



UNIVERSIDAD DE CHILE

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Doctor Fernando Monckeberg Barros

“EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS: ÁCIDO CAFEICO,  
PROCIANIDINA Y ÁCIDO NEOCLOROGÉNICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE  
ÓXIDO NÍTRICO DE CÉLULAS ENDOTELIALES”

Tesista: Vania Rodríguez

Director de Tesis: Omar Porras Espinoza

TESIS PARA OPTAR AL GRADO MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS  
MENCIÓN NUTRICIÓN HUMANA

Enero 2021

Santiago-Chile

## **1. Cuerpo preliminar**

### **ii. Comisión de tesis**

Juan Pablo Rodríguez, Profesor Titular; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

Diego García, Profesor Asociado; Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Rodrigo Troncoso, Profesor Asociado; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

### **iii. Agradecimientos**

Al apoyo académico entregado por parte de los profesores e integrantes del laboratorio de biología celular del INTA. Por su ayuda profesional y la capacidad de compartir y enseñar sus conocimientos.

A mi familia especialmente mis hijos quienes fueron un apoyo y motivación constante para concluir esta Tesis.

#### iv. Índice de contenidos

1. Cuerpo preliminar .....	1
ii. Comisión de tesis .....	1
iii. Agradecimientos .....	2
iv. Índice de contenidos .....	3
v. Índice de figuras .....	4
vi. Abreviaturas .....	5
2. Resumen .....	7
3. Abstract.....	8
4. Introducción.....	9
5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos .....	11
7. Resultados .....	15
<b>Impacto antioxidante del ácido cafeico, neoclorogénico y la procianidina en células TIME vivas</b>	
<b>Efecto del ácido cafeico, neoclorogénico y la procianidina sobre el Ca<sup>2+</sup> citoplasmático de células TIME</b>	
<b>Efecto del ácido cafeico, neoclorogénico y la procianidina sobre los niveles de óxido nítrico en células endoteliales TIME</b>	
8. Discusión .....	24
9. Conclusiones .....	29

## **v. Índice de figuras**

Figura 1. Los ácidos cafeico y neoclorogénico y la procianidina disminuyen la señal HyPer en células TIME.

Figura 2. Curso temporal de la exposición a los ácidos cafeico y neoclorogénico y la procianidina sobre los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  en células TIME.

Figura 3. La acetilcolina induce un aumento de óxido nítrico en células TIME.

Figura 4. La quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con BAPTA evita el aumento de los niveles de óxido nítrico inducido por los ácidos cafeico y neoclorogénico en células TIME.

Figura 5. Procianidina no causa efecto sobre los niveles de óxido nítrico en células TIME.

## vi. Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
BAPTA AM	Ácido 1,2-bis(o-aminofenoxy-etano-N,N,N',N'-tetraacético
CAPE	ácido cafeico fenetil éster
DAF	4-amino-5-metilamino-2'-7'-fluoresceína diacetato
DMSO	dimetilsulfóxido
E NOS	óxido nítrico sintasa del endotelio
HYPER	biosensor sensible a peróxido
KRH	Krebs Ringer Hepes
ROS	especies reactivas de oxígeno
ON	óxido nítrico
O <sub>2</sub> •-	anión superóxido
ONOO•-	peroxinitrito
NOC-7	3-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrasino)-N-methyl-1-propanamine

## AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis de Magister por la estudiante Vania Rodríguez, ha sido revisado y aprobado por mí como Director de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora que designará el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



---

Omar Porras  
Director de tesis

Santiago de Chile, 21 de Enero del 2021

## 2. Resumen

La disfunción endotelial se entiende como una disminución en la producción de óxido nítrico (ON), un potente vasodilatador gaseoso. El estrés oxidativo explica en parte la pérdida de función en las células endoteliales y se considera un evento temprano en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Considerando esta condición, se hace interesante evaluar si las propiedades antioxidantes de algunos compuestos dietarios promueven la producción de óxido nítrico y, en consecuencia, tienen potencial beneficioso para la salud cardiovascular de quienes los consumen.

En esta tesis se investigó el impacto de los ácidos cafeico (10  $\mu\text{M}$ ) y neoclorogénico (5  $\mu\text{M}$ ), así como también procianidina (10  $\mu\text{M}$ ), sobre la producción de ON en células TIME, una línea celular de endotelio dérmico humano. Para tal propósito, utilizamos DAF, una sonda química fluorescente que reporta los niveles de ON citoplasmáticos. Sólo los ácidos cafeico y neoclorogénico evocaron un aumento rápido en la señal fluorescente proveniente de DAF, incremento que fue abolido cuando las células fueron cargadas con BAPTA-AM, un quelante intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que el efecto observado sobre los niveles de ON fue  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente. Adicionalmente, evaluamos las fluctuaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  y tono redox citoplasmáticos mediante el seguimiento de la fluorescencia de Fura-2 y el biosensor redox HyPer, respectivamente. Según nuestras observaciones, ni los cambios en el tono antioxidante ni los aumentos del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático son por sí mismos estímulos suficientes para aumentar los niveles de ON.

Nuestros resultados permiten dissociar un efecto redox celular del aumento en los niveles de ON como un mecanismo general de acción. En este sentido, parece que cada compuesto fenólico podría gatillar mecanismos específicos de activación de la maquinaria productora de ON. Queda pendiente conocer las implicancias del efecto redox observado con estas tres sustancias en la fisiología celular del endotelio a tiempos prolongados de exposición.

### 3. Abstract

Endothelial dysfunction corresponds to a deficient production in the nitric oxide (NO), a potent gaseous vasodilator, condition exacerbated by oxidative stress. This phenomenon corresponds to an early event in the pathogenesis of cardiovascular diseases and, offers an opportunity for evaluating if antioxidant properties of some dietary compounds can promote nitric oxide production, and in consequence, have the beneficial potential for the cardiovascular health of consumers.

In this thesis, caffeic (10  $\mu\text{M}$ ) and neochlorogenic (5  $\mu\text{M}$ ) acids, as well as procyanidin (10  $\mu\text{M}$ ), were investigated regarding their impact on the NO production on TIME cells, a human cell line from dermic microvasculature. With that purpose, we used DAF, a fluorescent dye that reports intracellular changes of NO in real-time. Only caffeic and neochlorogenic acids evoked a rapid increase in the DAF signal, which was abolished when cells were previously treated with BAPTA, an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator, suggesting that the augment on cytoplasmic NO was  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. Moreover, we evaluated the fluctuations in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and redox tone by monitoring Fura-2 and the redox biosensor HyPer, respectively. According to our observations, neither the changes in the redox tone nor the augments in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  were directly associated to the increases in NO levels, which implies that the loss of effect observed in BAPTA-treated cells is better explained by considering tonic levels of  $\text{Ca}^{2+}$  as a necessary element to allow the activation of eNOS, which ultimately would result in NO increasing.

Our results allowed the dissociation between cellular redox effects with changes in NO levels as a general mechanism. Each phenolic compound triggered a different response profile, and therefore, the mechanism involved in the activation of NO machinery production seems to be diverse and specific. Still is pending to explore long-term exposures of dietary compounds on the cellular physiology of endothelium.

#### 4. Introducción

Actualmente, existe una alta demanda por acceder a un bienestar a través del consumo de alimentos con potenciales propiedades beneficiosas. Algunos de estos beneficios incluyen la prevención de algunas enfermedades crónicas no transmisibles como las cardiovasculares, las cuales son la primera causa de muerte en Chile con 24.000 muertes/año, lo que representa un 27,1% (1), un fenómeno que se replica a nivel mundial, con un 31% (17,5 millones) del total de muertes (2).

Una creciente lista de factores de riesgo cardiovascular tales como la hipertensión, la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la diabetes mellitus, la insuficiencia cardíaca congestiva, entre otras, están asociados con un deterioro de la función endotelial (3). La disfunción endotelial es un elemento clave en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares y se define como una pérdida de función de las células endoteliales, las cuales tapizan los lechos vasculares y mantienen el tono vasodilatador a través de la producción del ON.

El ON es de naturaleza gaseosa y es sintetizado por la enzima ON sintasa del endotelio (eNOS), que convierte a la L-arginina y al  $O_2$  en L-citrulina y ON, usando cofactores redox, tales como la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), el  $FADH_2$  y el NADPH, todos estos susceptibles de ser oxidados (4). En efecto, en cuadros de estrés oxidativo ocurre una disminución del ON endotelial, debido a que el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), una de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (5), reacciona directamente con el ON generando peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ). Este último oxida directamente al  $BH_4$  limitando el funcionamiento correcto de la eNOS, promoviendo su desacoplamiento, lo cual significa que la eNOS produce  $O_2^{\bullet-}$  en vez de ON, situación que agrava y consolida la disfunción endotelial (6).

Considerando el mecanismo patogénico descrito para la disfunción endotelial, toma sentido la recomendación de consumir antioxidantes dietarios para prevenir enfermedades cardiovasculares (7). La mayoría de los estudios sobre los efectos cardiovasculares de los polifenoles se ha centrado en modelos de exposición de manera crónica. Un estudio realizado en 13 hombres adultos reporta que la ingesta

de una bebida con 600 mg de ácido clorogénico en 100 ml de agua indujo una respuesta vasodilatadora más rápida asociada con mayores niveles de ON (8).

En otro estudio, un grupo de 70 pacientes ingresados por pre-hipertensión e hipertensión en etapa 1, que además presentaban sobrepeso u obesidad, recibieron 1 cápsula diaria con 162 mg de quercetina y otro grupo recibió cápsulas placebo por un periodo inicial de 6 semanas de tratamiento y después, un periodo de 6 semanas sin tratamiento. Los resultados indicaron que la quercetina fue efectiva para disminuir la presión arterial sistólica en el grupo de hipertensos (9).

El impacto de fenoles también ha sido evaluado en modelos animales de aterosclerosis, grupos de animales sometidos a una dieta alta en colesterol y grasas saturadas por 10 semanas para inducir la formación de células espumosas, fueron sometidos a los fenoles contenidos en el vino. Solo en el grupo de hámsteres que recibió vino tinto desalcoholizado se observó una reducción significativa de aterosclerosis acompañada de un efecto hipolipemiante (10). En ratas, compuestos polifenólicos presentes en vino tinto aminoraron el depósito de lípidos en la aorta sin alterar marcadores de lipoperoxidación (11).

En este trabajo de tesis se abordó el estudio del impacto celular de tres compuestos fenólicos: ácido cafeico, ácido neoclorogénico y procianidina sobre una línea celular de endotelio dérmico humano. El enfoque experimental estuvo orientado a conocer los primeros eventos celulares gatillados por la presencia de estos compuestos. Mediciones en tiempo real de las fluctuaciones de  $Ca^{2+}$  y redox citoplasmático fueron evaluados con la sonda Fura-2 y el biosensor HyPer, respectivamente, para investigar su relación al efecto sobre los niveles de óxido nítrico observados.

En resumen, este trabajo ofrece una ventana de observación temprana asociada a la interacción molecular primaria entre compuestos fenólicos dietarios y el lecho vascular, representado por las células endoteliales. Nuestros resultados disocian, mecánicamente, el efecto redox del efecto sobre la producción de ON; sin embargo, esta interpretación sólo es válida para los primeros minutos de exposición y no podemos descartar que este efecto antioxidante celular participe en mecanismos celulares que tomen más tiempo para consolidarse.

#### **4. Hipótesis de Trabajo y Objetivos**

##### **Hipótesis**

El ácido cafeico, la procianidina y el ácido neoclorogénico favorecen la disponibilidad de óxido nítrico ya sea aumentando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos o la capacidad antioxidante de las células endoteliales.

##### **Objetivo general**

Determinar si los fenoles dietarios aumentan la producción de ON de células endoteliales vivas y si este aumento obedece a un efecto antioxidante o a una señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

##### **Objetivos específicos**

- i. Evaluar el impacto de los fenoles sobre la capacidad redox de las células endoteliales.
- ii. Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células endoteliales.
- iii. Determinar si los compuestos fenólicos ejercen un aumento en los niveles de ON en presencia y ausencia de un quelante intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 6. Metodología

Los reactivos y las sales se compraron de Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.). Los medios de cultivo y suplementos provinieron de Life Technologies (NY, EE. UU.). La solución stock de peróxido de hidrógeno (30%) utilizada en este trabajo se adquirió de Merk (Darmstadt, Alemania). Los fenoles dietarios, ácido cafeico fenetil éster (CAPE), ácido neoclorogénico y procianidina B2 fueron encargados a la Compañía Extrasynthese (France). El stock de fenoles se preparó a 50 mM disuelto en etanol.

Cultivo celular: La línea celular de microvasculatura dérmica humana, TIME (CRL-4025TM, ATCC, USA) fue mantenida a 37°C en medio M131 suplementado con Microvascular Endothelial Cell Growth Kit-VEGF, penicilina-estreptomina y anfotericina bajo una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub>/aire 5/95%. Los medios de cultivo se renovaron cada 2 a 3 días y las células fueron usadas entre los pasajes 3 y 10.

Registro de parámetros intracelulares en células vivas: Para estos fines, las células TIME se sembraron sobre cubreobjetos redondos de 25 mm de diámetro (Marienfeld, Alemania) compatibles con una cámara de registro abierta. El día del experimento, el medio de cultivo fue reemplazado por el tampón KRH (en mM: NaCl 136; KCl 4,7; Hepes 10; MgSO<sub>4</sub> 1,25; CaCl<sub>2</sub> 1,25; pH 7,4) suplementado con glucosa 5 mM. La cámara fue posteriormente montada en la platina de un microscopio Nikon Ti invertido equipado con un objetivo 40X [NA1.3]; un monocromador (Cairn Research, Faversham, UK) y una cámara CCD (Hamamatsu, Japón). Los dispositivos conectados al sistema de *imaging* están sincronizados por la interfaz de código abierto microManager (NIH, EE.UU.).

Ca<sup>2+</sup> intracelular: Para monitorear los niveles de calcio intracelular utilizamos Fura-2 reconstituida en DMSO y ácido plurónico al 20% p/v. Las células fueron incubadas con Fura-2 (5µM) por 30 minutos a T° ambiente en la oscuridad. Luego, se dejaron otros 20 minutos en reposo con KRH-glucosa. La intensidad de fluorescencia obtenida a 350 y 380 ± 10 nm fue optimizada al inicio de cada experimento

evaluando la señal /ruido de la luz emitida sobre 520 nm. El ruido para cada canal de excitación fue sustraído y los datos se expresan como la razón 350/380.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular: Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular fueron monitoreados con el biosensor HyPer, el cual fue introducido mediante infección con adenopartículas. (12). Dos días después de la infección, el biosensor es expresado en las células TIME. El día del experimento, el medio de cultivo fue reemplazado por KRH-glucosa y las células se dejaron en reposo por 30 minutos para asegurar señales estables al inicio de los registros. El biosensor fue excitado a 420 y 490 ± 10 nm y la fluorescencia emitida fue seleccionada por un filtro LP 520 nm. Al igual que con fura-2, los datos son expresados como una razón y, además cada registro cuenta con una línea base de, al menos, 10 minutos.

Medición de la producción de óxido nítrico: Los niveles de ON fueron monitoreados utilizando la sonda fluorescente 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorescein diacetato (DAF-FM diacetato, Molecular Probes, Life Technologies; OR, EE.UU), de acuerdo a lo descrito en (14). El día del experimento, los coverslips con células TIME fueron incubadas con L-arginina 100 µM por al menos 1 hora (Sigma Aldrich, MO, EE.UU). Luego, las células se cargaron con DAF-FM diacetato a una concentración final de 5 µM, a 37°C durante 45 minutos. Luego, las células se lavaron tres veces con 1 mL de KRH suplementado con glucosa 5 mM. Una vez transcurrido este tiempo se montan en la platina del microscopio en el objetivo 40X. Se seleccionó una longitud de onda de excitación de 485 ± 10 nm. Se inicia el registro, dejando una línea base de 10 minutos; transcurrido este tiempo, los cambios inducidos por la exposición a los compuestos seleccionados se llevaron a cabo por 10 minutos. Se registraron los datos cada 20 segundos.

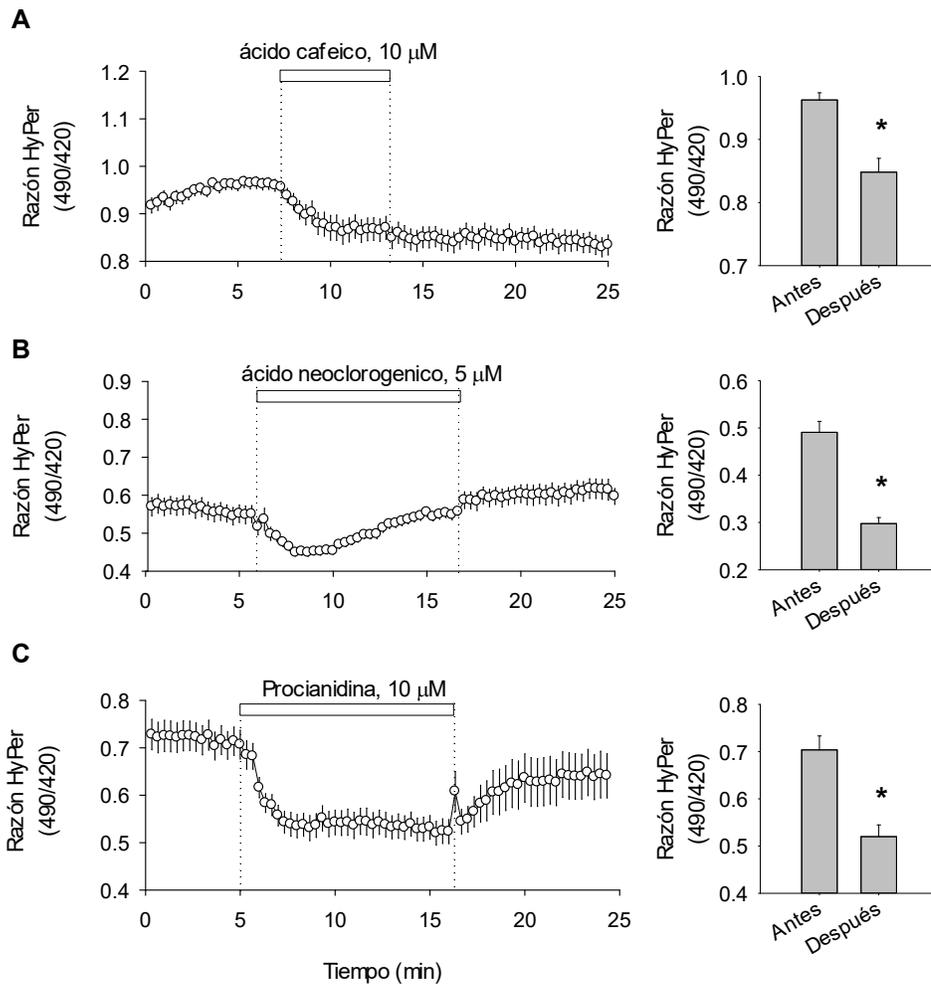
Análisis estadístico: los datos obtenidos de los registros en modalidad célula única fueron analizados estadísticamente utilizando el software SigmaPlot 12 (Jandel, USA). Pruebas paramétricas o no paramétricas procedieron de acuerdo al test Shapiro-Wilk que realiza el software. Para comparar condiciones experimentales de antes y después se utilizó t-student pareado o Wilcoxon. La comparación de más de dos grupos experimentales se realizó por ANOVA o Kruskal-Wallis, con la prueba

post-hoc Bonferroni o Dunns, según la naturaleza de los datos. Un *p-value* < 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

## 7. Resultados

### **Impacto antioxidante del ácido cafeico, neoclorogénico y la procianidina en células TIME vivas.**

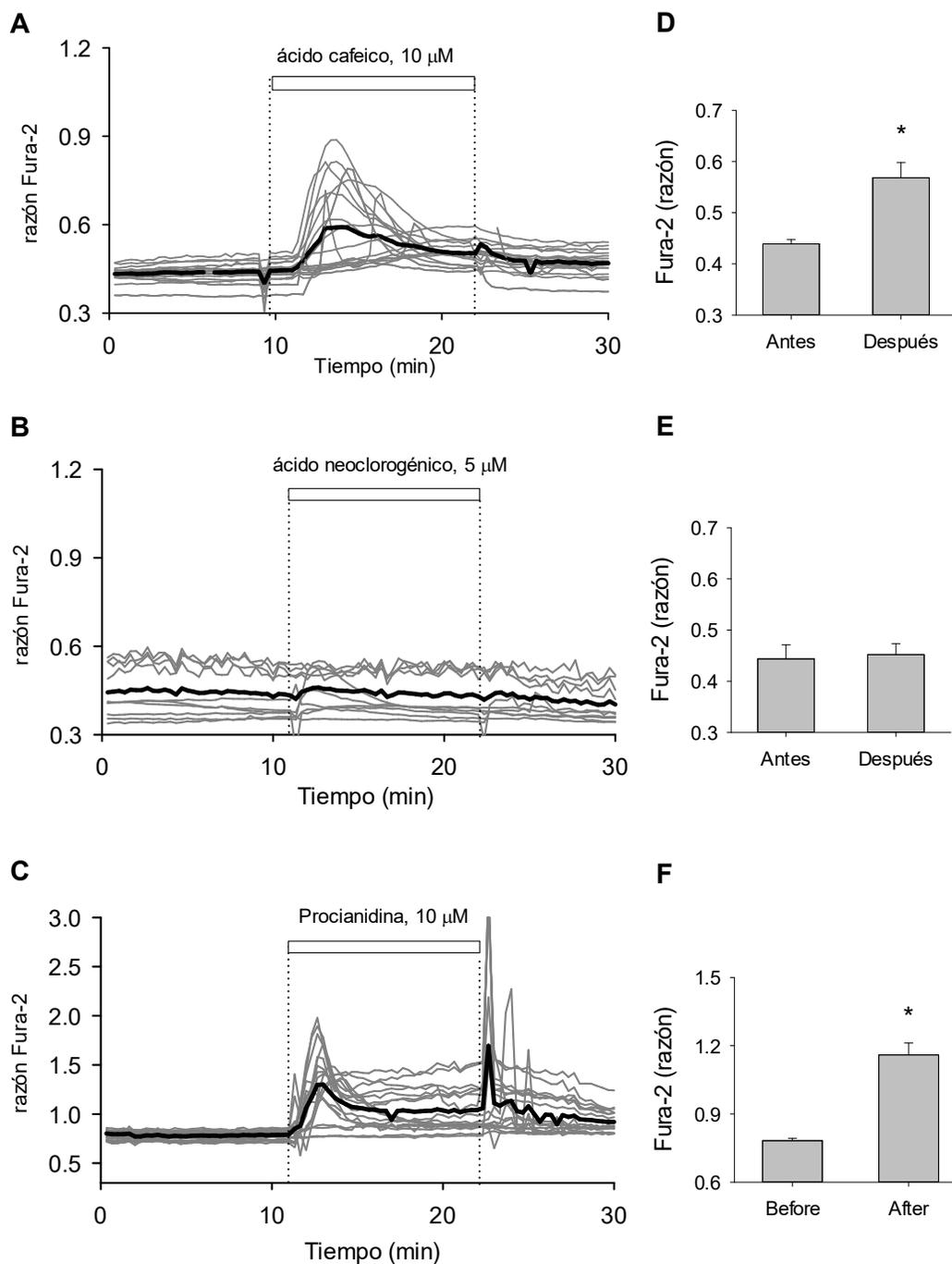
Transcurridas 48 horas post-infección con las partículas adenovirales que codifican para el biosensor redox HyPer, las células TIME exhibieron una fluorescencia homogénea en todo su citoplasma. En la figura 1 se compara el efecto inmediato que tiene la aplicación de ácido cafeico (CAPE, 10  $\mu\text{M}$ ), ácido neoclorogénico (5  $\mu\text{M}$ ) y procianidina (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la señal basal del biosensor. La señal basal del biosensor integra tanto los eventos de oxidación, que ocurren sobre los tioles presentes en el biosensor provocados por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno, como los eventos de restauración de los enlaces disulfuro, ejecutados por la maquinaria antioxidante del citoplasma. En consecuencia, este parámetro reporta el estado estacionario del ambiente redox del citoplasma en células vivas. Como se aprecia en la figura, los tres compuestos provocaron una caída en la señal HyPer. Sin embargo, la cinética de la respuesta permite distinguir algunas diferencias, por ejemplo, se observa que el efecto redox que provoca CAPE es irreversible, mientras que el efecto del ácido neoclorogénico es transitorio aun en presencia del estímulo. Para llevar a cabo una cuantificación del efecto descrito, consideramos un lapso de tres minutos antes y después de la exposición a los compuestos seleccionados para cada registro de célula única. Con esta aproximación, pudimos confirmar que efectivamente todos los compuestos indujeron una disminución significativa en la señal HyPer. Estos resultados se enmarcan en la ejecución del objetivo específico 1: **Evaluar el impacto de los fenoles sobre la capacidad redox de las células endoteliales.**



**Figura 1. Los ácidos cafeico y neoclorogénico y la procianidina disminuyen la señal de HyPer en células TIME.** 48 horas después de la infección con adeno-HyPer, las células TIME fueron expuestas a ácido cafeico, 10  $\mu\text{M}$  (**A**); ácido neoclorogénico, 5  $\mu\text{M}$  (**B**) y procianidina 10  $\mu\text{M}$  (**C**) en el momento que se indica por medio de líneas punteadas y la barra blanca sobre cada gráfico. Los cursos temporales de A, B y C corresponden a los promedios  $\pm$  ES de 31 registros para ácido cafeico; 10 para ácido neoclorogénico y 12 para procianidina, obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó comparando el grupo de valores 3 min antes y 3 min después de aplicar el estímulo. El promedio  $\pm$  ES de estos valores está representado por el gráfico de barras ubicado al lado derecho. Los asteriscos significan un  $p < 0.05$ , t-student pareado.

## **Efecto del ácido cafeico, neoclorogénico y la procianidina sobre el $\text{Ca}^{2+}$ citoplasmático de células TIME**

Nuestro siguiente paso consistió en determinar el impacto de estos compuestos fenólicos sobre los niveles basales del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Para tal efecto, cargamos las células con Fura-2, un indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que al ser administrado en su forma acetoximetil ester (AM), se acumula en las células vivas gracias a la acción de las esterasas presentes en las cercanías de la membrana plasmática. Al igual que con los registros del biosensor redox, el seguimiento de las fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizó cada 20 segundos, resolución temporal suficiente para capturar las elevaciones de calcio inducidas tanto por el ácido cafeico como por la procianidina. Ambos compuestos fueron capaces de generar elevaciones transitorias en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, aunque en el caso del efecto inducido por la procianidina, un grupo importante de las respuestas celulares se mantuvo durante la exposición al estímulo, además, como se aprecia en los registros, al retirar el compuesto del medio extracelular, se produce un aumento secundario de  $\text{Ca}^{2+}$ , que no se observa en las otras dos condiciones experimentales (**Figura 2**). A diferencia del efecto observado para los compuestos anteriores, el ácido neoclorogénico no indujo un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, lo cual indica que ni el compuesto en sí, ni el solvente utilizado, gatillan un aumento en los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  en este modelo de células endoteliales (**Figura 2B**). Similar al análisis realizado con los registros del biosensor HyPer, se comparó la señal de Fura-2 antes y después de la aplicación de los tres compuestos, cuyos valores se presentan al lado derecho de los cursos temporales que muestran la familia de registros de calcio. Estos resultados abordan el cumplimiento del Objetivo específico 2: **evaluar el efecto de los compuestos fenólicos sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células endoteliales.**

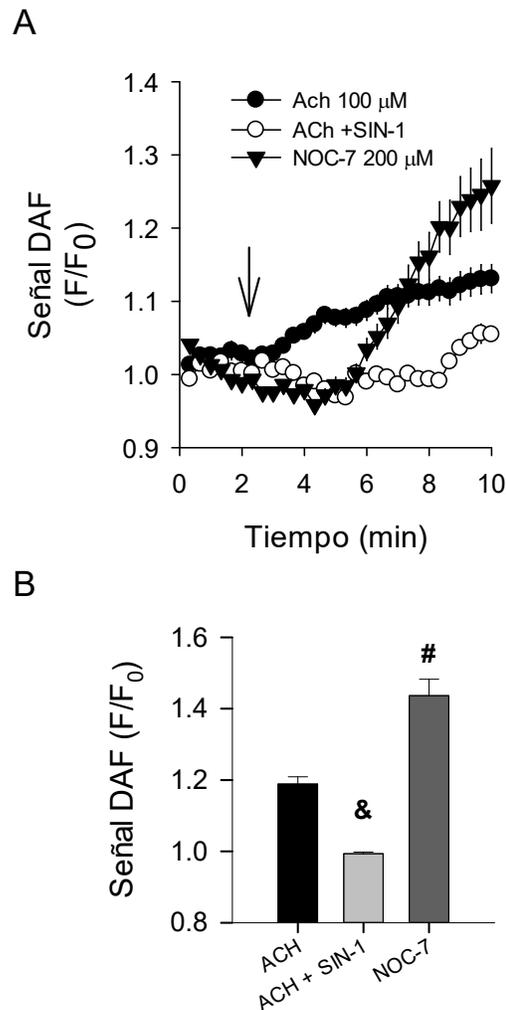


**Figura 2. Curso temporal de la exposición a los ácidos cafeico y neoclorogénico y la procianidina sobre los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  en células TIME.** Células TIME cargadas con Fura-2 fueron expuestas a ácido cafeico, 10  $\mu\text{M}$  (A); ácido neoclorogénico, 5  $\mu\text{M}$  (B) y procianidina 10  $\mu\text{M}$  (C) como se indica por las líneas punteadas y la barra blanca sobre los gráficos. Los trazos grises corresponden a los registros en célula única mientras que el trazo negro representa el promedio de las señales registradas. En los gráficos D, E y F, se presenta la cuantificación del efecto observado tras 3 minutos de exposición a ácido cafeico (D, 17 registros de 3 experimentos), ácido neoclorogénico (E, 10 registros de 3 experimentos) y procianidina (F, 18 registros de 4 experimentos). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES y el asterisco indica la significancia estadística obtenida por el test t-student pareado.

## **Efecto del ácido cafeico, neoclorogénico y la procianidina sobre los niveles de óxido nítrico en células endoteliales TIME**

La medición de los niveles de óxido nítrico en células endoteliales se consideró central en esta tesis y, en consecuencia, se implementó una metodología para registrar fluctuaciones en los niveles de este vasodilatador. Para lograr este objetivo cargamos las células con DAF, una sonda química fluorescente sensible a óxido nítrico. Adicionalmente, pre-incubamos las células TIME con arginina (100  $\mu\text{M}$ ), un precursor necesario para la síntesis de ON mediada por la eNOS. En estas condiciones la señal de DAF mostró un aumento frente a la aplicación de acetilcolina (100  $\mu\text{M}$ ), un agonista de los receptores muscarínicos que induce vasodilatación (**Figura 3**). La respuesta evocada por la acetilcolina fue sensible a la inhibición farmacológica de la eNOS, lo que sugiere que nuestro sistema de registro es sensible a la estimulación de la producción endógena de ON. Finalmente, indujimos un aumento en los niveles de ON con NOC-7, un dador químico de ON. Siguiendo la misma lógica en el análisis de los datos presentados para el efecto redox y sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, evaluamos la señal de DAF antes y después de tres minutos de exposición a acetilcolina y NOC-7, en ambas condiciones, la estimulación de la maquinaria endógena, así como la generación exógena de ON, produjeron un

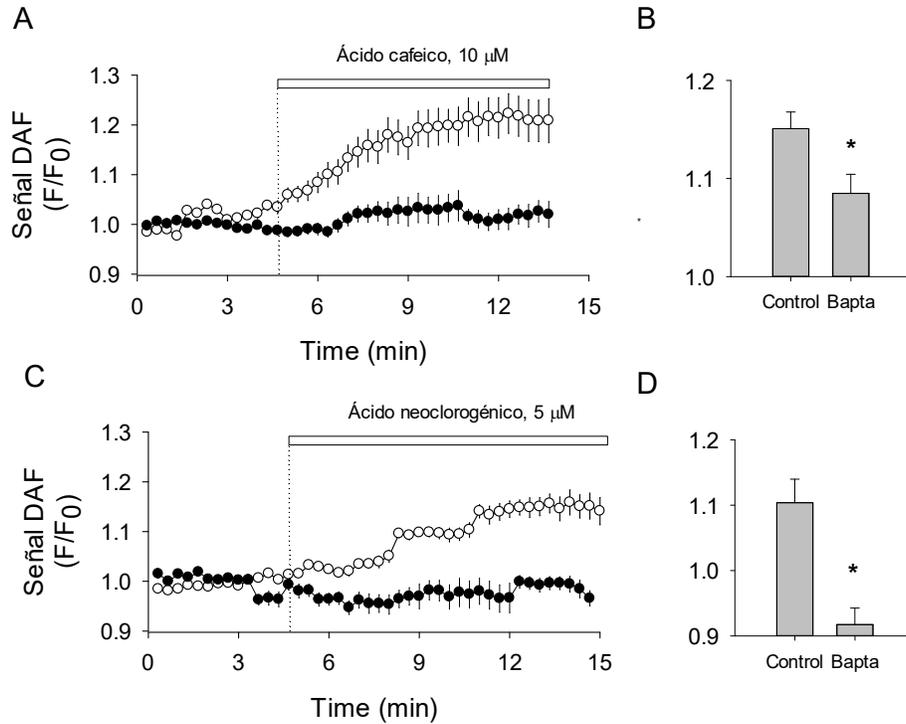
aumento significativo de la señal DAF y más relevante aún, la estimulación gatillada por acetilcolina fue sensible a la inhibición de la eNOS.



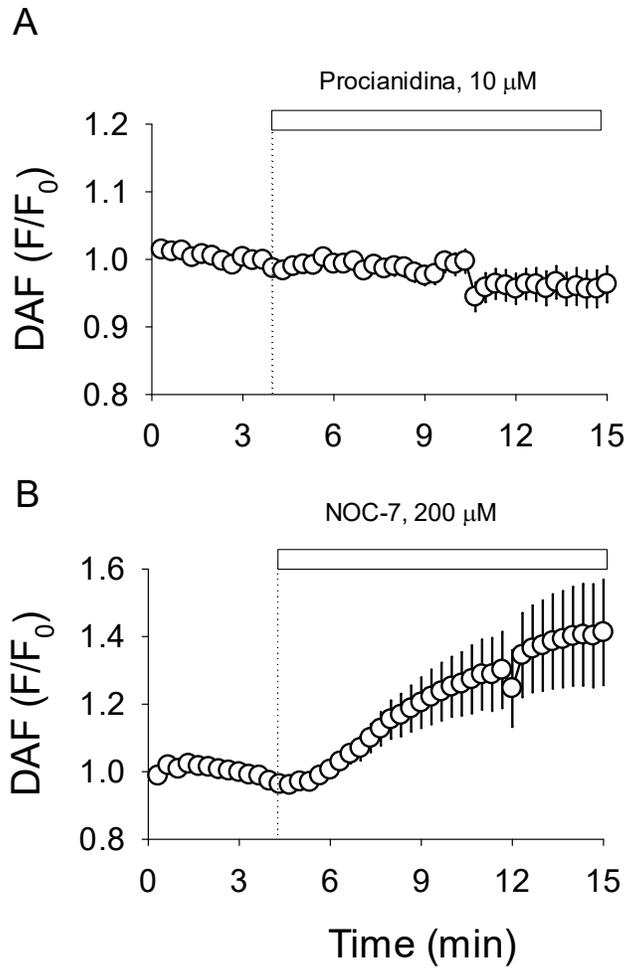
**Figura 3. La acetilcolina induce un aumento de óxido nítrico en células TIME.** **A**, las células TIME pre-incubadas con L-arginina (100 μM) fueron cargadas con DAF y luego tratadas con acetilcolina (100 μM, círculos negros) en ausencia y presencia de SIN-1 (200 μM, círculos vacíos). Un grupo de células fue expuesto al dador químico de óxido nítrico, NOC-7, (200 μM, triángulos negros). Los puntos representan los promedios ± ES de 23-37 registros de célula única normalizados a la señal basal obtenidos en al menos tres experimentos independientes. En **B**, se presenta el resumen del efecto obtenido al promediar los datos tres minutos antes y después de aplicar acetilcolina (Ach, barra negra); Ach+SIN-1 (barra gris claro) y NOC-7 (barra gris oscuro). Los símbolos & y # indican diferencias significativas en relación al efecto observado con acetilcolina.

Una vez implementada la metodología para registrar cambios en los niveles de óxido nítrico intracelular, evaluamos si la exposición aguda a los compuestos seleccionados provocaba cambios en los niveles de ON. La **figura 4** muestra que tanto el ácido cafeico (10  $\mu\text{M}$ ) como el neoclorogénico (5  $\mu\text{M}$ ) inducen un aumento en la señal de la sonda fluorescente DAF, efecto que no pudo ser observado en células tratadas con BAPTA (75  $\mu\text{M}$ ), un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Ambos compuestos difieren en su efecto sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, mientras el ácido cafeico genera un incremento en el calcio citoplasmático, el ácido neoclorogénico no provoca cambios en este parámetro intracelular. Sin embargo, ambos compuestos incrementan el ON endotelial, cuyo efecto es interferido por la aplicación de un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos resultados sugieren un papel permisivo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para observar una estimulación en la producción de ON. Por otra parte, una elevación por sobre los niveles basales no es requisito para observar un aumento en los niveles del ON, puesto que el ácido neoclorogénico no induce cambio alguno en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático.

Esta disociación entre el efecto sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y un efecto positivo sobre el óxido nítrico queda en evidencia al observar que la procianidina no induce cambios en los niveles de ON (**Figura 5**), a pesar de inducir elevaciones robustas en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. La falta de efecto de la procianidina sobre la señal fluorescente DAF en las células TIME no obedece a algún problema con la sonda puesto que en el mismo registro mostrado en la figura 5A, la señal mostró una clara elevación frente a la aplicación del dador sintético de óxido nítrico, NOC-7 (**Figura 5B**).



**Figura 4. La quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con BAPTA evita el aumento de los niveles de óxido nítrico inducido por los ácidos cafeico y neoclorogénico en células TIME. A,** Células TIME fueron pre-incubadas con L-arginina (100  $\mu\text{M}$ ), tratadas con BAPTA (75  $\mu\text{M}$ ) (círculos vacíos) y control (círculos negros), fueron cargadas con DAF y luego expuestas al ácido cafeico (10  $\mu\text{M}$ ) en el momento que se indica por la línea punteada y la barra blanca sobre el gráfico. **B,** se compara el efecto tres minutos antes y después de aplicar CAPE en células control (29 células, 4 experimentos) y tratadas con BAPTA (15 células, 3 experimentos). En **C,** las células fueron expuestas al ácido neoclorogénico (5  $\mu\text{M}$ ) por el tiempo indicado por la barra blanco sobre el gráfico. **D,** se compara el efecto antes y después de aplicar CAPE en células control (19 células, 3 experimentos) y tratadas con BAPTA (9 células, 3 experimentos.). Los asteriscos indican la diferencia significativa entre los grupos obtenida por t-student no pareado.



**Figura 5. Procianidina no induce un aumento de los niveles de óxido nítrico en células TIME.** **A**, células TIME pre-incubadas con L-arginina (100 μM) fueron cargadas con DAF y luego sometidas a procianidina (10 μM) en el momento indicado por la línea punteada y la barra blanca presentes en el gráfico. En **B**, el mismo grupo de células fue expuesto al dador químico de óxido nítrico, NOC-7, (200 μM) para confirmar que la sonda mantenía sensibilidad a las fluctuaciones de óxido. Los datos corresponden al promedio de 12 registros de célula única provenientes de dos experimentos independientes.

## **8. Discusión**

Durante la ejecución de esta tesis se investigó la capacidad de los ácidos cafeico y neoclorogénico y la procianidina para aumentar los niveles de óxido nítrico en un modelo de células endoteliales humanas. Nuestro enfoque experimental consistió en la determinación intracelular de los niveles de óxido nítrico y  $\text{Ca}^{2+}$ , junto con el seguimiento del tono redox citoplasmático, mediante la expresión del biosensor HyPer. La observación y análisis de las respuestas celulares en el orden de segundos a minutos fue clave para investigar la relación causal del efecto antioxidante sobre un incremento en los niveles de óxido nítrico y también, si una eventual señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático podría mediar algún efecto sobre los niveles de ON.

Nuestros resultados indican que, aunque los tres compuestos evaluados provocaron un efecto antioxidante en el citoplasma de las células endoteliales, visible durante los primeros 2 minutos de exposición, sólo los ácidos cafeico y neoclorogénico, elevaron los niveles de óxido nítrico intracelular, lo que sugiere que un efecto antioxidante no es un factor determinante para promover un aumento de ON endotelial.

### **Impacto antioxidante del ácido cafeico, ácido neoclorogénico y la procianidina en células TIME vivas**

La respuesta redox de las células en presencia de los compuestos evaluados fue diferente en términos de la cinética del efecto. Por ejemplo, el ácido cafeico disminuye la señal HyPer de manera persistente, incluso cuando el compuesto es retirado del medio extracelular, un fenómeno que podría indicar algún tipo de interacción con los componentes celulares que son capaces de mantener este efecto. Los otros dos compuestos, ácido neoclorogénico y procianidina exhiben un efecto más bien reversible. El efecto inducido por el ácido neoclorogénico se revierte aun en presencia del compuesto, lo que sugiere que su efecto inicial es intrínsecamente transitorio. Esta reversibilidad nos invita a considerar que las células TIME manifiestan una adaptación rápida que significa la pérdida del efecto redox

observado inicialmente. La procianidina también induce un efecto reversible, que es totalmente dependiente de su presencia en el medio extracelular. Que su efecto desaparezca al removerlo por lavados extracelulares indica que el compuesto es altamente soluble y no interactúa significativamente con los componentes celulares. Aunque los registros de efectos agudos en células son escasos, se han reportado efectos de CAPE sobre canales iónicos al minuto de exposición en líneas celulares epiteliales. Por ejemplo, el ácido cafeico aumentó la corriente de  $K^+$  mediada por el canal tipo IK (Ca), un efecto celular observado a concentraciones comparables a las utilizadas en esta tesis (13). Recientemente, Shin et al (21) demostró que el CAPE es capaz de interactuar con residuos de cisteína de la proteína ORA-1 que resultan en la inhibición de los canales tipo CRAC, entidades involucradas en la mantención de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  intracelular. En el caso de la procianidina, se han observado efectos inmediatos sobre la vasodilatación de anillos aórticos pre contraídos con fenilefedrina, la vasodilatación fue observada con concentraciones mayores a  $1.0 \mu M$  (22).

La capacidad del ácido cafeico para generar una respuesta redox persistente, al menos en el tiempo de observación de 10 minutos que evaluamos en esta tesis, es consistente con la modificación en cisteínas que reportó Shin et al (21) y sus efectos en otros sistemas celulares. Se sabe que el ácido cafeico interactúa con el factor intracelular NF- $\kappa$ B inhibiendo la respuesta inflamatoria (23). El ácido cafeico disminuye el stress oxidativo inducido por hiperglicemia (25 mM glucosa) en células endoteliales y además, activa proteínas antiapoptóticas. (15). También se ha descrito que el ácido cafeico tiene un efecto antioxidante y antiinflamatorio, mediado por el bloqueo del sistema xantina/xantina oxidasa que conlleva a una disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno en neutrófilos humanos (26).

### **Efecto del ácido cafeico, ácido neoclorogénico y la procianidina sobre el $Ca^{2+}$ citoplasmático**

Durante nuestra investigación pudimos observar que no todos los compuestos evaluados inducen un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular. El ácido neoclorogénico, por

ejemplo, no moviliza  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de las células TIME, al menos durante los 10 minutos de observación. Tanto la adición de procianidina como la de ácido cafeico generan un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , fenómeno que se desarrolla con inmediatez, en el caso del efecto inducido por procianidina y, con algo de desfase en el caso del ácido cafeico. La respuesta inducida por el ácido cafeico es transitoria y desaparece gradualmente aun cuando el compuesto esté presente en el medio extracelular. La respuesta inducida por procianidina, por otra parte, se manifiesta con un patrón persistente en algunas células, caracterizado por los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  elevados durante todo el periodo de exposición. Posteriormente, al retirar el estímulo pudimos observar una mayor actividad en las fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , probablemente inducida por la estimulación mecánica que ocurre durante la remoción del compuesto. Existen algunos reportes que involucran a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje como una de las vías responsables de las elevaciones  $\text{Ca}^{2+}$  observadas. La respuesta inducida por la procianidina es prácticamente instantánea en células endoteliales aorticas de rata, donde desempeña un papel en la promoción de la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , como también la hiperpolarización de la membrana celular a través de canales de  $\text{K}^+$  y activa la liberación de ON (16). Nuestros registros con el ácido cafeico indican que la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada no es instantánea y requiere de unos minutos en desarrollarse. Existen reportes que relacionan a una conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a ácido cafeico a concentraciones de 5 a 50  $\mu\text{M}$  en linfocitos T, cuya activación resulta en un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (17).

Aún queda pendiente conocer el origen del aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que observamos, sin embargo, la velocidad de respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la procianidina es rápida, lo que sugiere un origen extracelular, como los reportados para los isómeros de tocoferol (18). En cambio, el ácido cafeico induce una respuesta gradual que incluso se demora unos minutos en desarrollar un aumento de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , fenómeno que se ajusta al reclutamiento de una maquinaria de señalización del calcio intracelular.

## **Efecto del ácido cafeico, ácido neoclorogénico y la procianidina sobre los niveles de óxido nítrico en células endoteliales TIME**

En el transcurso de esta tesis se trató de implementar la medición en tiempo real de los niveles de ON con el biosensor G-geNOP. Esta herramienta molecular exigía un sistema de adquisición de imágenes con muy bajo ruido, puesto que los desarrolladores de esta herramienta registraban una respuesta del 1 %, interpretado con un aumento en los niveles de ON, aspectos técnicos muy exigentes para nuestro *setup* (19). Al implementar la sonda DAF en nuestros cultivos pudimos monitorear fluctuaciones del orden de 20% en los niveles de óxido nítrico al ser estimuladas con acetilcolina en células endoteliales pre-tratadas con arginina (100  $\mu$ M), respuesta que fue rápida (8 minutos) y sensible a SIN-1, un inhibidor de la e-NOS, lo cual indica que el aumento inducido por la acetilcolina era mediado por una activación de la enzima eNOS. En cambio al adicionar NOC-7, que es donante de ON con una vida media de 10 minutos (20), permite crear un gradiente extracelular de ON que permea la membrana plasmática, NOC-7 se degrada para liberar ON espontáneamente (24) y finalmente, es detectado por la sonda.

Con esta metodología pudimos evaluar el efecto de ácido cafeico y ácido neoclorogénico, ambos compuestos fueron capaces de aumentar la señal de DAF, fenómeno totalmente abolido en presencia de BAPTA, un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para que aumente el ON inducido por estos compuestos. Teniendo en cuenta que el ácido neoclorogénico no induce un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, y que su efecto sobre el ON fue cancelado en presencia de BAPTA, nos invita a considerar que los niveles de calcio tónicos, es decir, en reposo, juegan un papel permisivo en la eventual activación de la maquinaria productora de ON (25).

La vinculación de los efectos redox con el  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el aumento de ON son un tanto complejos puesto que no existe un patrón definido. Por ejemplo, la procianidina, que no induce un aumento en el ON, pero si genera incrementos en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y tiene un efecto redox en este compartimiento, nos obliga a considerar otros factores que claramente, la procianidina no es capaz de estimular

para generar una estimulación de la eNOS. Su efecto redox es muy transitorio, absolutamente lavable y además, su impacto en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es inmediato y está en línea con una activación de permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular (27). La concentración usada de procianidina en nuestros experimentos fue de 10  $\mu\text{M}$  y en la literatura describen efectos con concentraciones de 50 -100  $\mu\text{M}$  sobre el ON en células endoteliales aorticas de rata (16). Quizás, 10  $\mu\text{M}$  fue insuficiente para evocar una respuesta de aumento de ON, y en este trabajo no se exploraron concentraciones mayores.

De los dos compuestos fenólicos que tienen un efecto en los niveles de ON, hay uno que aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (ácido cafeico) y otro no lo aumenta (ácido neoclorogénico); sin embargo, los dos son capaces de gatillar un aumento en el ON. El efecto antioxidante es el único aspecto celular que comparten. La cinética de los registros HyPer indica que hay una interacción. Mientras el ácido cafeico genera un efecto que no es reversible, es decir el estado redox celular cambió, el efecto del ácido neoclorogénico indica que la maquinaria celular respondió y luego, se desactiva ese efecto aun en presencia del compuesto.

En resumen, nuestra experiencia con estos tres compuestos fenólicos nos ha mostrado que ni un aumento de calcio o un efecto redox en células endoteliales es suficiente para evocar un aumento en los niveles de óxido nítrico, en consecuencia, podemos rechazar la hipótesis propuesta. Los resultados obtenidos en esta tesis nos han mostrado que no existen mecanismos generales, como aumentos de calcio o fenómenos redox citoplasmáticos, que expliquen o permitan agrupar fitocompuestos con potencial efecto vascular, entendido como un efecto positivo en la producción de óxido nítrico, sino más bien, nos invitan a investigar los determinantes celulares que si llevan a una estimulación de la eNOS y que son gatillados por fitocompuestos que no tienen una vía de señalización conocida en células de mamífero, puesto que provienen de otro reino.

## 9. Conclusiones

De acuerdo a nuestros resultados podemos decir que la hipótesis es rechazada. Nuestra conclusión es que los efectos redox agudos no están vinculados directamente a una producción de ON endotelial.

A continuación, las conclusiones de nuestro trabajo son:

- Los compuestos fenólicos, ácido cafeico, procianidina y ácido neoclorogénico inducen un cambio redox celular inmediato en células endoteliales humanas.
- Tanto el ácido cafeico como la procianidina inducen, aunque con distintas características cinéticas, aumentos en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático.
- Algunos compuestos como el ácido cafeico y ácido neoclorogénico, inducen un aumento de los niveles de ON en un modelo celular de endotelio humano.
- Un efecto redox no es condición necesaria para inducir un aumento inmediato en los niveles de ON
- La disponibilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático es una condición necesaria pero no suficiente para observar aumentos en los niveles de ON inducidos por los compuestos fenólicos utilizados aquí.

En el desarrollo de la tesis formulé una hipótesis simple para entender un efecto celular directo evaluando los fitocompuestos mencionados. Ahora, me doy cuenta que la complejidad de las células endoteliales y los efectos inducidos por compuestos de origen vegetal implican que esta interacción sea de otro orden y quizás a diferentes niveles, y no solamente en el sentido antioxidante.

Ahora entiendo mejor que los compuestos (ácido cafeico, la procianidina y el ácido neoclorogénico) deben ser evaluados por sus propios méritos en distintos sistemas, y es importante considerar la concentración efectiva y también, investigar otros elementos, más allá del antioxidante, para establecer el potencial beneficio de estos, en el contexto de las enfermedades cardiovasculares.

## 10. Referencias

1. DEIS. 2014. Indicadores Básicos de Salud Chile 2014. Obtenido de: <http://www.deis.cl/indicadores-basicos-de-salud/>. Acceso: 2017, Octubre.
2. Lim, S. S, Vos, T, Flaxman, A.D., Danaei, G., Shibuya, K, Adair-Rohani, H., Z.A. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380(9859):2224-2260.
3. Siasos G, Tousoulis D, Michalea S, Oikonomou E, Kolia C, Kioufis S, Synetos A, Vlasis K, Papavassiliou AG, Stefanadis C. Biomarkers determining cardiovascular risk in patients with kidney disease. *Curr Med Chem* 2012; 19(16):2555-71.
4. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolucci N, Ambis S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(1):18-31.
5. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33(7):829-37, 837a-837d.
6. Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front Physiol* 2012; 3:441.
7. Del Bo`C, Bernardi S, Marino M, Porrini M, Tucci M, Guglietmetti S, Cherubini A, Carrieri B, Kirkup B, Kroon P, Zamora-Ros R, Liberona NH, Andres-Laweve C, Riso P. Systematic review on polyphenol intake and health outcomes: Is there sufficient evidence to define a health-promoting polyphenol-rich dietary pattern?. *Nutrients* 2019; 11(6):1355.
8. Ochiai R, Sugiura Y, Otsuka K, Katsuragi Y, Hashiguchi T. Coffee bean polyphenols ameliorate postprandial endothelial dysfunction in healthy male adults. *Int J Food Sci Nutr* 2015; 66(3):350-4.

9. Brüll V, Burak C, Stoffel-Wagner B, Wolfram S, Nickenig G, Müller C, Langguth P, Alteheld B, Fimmers R, Naaf S, Zimmermann BF, Stehle P, Egert S. Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br J Nutr* 2015; 114(8):1263-77.
10. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 2001; 156(1):67-72.
11. Waddington E, Puddey IB, Croft KD. Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(1):54-61.
12. Huang BK, Ali S, Stein KT, Sikes HD. Interpreting Heterogeneity in Response of Cells Expressing a Fluorescent Hydrogen Peroxide Biosensor. *Biophys J* 2015 ; 109(10):2148-58.
13. Lin MW, Yang SR, Huang MH, Wu SN. Stimulatory actions of caffeic acid phenethyl ester, a known inhibitor of NF-kappaB activation, on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in pituitary GH3 cells. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25; 279(26):26885-92.
14. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagono T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem* 1999; 111: 3419-3422
15. Natarelli L, Ranaldi G, Leoni G, Roselli M, Guantario B, Speciale A, Virgili F, Canali R. Nanomolar caffeic acid decreases glucose uptake and the effects of high glucose in endothelial cells. *Plos One* 2015; 10:11.

16. Byun MW. Effect of procyanidin C1 on nitric oxide production and hyperpolarization through Ca (2+)-dependent pathway in endothelial cells. *J Med Food*. 2012 Nov; 15(11):1032-7.
17. Nam JH, Shin DH, Zheng H, Kang JS, Kim WK, Kim SJ. Inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channels and K<sup>+</sup> channels by caffeic acid phenethyl ester in T lymphocytes. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jun 10; 612(1-3):153-60.
18. Hidalgo M, Rodríguez V, Kreindl C, Porrás O. Biological Redox Impact of Tocopherol Isomers Is Mediated by Fast Cytosolic Calcium Increases in Living Caco-2 Cells. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Feb 14; 9(2).
19. Eroglu E, Gottschalk B, Charoensin S, et al. Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. *Nat Commun*. 2016; 7:10623.
20. Opelt M, Eroglu E, Waldeck-Weiermair M, Russwurm M, Koesling D, Malli R, Graier WF, Fassett JT, Schrammel A, Mayer B. Formation of Nitric Oxide by Aldehyde Dehydrogenase-2 Is Necessary and Sufficient for Vascular Bioactivation of Nitroglycerin. *J Biol Chem*. 2016 Nov 11; 291(46):24076-24084.
21. Shin DH, Nam JH, Lee ES, Zhang Y, Kim SJ. Inhibition of Ca (2+) release-activated Ca (2+) channel (CRAC) by curcumin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) via electrophilic addition to a cysteine residue of Orai1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 9; 428(1):56-61.
22. Matsui T, Korematsu S, Byun EB, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T. Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K<sup>+</sup> channel activations. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009 Oct; 73(10):2246-51.

23. Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Dec; 299(3):915-20.

24. Pye D, Palomero J, Kabayo T, Jackson MJ. Real-time measurement of nitric oxide in single mature mouse skeletal muscle fibres during contractions. *J Physiol.* 2007; 581(Pt 1):309-318.

25. Novakovic A, Marinko M, Jankovic G, Stojanovic I, Milojevic P, Nenezic D, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Endothelium-dependent vasorelaxant effect of procyanidin B2 on human internal mammary artery. *Eur J Pharmacol.* 2017 Jul 15; 807:75-81.

26. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1993 Aug 23; 329(1-2):21-4.

27. Li P, Wang JN, Hou JC, Fu JH, Liu JX. [Calcium mobilizing effect of hawthorn leaf procyanidins in vascular endothelial cells]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2018 Jun; 43(12):2600-2606.



