].

Il glutazione, coinvolto in entrambe le linee di difesa contro le ROS, riveste un ruolo centrale [84]. Il tripeptide  $\gamma$ -glutamylcisteinglicina o glutazione (GSH) è, infatti, il regolatore non enzimatico più importante dell'omeostasi redox intracellulare ed è presente ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule a concentrazioni millimolari [85]. Questo tripeptide, contenente cisteina, esiste sia in forma ridotta (GSH) che in forma ossidata (GSSG), meglio indicata come glutazione bisolfuro, e prende parte alle reazioni redox grazie all'ossidazione reversibile dei suoi gruppi tiolici attivi [86, 87]. Nella cellula, in condizioni redox normali, la maggior parte del GSH è in forma ridotta ed è distribuito nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri. Oltre che in forma libera, il GSH, mediante un processo chiamato glutationilazione, può anche essere legato covalentemente a proteine, regolandone la funzione o fungendo da coenzima in sistemi enzimatici antiossidanti [88]. Il GSH può quindi agire direttamente da *scavenger* di radicali liberi e di xenobiotici elettrofili, oppure da substrato per le glutazione perossidasi (GPxs) e glutazione S-transferasi (GSTs), durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno, di idroperossidi lipidici e di composti elettrofili.

Le glutazione perossidasi costituiscono una famiglia di enzimi contenenti selenio capaci di ridurre idroperossidi, sia organici che inorganici, nei corrispondenti composti idrossilici, utilizzando il GSH e/o altri equivalenti riducenti. Durante il ciclo catalitico il selenio viene ossidato dall'idroperossido ad un derivato dell'acido selenico; questo prodotto intermedio è successivamente ridotto dal donatore di elettroni. In presenza di GSH si forma un legame tra il selenio e lo zolfo, che viene poi rotto da una seconda molecola di GSH producendo GPx ridotta (Figura 3). Durante questo processo catalitico, lo stato di ossidazione dell'enzima dipende dalla concentrazione relativa del substrato ridotto (GSH) e di quello ossidato (idroperossidi).

Sono note diverse isoforme della GPx, tessuto- o substrato-specifiche [89]. Gli isoenzimi identificati possono essere, inoltre, distinti per localizzazione cellulare ed extracellulare. Esempio di isoenzima tessuto-specifico è rappresentato dalla GPx presente nel tratto gastroenterico, localizzata nel citoplasma degli



**Fig. 3** | *Ciclo catalitico della glutazione perossidasi. Durante il ciclo catalitico della glutazione perossidasi, il selenio viene ossidato dall'idroperossido ad un derivato dell'acido selenico; questo prodotto intermedio è successivamente ridotto dal donatore di elettroni. In presenza di GSH si forma un legame tra il selenio e lo zolfo, che viene poi rotto da una seconda molecola di GSH producendo GPx ridotta. Modificato da: [82].*

enterociti, che ha un ruolo importante nella difesa dagli idroperossidi derivanti dalla dieta o dal metabolismo di sostanze xenobiotiche ingerite. Un esempio di isoenzima substrato-specifico è, invece, rappresentato dalla GPx specifica per gli idroperossidi fosfolipidici. I diversi isoenzimi potrebbero avere una funzione nel mantenimento, in distretti diversi, di un adeguato livello di idroperossidi, coinvolto nel signalling cellulare ed in risposte cellulari come apoptosi, proliferazione e produzione di citochine [90].

Nell'uomo e nei mammiferi sono state identificate e caratterizzate 7 diverse classi di glutazione S-transferasi appartenenti ad un'unica famiglia di enzimi solubili citosolici e, solo recentemente, sono state identificate altre due famiglie di enzimi a localizzazione rispettivamente mitocondriale e microsomale (MAPEG) [91]. Tutte le GSTs hanno la funzione di detossificare sostanze xenobiotiche dannose, come sostanze chimiche cancerogene, sostanze inquinanti ambientali e agenti antitumorali. Tali enzimi svolgono, inoltre, un'azione protettiva contro sostanze potenzialmente tossiche prodotte nella cellula in seguito all'esposizione a contaminanti ambientali o al consumo di cibi cotti alla brace o contaminati con micotossine, o di acqua inquinata [91]. Le GSTs esercitano queste azioni protettive grazie alla loro capacità di catalizzare la coniugazione del GSH con i prodotti finali dell'ossidazione e rappresentano una seconda linea di difesa contro l'ampio spettro di sostanze tossiche prodotte dalle reazioni mediate dalle ROS.

L'attività sia delle GPxs che delle GSTs comporta un abbassamento del livello totale del GSH intracellulare ed un aumento del GSSG. Questo aumento è potenzialmente molto citotossico, in quanto porta alla formazione di ponti disolfuro nelle proteine cellulari. Al fine di mantenere costante il rapporto GSH/GSSG, il GSSG

viene rilasciato dalla cellula e degradato nell'ambiente extracellulare. Durante le reazioni mediate dalle GST, inoltre, il GSH si coniuga a varie sostanze elettrofile, e gli addotti così formati vengono secreti attivamente dalla cellula, con ulteriore deplezione di GSH se la concentrazione della sostanza elettrofila è maggiore della capacità di risintesi. Il GSH cellulare può essere rigenerato in seguito a riduzione del GSSG formatosi, oppure sintetizzato *ex novo*.

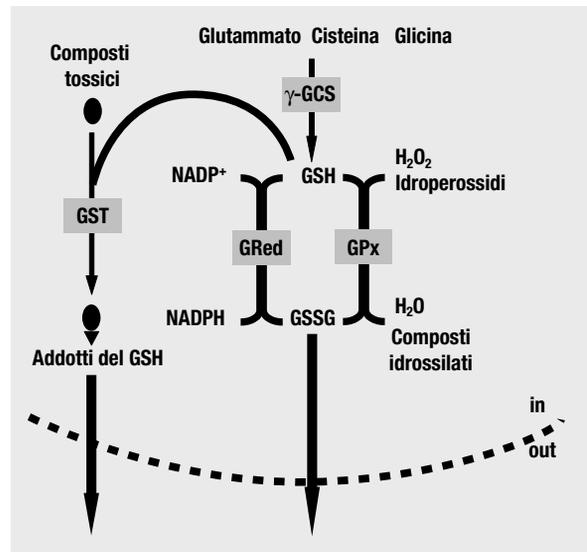
La riduzione del GSSG a GSH è catalizzata dalla glutatione reduttasi (GRed), che utilizza come agente riducente il NADPH, prodotto dal ciclo dei pentoso fosfati, ed è quindi dipendente dalla efficienza di tale via metabolica [92]. La glutatione reduttasi è un flavoenzima, codificato nell'uomo da un singolo gene. È stato osservato che l'esposizione ad agenti che inducono stress ossidativo porta ad un aumento della trascrizione dell'enzima. Dati sperimentali hanno dimostrato l'importanza dell'attività della GRed nel metabolismo del GSH e delle reazioni di difesa GSH-dipendenti; la sua attività viene regolata in risposta allo stress, e alcuni polimorfismi, che modificano tale attività, hanno conseguenze deleterie sulla efficienza del ciclo del GSH [93].

Il GSH viene sintetizzato *ex novo* attraverso due reazioni sequenziali, ATP-dipendenti, catalizzate rispettivamente dalla  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasi ( $\gamma$ GCS), la cui attività limita la velocità di sintesi, e dalla glutatione sintetasi. Altri fattori che intervengono nella regolazione della sintesi del GSH sono la disponibilità di cisteina e la concentrazione stessa di GSH che funge, con un meccanismo di feedback negativo, da inibitore dell'attività della  $\gamma$ GCS [94].

In conclusione si può dire che la presenza di GSH è essenziale, ma non di per sé sufficiente, a prevenire la citotossicità delle ROS, data la fondamentale importanza degli enzimi glutatione-dipendenti nelle reazioni di prima e seconda linea di difesa (Figura 4).

#### POLIFENOLI ED ENZIMI DEL CICLO DEL GSH

Molti dati sperimentali dimostrano che sistemi cellulari, trattati con polifenoli, presentano un aumento della concentrazione di GSH e delle attività enzimatiche ad esso correlate, in particolare della  $\gamma$ GCS, della GRed, della GPx e della GST [95-100]. Dall'analisi di questi lavori si possono trarre interessanti indicazioni, prima fra tutte che esiste una sorta di selettività di azione dei polifenoli, i quali sembrano agire in maniera diversa su attività enzimatiche diverse. Si è dimostrato, per esempio, che il trattamento con resveratrolo di cardiomiociti H9C2 determina un aumento della concentrazione di GSH e dell'attività di GRed e GST ma non ha effetti sull'attività della GPx [101]. Un'altra osservazione interessante è che gli effetti osservati sono fortemente dipendenti dalla struttura chimica del polifenolo e dal sistema cellulare utilizzato. Questo è ben esemplificato da uno studio condotto su cellule PC12 [102], nelle quali il trattamento con  $Pb^{2+}$  determina una forte citotossicità accompagnata dalla riduzione della con-



**Fig. 4** | Glutazione ed enzimi correlati. Il GSH può eliminare direttamente i radicali liberi o funzionare da substrato per la glutatione perossidasi (GPx) e la glutatione-S-trasferasi durante la detossificazione dei perossidi di idrogeno, idroperossidi organici (lipidici) e composti elettrofili. Durante le reazioni mediate dalla GST, il GSH viene coniugato con diversi composti elettrofili e gli addotti del GSH, così formati, vengono secreti attivamente dalla cellula. Le reazioni mediate dalla GPx portano alla ossidazione del GSH con conseguente aumento della forma glutatione bisolfuro (GSSG). Il GSSG formatosi può 1) formare ponti disolfuro con proteine cellulari; 2) essere rilasciato da parte della cellula per mantenere costante il rapporto intracellulare GSH/GSSG; 3) essere ridotto di nuovo a GSH ad opera della glutatione reduttasi (GRed), che utilizza il NADPH come riducente. La perdita complessiva di GSH, che ne risulta, può essere contrastata dalla sintesi *de novo* di GSH attraverso due reazioni sequenziali, dipendenti dall'ATP, catalizzate dalla  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasi ( $\gamma$ GCS), la cui attività limita la velocità di sintesi, e dalla glutatione sintetasi.

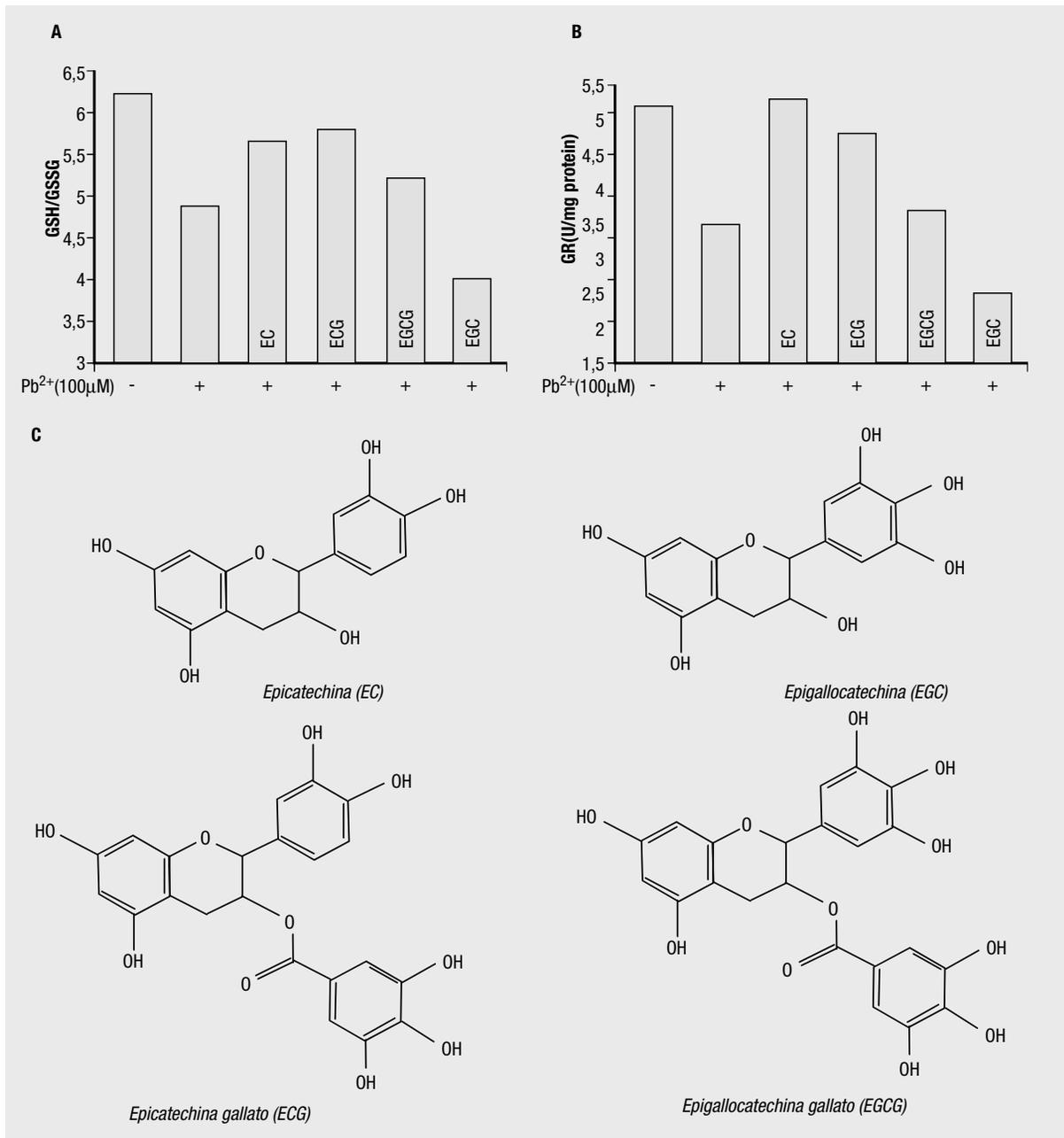
Modificato da: Masella R et al. *J Nutr Biochem* 2005;16:577

centrazione del GSH e dell'attività della GRed. Il trattamento di queste cellule con catechine contenute nel tè, strutturalmente differenti fra loro, produceva effetti diversi sulla citotossicità indotta da  $Pb^{2+}$ , a seconda del tipo di catechina utilizzato. La epicatechina e l'epicatechina gallato mantenevano i livelli di GSH comparabili a quelli del controllo attraverso il mantenimento dell'attività della GRed; la epigallocatechina mostrava addirittura un effetto proossidante e la epigallocatechina gallato non aveva invece alcun effetto apprezzabile (Figura 5). Questa catechina, invece, esercitava un effetto protettivo nei confronti dei danni causati da xenobiotici tossici in epatociti di ratto [97].

Effetti dei polifenoli sulle attività enzimatiche correlate al glutatione, in particolare sulla GPx, sono stati dimostrati anche in studi *in vivo*, sia in modelli animali che nell'uomo [103-106].

Uno dei meccanismi attraverso i quali i polifenoli esercitano tali effetti sembra essere un'azione diretta sull'espressione genica degli enzimi.

Studi da noi condotti hanno dimostrato che l'oleuropeina e l'acido protocatecuico, composti fenolici con-



**Fig. 5** | Relazione tra struttura chimica ed effetto dei polifenoli. Effetto di Epicatechina, Epicatechina gallato, Epigallocatechina, Epigallocatechina gallato sulla tossicità indotta da Pb<sup>2+</sup> in cellule PC 12. A) Effetto delle catechine sulla diminuzione del rapporto GSH/GSSG indotta da Pb<sup>2+</sup>. B) Effetto delle catechine sulla riduzione dell'attività della glutazione reduttasi indotta da Pb<sup>2+</sup>. C) Struttura chimica delle catechine. I risultati rappresentati in A e B sono tratti da [102].

tenuti nell'olio extra vergine di oliva, aumentano significativamente le attività della GRed e, soprattutto, della GPx in macrofagi murini J774 A.1 e che tale aumento è collegato alla capacità di questi biofenoli di indurre direttamente la trascrizione della GRed e ancor più della GPx [107]. Le nostre osservazioni sono in accordo con precedenti studi *in vitro* condotti per valutare le attività antitumorali e antitrombotiche esercitate dai polifenoli [108-111]. A conferma di ciò, un interessante studio condotto con microarrays su linee cellulari modificate

di prostata umana, LNCaP e PC-3, ha dimostrato che gli isoflavoni della soia, in particolare la genisteina, possono modulare positivamente diversi geni tra cui, in particolare, il gene della GPx [112]. D'altra parte l'attività antitumorale, dimostrata da diversi polifenoli, potrebbe essere dovuta non solo al rafforzamento delle difese antiossidanti endogene e alle attività detossificanti [113], ma anche alle funzioni estrogeniche/antiestrogeniche, antiproliferative e proapoptotiche, nonché ai cambiamenti indotti nel signalling cellulare e nella regolazione

del sistema immunitario [70]. Inoltre, alcuni studi indicano nell'induzione della glutatione S-transferasi uno dei principali meccanismi antitumorali dei polifenoli che condividono la struttura 1,4 difenolica [70, 114].

Dagli studi riportati dalla letteratura emergono risultati contrastanti che rendono conto di quanto sia difficile prevedere gli effetti di ogni singolo polifenolo su una particolare attività cellulare [115], anche perché limitate differenze di struttura possono influenzare, non solo la capacità antiossidante dei singoli composti, ma anche l'abilità di modulare l'espressione di enzimi antiossidanti/detossificanti [116-118].

### ELEMENTI DI RISPOSTA ANTIOSSIDANTE E REGOLAZIONE DEGLI ENZIMI DI FASE II

È ragionevole ritenere che la coordinazione della risposta tra antiossidanti endogeni ed esogeni sia realizzata, almeno in parte, attraverso i cosiddetti elementi di risposta antiossidante o *antioxidant responsive elements* (ARE), sequenze geniche localizzate nel sito del promotore di alcuni geni indotti da stress ossidativo e chimico.

Gli enzimi di fase II sono responsabili della detossificazione finale di un composto esogeno, o di un metabolita derivante da altre reazioni enzimatiche, attraverso reazioni di coniugazione covalente con molecole endogene generalmente polari, rendendo i coniugati così ottenuti facilmente eliminabili. L'attivazione della trascrizione di diversi enzimi, tra cui enzimi antiossidanti e detossificanti di fase II (chinone ossidoreduttasi,  $\gamma$ GCS, GST, GRed, GPx, sulfotransferasi, epossido idrolasi ed altre superfamiglie di enzimi e/o di geni antiossidanti) è stata messa in relazione con gli ARE, chiamati anche elementi di risposta agli elettrofilici (EpRE). Gli ARE possono regolare l'espressione costitutiva e/o quella inducibile dei geni coinvolti nella trascrizione di tali enzimi [119, 120]. Le sequenze ARE condividono alcune sequenze di nucleotidi, le cosiddette core sequence, le quali da sole non sono sufficienti a mediare l'induzione e necessitano di una seconda sequenza, simile alla prima ed adiacente ad essa [121]. Ci sono buoni motivi per pensare che le sequenze ARE giochino un ruolo centrale nella regolazione del sistema di difesa cellulare, essendo a loro volta finemente regolate da fattori di trascrizione, come Nrf1 e, soprattutto, Nrf2 (*nuclear related factors* 1 e 2), ubiquitariamente espressi e appartenenti alla superfamiglia caratterizzata da una regione basica contenente uno "zipper" di leucina [122]. Esperimenti condotti mediante elettroforesi su gel hanno dimostrato che la proteina Nrf2 si lega alla sequenza ARE, regolandone positivamente l'attività [123]. L'interazione tra Nrf2 ed ARE coinvolge diversi cofattori di inibizione o di attivazione. Ad esempio la proteina *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), legata all'actina e localizzata nello spazio perinucleare, sequestra l'Nrf2 presente nel citoplasma formando con esso un eterodimero. In tal modo ne impedisce la traslocazione nel nucleo e lo rende quindi incapace di legare ed attivare le sequenze ARE [124, 125]. La modulazione del complesso Keap1-Nrf2 sembra avere un ruolo cen-

trale nella risposta cellulare allo stress ossidativo, anche se ancora rimangono sconosciuti sia il meccanismo esatto di dissociazione dell'Nrf2 dal suo inibitore, sia la via di trasduzione del segnale che va dagli ossidanti al complesso Keap1-Nrf2 [126]. È stato ipotizzato che le ROS ed i composti elettrofilici possano agire come messaggeri [127], presumibilmente attraverso l'attivazione di fattori citosolici, influenzando il rilascio di Nrf2 da Keap1, e la sua successiva traslocazione nel nucleo. Nel comparto nucleare, Nrf2, dopo essersi legato con c-Jun o *Small Maf* o altri partners sconosciuti, induce l'attivazione degli ARE e la conseguente trascrizione dei geni degli enzimi detossificanti [128-131]. Un problema ancora irrisolto è rappresentato dal meccanismo con il quale Nrf2 viene stabilizzato in modo da sfuggire alla inattivazione. La fosforilazione sembra essere un meccanismo fondamentale per la stabilizzazione dell'Nrf2 e può coinvolgere diverse vie di attivazione del segnale di trascrizione, quali quelle dipendenti dall'attivazione delle chinasi *mitogen activated protein kinase* (MAPK), protein chinasi C (PKC) e fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) [132-135]. In seguito all'attività di queste chinasi, Nrf2 trasloca nel nucleo dove si accumula. È quindi, al momento, ipotizzabile che l'attività trascrizionale di Nrf2 sia regolata da vie di signalling multiple, diverse ma convergenti, forse soggette a meccanismi regolatori a monte, che potrebbero anche essere specifici per agente chimico/tossico e per tipo cellulare.

### POLIFENOLI ED ELEMENTI ARE/EpRE

Recentemente sono stati pubblicati da Myhrstad *et al.* [136, 137] dati interessanti che dimostrano come l'aumento dei livelli di GSH in cellule COS-1 e HepG2, trattate con quercetina o con estratti di cipolla, sia dovuto ad un aumento di trascrizione del gene della  $\gamma$ GCS. Ancora più interessanti sono i dati ottenuti dagli stessi autori in cellule transfettate con costrutti di luciferasi, costituiti da frammenti del promotore del  $\gamma$ GCS contenenti sequenze ARE/EpRE, che dimostrano come l'aumento della trascrizione sia mediato dall'attivazione di sequenze ARE presenti nel promotore del gene. Questi risultati sono in accordo con dati ottenuti precedentemente sull'espressione del gene della NAD(P)H-chinone ossidoreduttasi umana in linee cellulari di carcinoma del seno trattate con quercetina [138]. Flavonoidi, proantocianidine, flavonoli e catechine contenuti in estratti di alcune piante caratteristiche delle Mauritius hanno mostrato di avere effetti modulatori sulle attività del promotore di diversi enzimi antiossidanti in cellule dei tubuli renali di scimmia COS7. È interessante notare che, mentre l'attività del promotore della SOD è associata con l'aumento del contenuto dei fenoli, quella della GPx è in relazione inversa con il contenuto delle proantocianidine [139]. È stato anche dimostrato che composti con strutture lievemente diverse possono mostrare notevoli differenze di efficienza nell'induzione di enzimi di Fase II [116, 140]. Nella stessa direzione vanno i risultati ottenuti su linee cellulari HepG2-C8 trattate con cinque differenti catechine ottenute dal tè verde [141]. Tra le catechine, quelle che hanno mostrato un'attività maggiore nell'induzione

dei geni degli enzimi di fase II, attraverso l'attivazione degli ARE, sono state l'epigallocatechina 3-gallato e l'epicatechina 3-gallato, suggerendo che l'efficacia di questi composti sia dovuta al gruppo 3-gallato.

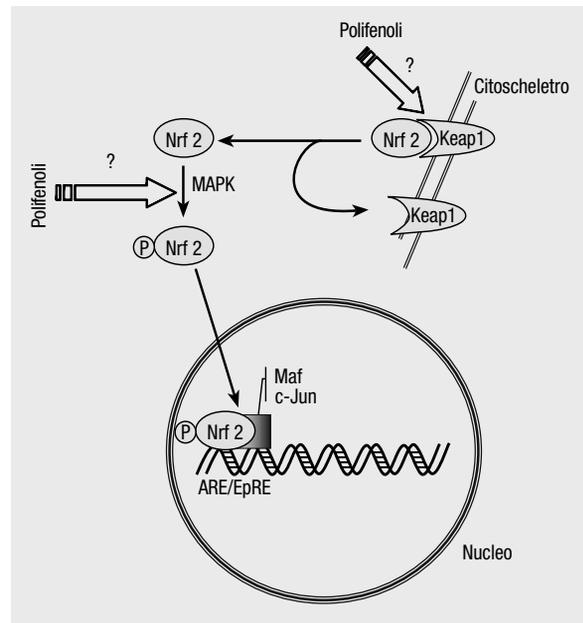
In definitiva, molti dati sperimentali dimostrano che i polifenoli della dieta sono in grado di stimolare la trascrizione dei sistemi di difesa antiossidante e di detossificazione, direttamente attraverso gli ARE.

Un'altra ipotesi potrebbe essere che i polifenoli influenzano l'attivazione degli ARE/EpRE indirettamente, modulando l'attività di Nrf2. Ad esempio i polifenoli potrebbero diminuire la capacità di Keap1 nel sequestrare Nrf2, il quale sarebbe libero di traslocare nel nucleo ed attivare il promotore di vari geni. Questa ipotesi è supportata dall'evidenza che i polifenoli sono in grado di reagire con i gruppi sulfidrilici attivi [142], strettamente correlati con l'induzione enzimatica e l'aumento di GSH [143], modulando in questo modo diverse proteine sensore tra cui il Keap1 [144]. Attraverso l'attivazione delle chinasi MAPK (ERK, JNK e p38), potrebbero invece contribuire alla stabilizzazione di Nrf2 [145]. A sostegno di questa ipotesi è stato dimostrato che i polifenoli estratti dal tè verde stimolano la trascrizione di enzimi di fase II attraverso l'attivazione degli ARE, probabilmente utilizzando la via del signalling delle MAPK [146] (Figura 6). Più recentemente, l'epigallocatechina 3-gallato ha mostrato un forte potere di attivazione su tutte e tre le MAPKs in modo dose- e tempo-dipendente, mentre l'epicatechina 3-gallato agisce sull'attivazione solo di ERK e della p38 [147]. L'attivazione delle MAPKs è stata dimostrata in topi privi di pelo SKH-1, irradiati con raggi UV, in seguito a trattamento topico con i polifenoli del tè verde [110]. Infine il resveratrolo, contenuto nel vino rosso, considerato un componente ad attiva azione cardioprotettiva, aumenta l'attività degli enzimi di fase II [101, 148]. Tale induzione enzimatica è dovuta all'attivazione del Nrf2, probabilmente mediata da MAPKs o PKB/Akt. È stato infatti dimostrato che il resveratrolo è in grado di attivare le MAPKs nel melanoma umano [149] e in cellule epidermiche JB6 di topo [150] e la PKB/Akt in linee cellulari MCF-7 [151].

Il diverso grado di efficienza mostrato dai vari polifenoli indica, d'altra parte, l'esistenza di una forte relazione tra struttura e attività, per ora non completamente dimostrata, che potrebbe essere messa in relazione con la diversa capacità antiossidante di ogni composto, ma anche con la differente capacità di agire da ligandi per recettori ancora sconosciuti. Si deve inoltre tener conto che il grado di stress ossidativo, la concentrazione dei polifenoli, così come la diversità dei sistemi biologici studiati, introducono ulteriori elementi di variabilità nel tipo di risposta osservata.

## Bibliografia

1. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1993;6:1-31.
2. Nohl H, Gille L, Staniek K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2005;69: 719-23.
3. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production on ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys* 2004;23:265-95.
4. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. UV-induced skin damage. *Toxicology* 2003;189:21-39.



**Fig. 6** | Polifenoli e induzione di enzimi di fase II. I polifenoli inducono l'espressione dei geni codificanti per gli enzimi di fase II attraverso le vie intracellulari di attivazione degli ARE/EpRE. I polifenoli possono modificare la capacità di Keap1 di sequestrare l'Nrf2, oppure attivare le MAP chinasi (ERK, JNK e p38), probabilmente coinvolte nella stabilizzazione dell'Nrf2. L'Nrf2 potrebbe così traslocare nel nucleo ed attivare i geni contenenti le sequenze ARE/EpRE nel promotore. Modificato da: Masella R et al. *J Nutr Biochem* 2005;16:577.

## CONCLUSIONI

Alla luce di quanto riportato si può affermare che, sebbene la maggior parte dei polifenoli abbia proprietà antiossidanti, queste ultime da sole non possono spiegare tutti i gli effetti biologici da loro mostrati. Studi recenti suggeriscono la presenza di meccanismi di azione dei polifenoli nella protezione della cellula contro lo stress ossidativo, che potrebbero non dipendere dalle attività riducenti tipiche dell'antiossidante. Tali meccanismi potrebbero riguardare l'interazione con il signalling cellulare e l'influenza sull'espressione genica, con conseguente modulazione di specifiche attività enzimatiche, capaci di guidare la risposta intracellulare contro lo stress ossidativo. È comunque importante sottolineare che la maggior parte degli studi riportati è stata condotta in sistemi *in vitro* ed è quindi necessario avere una conferma dei risultati con studi *in vivo* per un eventuale impiego di tali composti in interventi terapeutici o dietetici.

Ricevuto il 5 ottobre 2005.

Accettato il 27 aprile 2006.

5. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells *FASEB J* 1995;9:200-9.
6. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. ed. Oxford: Clarendon Press; 1999 (Chapter 4).
7. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266:37-56.
8. Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end. *Free Rad Res* 1999;31:261-72.
9. Gutteridge JMC. Free radicals in diseases processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm* 1993;19: 141-58.
10. Kehrer J. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:21-48.
11. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005;10:1881-96.
12. Benzie IFF. Antioxidants: observational epidemiology. In: Sadler MJ, Strain JJ, Cabellero B (Ed.). *The Encyclopedia of human nutrition*. New York: Academic Press; 1999. p. 106-15.
13. Yao LH, Jiang YM; Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum Nutr* 2004;59:113-22.
14. Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. *Br J Nutr* 2005;93:93-9.
15. Halliwell B. Antioxidants and human diseases: a general introduction. *Nutr Rev* 1997;55:S44-52.
16. Gawrieh S, Opana EC, Koch TR. Oxidative stress in non alcoholic fatty liver disease: pathogenesis and antioxidant therapies. *J Invest Med* 2004;52:506-14.
17. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003;189:147-63.
18. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001;8: 797-807.
19. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996;20:933-56.
20. Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radicals scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp* 1995;61:103-16.
21. Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, Van den Berge DA. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol Trace Elem Res* 1995;47:327-31.
22. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leewen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications *Am J Clin Nutr* 2001;74:418-25.
23. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.
24. Huxley RR, Neil HAW. The relation between dietary flavonoid intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:904-8.
25. Hertog MGL, Hollman PCH. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:63-71.
26. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81(Suppl. 1):317S-25S.
27. Sesso HD, Gaziano M, Buring JE, Hennekens CH. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Epidemiol* 1999;149:162-7.
28. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1999;149:943-9.
29. Hertog MG, Bueno de Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, Kromhout D. Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:673-7.
30. Bors W, Michel C, Stettmaier K. Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods Enzymol* 2001;335:166-80.
31. Spencer JPE, Srai SK, Rice-Evans C. Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In: Rice-Evans C, Parker L (Ed.). *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 363-90.
32. Heijnen CGM, Haenen GRMM, Oostveen RM, Stalpers EM, Bas A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: structure activity relationship revisited. *Free Rad Res* 2002;36:575-81.
33. Aviram M, Fuhrman B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis* 1998;137:45-50.
34. Masella R, Cantafora A, Modesti D, Cardilli A, Gennaro L, Bocca A, Coni E. Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Report* 1999;4:113-21.
35. Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R, Carlini EA. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 2000;35:45-54.
36. Masella R, Giovannini C, Vari R, Di Benedetto R, Coni E, Volpe R, Fraone N, Bucci A. Effects of dietary olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids* 2001;36:1195-202.
37. Szeto YT and Benzie IFF. Effects of dietary antioxidants on human DNA *ex vivo*. *Free Rad Res* 2002;36:113-8.
38. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knaemuehler S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J* 2005;19(7): 807-9.
39. Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(Suppl): 284S-91S.
40. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee M, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem* 2002;50:5042-7.
41. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology: terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 2004;558:3-6.
42. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med* 2000;28:463-99.
43. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 2003;17:287-96.
44. Kwon YW, Masutani H, Nakamura H, Ishii Y, Yodoi J. Redox regulation of cell growth and cell death. *Biol Chem* 2003;384:991-6.
45. Donovan JL, Waterhouse AL. Bioavailability of flavanol monomers. In: Rice-Evans C, Parker L (Ed.). *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 413-40.
46. Spencer JPE, Abd El Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys* 2004;423: 148-61.
47. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(Suppl):230S-42S.
48. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II: Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81(Suppl.):243S-55S.

49. Naasani I, Oh-Hashi F, Oh-Hara T *et al*. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanisms for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2003;63:824-30.
50. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRS, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-81.
51. O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2). *Mutat Res* 2004;551:245-54.
52. Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer* 2005;113:660-9.
53. Schewe T, Sadik C, Klotz L-O, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001;382:1687-96.
54. Sadik CD, Sies H, Schewe T. Inhibition of 15-lipoxygenase by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* 2003;65:773-81.
55. Van Hoorn DEC, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PAM, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB, Van Norren K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol* 2002;451:111-8.
56. Isemura M, Saeki K, Minami T *et al*. Inhibition of matrix metalloproteinases by tea catechins and related polyphenols. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:629-31.
57. Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004;110:1861-7.
58. Actis-Goretta L, Ottaviani JJ, Keen CL, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett* 2003;555:597-600.
59. Agullo G, Gamet-Payrastré L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, Payrastré B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1649-57.
60. Gamet-Payrastré L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payrastré B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol* 1999;32:279-86.
61. Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathway *in vitro*. *Antiox Redox Signal* 2001;3:1009-21.
62. Kong An, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res* 2000;23:1-16.
63. Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Modulation of pro-survival Akt/PKB and ERK1/2 signalling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem* 2003;278:34783-93.
64. Rosenkranz S, Knirel D, Dietrich H, Flesch M, Erdmann E, Böhm M. Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the "French Paradox". *FASEB J* 2002;16:1958-60.
65. Mueller So, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci* 2004;80:14-25.
66. Way TD, Kao MC, Lin JK. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett* 2005;579:145-52.
67. Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV, Lopez-Moratalla N, Martínez-Irujo JJ. Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutr Cancer* 2004;50:90-100.
68. Sergeev IN. Genistein induces Ca<sup>2+</sup>-mediated, calpain/caspase-12-dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2004;321:462-7.
69. Fischer PM, Lane DP. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2000;7:1213-45.
70. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 2001;90:157-77.
71. Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidence for cardio-protection. *Life Science* 2003;73:2883-98.
72. Wallerath T, Poleo D, Li H, Fostermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:471-8.
73. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (Teobroma cacao) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1466-73.
74. Vera JC, Reyes AM, Cárcamo JG, Velásquez FV, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, Iribarren R, Scher HI, Slebe JC *et al*. Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter GLUT1. *J Biol Chem* 1996;271:8719-24.
75. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999;31:273-300.
76. Talalay P. Chemoprotection against cancer by induction of phase II enzymes. *Biofactors* 2000;12:5-11.
77. Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000;267:6102-9.
78. Matés J, Pérez-Gomez C, Nùñez De Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595-603.
79. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular Antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37:949-62.
80. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferase. *Chem Res Toxicol* 1997;10:2-18.
81. Brigelius-Flohè R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med* 1999;27:951-65.
82. Kuhn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Rad Biol Med* 2002;33:154-72.
83. Akerboom TPM, Sies H. Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol* 1989;134:523-34.
84. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad Biol Med* 1999;27:916-21.
85. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983;52:711-60.
86. Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC. Detection of thyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols- a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Anal Biochem* 1996;241:75-81.

87. Briviba K, Klotz LO, Sies H. Defenses against peroxynitrite. *Methods Enzymol* 1999;301: 301-11.
88. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, de Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1499-503.
89. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. The diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995;252 B:38-53.
90. Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Suzuki H. Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. *Arch Biochem Biophys* 2005;434:3-10.
91. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
92. Argyrou A, Blanchard JS. Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004;78:89-142.
93. Rogers LK, Tamura T, Rogers BJ, Welty SE, Hansen TN, Smith CV. Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout. *Toxicol Sci* 2004;82:367-73.
94. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* 2000;36:95-116.
95. Steele VE, Kelloff GJ, Balentine D, Boone CW, Metha R, Bagheri D, Sigman CC, Zhu S, Sharma S. Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by *in vitro* bioassays. *Carcinogenesis* 2000;21:63-7.
96. Scharf G, Prustomsky S, Knasmuller S, Schulte-Hermann R, Huber WW. Enhancement of glutathione and  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr Cancer* 2003;45:74-83.
97. Ramirez-Mares MV, Gonzales de Mejia E. Comparative study of the antioxidant effect of ardisin and epigallocatechin gallate in rat hepatocytes exposed to benomyl and 1-nitropyrene. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1527-35.
98. Jeon SE, Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Kwon SB, Park KC. Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003;19:235-41.
99. Soto C, Recoba, R, Barrón H, Alvarez C, Favari, L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003;136:205-12.
100. Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharma Bull* 2003; 26:1398-1402.
101. Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol* 2004; 489:39-48.
102. Chen L, Yang XQ, Jiao H, Zhao B. Effect of tea catechins on the change of glutathione levels caused by Pb<sup>++</sup> in PC12 cells. *Chem Res Toxicol* 2004;17:922-8.
103. Rodrigo R, Rivera G, Orellana M, Araya J, Bosco C. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Science* 2002;71:2881-95.
104. Rodrigo R, Castillo R, Carrasco R, Huerta P, Moreno M. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the *in vitro* antioxidant capacity of wine. *Life Science* 2005; 76: 889-900.
105. Khan N, Sultana S. Abrogation of potassium bromate-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats. *Toxicology* 2004; 201:173-84.
106. Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Alcántara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Bruguera J, López-Sabater MC, Vila J, Covas MI. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, cross-over, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* 2005;181:149-158.
107. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scaccocchio B, Giovannini C. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr* 2004;134:785-91.
108. Gohil K, Mory RK, Farzin S, Maguire JJ, Packer L. mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to Ginkgo biloba extract: induction of antioxidant response and the Golgi system. *Free Rad Res* 2000;33:831-49.
109. Waeber CM, Liebman M. Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis. *Br J Nutr* 2002;88(Suppl.2):S225-32.
110. Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis* 2003;24:927-36.
111. Luceri C, Caderni G, Sanna A, Dolora P. Red Wine and Black Tea Polyphenols Modulate the Expression of Cyclooxygenase-2, Inducible Nitric Oxide Synthase and Glutathione-Related Enzymes in Azoxymethane-Induced F344 Rat Colon Tumors. *J Nutr* 2002;132:1376-79.
112. Suzuki K, Koike H, Matsui H, Ono Y, Hasumi M, Nakazato H, Okugi H, Sekine Y, Oki K, Ito K, Yamamoto T, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCAP and PC-3. *Inter J Cancer* 2002;99:846-52.
113. Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Viner JL, Sigman CC. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr* 2000;130 (Suppl. 2S):467S-71.
114. Fiander H, Schneider H. Dietary ortho-phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Lett* 2000;156:117-24.
115. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation. Cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999; 38:133-42.
116. Van Zanden JJ, Geraets L, Wortelboer HM, Van Bladeren PJ, Rietjens IMCM, Cnubben NHP. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1607-17.
117. Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 2002;61:97-103.
118. Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T, Ariga T. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food Chem Toxicol* 2004;42:743-9.
119. Dhakshinamoorthy S, Long DJ II, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul* 2000;36:201-6.
120. Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Rad Biol Med* 2000;29:254-62.
121. Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:5361-6.
122. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol* 2003;43:233-60.

123. Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004;37:139-43.
124. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999;13:76-86.
125. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 2003;8:379-91.
126. Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Rad Biol Med* 2004;37:433-41.
127. Dinkova-Kostova AT, Holczlaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. Direct evidence that sulphhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase II enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:11908-13.
128. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf2 and Nrf1 in association with cJun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 1998;17:3145-56.
129. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;236:313-22.
130. Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. c-Maf negatively regulates ARE-mediated detoxifying enzyme gene expression and antioxidant induction. *Oncogene* 2002;21:5301-12.
131. Wasserman WW, Fahl WE. Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemopreventive induction response. *Arch Biochem Biophys* 1997;344:387-96.
132. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002;277:42769-74.
133. Kang KW, Choi SH, Kim SG. Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: The role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction. *Nitric Oxide* 2002;7:244-53.
134. Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K, Nakashima K. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 2003;546:181-4.
135. Zipper LM, Mulcahy RT. Inhibition of ERK and p38 MAPkinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochem. Biophys Res Comm* 2000;278:484-92.
136. Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increases the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. *Free Rad Biol Med* 2002;32:386-93.
137. Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MCW, Blumhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 2005;81(Suppl.):277S-83S.
138. Valerio LG Jr, Kepa JK, Pickwell GV, Quattrocchi LC. Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol Lett* 2001;119:49-57.
139. Toyokuni S, Tanaka T, Kawaguchi W, Fang NR, Ozeki M, Akatsuka S, Hiai H, Aruoma OI, Bahorun T. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Rad Res* 2003;37:1215-24.
140. Myhrstad MCW, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 1999;20:911-4.
141. Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenols components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* 2000;23:605-12.
142. Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. Potency of the Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3404-9.
143. Galati G, Moridiani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Rad Biol Med* 2001;30:370-82.
144. Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Caesar EK, Dickinson DA, Zanon G, Morrow JD, Darley-Usmar VM. Cellular mechanisms of redox cell signaling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 2004;378:373-82.
145. Yu R, Tan TH, Kong A-NT. Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1997; 272:28962-70.
146. Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Gudehithlu K, Tan TH, Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* 1997;18:451-6.
147. Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R, Mandelkar S. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev* 2001;33:255-71.
148. Lang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218-20.
149. Niles RM, McFarland M, Weimer MB, Redkar A, Fu YM, Meadows GG. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett* 2003;190:157-63.
150. She QB, Huang C, Zhang Y, Dong Z. Involvement of c-jun NH2 terminal kinases in resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis. *Mol Carcinog* 2002;33:244-50.
151. Pozo-Guisado E, Lorenzo-Benayas MJ, Fernandez-Salguero PM. Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation. *Int J Cancer* 2004;109:167-73.