



MILENA ALMEIDA SANTOS

**ENVELHECIMENTO: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTI-INFLAMATÓRIA DO RESVERATROL ATRAVÉS DO ESTUDO DAS VIAS
DE SINALIZAÇÃO CELULAR PKA, MAPK E AKT/PKB EM CÉLULAS MONO-
NUCLEARES HUMANAS *IN VITRO*.**

**Belo Horizonte,
Minas Gerais - Brasil
Março - 2019**

MILENA ALMEIDA SANTOS

**ENVELHECIMENTO: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTI-INFLAMATÓRIA DO RESVERATROL ATRAVÉS DO ESTUDO DAS VIAS
DE SINALIZAÇÃO CELULAR PKA, MAPK E AKT/PKB EM CÉLULAS MONO-
NUCLEARES HUMANAS *IN VITRO*.**

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Chaves Schultz

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Belo Horizonte,
Minas Gerais - Brasil
Março - 2019**



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MILENA ALMEIDA SANTOS. Aos vinte e oito dias do mês de março de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Envelhecimento: avaliação da capacidade antioxidante e anti-inflamatória do Resveratrol através do estudo das vias de sinalização celular PKA, MAPK e AKT/PKB em células mononucleares humanas in vitro."" , requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Miriam Chaves Schultz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Daniela Caldeira Costa (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dr. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ APROVADA
☐ REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de março de 2019.


Dr. Daniela Caldeira Costa (Universidade Federal de Ouro Preto)


Dr. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)


Dr. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (UFMG)


Profa Leda Quêrcia Vieira
Coordenadora do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não pases, nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo, por onde quer que andares!

Josué 1:9

À minha mãe, minha maior incentivadora!

Minha admiração e profundo respeito!

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor de todas as coisas, ao dono de tudo, obrigada por me sustentar em todos os meus passos, ser sempre o meu socorro presente na hora da angústia! Ebenézer!!!!

Minha mãe, minha Maria, meu maior exemplo de mulher forte e guerreira, como em tanta simplicidade, tanta pequenez pode caber tanta força, tanta grandiosidade de alma?!!

Sou eternamente grata pelas suas orações incansáveis, pelo seu incentivo, pelos seus conselhos e pela sua fé inabalável! Não te admiro somente como filha, e destaco aqui o quanto sou honrada em tê-la como mãe, te admiro como Mulher, de Mulher para Mulher!! Seremos sempre eu e você!! TE AMO MAINHA!!!

Aos meus amigos, que mesmo com a distância sempre me acolhem com carinho e saudade. Saibam que a cada encontro, a cada conversa jogada fora, a cada gargalhada meu coração se aquece de AMOR! Entre todos os meus amados amigos, destaco aqui o meu casal, os meus afilhados, Claudinha e Roger amo vocês, sou eternamente grata á Deus por essa amizade. Obrigada pelo incentivo, pelo zelo, pela paciência e pelo amor!

À minha família, por sua capacidade de acreditar em mim mesmo nos momentos em que não fui capaz de acreditar! Por toda ajuda, das coisas mais simples até as mais complexas! Obrigada por todo carinho, todas as demonstrações de saudade, do querer bem! Saibam que seja qual for o lugar onde estiver vocês sempre serão OS MEUS!

À minha orientadora, professora Míriam, muito obrigada pela oportunidade e confiança que foi a mim depositada mesmo sem saber quem eu era e de onde vim! Sou muito grata pelas orientações e por todos os ensinamentos! Você é um exemplo de mulher determinada e empreendedora!

À minha colega de bancada, Camila, sou eternamente grata ao Senhor pela sua vida, eternamente grata por ele ter colocado você em meu caminho! Obrigada por toda ajuda, pela sua companhia diária, por compartilhar comigo todo o seu conhecimento e todos os momentos de alegrias e lutas durante esses dois anos! Saiba que você é LUZ menina!

As minhas colegas de laboratório, cada uma com sua característica, vocês tornaram os meus dias mais leves!

Raquel, obrigada por toda a sua paciência e seu jeitinho especial em ensinar e ajudar em todos os momentos que necessitei. Obrigada também pela sua amizade, pelo seu carinho e pelas conversas! A Maria Regina tem sorte!!

Gláucia foi um prazer compartilhar com você toda sua experiência e conhecimento, assim como os conselhos por parte de alguém que tem tanto a ensinar como você!

Á Glaucy, minha grande admiração como mulher, como pesquisadora, como pessoa, como amiga! Muito obrigada, por tanta disponibilidade e solicitude! Este trabalho não seria o mesmo sem a sua ajuda. Você é GRANDE!

Luciana como sua força e sua positividade me inspiram. Muito obrigada por estender sua mão amiga sempre sem medir esforços em ajudar no que fosse necessário!

Alessandra deixo aqui a minha gratidão por todas as palavras de incentivo e disponibilidade em ajudar no que fosse necessário. Como são nobres aqueles que têm a coragem de recomeçar!

Á professora Eliane, obrigada pela presença constante e gentil!

Paulo, obrigada por sua educação e gentileza, sempre transformando uma simples conversa em uma solução!

Aos funcionários da UFMG especialmente aos da Bioquímica, Orlando e Alexandre, o meu muito obrigada!

Á todos que compartilharam comigo esse momento, essa conquista é nossa!

APOIO FINANCEIRO

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação e oficialização do estudo. A realização do trabalho deu-se no Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas da Universidade Federal de Minas Gerais com o apoio financeiro adicional da PRPq/UFMG, FAPEMIG, CNPq e IVC Health testes em saúde humana.

RESUMO

O envelhecimento é caracterizado por um processo lento e progressivo, no qual ocorrem diversas modificações morfológicas, funcionais e bioquímicas, que contribuem para o aumento da vulnerabilidade e incidência dos processos patológicos no organismo, tais como diabetes, distúrbios cardiovasculares, Doença de Alzheimer e outras morbidades. Sendo que tais alterações podem ser geradas através do “Estresse Oxidativo”, que é marcado pelo desequilíbrio no estado redox, devido à exacerbação das substâncias pró-oxidantes ou disfunção dos mecanismos antioxidantes. Este desequilíbrio está intimamente associado à imunossenescência, na qual o indivíduo idoso apresenta redução funcional do sistema imune inato, aumento da atividade inflamatória basal e elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias que propiciam um estado de inflamação crônica denominado “Inflammaging”. Em contraponto, existem os compostos antioxidantes, produzidos de forma endógena ou exógena com o intuito de bloquear e/ou eliminar tais espécies oxidantes, impedindo a oxidação de biomoléculas. Fazendo parte das substâncias antioxidantes exógenas classificadas como não-enzimáticas, o Resveratrol (RSV) é um polifénol que apresenta diversas atividades biológicas comprovadas como capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. O objetivo do nosso estudo foi verificar em um ambiente de estresse oxidativo em células Mononucleares Humanas (PBMC) de doadores de 40-59 e 60-80 anos o possível efeito antioxidante e/ou anti-inflamatório do Resveratrol. Para tanto, utilizou-se 5 μ M de Resveratrol e um estímulo com H_2O_2 0,64%v/v, em que através do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol houve maior atuação do RSV na faixa etária de meia idade, perfil encontrado também nas dosagens de IL-6, TNF- α e IL-10. Tal perfil referente ao efeito do RSV na faixa etária de meia idade também foi encontrado em relação à concentração de biomarcadores de cardiopatia Lipoproteína A e Fosfolipase A2 num estudo intervencional *in vivo*. Quando observada a interferência do composto nas vias de sinalização PKA, Akt/PKB e MAPK apenas a terceira via promoveu a regulação da atividade do RSV nos experimentos. Através do ensaio de produção de óxido nítrico o RSV não promoveu alteração significativa em ambas as faixas etárias estudadas. Observamos neste estudo que o RSV apresenta uma melhor atividade antioxidante e anti-inflamatória de forma preventiva em PBMC humanas e a sua atuação é alterada no envelhecimento pela mudança do padrão de sinalização da via de MAPK.

Palavras-chave: Envelhecimento. Estresse Oxidativo. Inflamação. Resveratrol.

ABSTRACT

Aging is characterized by a slow and progressive process in which various morphological, functional and biochemical changes occur which contribute to the increased vulnerability and incidence of pathological processes in the organism such as diabetes, cardiovascular disorders, Alzheimer's disease and other morbidities. These changes can be generated through "Oxidative Stress", which is marked by imbalance in the redox state, due to the exacerbation of the pro-oxidants or dysfunction of the antioxidant mechanisms. This imbalance is closely associated with immunosenescence, in which the elderly individual presents functional reduction of the innate immune system, increased basal inflammatory activity and elevated expression of proinflammatory cytokines that provide a state of chronic inflammation called Inflammaging. In counterpoint, there are the antioxidant compounds, produced in an endogenous or exogenous way in order to block and / or eliminate such oxidant species, preventing the oxidation of biomolecules. As part of the exogenous antioxidant substances classified as non-enzymatic, Resveratrol (RSV) is a polyphenol that has several proven biological activities as antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor capacity. The objective of our study was to verify the possible antioxidant and/or anti-inflammatory effect of Resveratrol in an environment of oxidative stress in Human Mononuclear Cells (PBMC) of donors aged 40-59 and 60-80 years. For that, 5 μ M of Resveratrol and a stimulus with 0.64% v/v H₂O₂ were used, in which through the luminol-dependent chemiluminescence assay there was a higher performance of RSV in the middle age group, a profile also found in dosages of IL-6, TNF and IL-10. This profile related to the effect of RSV on the middle age group was also found in relation to the concentration of lipoprotein A and Fosfolipase A2 heart biomarkers in an *in vivo* interventional study. When interfering with the compound in the signaling pathways PKA, Akt/PKB and MAPK, only the third pathway promoted the regulation of RSV activity in the experiments. Through the nitric oxide production test, RSV did not promote significant alteration in both age groups studied. We observed in this study that RSV presents a better anti-inflammatory and anti-inflammatory activity in a preventive way in human PBMC and its performance is altered in aging by changing the signaling pattern of the MAPK pathway.

Keywords: Aging. Oxidative Stress. Inflammation. Resveratrol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Principais agentes de defesa antioxidante enzimática e não-enzimática.....	22
Esquema 1: Desenho piloto utilizado no Estudo Intervencional para Dosagem de Lp(a) e PLA ₂ sob o efeito do RSV.....	45
Esquema 2: Manutenção do sistema imune homeostático através do RSV.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de MTT em PBMC.....	39
Tabela 2: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC.....	40
Tabela 3: Disposição dos grupos controles sem células e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC.....	41
Tabela 4: Disposição dos grupos com inibidor e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC.....	42
Tabela 5: Disposição dos grupos e seus tratamentos na Análise de produção de NO pela “Reação de Griess” em PBMC.....	44
Tabela 6: Análise comparativa entre as duas faixas etárias do efeito do RSV.....	54
Tabela 7: Controles sem células/com células no Ensaio de Quimioluminescência.....	54
Tabela 8: Controles sem células comparado com os controles com células/Inibidor da via PKA.....	55
Tabela 9: Controles sem células comparados com os controles com células/Inibidor da via AKT/PKB.....	57
Tabela 10: Controles sem células comparados com os controles com células /Inibidor da via MAPK.....	59
Tabela 11: Viabilidade celular obtida através do teste de Azul de Tripán dos grupos do ensaio de Óxido Nítrico.....	65
Tabela 12: Avaliação comparativa do efeito antioxidante e anti-inflamatório do RSV em células PBMC.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população brasileira.....	17
Figura 2: Fatores internos e fatores externos envolvidos na formação de radicais livres que podem contribuir para o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante.....	20
Figura 3: Principais vias de formação intra e extracelular de ERO e ERN.....	21
Figura 4: Representação esquemática do processo de “Inflamming”.....	23
Figura 5: Estrutura química da molécula de Resveratrol.....	30
Figura 6: Reação de Quimioluminescência dependente de Luminol.....	40
Figura 7: Curva Concentração-Resposta de H ₂ O ₂ em PBMC.....	48
Figura 8: Avaliação da produção de ERO induzida pelo H ₂ O ₂ no ensaio de Quimioluminescência.....	49
Figura 9: Avaliação da produção de Óxido Nítrico induzida por H ₂ O ₂	50
Figura 10: Curva Dose-Concentração de Resveratrol em Leucócitos Humanos.....	51
Figura 11: Viabilidade das células mononucleares humanas pelo ensaio de MTT.....	52
Figura 12: Avaliação do efeito do RSV na produção de ERO em PBMCs induzidas por H ₂ O ₂	53
Figura 13: Avaliação comparativa do RSV sob a via de PKA na produção de ERO em PBMC induzida por H ₂ O ₂	56
Figura 14: Avaliação comparativa do RSV sob a via de AKT/PKB na produção de ERO em PBMC induzida por H ₂ O ₂	58
Figura 15: Avaliação comparativa do RSV sob a via de MAPK na produção de ERO em PBMC induzida por H ₂ O ₂	60
Figura 16: Avaliação comparativa do efeito do RSV na dosagem de IL-6 em PBMC.....	62

Figura 17: Avaliação comparativa do efeito do RSV na dosagem de TNF em PBMC.....	
.....	63
Figura 18: Avaliação comparativa do efeito do RSV na dosagem de IL-10 em PBMC.....	
.....	64
Figura 19: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em PBMC.....	66
Figura 20: Avaliação comparativa da eficácia do RSV na modificação dos níveis plasmáticos de Lp(a) na duas faixas etárias.....	67
Figura 21: Avaliação comparativa da eficácia do RSV na modificação dos níveis plasmáticos de PLA2 nas duas faixas etárias.....	68
Figura 22: Novo mecanismo de interação entre AMPc, EPAC1, SIRT1, AMPK e o RSV.....	
.....	76
Figura 23: Novo mecanismo de interação entre as vias de SIRT1 e AMPK e o RSV.....	
.....	77
Figura 24: Efeito do Resveratrol sobre doenças correlacionadas ao envelhecimento: necessidade de interação de vias metabólicas.....	79
Figura 25: Mecanismos para ativação e inibição mediada por ERO das vias de MAPK.....	
.....	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

·NO = óxido nítrico

·NO₂ = dióxido de nitrogênio

AKT/PKB = proteína cinase B

AMPc / PKA = proteína cinase dependente de AMPc – proteína cinase A

AMPc = 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico

AMPk = Proteína quinase ativada por Monofosfato de Adenosina

Ca²⁺ = íon cálcio

CamKKβ = proteína quinase β dependente de cálcio / calmodulina

CAT = catalase

CD19 + = linfócitos do tipo B do tipo CD19

Cl· = radical cloro

c-NOS = óxido sintase constitutiva

COX = cicloxigenase

COX-2 = ciclooxigenase 2

cPLA2 = fosfolipase A₂ citosólica

CREB = proteína de ligação responsiva ao AMPc

DMSO = dimetil sulfóxido

DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica

Epac 1 = fator de troca do nucleotídeo guanina dependente de AMPc

ERCL = espécies reativas de cloro

ERK-1 = quinase regulada pela sinalização extracelular 1

ERK-2 = quinase regulada pela sinalização extracelular 2

ERN = espécies reativas de nitrogênio

ERO = espécies reativas de oxigênio

GLUT-4 = transportador de glicose do tipo 4

GMCSF = fator de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos

GPx = glutathione peroxidase

GSH = glutathione

GSK3 = glicogênio sintase quinase-3

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

H89 = inibidor de PA

hMESC's = células estaminais mesenquimais derivadas do endométrio humano

HO $\cdot$ = radical hidroxila
HOCl = ácido hipocloroso
IKK = Complexo de proteínas inibitórias
IL-10 = interleucina 10
IL-1 β = interleucina 1-beta
IL-2 = interleucina 2
IL-6 = interleucina 6
IL-8 = interleucina 8
i-NOS = óxido sintase induzível
I κ B = inibidor de kappa beta
JNK = quinase regulada pela sinalização extracelular
LDL = lipoproteína de baixa densidade
LDL = lipoproteína de baixa densidade
Lp (a) = lipoproteína A
Lp-PLA₂ = fosfolipase A₂ associada à lipoproteína
LPS = lipopolissacarídeo
MAP3Ks = MAP quinase quinase quinase
MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno
MKP = Proteína quinase fosfatase
mRNA = RNA mensageiro
MTT = brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólico
N2-A = células de neuroblastoma murinho
NAD⁺ = forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF- κ B = fator de transcrição nuclear kappa B
NOS = óxido nítrico sintase
Nox2 = NADPH oxidase 2
O₂^{•-} = ânion superóxido
ONOO⁻ = peroxinitrito
p38 MAPKinase Inhibitor III = inibidor de p38 MAPKinase
p38MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno p38
PBMC = células mononucleares do sangue periférico
PBS = solução salina tamponada
PCR = proteína C reativa

PDE = fosfodiesterase

PDE4 = fosfodiesterase do tipo 4

PI3K/AKT = fosfatidilinositol-3-quinase/ serina-treonina quinase

PKA = proteína cinase A

PLA₂ = fosfolipase A₂

PPA = proteína precursora de amilóide

RAW 264 = cultura de células de macrófagos da linhagem RAW 264

RSV = Resveratrol

RTKs = Receptores tirosina quinases

SASP = Fenótipo secretor associado à senescência

SIRT's = Sirtuínas

SIRT1 = sirtuína 1

SOD = superóxido dismutase

sPLA₂ = fosfolipase A₂ secretora circulante

TNF = fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	17
2- OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos:	32
2.2.1 Avaliação da Viabilidade Celular através de MTT	32
2.2.2- Avaliação dos Compartimentos Oxidativos e Redutores em Células Mononucleares Humanas.....	32
2.2.3- Avaliação das Vias de Sinalização na liberação de ERO por Células Mononucleares Humanas.....	32
2.2.4- Verificação da Liberação de Interleucinas por células Mononucleares Humanas	32
2.2.5- Avaliação da Produção de Biomarcadores de Cardiopatia em Células Mononucleares Humanas.....	33
3- METODOLOGIA.....	34
3.1-Equipamentos.....	34
3.2- Reagentes	34
3.3- Kits Comerciais	34
3.4- Preparo das soluções	35
3.5- Seleção de Doadores	37
3.6- Separação de células Mononucleares Humanas.....	37
3.7- Ensaio para Definição da concentração de H ₂ O ₂ utilizada no estudo	37
3.8- Definição da concentração de RSV utilizada no estudo.....	38
3.9- Avaliação da viabilidade celular	38
3.9.1- Teste de exclusão por Azul de Tripán	38
3.9.2- Ensaio de MTT.....	38
3.10- Ensaio de Quimioluminescência	39
3.10.1- Quimioluminescência com Células Mononucleares Humanas	40
3.10.2- Quimioluminescência com inibidores da via de PKA (H89), AKT/PKA (Akt Inhibitor) e de MAPK (p38 MAP Kinase Inhibitor III)	40
3.11- Avaliação da dosagem de IL-10 em Células Mononucleares Humanas	42
3.12- Avaliação da dosagem de IL-6 em Células Mononucleares Humanas	42
3.13- Avaliação da dosagem de TNF em Células Mononucleares Humanas	43

3.14- Avaliação do Resveratrol sobre Biomarcadores de Complicações Cardiometabólicas	43
3.14.1- Produção de NO pela “Reação de Griess”	43
3.14.2 Avaliação Comparativa do Efeito do Resveratrol nas Faixas Etárias de Meia Idade e Idosos - Estudo Intervencional.....	44
3.14.3- Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV sobre a Atividade da Lipoproteína A [Lp (a)] em Plasma Humano.....	46
3.14.4 Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV sobre a Atividade da Fosfolipase A ₂ em Plasma Humano	46
3.15- Análise estatística.....	47
4- RESULTADOS	48
PARTE I	48
4.1- Padronização	48
4.1.1 Padronização Através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de H ₂ O ₂ Utilizada em Células Mononucleares Humanas	48
4.1.2- Avaliação por Quimioluminescência e Óxido Nítrico da Produção de ERO Induzida por H ₂ O ₂ em Células Mononucleares Humanas	49
4.1.3- Padronização Através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de RSV Utilizada em Células Mononucleares Humanas	50
4.1.4- Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio de MTT em Células Mononucleares Humanas.....	51
PARTE II	52
4.2- Estudo dos efeitos do Resveratrol sobre os biomarcadores de estresse oxidativo – estudo da sinalização celular.....	52
4.2.1 Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência Dependente de Luminol do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Induzidas por H ₂ O ₂	52
4.2.2- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Sobre a Via de PKA.....	55
4.2.3- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Sobre a Via de AKT/PKB.....	57
4.2.4- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Sobre a Via de MAPK.....	59
PARTE III.....	61

4.3- Estudo dos Efeitos do RSV Sobre os Biomarcadores do Processo Inflamatório Crônico Subclínico	61
4.3.1 Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Dosagem da IL-6 em Células Mononucleares Humanas	61
4.3.2- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Dosagem da TNF em Células Mononucleares Humanas	63
4.3.3- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Dosagem da IL-10 em Células Mononucleares Humanas	64
Parte IV	65
4.4- Estudo dos Resveratrol sobre os biomarcadores de complicações cardiometabólicas - estudos <i>in vitro</i> e intervencional	65
4.4.1- Avaliação Comparativa das Faixas Etárias pelo Método de Griess do Efeito do RSV em Células Mononucleares Humanas Induzidas por H ₂ O ₂	65
4.4.2- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Atividade da Lipoproteína A [Lp(a)] em Plasma Humano.	66
4.4.3- Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Atividade da Fosfolipase A ₂ em Plasma Humano	68
4.4.4- Avaliação Comparativa do Efeito Antioxidante e/ou Anti-inflamatório do RSV nas Faixas Etárias de Meia Idade e Idosos.....	69
5- DISCUSSÃO	70
6- CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO	105
Anexo 1 – Características Demográficas da população do estudo.....	105
Anexo 2: Características estabelecidas no desenho piloto para a dosagem dos níveis plasmáticos de Lp(a) e PLA ₂ após tratamento com RSV.	106

1- INTRODUÇÃO

O processo do envelhecimento populacional é um fenômeno verificado mundialmente, e no Brasil não se dá de forma diferente. As projeções indicam que a população idosa brasileira irá ultrapassar um número de 30 milhões de habitantes em 2020, enquanto que no ano de 2050 tal população será em torno de 253 milhões de pessoas (MENDES *et al*, 2018). Apesar de ser bastante evidenciado nos países desenvolvidos, tal crescimento vem ocorrendo de forma acelerada em países subdesenvolvidos como o Brasil, visto que segundo Renato Veras (2007) o número de idosos no país aumentou num percentual de 600% no período de 1960 a 2006, ou seja, um aumento em menos de cinquenta anos. Os gráficos abaixo (**Figura 1**) demonstram as alterações ocorridas na população brasileira ao longo dos anos.

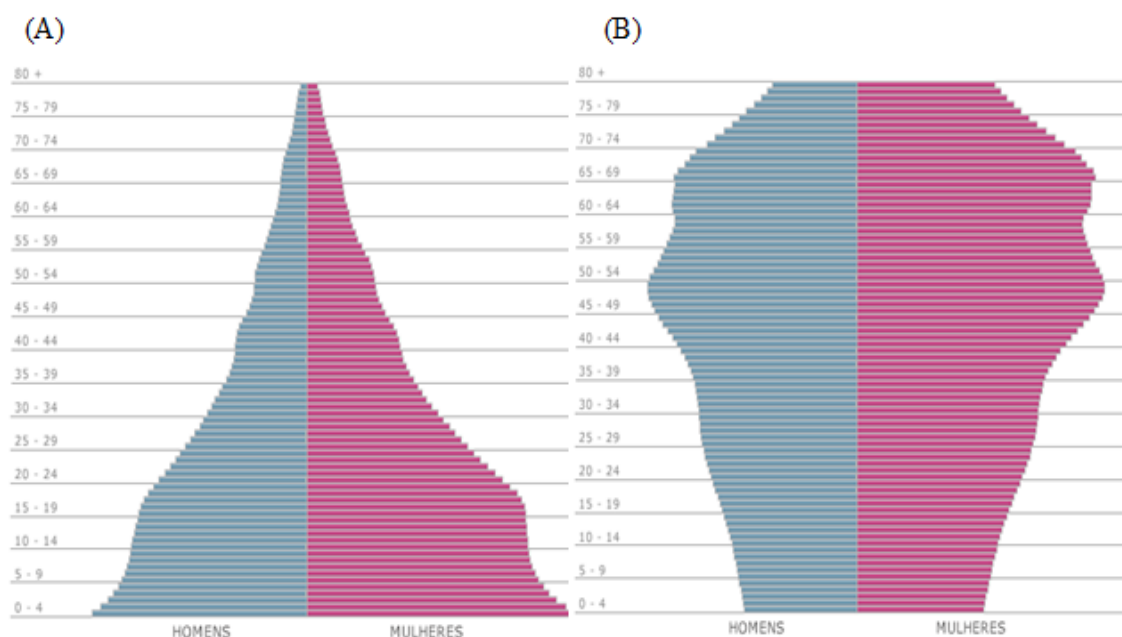


Figura 1: Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população brasileira. Em (A) 1980 e (B) uma projeção para 2050. **Fonte:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2017.

Diante de tal imposição demográfica o processo de envelhecimento tem recebido um maior interesse em todo mundo. O crescente grupo de pessoas idosas não apenas contribui para mudanças nas estruturas sociais, mas também requer uma modificação dos programas nacionais de políticas sociais orientados a satisfazer as diversas necessidades dos idosos (TALARSKA *et al*, 2018).

O envelhecimento pode ser classificado como uma das etapas sequenciais da vida, apresentando-se como um processo lento, progressivo e inevitável, caracterizado por diversas modificações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas, que contribuem para o aumento da vulnerabilidade e incidência dos processos patológicos no organismo (CUNHA, G. L.; JECKEL-NETO, 2002).

Diante desse crescimento acelerado da população idosa, torna-se necessário um maior desenvolvimento de pesquisas a fim de adequar a sociedade a esta nova realidade. De forma que o envelhecimento possui afeitos impactantes na sociedade, sendo o que diz respeito à saúde o mais relevante. Com o aumento da perspectiva de vida, o desafio agora é viver mais, porém de forma saudável e com uma melhor qualidade de vida (MENEZES *et al*, 2018).

A dinâmica do envelhecimento da população mundial fez com que a ciência, os pesquisadores e também a população buscassem formas para minimizar ou evitar os efeitos deste processo, fato que proporcionou nos últimos anos um aumento de pesquisas voltadas para o envelhecimento humano, surgindo várias teorias com o propósito de explicar as causas desse fenômeno (MATSUDO, S. *et al*. 2000).

O processo que envolve o envelhecimento fisiológico classifica-se por inúmeras alterações orgânicas decorrentes do avançar da idade no organismo humano. Tais modificações podem culminar na perda da capacidade desse indivíduo em manter o equilíbrio homeostático, gerando um declínio das funções fisiológicas. De modo que em indivíduos identificados em condições normais, esse processo de envelhecimento irá acontecer, porém o mesmo será capaz de se adaptar a esse novo fenótipo biológico, entretanto quando tal indivíduo se encontra em situações que perturbem a homeostase, pode ocorrer uma disfunção dos sistemas fisiológicos acarretando em processos patológicos (CANCELA, 2007).

A partir daí surge o conceito de senescência e senilidade. O primeiro define-se como o resultado do somatório das mudanças características do processo biológico natural que faz com que as células atinjam um estado de parada de crescimento irreversível fato que pode ser um fator importante no surgimento do fenótipo do envelhecimento, enquanto que o segundo é determinado por alterações de cunho patológico que podem acometer a saúde do idoso (CIO-SAK, S. *et al*. 2011; FARFEL, 2008).

Frente à expansão dos estudos a cerca do envelhecimento, surgiram diversas teorias geradas através de dados epidemiológicos, demográficos e biológicos. Tais teorias tentam explicar o processo de envelhecimento e suas consequências como um mecanismo complexo e multifatorial, sendo que para tanto estas diferentes teorias não apresentam-se em exclusividade podendo descrever tal processo de forma isolada ou em combinação com outras teorias (WEINERT, B.T.; TIMIRAS, P. S, 2003).

Dentre as inúmeras teorias do envelhecimento, as mais conhecidas e difundidas são a Teoria do Envelhecimento Celular, Teoria Imunológica, Teoria das Mutações, Teoria da Reparação do DNA, Teoria da Glicosilação, Teoria da Mutagênese Intrínseca, Teoria dos Telômeros e a Teoria dos Radicais Livres. Como uma das mais conhecidas, a Teoria dos Telômeros descreve que o encurtamento desses componentes celulares está relacionando a perda da longevidade nos organismos, devido a ausência da telomerase, uma enzima que adiciona repetições sucessivas de bases de DNA telomérico aos telômeros (MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P.A.; DUARTE, J. A. 2004).

No entanto, umas das teorias mais bem aceitas é a Teoria dos Radicais Livres, na qual o envelhecimento é desencadeado pelos radicais livres, espécies químicas de alta instabilidade e reatividade que alteram os constituintes biomoleculares do organismo através da sua capacidade em reagir com os mesmos (FRIES, A. T.; PEREIRA, D. C. 2011).

Neste contexto, as espécies de radicais livres são oriundas do meio endógeno tais como das membranas mitocondriais, principalmente na cadeia de transporte de elétrons, bem como fontes citoplasmáticas como a enzima xantina oxidase, outras enzimas oxidantes como ciclooxigenase, NAPH oxidase, peroxissomos e membranas celulares (Yu B. P, 1994; McCord J. M, 1985).

Por outro lado tais espécies também podem ser formadas no ambiente exógeno através de radiação ultravioleta, fumaça de cigarro, poluentes ambientais, álcool, metais pesados e radiação ionizante (PHANIENDRA *et al*, 2015) , os quais podem ser demonstrados na **Figura 2** abaixo.

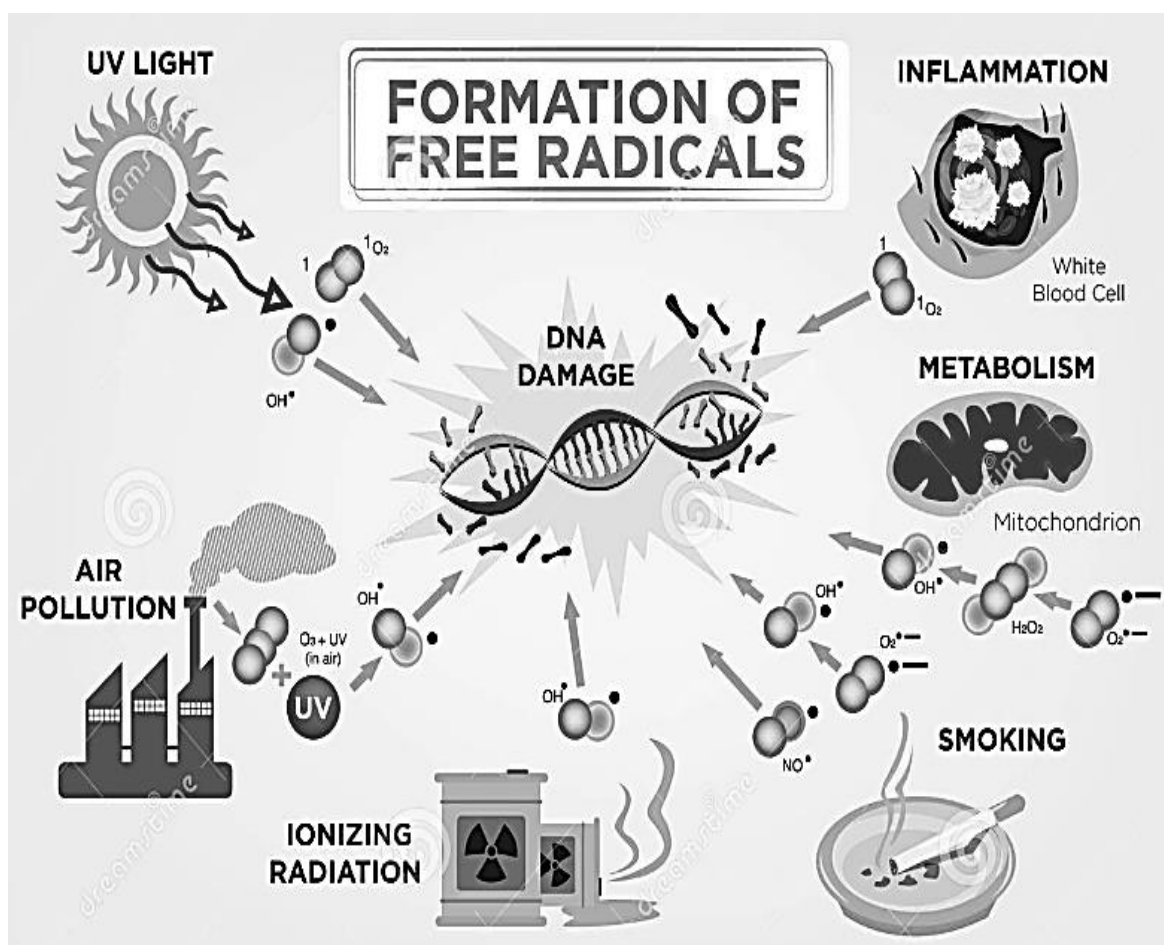


Figura 2: Fatores internos e fatores externos envolvidos na formação de radicais livres que podem contribuir para o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante. **Fonte:** Modificado PENDYALA; THOMAS; KUMARI, 2008.

As espécies reativas são classificadas em espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de cloro (ERCL). O primeiro grupo inclui o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o segundo grupo é representado pelo peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), o óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) e o radical dióxido de nitrogênio ($^{\cdot}NO_2$) enquanto que o terceiro grupo é formado pelo cloro atômico ($Cl^{\cdot}$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (BISWAS, 2016). A **figura 3** representa alguns dos mecanismos intra e extracelulares de formação de ERO e ERN.

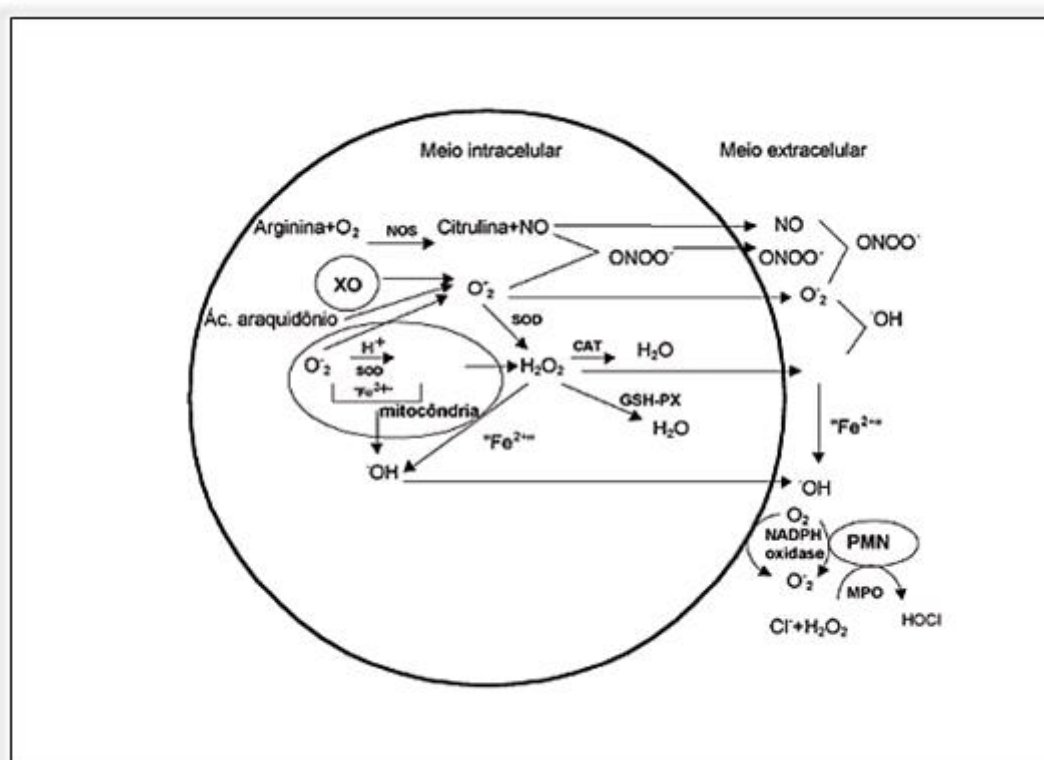


Figura 3. Principais vias de formação intra e extracelular de ERO e ERN. Abrev. NOS (óxido nítrico sintase), NO (óxido nítrico), $ONOO^-$ (peróxido nitrito), XO (xantina oxidase), O_2^- (radical ânion superóxido), PMN (neutrófilos polimorfonucleares), MPO (mieloperoxidase), HOCl (ácido hipoclorídrico), $\cdot OH$ (radical hidroxila), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), SOD (superóxido desmutase), CAT (catalase) e GSH-PX (glutathiona peroxidase). **Fonte:** SILVEIRA, *et al.* 2004.

Diante da exposição elevada às espécies reativas, derivadas de diversas fontes, foi necessário o desenvolvimento de uma série de mecanismos de defesa por parte dos sistemas biológicos. Denominados de defesas antioxidantes, tais mecanismos dividem-se em sistemas enzimáticos os quais destaca-se a atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), e também em sistemas não-enzimáticos representados por alguns compostos como ácido ascórbico (vitamina C), -tocoferol (vitamina E), glutathiona (GSH), carotenoides, flavonoides e outros antioxidantes obtidos através de fontes dietéticas (VALKO *et al.*, 2007). O **Quadro 1** apresenta alguns exemplos de agentes antioxidantes.

Quadro 1. Principais agentes de defesa antioxidante.

Não-enzimático	L-cisteína
α -tocoferol (vitamina E)	curcumina
β -caroteno	Enzimático
Ácido ascórbico (vitamina C)	superóxido dismutase
Flavonóides	catalase
Proteínas do plasma	NADPH-quinona oxidoreductase
Selênio	glutathione peroxidase
Glutathione	enzimas de reparo
Clorofilina	

Quadro 1: Principais agentes de defesa antioxidante enzimática e não-enzimática. **Fonte:** BIANCHI; ANTUNES, 1999.

Quando ocorre um desequilíbrio no estado redox, devido à exacerbação das substâncias pró-oxidantes ou disfunção dos mecanismos antioxidantes, caracteriza-se o Estresse Oxidativo (CROTTY *et al*, 2017). Processo capaz de gerar modificações bioquímicas irreversíveis, sendo responsável por inúmeras doenças crônicas associadas à idade avançada, como diabetes, distúrbios cardiovasculares, reumatismo, mal de Alzheimer e doença de Parkinson (FRIJHOFF *et al*, 2015; CABELLO-VERRUGIO *et al*, 2016; COELHO *et al*, 2005).

O desencadeamento destes estados patológicos no envelhecimento está intimamente relacionado às alterações ocorridas no sistema imune, fenômeno conhecido como imunossenescência, no qual o indivíduo idoso assume um perfil “auto-imune” associado também ao desenvolvimento do estresse oxidativo crônico (BULLONE, M; LAVOIE, J, 2017). Ao se tratar de Sistema Imune deve-se ressaltar que este age através de suas células e as células mononucleares (PBMC) tem importante participação no processo de imunossenescência visto que estas células estão envolvidas na inflamação e durante esse processo existe um aumento significativo da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio e formação de radicais livres (MELLO, A.P, 2015; ABBAS *et al*, 2014; FAURSCHOU, M. BORREGAARD, N, 2003).

Esta condição na qual é caracterizada a redução de função do sistema imune inato, com macrófagos e neutrófilos apresentando alteração da resposta fagocítica, aumento da ati-

vidade inflamatória basal e elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias propiciam um estado de inflamação crônica denominado “Inflammaging” (CECÍ.K, *et al*, 2011).

De modo que esse processo de inflamação crônica subclínica é caracterizado por alterações nas células senescentes que envolvem mudanças relacionadas à expressão gênica, secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, proteases como as mieloperoxidases e ERO. Sendo que tais alterações são características associadas ao surgimento do “fenótipo secretor associado à senescência (SASP)” (COPPÉ, J. *et al*. 2010).

Diversos estudos apontam que o “Inflammaging” contribua para o surgimento de diversas doenças de cunho inflamatório, como a doença de Alzheimer, aterosclerose, diabetes, osteoporose e alguns tipos de cânceres (BRITO. C *et al*, 2011; BAUER. M, 2016). A esquematização deste processo é demonstrada na **Figura 4** abaixo.

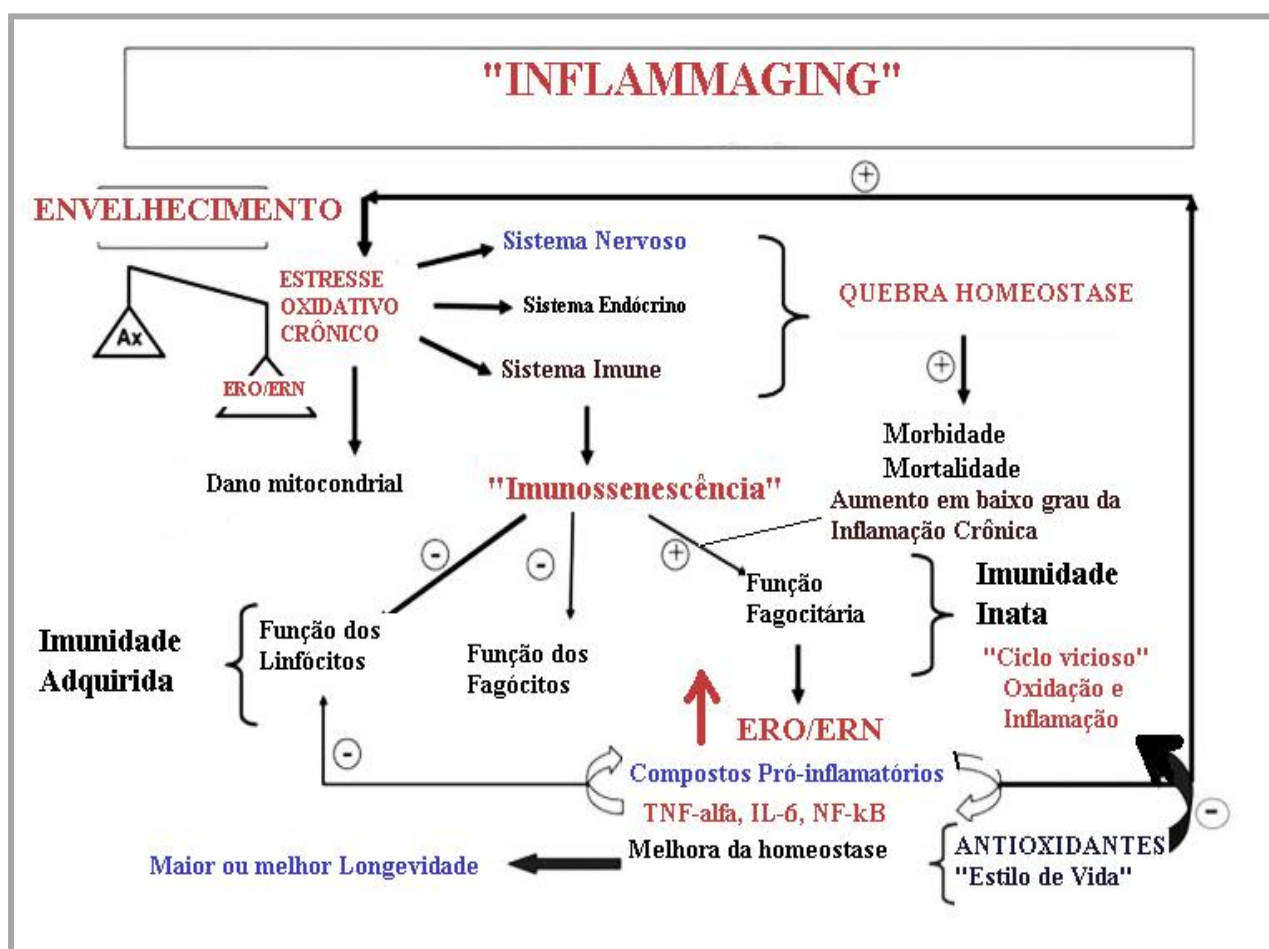


Figura 4: Representação esquemática do processo de “Inflammaging”. **Fonte:** Modificado DE LA FUENTE, 2011.

A inflamação é um mecanismo natural de defesa que ocorre em resposta a estímulos exógenos e endógenos com o objetivo de eliminar o fator causador inicial da lesão celular, bem como as consequências de tal lesão. No entanto, o processo inflamatório prolongado (Inflamação crônica subclínica), que é caracterizado no envelhecimento, pode induzir o dano tecidual e é a causa de muitas doenças crônicas no idoso (BISWAS. S, 2016). Esse perfil de inflamação crônica subclínica caracteriza-se pela infiltração persistente de baixo nível de células imunes, principalmente de células do sistema imune inato e níveis elevados de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tanto no microambiente tecidual quanto no meio sistêmico (PINTI. M *et al*, 2016).

Diante deste novo perfil do sistema imune no envelhecimento, as células inflamatórias liberam várias espécies reativas no local da inflamação, levando a um estresse oxidativo exagerado. Porém numa espécie de mecanismo de retroalimentação, várias espécies reativas de ERO e ERN podem iniciar uma cascata de sinalização intracelular que aumenta a expressão gênica pró-inflamatória (CHANDEL, N. *et al* 2000).

Neste mecanismo de inflamação, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é amplamente conhecido por ser responsável pela expressão de vários componentes inflamatórios. E estudos também apontam que há uma associação entre o estado do envelhecimento e o aumento da atividade do NF- κ B desencadeado pela ocorrência de uma alteração fenotípica transcricional que ocorre nas células no processo de senescência. Outro fator que correlaciona-se com a ação do NF- κ B é o estresse oxidativo, de modo que as ERO que são formadas intracelularmente, regulam positivamente tal composto levando à expressão de citocinas, quimiocinas, e enzimas inflamatórias. Sendo que esse processo se dá através da ativação do IKK pelas espécies reativas, que por sua vez faz com que haja a translocação do NF- κ B para o núcleo da célula, onde ocorre a transcrição dos genes-alvo (TILSTRA, *et al*, 2011; SARKAR, *et al*, 2008).

As citocinas são proteínas reguladoras de baixo peso molecular que agem em resposta a variados estímulos, sendo responsáveis pela mediação, intensidade e duração das respostas imunológicas, tornando-as mais eficazes (TONET. A; NÓBREGA. O, 2008). Existem estudos que apontam para a alteração na secreção dessas substâncias no envelhecimento, de forma que uma importante característica nesse processo é o aumento da produção de citocinas inflamatórias pela imunidade inata (VASTO, S. *et al*, 2007).

De acordo com os dados da literatura as citocinas se subdividem em diferentes tipos e famílias nas quais as funções geram diversos tipos de respostas no sistema imune. Dentre as citocinas de caráter pró-inflamatório o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 6 (IL-6) estão entre as mais conhecidas por desempenharem diversas atividades nos mecanismos imunes relacionados a inflamação, especificamente pela mediação central da resposta de fase aguda (VOLP, A. *et al.* 2010). Devemos ressaltar, que a interleucina 6 também exerce um papel anti-inflamatório dependendo da sua concentração (ROSE-JOHN, S. *et al.* 2012; SCHELLER, J. *et al.* 2011). Já a interleucina 10 (IL-10) destaca-se pelo seu perfil anti-inflamatório nas reações imunológicas na quais participa (ZHANG, J; AN, J, 2007).

A IL-6 é um citocina que desempenha um papel essencial na resposta da inflamação de fase aguda, através da indução da inflamação tanto local quanto sistêmica. Produzida por macrófagos, linfócitos T e células endoteliais, os efeitos desta citocina demonstram-se prejudiciais no envelhecimento, pela sua produção de forma continuada, gerando perda de força muscular, declínio cardiológico, neurológico e alterações cardiovasculares (MINCIULLO, P.L. *et al.* 2016; HOLDSWORTH, S. R.; GAN, P, 2015). Devido a esses achados esta tem sido utilizada como marcador do declínio funcional confiável, agindo como um possível preditor de morbidade e mortalidade no envelhecimento (Giovannini *et al.* 2011).

Assim como a interleucina 6, o TNF também é um mediador da resposta de fase aguda, porém também está envolvido na imunidade adquirida participando, portanto de respostas imunológicas mais específicas. Durante as reações inflamatórias o mesmo realiza o recrutamento de leucócitos, bem como induz a produção de IL-6 e a proteína C reativa (PCR) (BRUUNSGAARD, H. *et al.* 2000).

Já a IL-10 é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, e atua prevenindo a amplificação da resposta inflamatória, suprimindo essa resposta por meio da inativação de macrófagos e bloqueio da apresentação de antígenos. Outra função anti-inflamatória essencial desta citocina é a supressão da atividade de citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF e IL-1 β . Estudos verificaram que os níveis de IL-10 podem estar diminuídos na inflamação crônica em indivíduos idosos (DAGDEVIREN, S. *et al.* 2016; HOLDSWORTH, S. R.; GAN, P , 2015, CHAVES, M.M. *et al.*, 2009).

Após a sua descoberta, a comunidade científica passou anos atribuindo aos ERO a definição de moléculas produzidas por leucócitos com função de proteger o organismo hospedeiro de agressões realizadas por agentes patogênicos externos tais como vírus e bactérias, porém estudos mais recentes apontam que os mesmos também desempenham funções centrais nos mecanismos de sinalização, podendo alterar o caminho de segundos mensageiros e moléculas de sinalização. Tem sido demonstrado que o surgimento de várias condições patológicas de cunho inflamatório pode ser resultado de alterações em vias de sinalização provocadas pelas interações dessas vias com as espécies reativas, citocinas e moléculas inflamatórias. Nesse contexto, há relatos do impacto causado pela produção de ERO em algumas vias de sinalização, tais como as vias de PKA, AKT/PKB e MAPK e de como estes podem alterar as funções das mesmas (LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; FORTUNATO, J. S, 2008).

A Proteína quinase A (PKA) é uma serina-treonina que age como o principal receptor do AMPc em células de mamíferos, sendo associada a maioria dos efeitos biológicos desta substância. A ativação de PKA por meio da geração de AMPc é responsável pela regulação de vários processos celulares tais como, metabolismo, regulação gênica, crescimento, divisão e diferenciação celular (SKALHEGG, B. S.; TASKEN, K. 2000). Pesquisas apontam que a via de AMPc/PKA pode determinar a formação e o acúmulo de ERO em células de mamíferos, através da regulação da expressão e funcionamento catalítico do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Bem como as ERO podem promover a fosforilação de PKA de forma independente de AMPc (ZHANG, et al. 2016). Por outro lado, a proteína PKA foi capaz de inibir a secreção de interleucina 8 (IL-8) na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), exibindo atividade anti-inflamatória (OLDENBURGER, et al. 2012).

Outra via de sinalização em que o estresse oxidativo tem implicações no seu funcionamento é a via da proteína quinase B (Akt/PKB). Esta molécula sinalizadora participa de diversos processos críticos para a célula tais como síntese de proteínas, sobrevivência celular, proliferação e apoptose assim como os mecanismos de inflamação por meio da estimulação de citocinas como IL-6 e IL-2 (ZHANG, et al. 2016). Com a função de sobrevivência celular bem elucidada, esta via promove a sobrevivência neuronal através da sua fosforilação mediada pelo estresse oxidativo induzido por H₂O₂, contra a morte neuronal hipóxica e isquêmica (PARK, et al. 2016). Em contraponto com a função de sobrevivência celular bem estabelecida, autores mostraram que a alta atividade de Akt associada a altos níveis de ERO podem pre-

dispor as células cancerígenas a morte, bem como induzir a senescência celular no envelhecimento (LOS, *et al.* 2009).

Semelhante às vias já citadas, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) as quais são caracterizadas como reguladores que medeiam a transdução de sinal e desempenham papéis importantes em vários processos celulares, como crescimento celular, diferenciação, desenvolvimento, sobrevivência e morte celular, também demonstram alterações ao serem expostas ao estresse oxidativo. Há relatos que indicam que as ERO podem ativar tal via em vários tipos celulares, ao passo que o uso de antioxidante, que acabam por amenizar o acúmulo de ERO na célula, bloqueia a ativação da MAPK (SON, *et al.* 2013). Tratando-se da correlação entre produção de espécies reativas e inflamação, a via p38MAPK pode ser ativada por fator de crescimento e citocinas com o TNF e IL-1 β , assim como é afetada direta ou indiretamente pelo estresse oxidativo (ZHANG, *et al.* 2016).

Diante da ocorrência cada vez mais crescente de doenças crônicas com inflamação subclínica tais como obesidade, doenças cardiovasculares, tromboembólicas e aterogênicas, tem havido um esforço na busca da compreensão a cerca dos mecanismos que envolvem esses processos inflamatórios e se há algum fator que pode preceder um risco futuro de desenvolvimento de tais doenças. Para tanto, os marcadores de inflamação como óxido nítrico (NO), lipoproteína A [Lp (a)] e fosfolipase A₂ (PLA₂) tem sido introduzidos na clínica como alvos potenciais de terapia na prevenção ou no tratamento destas doenças, principalmente as cardiovasculares (VOLP, *et al.* 2008).

Como já mencionado, o óxido nítrico (NO) faz parte das espécies reativas que contribuem no desenvolvimento do estresse oxidativo. Porém há um número crescente de estudos que abordam a participação deste composto em processos biológicos benéficos para a célula. Para tanto a concentração e a fonte de sua síntese que podem determinar tal ação protetora ou tóxica, visto que a reação de síntese é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS), agrupada nas isoformas: NOS constitutiva (c-NOS) e NOS induzível (i-NOS). A c-NOS produz pequenas quantidades de NO, da ordem de nano ou picomols nas células endoteliais em um processo natural a célula, enquanto que a i-NOS não é expressa sob condições normais, sendo induzida por citocinas e endotoxinas em células de macrófagos, linfócitos T, neutrófilos e plaquetas (DUSSE, 2003).

Nessas condições, estudos afirmam que em baixas concentrações o NO tem um papel crucial na vasodilatação, regulação da pressão sanguínea e prevenção da agregação plaquetária. E ainda pode agir como antioxidante pois quando produzido pela c-NOS induz a liberação da SOD e consequentemente diminui a produção ONOO-, assim como diminui a disponibilidade de O₂ através da indução da síntese da ferritina (BARTBERGER, *et al.* 2002; DUSSE, 2003). Por outro lado, acredita-se que a liberação do NO por um longo tempo, através da i-NOS que deveria ser tóxico na invasão de agentes patogênicos também pode acarretar o desenvolvimento de processos patológicos por conta da lesão excessiva a células saudáveis (CERQUEIRA, N. F; YOSHIDA, W. B, 2002; FLORA F, R.; ZILBERSTEIN, B, 2000).

Com o crescimento contínuo da ocorrência de doenças cardiovasculares na população, principalmente em idosos, os biomarcadores de cardiopatia tem demonstrado relevância no que se refere especialmente ao prognóstico dessas doenças, por essa razão biomarcadores tais como a Lipoproteína A e a Fosfolipase A₂ estão cada vez mais inseridos no ambiente clínico (MOTTA, N. A. V. *et al.* 2013; TSIMIKAS. S, 2016).

A lipoproteína A (Lpa), define-se como uma partícula modificada da lipoproteína de baixa densidade (LDL), porém adicionada a uma apolipoproteína específica e ligada à apolipoproteína B-100. Dados sugerem que a Lp(a) também sofre alterações no estresse oxidativo, ocasionando a produção de “epítomos de oxidação” formados através de fosfolipídios oxidados pró-inflamatórios e pró-aterogênicos, assim como a ocorrência de apoptose vascular nas células endoteliais, em resposta a estimulação por espécies reativas de oxigênio. Por conta disso e pela sua concentração plasmática encontrar-se aumentada em situação de estresse, a Lp(a) é um bom preditor de doença cardiovascular aterosclerótica e doença arterial periférica (ORSÓ, E; SCHMITZ, G. 2017 ; KOTANI, K; SAKANE, N. 2011; HEERMEIER *et al*, 1999).

Igualmente utilizado como biomarcador de risco cardiovascular, a fosfolipase A₂ (PLA₂) é uma enzima responsável pela propagação do processo de inflamação produzindo precursores do ácido araquidônico a partir de glicerofosfolipídeos de membrana. Existem cinco principais classes de PLA₂, sendo que duas delas, a fosfolipase A₂ secretora circulante (sPLA₂) e fosfolipase A₂ associada à lipoproteína (Lp-PLA₂) estão relacionadas a progressão da aterosclerose (CORSON, M. 2009) .

A influência dos níveis plasmáticos das sPLA₂ sobre doenças inflamatórias, como artrite reumatóide correlaciona-se com a sua ação enzimática no que tange a geração de mediadores pró-inflamatórios. Estudos sugerem que a sua interação com a bicamada fosfolipídica de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) promove uma mudança na conformação apolipoproteína B acarretando na formação de LDL pró-aterogênica. A agregação da lipoproteína modificada podem sofrer oxidação e captação pelos macrófagos, gerando células espumosas (TALMUD, P; HOLMES, M. 2015).

A Lp-PLA₂ é secretada por células sanguíneas que compõem as respostas inflamatórias como os linfócitos T, macrófagos e mastócitos. Já é consenso no meio científico que a hipertensão constitui um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares baseado nisso, uma pesquisa apontou que uma a isoforma cPLA₂ é crucial para o desenvolvimento da hipertensão induzida por angiotensina II podendo gerar disfunção cardíaca e endotelial e que o estresse oxidativo e a inflamação também dependem desta fosfolipase (KHAN, *et al.* 2015). Baseado em estudos epidemiológicos, é possível inferir que a Lp-PLA₂ está intimamente relacionada com o mecanismo de inflamação vascular, por gerar, dois potentes mediadores pró-inflamatórios, os ácidos graxos livres oxidados e lisofosfolipídeos, ao hidrolisar o componente oxidado da fosfatidilcolina da LDL oxidada (HUANG, *et al.* 2017).

Como dito anteriormente, diante da produção e acúmulo de espécies reativas advindas de diversas fontes tanto no ambiente intracelular quanto extracelular, foram desenvolvidos na célula mecanismos com fim de bloquear e/ou eliminar tais espécies, denominados antioxidantes enzimáticos. Porém existem também os antioxidantes não-enzimáticos, classificados como substâncias naturais como vitaminas e compostos fitoquímicos que tem recebido bastante destaque em pesquisas a cerca do assunto.

Compreendendo substâncias como o ascorbato, carotenoides, tocoferóis, β -caroteno, zinco e polifenóis, esses compostos de baixo peso molecular são capazes de raptar as ERO e também exibem características de proteção de constituintes lipídicos da oxidação, inibição de enzimas como a ciclooxigenase (COX), assumindo então a função anti-inflamatória além da antioxidante (AFONSO, *et al.* 2010).

Fazendo parte das substâncias antioxidantes não-enzimáticas, o Resveratrol (RSV) (3,5,4'-tri-hidroxi-trans-estilbeno), estrutura química representada na **Figura 5**, é classificado como uma fitoalexina polifenólica que pode ser encontrado em algumas plantas como uvas, amendoim, frutas vermelhas e vinho tinto, e apresenta diversas atividades biológicas comprovadas como capacidade antioxidante, anti-inflamatória, anti-apoptótica e antitumoral (JARDIM, *et al.* 2018; TSAI, *et al.* 2017; GAMBINI, *et al.* 2015).

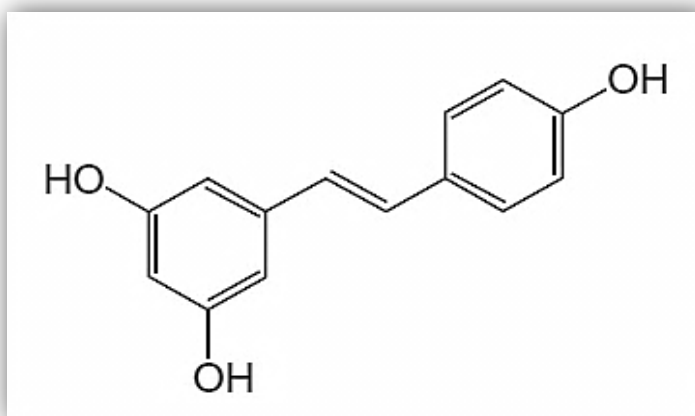


Figura 5: Estrutura química da molécula de Resveratrol. **Fonte:** PANGENI *et al.*, 2014.

Há diversos relatos a cerca da propriedade anti-inflamatória do RSV, realizada através da sua interação com espécies reativas ou substâncias geradoras das mesmas. Uma pesquisa demonstrou que ao ser administrado por via intravenosa o RSV foi capaz de diminuir tanto a inflamação por esquia quanto os oxidantes gerados pela hipoxantina/xantina oxidase (BAUR, *et al.* 2006). Por ser um potente antioxidante o resveratrol é capaz de promover a inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade, aumentar a síntese de óxido nítrico endotelial ativando a NO-sintase, resultando na vasodilatação, redução da agregação plaquetária, ou seja, exibindo assim um efeito de cardioproteção. A fim de avaliar a função anti-inflamatória do RSV, pesquisadores verificaram a redução nos níveis de marcadores de inflamação como o TNF, IL-6 e a enzima mieloperoxidase, assim como aumento de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios como a catalase, superóxido dismutase e a citocina IL-10, ao administrar uma dose de 20 mg/kg de resveratrol em ratos diabéticos (PANGENI, *et al.* 2014).

Tratando-se de pesquisas que abordam a relação entre os efeitos do resveratrol e o processo de envelhecimento, ao administrar uma dose 160 mg/kg por dia em camundongos com senescência acelerada (SAMP8), foi verificado um aumento nos níveis dos componentes

mitocondriais da cadeia respiratória (complexos I – IV) e do complexo V (ATP sintase/ATPase) . Dado interessante visto que, alterações na mitocôndria estão intimamente ligadas a senescência (JARDIM, *et al.* 2018). Dados recentes propõem que o RSV exerce algumas das suas atividades através da ativação de vias de sinalização tais como a Proteína quinase ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPk), que é responsável pela neuroproteção, bem como a via das Sirtuínas (SIRT's) que atua como via anti-inflamatória e antioxidante (CETRULLO *et.al.*, 2015; JÉSKO *et al.* , 2017). Porém diante das diversas propriedades do Resveratrol é possível que o mesmo possa atuar através de outras vias de sinalização, alterando outras moléculas mensageiras, modificando assim o metabolismo de uma forma mais ampla.

Como dito anteriormente, doenças relacionadas ao estresse oxidativo e a formação de radicais livres como as patologias de caráter inflamatório tem atingido um crescimento epidemiológico no cenário mundial. Nesse cenário, a população idosa faz parte de um perfil de risco, visto que inúmeras pesquisas comprovam a grande associação entre o estresse oxidativo e o processo de envelhecimento, fato que pode desencadear alterações biológicas ocorridas ao longo do tempo culminando nas doenças inflamatórias crônicas. Patologias com tal característica como as doenças cardiovasculares e diabetes vem se tornando altamente prevalentes nesta faixa etária da população sendo consideradas, portanto um problema de saúde pública na sociedade. Diante dessa problemática tem havido um número crescente de pesquisas na busca de entender como se dá tal processo, bem como o desenvolvimento de novas abordagens no que se refere ao diagnóstico, tratamento e especialmente a prevenção.

Baseado na busca cada vez mais crescente de terapias a partir de fontes naturais, somadas a comprovação da grande atividade antioxidante e anti-inflamatória de vários destes compostos, o Resveratrol configura-se como uma substância em potencial para tal fim. De modo que, apesar da comprovação das suas propriedades biológicas, o mecanismo de ação pelo qual exerce tais atividades ainda permanece com várias lacunas. Sendo assim demonstra-se de grande importância o esclarecimento por quais mecanismos e vias de sinalização atua o Resveratrol para reduzir os danos celulares e teciduais causado pelos radicais livres no processo de envelhecimento saudável, e ainda se há alguma variação quanto ao impacto na ação do mesmo em diferentes faixas etárias.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar em um ambiente de estresse oxidativo em células Mononucleares Humanas de doadores de 40-59 e 60-80 anos o possível efeito antioxidante e/ou anti-inflamatório do Resveratrol.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Avaliação da Viabilidade Celular através de MTT

- Avaliar a capacidade redutora celular por ensaio de MTT, em células Mononucleares Humanas estimuladas com Resveratrol.

2.2.2- Avaliação dos Compartimentos Oxidativos em Células Mononucleares Humanas

- Quantificar a produção de ERO, por ensaio de Quimioluminescência dependente de luminol, em Células Mononucleares Humanas;

2.2.3- Avaliação das Vias de Sinalização em Células Mononucleares Humanas

- Avaliar a produção de ERO por ensaio de Quimioluminescência dependente de luminol, na ausência ou presença de inibidor da via de sinalização celular: H89: Inibidor de PKA, Akt Inibitor: Inibidor de AKT/PKB e p38 MAP Kinase Inibitor III): Inibidor específico da MAPK; em Células Mononucleares Humanas.

2.2.4- Verificação da Liberação de Interleucinas por células Mononucleares Humanas

- Dosagem de IL-10, IL-6 e TNF, através de kits comerciais, em células Mononucleares Humanas.

2.2.5- Avaliação da Produção de Biomarcadores cardiometabólicos em Células Mononucleares Humanas

- Mensurar a Produção de NO por *Reação de Griess*, em Células Mononucleares Humanas estimuladas com Resveratrol;
- Realizar a dosagem da Lipoproteína A e Fosfolipase A₂ através de kits comerciais em plasma humano;

3- METODOLOGIA

3.1-Equipamentos

Autoclave vertical (PHOENIX), Banho-Maria a 37°C (HEMOQUÍMICA), Câmara de Neubauer espelhada (OPTIK LABOR), Centrífuga (LS3PLUS-CELM), Estufa (SHEL LAB), Leitor de Microplacas (THERMO PLATE), Microscópio biológico binocular (BIOVAL), Luminômetro (Berthold Lumat LB 9501), Capela (PERMUTION, E.J. Krieger, Cia LTDA), Balança semi analítica (MARTE), PhMETRO (Nalgon).

3.2- Reagentes

Resveratrol, Ácido Fosfórico 85%, Azul de Trypan, Dimetilsulfoxido (DMSO), Hidroxido de sódio Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione*), MTT 3-(4,5 dimethiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide), Naftiletilenodiamida, Sulfanilamida foram obtidos pela Sigma Aldrich (St Louis,MO). Ácido Clorídrico, Cloreto de sódio, Cloreto de Potássio, Fosfato de sódio bifásico anidro, Fosfato de potássio monobásico anidro, Nitrito de sódio e Peróxido de Hidrogênio 30% (H₂O₂) foram obtidos da LabSynth (São Paulo, BR). Meio RPMI-1640 com L-GLUTAMINA 25MM HEPES ISENTA DE BICARBONATO DE SÓDIO (SIGMA ALDRICH), gelatina de pele suína , tipo A (SIGMA ALDRICH), Telebrix 30 Meglumina (Guerbet). Por fim, In solutionTM H89, Akt Inhibitor, p38 MAP Kinase Inhibitor III foram obtidos pela Calbiochem (Darmstadt, Germany).

3.3- Kits Comerciais

ENZO (human) IL-10 (ADI 900-036), IL-6 (ADI 900-033) , TNF (ADI 901-099) e sPLA₂, (ADI-907-002) Elisa Kit – Enzo life Sciences e human Lp(a), ELISA AssayPro (CEL3001-1).

3.4- Preparo das soluções

SOLUÇÃO DE H₂O₂ 18%v/v

Para solução estoque, 300 µL de H₂O₂ 30%v/v foi diluído para um volume final de 500 µL com PBS. Posteriormente o conteúdo foi homogeneizado e colocado em eppendorf.

SOLUÇÃO DE RESVERATROL

Para solução estoque, o conteúdo do frasco (100mg) foi diluído em 10 mL de DMSO. Esta solução (43810µM) foi estocada refrigerada. Para uso, faz-se uma solução com volume de 10 mL: pipeta-se 18µL do estoque (43810µM) e adiciona-se 9982 mL de PBS. Esta solução está a 78.94µM que é também, filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns, e colocada em recipiente estéril.

SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO SALINA SEM CÁLCIO E SEM MAGNÉSIO (PBS)

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais: Na₂HPO₄ (1,15g), KH₂PO₄ (0,20g), NaCl (8,0g), KCl (0,20g), sendo o volume final completado para 1 litro com água MILLI-Q. O potencial hidrogeniônico (pH) da solução (7,3) foi acertado utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N.

SOLUÇÃO DE AZUL DE TRIPAN

Fez-se a diluição de 0,1g do corante Azul de Tripán em 100 mL de solução de PBS (0,1% em PBS).

MEIO DE CULTURA RPMI

Um frasco de RPMI foi diluído em 900 mL de água Mili-Q. Em seguida foram adicionados 2,2g de bicarbonato de sódio e solução antibiótica / antimicótica. O pH foi ajustado para a faixa de 7,3 – 7,4, utilizando-se NaOH 0,5N. O volume final da solução foi ajustado

para 1000 mL. Em seguida a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns, e colocada em recipiente estéril.

SOLUÇÃO PADRÃO DE NITRITO

Para o preparo da solução 6,9 mg de Nitrito de sódio (NaNO_2) foi dissolvido em 10 mL de PBS; com a obtenção de uma solução padrão a 10 mM.

SOLUÇÃO DE SUFANILAMIDA 1%

Para o preparo da solução, 1,0g de Sulfanilamida foi dissolvido em 100 mL de Ácido Fosfórico 2,5%. O conteúdo foi homogeneizado e protegido da luz.

SOLUÇÃO DE NAFTILENODIAMIDA 0,1%

Para o preparo da solução, 0,1g de Naftilenodiamida foi dissolvido em 100 mL de Ácido Fosfórico 2,5%. O conteúdo foi homogeneizado e protegido da luz.

SOLUÇÃO DE GRIESS

Esta solução foi preparada a partir da mistura em proporções iguais da Sulfanilamida 1% com Nafitiletenodiamida 0,1%. Essa solução é feita no momento da dosagem de nitrito, no Teste de produção de NO.

SOLUÇÃO DE LUMINOL

Luminol: 1,77 mg, DMSO: 1,00 mL. Esta solução (10^{-2}M) foi estocada sem contato com a luz. Para uso, diluía-se 100 vezes (1:100) a solução estoque em solução salina de PBS.

SEPARAÇÃO DAS CELULAS MONONUCLEARES

Solução fornecida pela Bion® e a separação foi realizada segundo as informações do fabricante.

MTT

A solução de MTT foi preparada com 5 mg de MTT para 1 mL de PBS a pH 7,3 e estocada em recipiente fechado, vedado de luz e ar sob refrigeração até 8° C.

3.5- Seleção de Doadores

Projeto aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - CAAE: 2 45249715.1.0000.5149. Foram selecionados indivíduos de 40 a 80 anos, pertencentes a ambos os sexos, nos quais as amostras foram cedidas através da parceria com diversos laboratórios. Os indivíduos selecionados foram divididos em duas faixas etárias, sendo a primeira de 40 a 59 anos, denominada grupo de meia idade, enquanto que a segunda faixa etária de 60 a 80 anos foi denominada, grupo de idosos. Aqueles que estiveram aptos à participação, foram submetidos à assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As características demográficas da população do estudo encontram-se no **anexo 1**.

3.6- Separação de células Mononucleares Humanas

Em suma, 4mL de sangue heparinizado foram adicionados sobre 3 mL de gradiente Monopaque (densidade= 1,12) em tubos de vidro. Após centrifugação a 2200 rpm por 15 minutos foram obtidas duas fases distintas separadas por dois anéis interfásicos. O plasma, correspondente à primeira fase formada após centrifugação, foi descartado. As células mononucleares foram acondicionadas em um tubo de vidro, que teve seu volume completado com PBS (pH=7,3) para duas sessões de lavagem a 2200 rpm por 10 minutos cada. Após as duas lavagens as células foram suspensas em 1,0 mL de PBS. Para utilização, as mesmas foram diluídas 100 vezes em PBS e contadas em placa de Newbauer. O volume final foi ajustado para 1×10^6 células em 100 μ L.

3.7- Ensaio para Definição da concentração de H₂O₂ utilizada no estudo

As células Mononucleares humanas foram estimuladas com concentrações crescentes de H₂O₂: H₂O₂ 0.1%v/v; H₂O₂ 0.25%v/v H₂O₂ 0.64%v/v; H₂O₂ 1.61%v/v; H₂O₂ 4.02%v/v, por 24 horas 37°C e umidade. O ensaio de Azul de Tripán foi utilizado para conferir a viabili-

dade celular. Foi realizado teste de quimioluminescência e óxido nítrico (item 4.10) para as concentrações que apresentaram viabilidade celular dentro dos parâmetros aceitáveis (OLIVEIRA, L; DIAS, S, 1970).

3.8- Definição da concentração de RSV utilizada no estudo

A concentração do RSV (5 µM) escolhida para ser usada em Células Mononucleares humanas foi baseada em uma Curva Dose-Resposta através do teste de Viabilidade por MTT, padronizada no laboratório.

3.9- Avaliação da viabilidade celular

3.9.1- Teste de exclusão por Azul de Tripán

A viabilidade das células Mononucleares Humanas utilizados nos ensaio de dosagem de óxido nítrico foi monitorada pelo teste de exclusão de azul de tripan (OLIVEIRA, L; DIAS, S., 1970). Resumidamente, após a incubação em banho-maria por 24 horas para quantificação de nitrito, as células foram centrifugadas a 1500 por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem de nitrito. O “pellet” foi ressuspenso em 100µL de PBS pH 7,4, ao qual foi adicionado imediatamente 1 gota de solução 0,1% de azul de tripan em salina. Após a análise por microscopia óptica, as células mononucleares eram consideradas inviáveis quando eram preenchidas pelo azul de Tripán ou então quando havia degeneração de seu formato comum. A contagem da viabilidade celular foi feita em placa de Newbauer, seguindo o cálculo a seguir:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{"número de células viáveis"}}{\text{"número total de células"}} \times 100$$

3.9.2- Ensaio de MTT

O MTT é um teste de citotoxicidade utilizado para mensurar a proliferação celular. Classificado como um teste colorimétrico, a determinação da viabilidade celular se dá de forma que o tetrazol do MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólico) sofre redução na mitocôndria de células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, formando cristais de formazan passando assim da coloração amarela para a púrpura (MOSMANN, *et al.* 1996). A formação dos cristais de formazan está ligada ao estado funcional da cadeia respiratória, bem como a sua formação é diretamente proporcional ao número de células viáveis e pode ser facilmente determinada em aparelho de espectrofotômetro (FIGUEIROA, *et al.* 2016).

Para execução deste experimento, as células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células/poço. Foram divididos em quatro grupos (triplicata por grupo) com tratamentos distintos descritos na **tabela 1**. Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 30 minutos.

Após esses 20 minutos, acrescentou-se 20µL da solução de MTT aos poços e a placa foi colocada mais uma vez em estufa a 37°C por 30 minutos protegida da luz. Em seguida, adicionou-se 100µL de DMSO homogeneizando para dissolução dos cristais de formazan gerados. A absorbância foi lida a 570nm no leitor de microplacas.

Tabela 1: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de MTT em PBMC.

Placa de 96 poços	PBMC (5×10^5)	H ₂ O ₂ 18% v/v	RSV 79.84 µM	RPMI sem soro
Basal	50 µL			130 µL
H ₂ O ₂ 0,64% v/v	50 µL	7 µL		123 µL
H ₂ O ₂ 0,64% v/v + RSV 5 µM	50 µL	7 µL	13 µL	110 µL
RSV 5 µM	50 µL		13 µL	117 µL

3.10- Ensaio de Quimioluminescência

Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4 phthalozinedione) e as espécies reativas geradas na ausência ou presença das diferentes concentrações das substâncias, individualmente. As células produzem uma luminosidade natural definida como quimioluminescência nativa ou natural. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada, usando-se reagentes químicos que, ao reagirem com as ERO produzidas, passam a emitir a luminescência amplificada, conforme a reação abaixo (**Figura 6**):

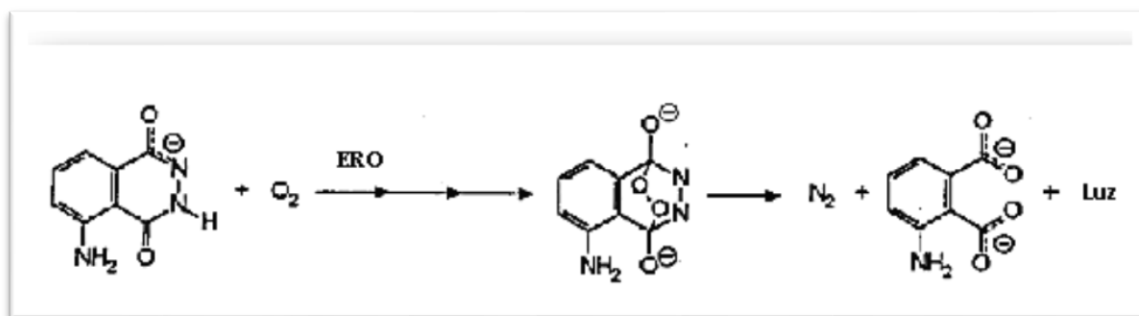


Figura 6: Reação de Quimioluminescência dependente de Luminol. **Fonte Modificada:** Albertin *et. al.*, 1998.

3.10.1- Quimioluminescência com Células Mononucleares Humanas

Um total 1×10^6 células Mononucleares Humanas foram divididas em quatro grupos (1×10^6 células/grupo) com tratamentos diferentes, como descrito na **tabela 2**. Em tubos específicos para Luminômetro, no qual os compostos contidos nos tratamentos foram colocados diretamente nos tubos, adicionou-se os 500 μ L de luminol 10^{-4} M para completar o volume final de 700 μ L. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 10 minutos. Após o tempo decorrido, a leitura era realizada com valores de Unidades Relativas de Luz/minuto (RLU/min.) colocando-se o tubo subsequente para leitura. O processo foi repetido para todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo.

Tabela 2: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC

Tubos de luminômetro	PBMC (1×10^6)	H ₂ O ₂ 18% v/v	RSV 79.84 μ M	PBS
Basal	100 μ L	-	-	100 μ L
H ₂ O ₂ 0,64% v/v	100 μ L	10 μ L	-	90 μ L
H ₂ O ₂ 0,64% v/v + RSV 5 μ M	100 μ L	10 μ L	43.5 μ L	46.5 μ L
RSV 5 μ M	100 μ L	-	43.5 μ L	56.5 μ L

3.10.2- Quimioluminescência com inibidores da via de PKA (H89), AKT/PKA (Akt Inhibitor) e de MAPK (p38 MAP Kinase Inhibitor III)

As concentrações dos inibidores H89, Akt Inhibitor e p38 MAP Kinase Inhibitor III foi baseada na literatura, além de padronizações realizadas anteriormente pelo laboratório. A concentração do H89 (1 μ M) foi baseada em experimentos realizados por ZHANG *et al.*, en-

quanto que as concentrações do Akt Inhibitor (1 μ M) e p38MAPKinase Inhibitor III (10 μ M) foram baseadas nos experimentos realizados por URAK *et al* e SWEPSO *et al*, respectivamente.

Com o objetivo de verificar se os inibidores necessitariam da maquinaria celular para exercer a sua ação ou se os mesmos poderiam reagir de forma inespecífica com compostos tais como o Resveratrol ou/e H₂O₂, foi realizado um experimento controle caracterizado pela não adição de célula, descritos na **tabela 3**.

Adicionalmente foi utilizado um segundo controle com adição de célula descritos na **tabela 4**, com o intuito de estabelecer uma comparação dos resultados da Quimioluminescência entres estes e os grupos que continham inibidor, bem como observar tal interação.

Somados aos grupos controles, foi realizado o experimento no qual utilizou-se grupos com adição dos respectivos inibidores, adicionados separadamente em relação ao outro inibidor. Inicialmente, 100 μ L das células a 1×10^6 foram incubadas com 100 μ L do inibidor (H89 a 1 μ M, Akt Inhibitor a 1 μ M e p38 MAP Kinase Inhibitor III a 10 μ M) em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, esses grupos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, o pellet foi descartado sendo que os tratamentos (descritos na tabela 4) foram adicionados.

Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 500 μ L de luminol 10⁻⁴M para completar o volume final de 700 μ L. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 10 minutos. Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de Unidades Relativas de Luz/minuto. (RLU/min.) colocando novo tubo para leitura. O processo foi repetido para todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo.

Tabela 3: Disposição dos grupos controles sem células e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC.

Tubos de luminômetro	Inibidor	H ₂ O ₂ 18% v/v	RSV 79.84 μ M	PBS
Inibidor + H ₂ O ₂ 0,64% v/v	100 μ L	10 μ L	-	90 μ L
Inibidor + RSV 5 μ M	100 μ L	-	44 μ L	56 μ L

Tabela 4: Disposição dos grupos com inibidor e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC.

Tubos de luminômetro	H ₂ O ₂ 18% v/v	RSV 79.84 µM	PBS
Basal	-	-	200 µL
H ₂ O ₂ 0,64% v/v	10 µL	-	190 µL
H ₂ O ₂ 0,64% v/v + RSV 5 µM	10 µL	44 µL	146 µL
RSV 5 µM	-	44 µL	156 µL

3.11- Avaliação da dosagem de IL-10 em Células Mononucleares Humanas

As células foram inicialmente incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas na concentração de 1×10^6 seguindo o padrão de análise com quatro grupos nos quais o tratamento encontra-se descrito na **tabela 5**. Após essas 24 horas, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante coletado para a análise posterior. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e seguiu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da concentração de IL-10.

Human IL-10 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences

As amostras foram lidas a 450nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

3.12- Avaliação da dosagem de IL-6 em Células Mononucleares Humanas

As células foram inicialmente incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas na concentração de 1×10^6 seguindo o padrão de análise com quatro grupos nos quais o tratamento encontra-se descrito na **tabela 5**. Após essas 24 horas, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante coletado para a análise posterior. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e seguiu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da concentração de IL-6.

Human IL-6 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences

As amostras foram lidas a 450nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

3.13- Avaliação da dosagem de TNF em Células Mononucleares Humanas

As células foram inicialmente incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas na concentração de 1×10^6 , seguindo o padrão de análise com quatro grupos nos quais o tratamento encontra-se descrito na **tabela 5**. Após essas 24 horas, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante coletado para a análise posterior. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e seguiu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da concentração de TNF.

Human TNF Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences

As amostras foram lidas a 450nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

3.14- Avaliação do Resveratrol sobre Biomarcadores de Complicações Cardiometabólicas

3.14.1- Produção de NO pela “Reação de Griess”

A determinação indireta do NO pode ser realizada através da dosagem de um dos seus metabólitos, o nitrito, sendo que o método frequentemente utilizado na mensuração desse íon baseia-se na reação de Griess (GRIESS, 1864).

Este método de quantificação caracteriza-se pela reação entre o nitrito com a sulfanilamida em meio ácido, gerando o composto diazótico que por sua vez reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina, resultando na coloração vermelha (RAMOS *et al.* 2006).

Seguindo tal protocolo, a produção de NO em Células Mononucleares humanas, através dosagem de nitrito, foi quantificada de modo que foram utilizados quatro grupos para análise, os quais encontram-se descritos na **tabela 5**. Sendo que em cada um dos grupos, 1×10^6 células foram inicialmente incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas. Após estas 24 horas, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem do nitrito. Enquanto que o *pellet* foi resuspenso em 100µl de PBS pH 7,4 e imediatamente, submetido à análise de viabilidade celular. Para dosagem do

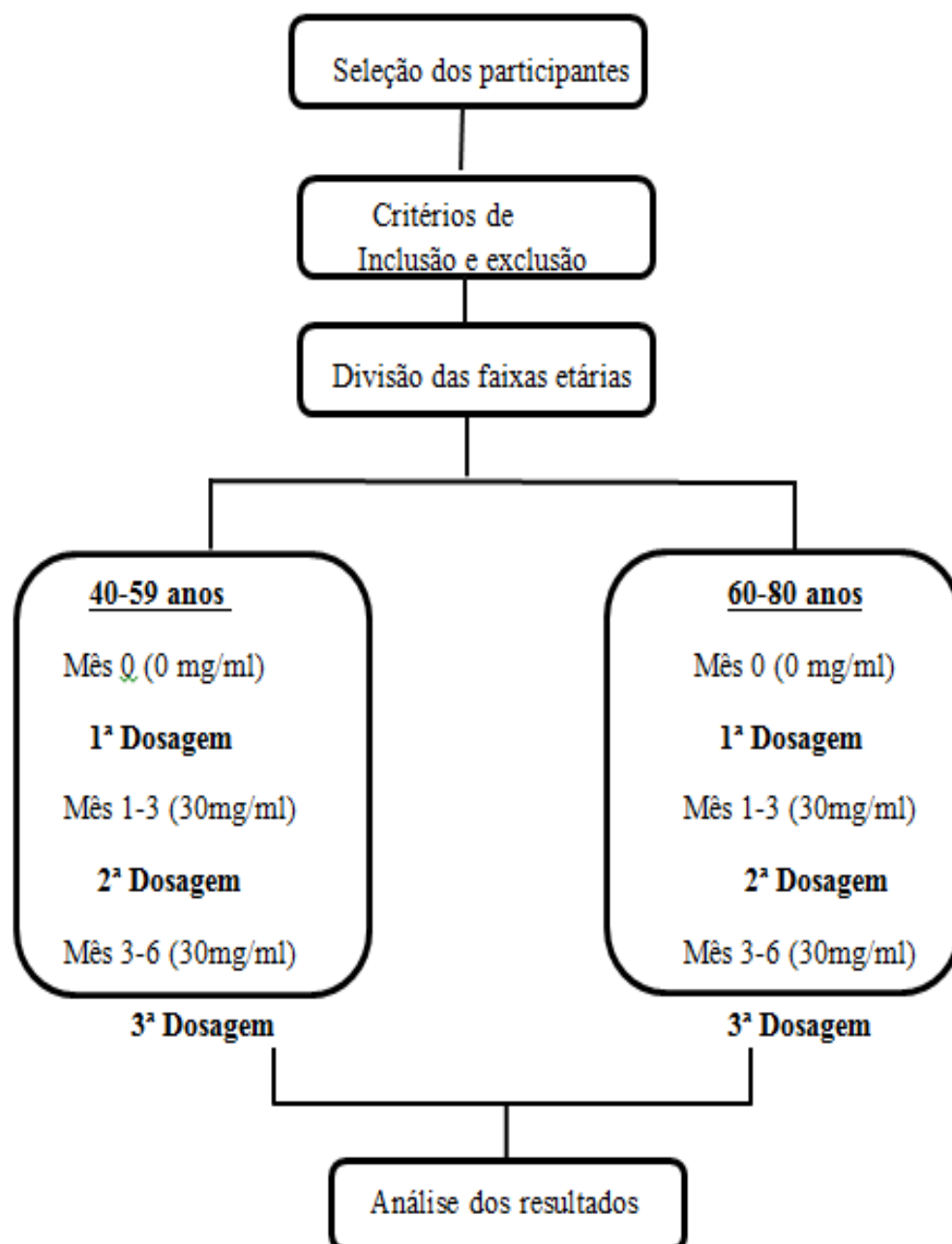
nitrito, foi utilizado 100µl de sobrenadante, que foram dispostos em placas de 96 poços. Aos sobrenadantes, foram adicionados 100µl de solução de Griess, que é formada de sulfanilamina 1% em 2,5% de ácido fosfórico e naitilenodiamina 0,1% em 25% de ácido fosfórico, na proporção 1:1. O conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1 mM e meio de cultura RPMI.

Tabela 5: Disposição dos grupos e seus tratamentos na Análise de produção de NO pela “Reação de Griess” em PBMC.

Tubos de vidro	PBMC (1X10 ⁶)	H ₂ O ₂ 18% v/v	RSV 79.84 µM	RPMI sem soro
Basal	100 µL	-	-	200 µL
H ₂ O ₂ 0,64% v/v	100 µL	10 µL		190 µL
H ₂ O ₂ 0,64% v/v + RSV 5 µM	100 µL	10 µL	18.75 µL	171.25 µL
RSV 5 µM	100 µL	-	18.75 µL	181.25µL

3.14.2 Avaliação Comparativa do Efeito do Resveratrol nas Faixas Etárias de Meia Idade e Idosos - Estudo Intervencional

O estudo foi realizado com doadores da faixa etária de 40 a 80 anos, sob a colaboração do médico José Wilson Ribas. De forma que a realização dos testes aconteceram na Clínica IVC Health testes em saúde humana – Belo Horizonte, MG com parceria da Reviv - Centro Avançado de Medicina Integrativa – ME – Brasília, DF. O estudo intervencional foi delineado através de um desenho piloto seguindo as características baseadas em estudos descritos na literatura (**Anexo 2**), de modo que tais características são representadas no **esquema 1**, a seguir.



Esquema 1: Desenho piloto utilizado no Estudo Intervencional para Dosagem de Lp(a) e PLA₂ sob o efeito do RSV.

3.14.3- Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV sobre a Atividade da Liproteína A [Lp (a)] em Plasma Humano

As amostras de plasma foram obtidas através da coleta de sangue via intravenosa, utilizando tubo heparinizado, sendo processadas através da centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. Após os 10 min, o plasma foi estocado a -20°C até o momento da realização do teste. Em seguida, 5µl de plasma foi utilizado numa diluição de 1:8000 e seguiu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade de [Lp (a)].

Human [Lp(a)] Uncoated ELISA- AssayPro

As amostras foram lidas a 405 nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

3.14.4 Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV sobre a Atividade da Fosfolipase A₂ em Plasma Humano

As amostras de plasma foram obtidas através da coleta de sangue via intravenosa, utilizando tubo heparinizado, sendo processadas através da centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. Após os 10 min, o plasma foi estocado a -20°C até o momento da realização do teste. Em seguida, 50µl de plasma foi utilizado e seguiu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade de PLA₂.

Human sPLA₂ Colorimetric detection - ENZO Life Sciences

As amostras foram lidas a 405 nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

3.15- Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Todos os dados foram analisados pelo teste de normalidade *Kolmogorov–Smirnov*. Foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA *one-way*) seguida pelo teste de Dunnett ou Bonferroni, quando as amostras apresentavam distribuição normal, e o teste de Dunns quando não seguiam a distribuição normal. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (San Diego, California, USA).

4- RESULTADOS

PARTE I

4.1- Padronização

4.1.1 Padronização Através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de H_2O_2 Utilizada em Células Mononucleares Humanas

Devido às suas propriedades físico-químicas, como estabilidade, meia-vida longa e fácil difusão através das membranas celulares, o H_2O_2 caracteriza-se como fator oxidante interessante na indução do estresse oxidativo, sendo bastante utilizado em estudos de sinalização das respostas celulares (HUANG, B; SIKES, H. 2014). Sendo este um potencial mensageiro no transporte da desregulação redox, podendo contribuir para ocorrência de diversos processos inflamatórios tais como nas doenças cardiometabólicas (SIES, H. 2017; FONSECA, L *et al.* 2014). Diante disto, foi realizada a padronização da concentração de uso do H_2O_2 através da estimulação das células mononucleares humanas com valores crescentes de concentração do H_2O_2 0.1%v/v; H_2O_2 0.25%v/v H_2O_2 0.64%v/v; H_2O_2 1.61%v/v; H_2O_2 4.02%v/v, as quais os resultados podem ser observados na **figura 7**.

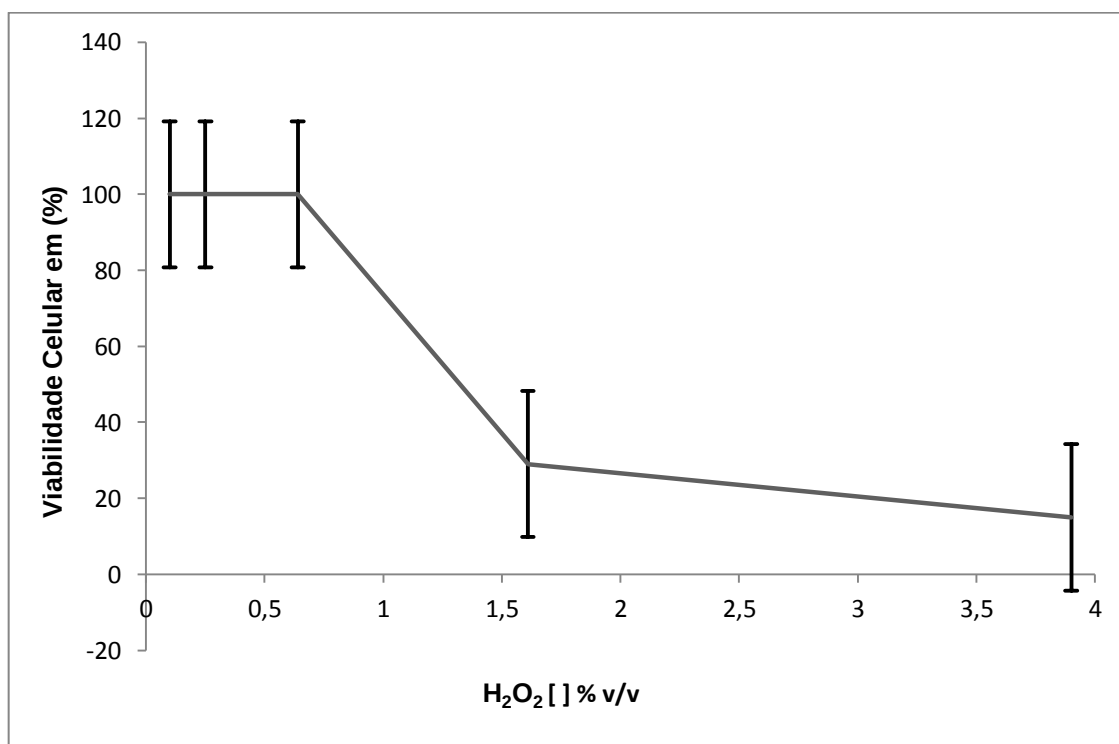


Figura 7: Curva Concentração-Resposta de H_2O_2 em PBCMs. As PBCMs foram estimuladas por concentrações crescentes de H_2O_2 por 10 minutos (H_2O_2 0.1%v/v; H_2O_2 0.25%v/v H_2O_2 0.64%v/v; H_2O_2 1.61%v/v; H_2O_2 4.02%v/v;) e a viabilidade das mesmas foi testada através do teste de Azul de Tripán, que para ser considerado viável deve apresentar pelo menos 70% de células vivas. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração com n= 9.

De acordo com o que é demonstrado na **figura 7** é possível observar que as PBCMs se mantêm viáveis, ou seja, com viabilidade acima de 70% apenas no intervalo de concentração 0.1%v/v a 0,64 %v/v de H₂O₂. Diante destes resultados o nosso próximo passo foi verificar se estas três concentrações eram capazes de gerar a mesma quantidade de ERO expressa por RLU/min, via ensaio de quimioluminescência.

4.1.2- Avaliação por Quimioluminescência e Óxido Nítrico da Produção de ERO Induzida por H₂O₂ em Células Mononucleares Humanas

Como dito anteriormente, seguindo com as três concentrações em que as células mononucleares apresentaram-se viáveis, no ensaio de Quimioluminescência foi possível constatar através da análise da **figura 8** que apesar da concentração de 0.1%v/v de H₂O₂ ter sido capaz de induzir um estímulo necessário para a produção de ERO quando comparada ao controle celular basal esta não foi capaz de induzir a mesma quantidade de ERO das duas outras concentrações estudadas a saber: 0,25 %v/v e 0,64 %v/v. Verificamos também que as concentrações de 0,25 %v/v e 0,64 %v/v induziram a mesma quantidade de ERO e que na nossa curva a concentração de 0,64% atingiu o estado de platô, no qual a partir desta concentração tivemos uma morte celular maior que 70%.

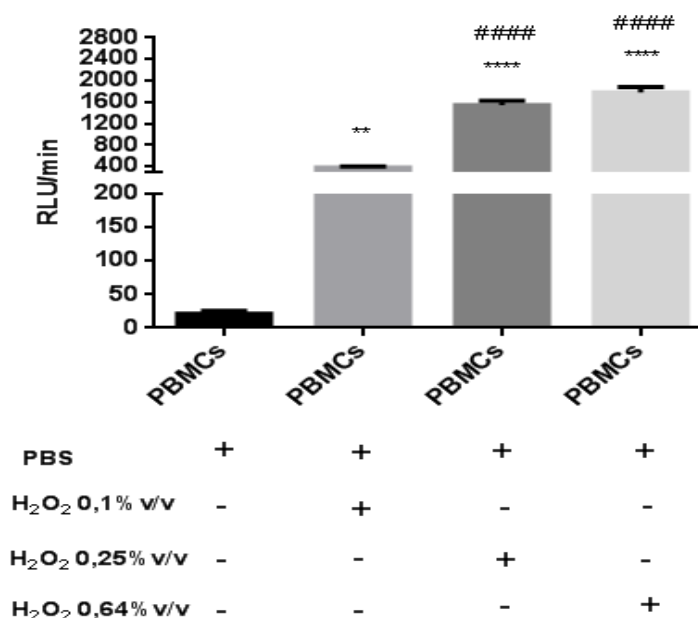


Figura 8: Avaliação da produção de ERO induzida pelo H₂O₂ no ensaio de Quimioluminescência. A geração de ERO foi expressa em RLU/min durante 10 minutos; **< 0,005; **** e ##### = p< 0,0001; = resultado significativo pela análise de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni's. **** e **: em relação ao grupo basal ; #####: em relação ao grupo H₂O₂ 0.1%v/v . n = 9.

Já no ensaio de NO (**Figura 9**) as três concentrações não diferiram estatisticamente entre si e com o basal. Portanto a concentração de 0,64% v/v foi escolhida para os ensaios desenvolvidos nas PBMC.

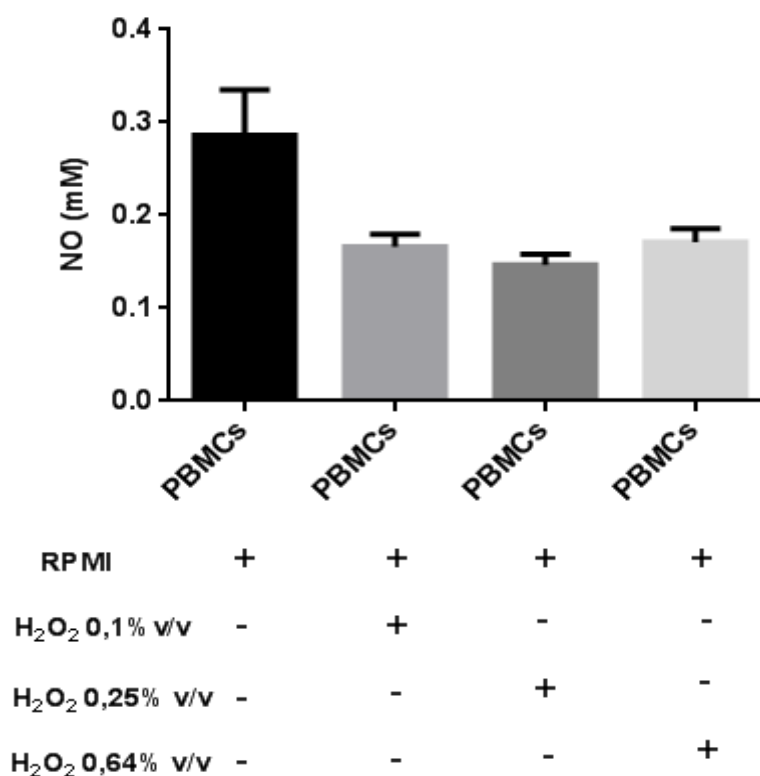


Figura 9: Avaliação da produção de Óxido Nítrico induzida por H₂O₂. A geração de NO foi expressa em mM; Não há diferença significativa entre os grupos. ANOVA on way teste, pós-teste de Bonferroni's Comparação múltipla. n = 9.

4.1.3- Padronização Através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de RSV Utilizada em Células Mononucleares Humanas

Com base na padronização da concentração do Resveratrol (RSV) abrangendo o uso em células leucocitárias humanas foi obtida a curva dose-concentração do RSV realizada por meio do teste de metabolização do MTT. Dentre as concentrações de RSV testadas, o valor correspondente a 5µM apresentou maior ($p < 0,05$) capacidade de metabolização de MTT com uma porcentagem de viabilidade celular maior que 95%, como é demonstrado nos resultados ilustrados na **figura 10**. Tal concentração foi previamente estabelecida por LARA *et al*, em concomitância com dados da literatura que sugerem que tal concentração corresponde ao nível celular fisiológico.

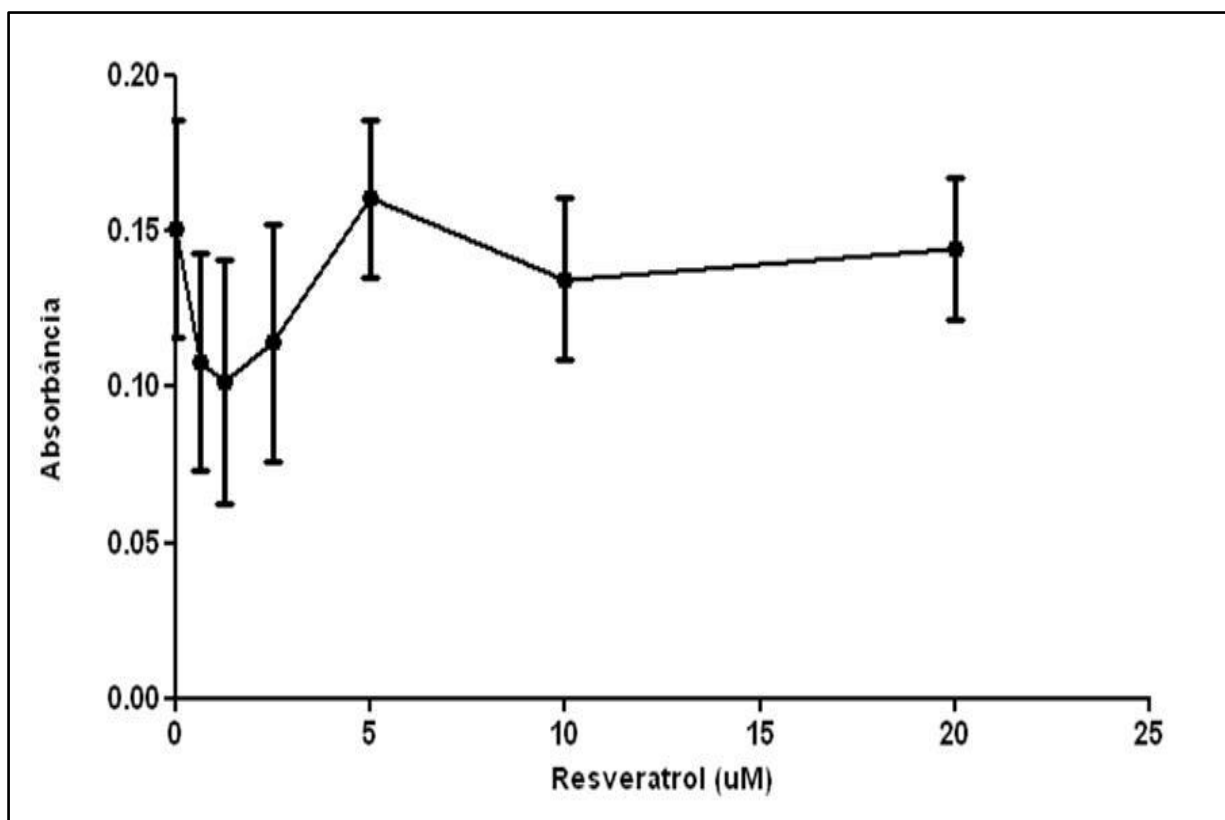


Figura 10: Curva Dose-Concentração de Resveratrol em Leucócitos Humanos. Os Leucócitos Humanos foram estimulados por concentrações crescentes de RESV (0,63 µM; 1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM e 20 µM) e a absorbância, a fim de se verificar o estímulo do RESV nas células foi medida por mudança da intensidade da coloração à 570 nm em Leitor de microplacas através do Teste de MTT. A concentração escolhida foi 5 µM que apresentou um pico de absorbância ($p < 0,05$) e corresponde a dosagem fisiológica. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração. $n = 8$.

4.1.4- Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio de MTT em Células Mononucleares Humanas

Foi utilizado o ensaio de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólico) para avaliar a viabilidade das células mononucleares frente aos estímulos com H_2O_2 (**figura 11- painéis A e C**) quanto do Resveratrol (5µM) – (**figura 11- painéis B e D**) como também do H_2O_2 + Resveratrol (**figura 11- painéis B e D**) Conforme mostra a **figura 11**, em todos os tratamentos utilizados as células mantiveram-se viáveis, de forma que não promoveram citotoxicidade significativa, tanto na faixa etária de meia idade (**figura 11- painel A e B**) quanto na faixa etária de idosos (**figura 11- painel D e C**). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade.

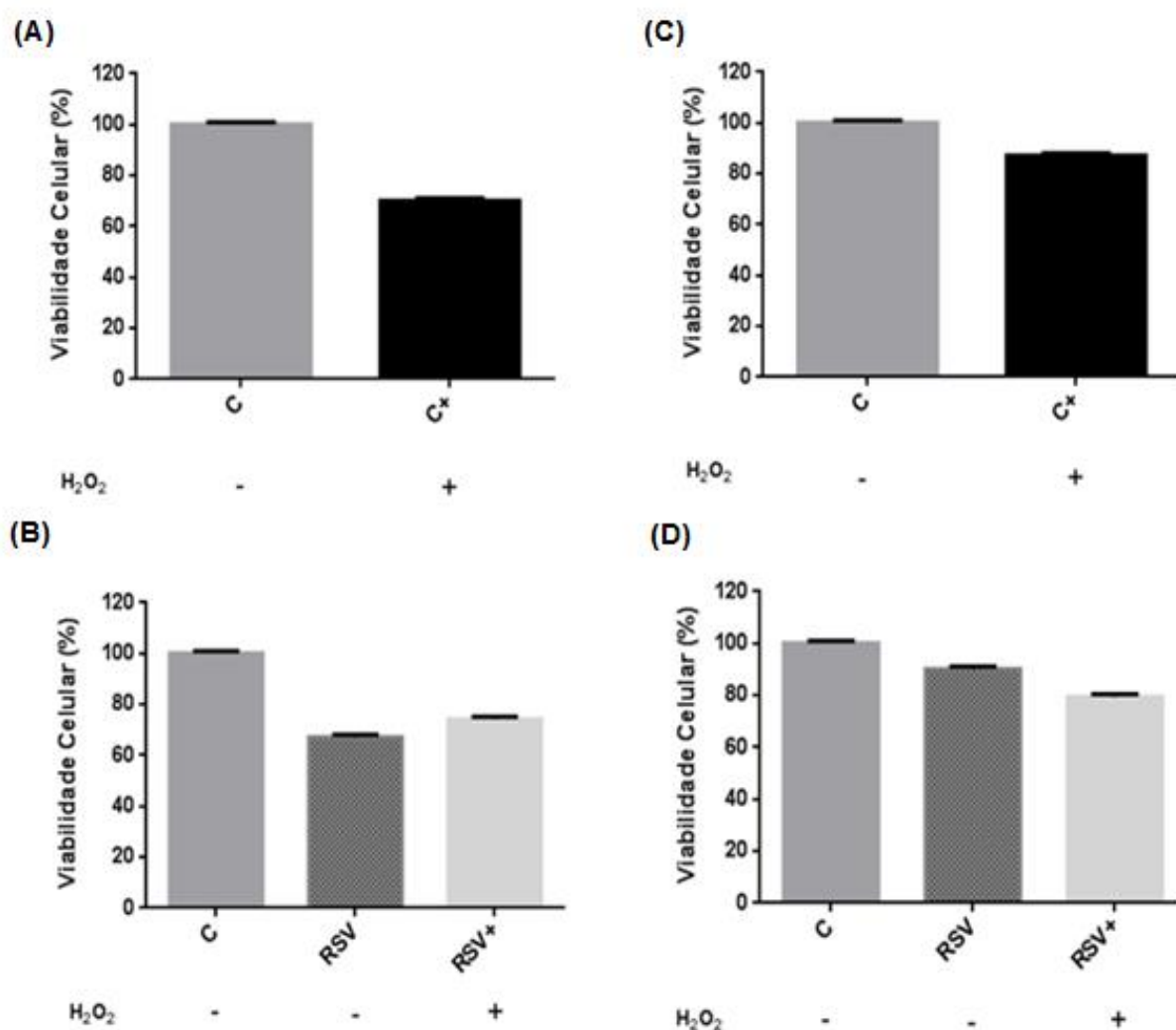


Figura 11: Viabilidade das células mononucleares humanas pelo ensaio de MTT. Células PBMC (5×10^3) por poço foram colocadas em placa de 96 poços e incubadas por 30 min com RSV $5 \mu M$ e H_2O_2 0,64 %v/v. Meia idade (painel A e B) e idosos (painel C e D). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de experimentos realizados em triplicata. $n = 6$. Não há diferença significativa entre os grupos. ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's.

PARTE II

4.2- Estudo dos efeitos do Resveratrol sobre os biomarcadores de estresse oxidativo – estudo da sinalização celular

4.2.1 Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência Dependente de Luminol do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Induzidas por H_2O_2

Após termos verificado que 0,64 %v/v H_2O_2 estimula a produção de ERO, bem como mantêm a viabilidade das células, caracterizando-se como platô da nossa curva, e que a con-

centração de Resveratrol padronizada foi de 5 μ M, avaliamos a produção dessas espécies reativas através da Quimioluminescência dependente de luminol, nos dois grupos categorizados como: grupo de meia idade **(A)** e grupo de idosos **(B)**. Os resultados são apresentados na **figura 12**, abaixo.

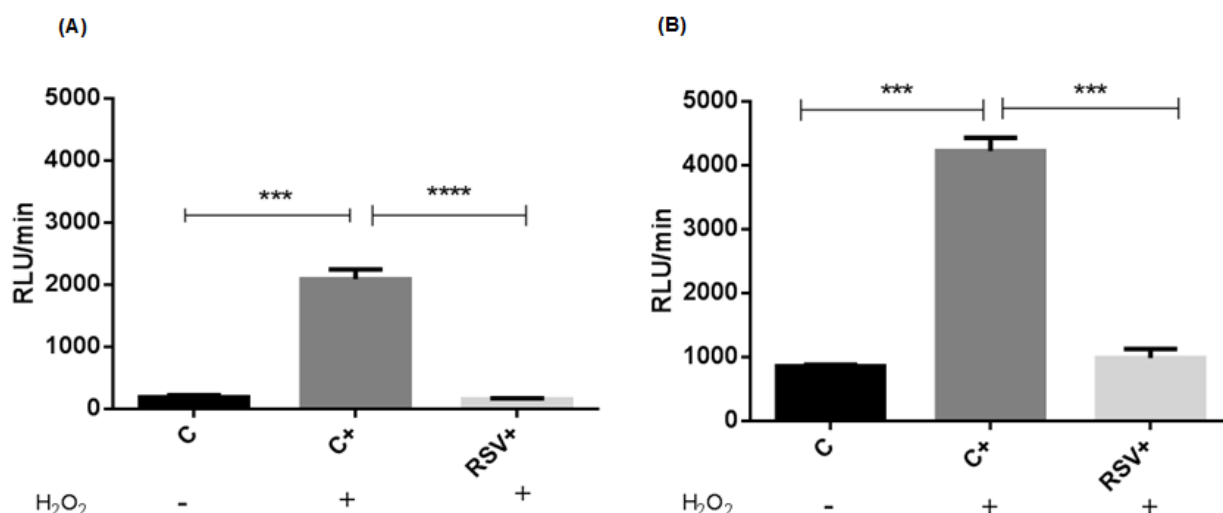


Figura 12: Avaliação do efeito do RSV na produção de ERO em PBMC induzidas por H₂O₂. Painel A= Meia idade (40/59 anos), Painel B = Idosos (60/80 anos). A geração de ERO foi expressa em RLU/min durante 10 minutos; *** e **** = $p < 0,0001$ = resultados significativos pela análise de ANOVA one way, seguido pelo pós-teste Bonferroni. $n = 40$.

Os resultados da **figura 12** demonstram que em ambas as faixas etárias (**figura 12 – painel A e B**) houve um aumento significativo na produção de ERO em relação ao grupo de tratamento basal, porém os mesmos apresentaram perfis diferentes quanto à produção destas espécies reativas após o estímulo com H₂O₂, de forma que o grupo de idosos produziu duas vezes mais tais espécies quando comparado ao grupo de meia idade, além de já apresentar uma produção mais significativa em seu estado basal.

Um segundo ponto a ser observado refere-se a ação do RSV, o qual foi capaz de reduzir significativamente a produção de ERO em ambas as faixas etárias (**figura 12 – painel A e B**). Porém no grupo de meia idade (**figura 12 – painel A**) o composto obteve uma eficiência de redução de 92,6%, conseguindo uma redução dessas espécies reativas a um nível abaixo do basal, frente à eficiência de 76,7% no grupo de idosos (**figura 12 – painel B**) no qual a redução alcançou um valor um pouco acima do estado celular basal.

Comparando-se as duas faixas etárias na qual os resultados são apresentados na **tabela 6**, foi possível constatar que no estado celular basal o grupo de idosos apresentou uma produção significativa de ERO 4,6 vezes maior que nos indivíduos pertencentes ao grupo de meia idade. Complementarmente, após o estímulo realizado apenas com H_2O_2 ocorreu uma produção de ERO duas vezes maior na faixa etária de idosos em relação a faixa etária de meia idade, de modo que quando adicionado o RSV 5 μM juntamente com H_2O_2 houve uma redução da produção destas espécies reativas em ambas as faixas etárias mas se mostrou mais eficiente no grupo de meia idade.

Tabela 6: Análise comparativa entre as duas faixas etárias do efeito do RSV.

Tratamentos	Meia-idade (RLU/min)	Idosos (RLU/min)
Basal	183,6 $\pm$ 36,96	852,34 $\pm$ 28,39****
H_2O_2 0,64% v/v	2083,65 $\pm$ 161,60	4027,2 $\pm$ 85,49****
H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM	153,35 $\pm$ 15,86	855,36 $\pm$ 80,91****

**** Diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao respectivo grupo de 40- 59 anos por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. RSV + células grupo meia-idade: 21.23 $\pm$ 0.87 RLU/min, RSV + células grupo idosos: 747,4 $\pm$ 199.1 RLU/min. n =40.

De acordo com os resultados apresentados na **tabela 7**, é possível confirmar que o H_2O_2 0,64% v/v e o RSV 5 μM necessitam da maquinaria celular para atuar, dada a diferença na produção de ERO existente entre os tratamentos contendo as PBMC e os controles sem adição das mesmas.

Tabela 7: Controles sem células/com células no Ensaio de Quimioluminescência.

Tratamentos	Meia-idade (RLU/min)	Idoso (RLU/min)
H_2O_2 0,64% v/v	58.54 $\pm$ 5.78	58.54 $\pm$ 5.78
H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM	14.34 $\pm$ 2.21	14.34 $\pm$ 2.21
H_2O_2 0,64% + PBMC	2083,65 $\pm$ 161,60****	4027,2 $\pm$ 85,49****
H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM + PBMC	153,35 $\pm$ 15,86 [#]	855,36 $\pm$ 80,91 ^{####}

**** Diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo de H_2O_2 0,64% v/v por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. #### e [#] Diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo de H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. n = 40.

4.2.2- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Sobre a Via de PKA

Inicialmente foi realizada uma análise utilizando os tratamentos descritos na **tabela 3**, com o intuito de verificar se o inibidor H89 seria capaz de reagir de forma inespecífica com o H_2O_2 0,64% v/v e com o RSV 5 μM ou se o mesmo necessitaria da maquinaria celular para exercer o seu efeito. Adicionalmente realizou-se um segundo controle utilizando os tratamentos descritos na **tabela 4**, a fim de realizar uma comparação com os resultados pertinentes a Quimioluminescência sem a presença de inibidor, estabelecendo tal comparação. Os resultados obtidos encontram-se expostos na **tabela 8**.

Tabela 8: Controles sem células comparado com os controles com células /Inibidor da via PKA.

Tratamentos	Meia Idade (RLU/min)	Idosos (RLU/min)
H89 + H_2O_2 0,64% v/v	18,08 $\pm$ 1,03	18,08 $\pm$ 1,03
H89 + H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM	14,52 $\pm$ 0,59	14,52 $\pm$ 0,59
H89+ H_2O_2 0,64% + PBMC	6391,8 $\pm$ 953,5****	8924,9 $\pm$ 1925****
H89+ H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM + PBMC	652,9 $\pm$ 266,0 [#]	348,05 $\pm$ 80,86 [#]

****Diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo de H89+ H_2O_2 0,64% v/v por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. [#] Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo de H89+ H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. n=38.

Através dos dados da **Tabela 8**, constatou-se que por haver uma diferença estatística na produção de ERO comparando os controles sem adição de célula PBMC e os tratamentos apenas com estímulo do H_2O_2 bem como com adição do RSV e H_2O_2 , ambos na presença de células PBMC, o inibidor da via de PKA necessita de uma maquinaria celular para promover a sua atividade, visto que os valores obtidos na Quimioluminescência sem acréscimo das referidas células encontram-se abaixo dos valores obtidos quando utiliza-se o inibidor juntamente com as PBMC.

Em sequência, seguindo com o padrão estabelecido do uso da faixa etária de meia idade (A) e faixa etária de idosos (B), com o intuito de avaliar a ocorrência da interação entre a via de PKA e o composto polifenólico Resveratrol, foi introduzido no ensaio de Quimiolumi-

nescência o inibidor desta via, H89. Sendo que os resultados são expostos na **figura 13** a seguir.

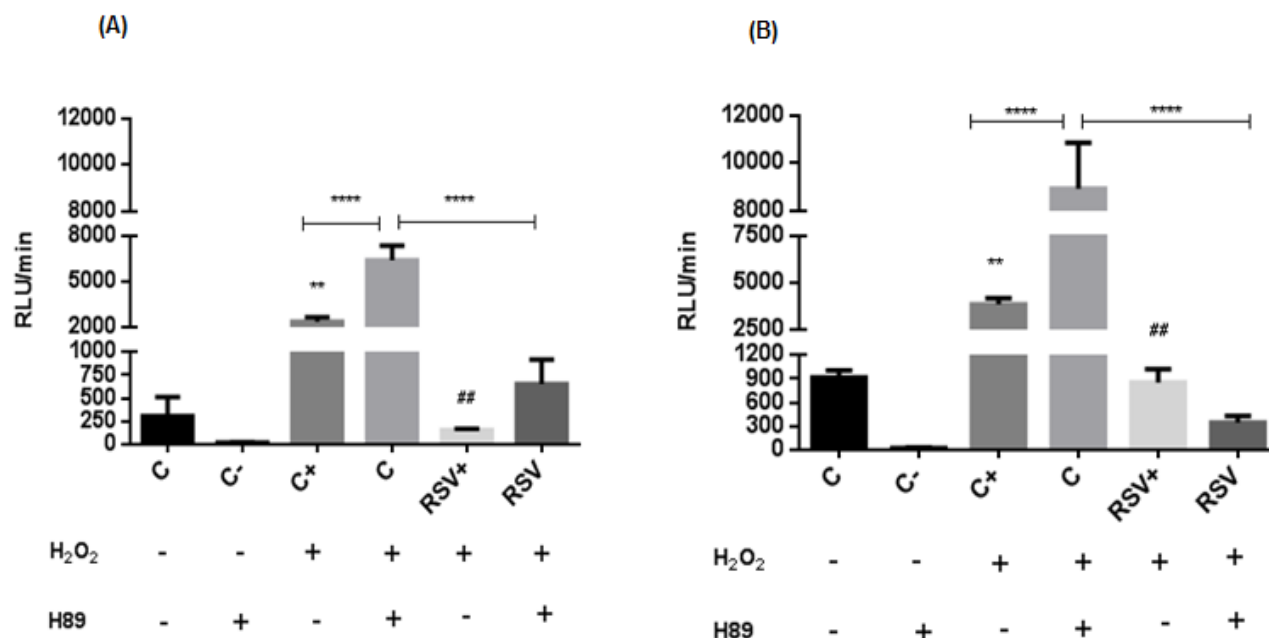


Figura 13: Avaliação comparativa do RSV sob a via de PKA na produção de ERO em PBMC induzida por H₂O₂. Painel A= Grupo de meia idade / Painel B= Grupo de idosos. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. ^{##} e ^{**}p < 0.005; ^{****}p < 0.0001 significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. ^{**}: em relação ao grupo C; ^{##}: em relação ao grupo C⁺. (A): grupo RSV⁻ (sem H₂O₂ e sem H89): 27,80 ± 4,95 RLU/min; grupo RSV⁺ (sem H₂O₂ e com H89): 19,00 ± 1,70 RLU/min. (B): grupo RSV⁻ (sem H₂O₂ e sem H89): 55,00 ± 22,55 RLU/min; grupo RSV⁺ (sem H₂O₂ e com H89): 30,67 ± 3,490 RLU/min. n = 38.

De acordo com a **figura 13**, foi possível observar que após o estímulo com o H₂O₂ tanto no grupo de idosos (**figura 13 - painel B**) quando no grupo de meia idade (**figura 13 - painel A**) houve um aumento significativo da produção de ERO quando adicionado o inibidor H89 em comparação com o grupo onde não há adição do inibidor, demonstrando que esta via controla mecanismos antioxidantes moleculares em PBMC.

Os resultados demonstraram também que quando adicionado o inibidor da via de PKA, o RSV também foi capaz de reduzir significativamente a produção de ERO, porém se compararmos o grupo que continha apenas H₂O₂ ao que houve adição de RSV (ambos contendo inibidor) nas duas faixas etárias (**figura 13 - painel A**) o mesmo apresentou-se mais efeti-

vo no grupo de idosos do que no grupo de meia idade, com 96,1% e 89,7% de inibição respectivamente.

Em relação à ação do RSV quando comparado o grupo tratado sem o inibidor ao que foi adicionado o inibidor (H89) nossos resultados mostraram que não houve diferença estatística na produção de ERO entre esses grupos, indicando então que possivelmente o RSV não exerce sua ação antioxidante através da modulação da via de PKA.

4.2.3- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Sobre a Via de AKT/PKB

Em conformidade com a análise realizada anteriormente, utilizando também os tratamentos descritos na **tabela 3**, e tendo como objetivo a verificação da capacidade do inibidor de AKT/PKB de reagir de forma inespecífica com o H_2O_2 0,64% v/v e com o RSV 5 μM ou se o mesmo necessitaria da maquinaria celular para exercer o seu efeito, foi realizado o experimento no qual os resultados obtidos encontram-se expostos na **tabela 9**. Adicionalmente realizou-se uma análise utilizando os tratamentos descritos na **tabela 4**, a fim de observar tais resultados comparando-os aos obtidos através da Quimioluminescência sem o inibidor.

Tabela 9: Controles sem células comparados com os controles com células/Inibidor da via AKT/PKB.

Tratamentos	Meia Idade (RLU/min)	Idosos (RLU/min)
AKT/PKB + H_2O_2 0,64% v/v	65,20 $\pm$ 10,34	65,20 $\pm$ 10,34
AKT/PKB + H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM	24,80 $\pm$ 1,32	24,80 $\pm$ 1,32
AKT/PKB + H_2O_2 0,64% + PBMC	7805,12 $\pm$ 953,5**	8159,03 $\pm$ 1620**
AKT/PKB + H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM + PBMC	491,85 $\pm$ 266,0 [#]	290,63 $\pm$ 114,1 [#]

** Diferença estatística ($p < 0,005$) em relação ao grupo de AKT/PKB + H_2O_2 0,64% v/v por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. [#] Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo de AKT/PKB + H_2O_2 0,64% v/v + RSV 5 μM por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. n = 37.

Em relação a este inibidor, a **tabela 9** demonstrou que o mesmo não é capaz de reagir de forma inespecífica com H_2O_2 0,64% v/v e com o RSV 5 μM dado os valores baixos gerados na quimioluminescência, quando aplicados aos controles onde houve adição apenas do

H₂O₂ e também quando houve acréscimo do RSV somado ao estímulo com H₂O₂ ambos sem PBMC, os quais apresentam diferença estatística nos respectivos tratamento porém com adição de PBMC.

Portanto, dando sequência a avaliação da interação entre o RSV e as vias de sinalização, foi acrescentado o inibidor Akt Inibitor, responsável pela inibição da via de AKT/PKB. Sendo que os resultados referentes a esse ensaio são apresentados na **figura 14**.

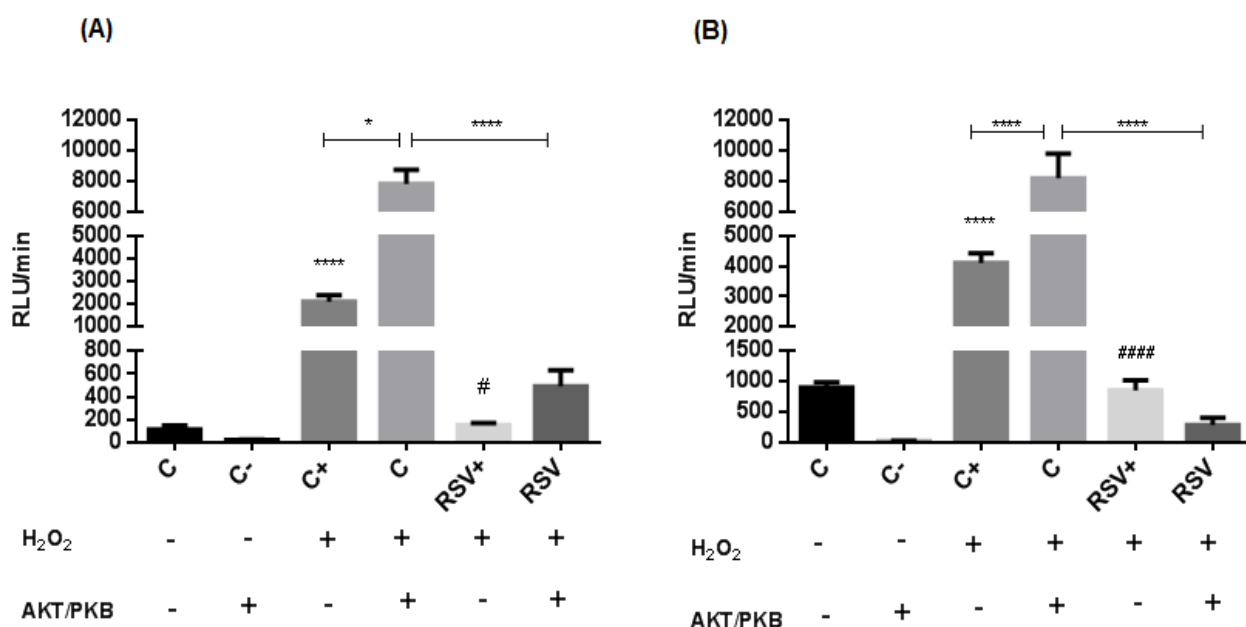


Figura 14: Avaliação comparativa do RSV sob a via de AKT/PKB na produção de ERO em PBMC induzida por H₂O₂. Painel A= Grupo de meia idade/ Paine B= Grupo de idosos. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. * e # $p < 0.05$; **** e ##### $p < 0.0001$ significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Bonferroni's Comparasion. *****: em relação ao grupo C; ### e #: em relação ao grupo C'. (A): grupo RSV⁻ (sem H₂O₂ e sem iAkt/PKB): 31,60± 8,83 RLU/min; grupo RSV⁺ (sem H₂O₂ e com iAkt/PKB): 17,10±1,86 RLU/min. (B): grupo RSV⁻ (sem H₂O₂ e sem iAkt/PKB): 17,00±3,79 RLU/min; grupo RSV⁺ (sem H₂O₂ e com iAkt/PKB): 21,31±3,10 RLU/min. n = 37.

A partir dos dados expostos na **figura 14**, constatou-se que também ocorreu um aumento significativo da produção de ERO em ambas as faixas etárias (**figura 14 - painel A e B**) ao ser adicionado o inibidor da via de AKT/PKB no grupo tratamento em que há apenas o estímulo com o H₂O₂, evidenciando um perfil antioxidante desta via neste ensaio.

Semelhantemente a sua ação no tratamento onde não houve acréscimo de Akt Inibidor, o RSV foi capaz de diminuir as espécies reativas de oxigênio em ambas as faixas etárias quando adicionado tal inibidor, porém neste ocorreu um aumento no potencial de inibição do

RSV de 1% e 18% nas faixas etárias de meia idade (**figura 14 - painel A**) e idosos (**figura 14 - painel B**) respectivamente.

Novamente podemos verificar que em relação à ação do RSV quando comparado o grupo tratado sem o inibidor ao que foi adicionado o inibidor (Akt Inibitor) não houve diferença significativa na produção de ERO nesses dois grupos, indicando também que possivelmente a ação antioxidante exercida pelo RSV não ocorre através da modulação da via de AKT/PKB.

4.2.4- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias por Quimioluminescência do Efeito do RSV na Produção de ERO em Células Mononucleares Humanas Sobre a Via de MAPK

Para a observação desta via de sinalização também foi reproduzido o ensaio inicial correspondente uma análise utilizando os tratamentos descritos na **tabela 3**, com o intuito de verificar se o inibidor MAPK também seria capaz de reagir de forma inespecífica com o H₂O₂ 0,64% v/v e com o RSV 5 µM ou se o mesmo necessitaria da maquinaria celular para exercer o seu efeito. Seguindo a padronização realizada nas vias de sinalização observadas anteriormente, utilizou-se os tratamentos descritos na **tabela 4**, a fim de estabelecer uma comparação entre os ensaios de Quimioluminescência na presença e ausência do inibidor. Os resultados obtidos encontram-se expostos na **tabela 10**.

Tabela 10: Controles sem células comparados com os controles com células /Inibidor da via MAPK.

Tratamentos	Meia Idade(RLU/min)	Idosos (RLU/min)
MAPK + H ₂ O ₂ 0,64% v/v	169,08 ± 28,18	169,08 ± 28,18
MAPK + H ₂ O ₂ 0,64% v/v + RSV 5 µM	84,54 ± 21,13	84,54 ± 21,13
MAPK + H ₂ O ₂ 0,64% + PBMC	9806,65 ± 1451****	11120,20 ± 1179****
MAPK + H ₂ O ₂ 0,64% v/v + RSV 5 µM + PBMC	1943,99 ± 391,5 [#]	445,57 ± 166,10 [#]

****Diferença estatística (p<0,0001) em relação ao grupo de MAPK + H₂O₂ 0,64% v/v por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. [#] Diferença estatística (p<0,05) em relação ao grupo de MAPK + H₂O₂ 0,64% v/v + RSV 5 µM por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. n= 24.

Os resultados contidos na **tabela 10**, também mostram o mesmo perfil verificado em relação às vias de sinalização anteriores, no qual os valores relativos à produção de ERO, obtidos através da Quimiluminescência, correspondentes aos controles sem PBMC contendo apenas o estímulo com H_2O_2 e os que continham estímulo com H_2O_2 associado ao RSV também foram baixos e apresentaram diferença estatística em comparação com os mesmos tipos de tratamento porém com adição de PBMC. Portanto, observou-se que o inibidor p38 MAP Kinase Inhibitor III também necessita de uma maquinaria celular para exercer a sua função.

Analizando a terceira via de sinalização proposta em nosso estudo, de forma a seguir a avaliação acerca da interposição causada pelo RSV na via de MAPK após o acréscimo do inibidor desta via, p38 MAP Kinase Inhibitor III. De modo que os resultados relacionados a esse ensaio são apresentados na **figura 15**.

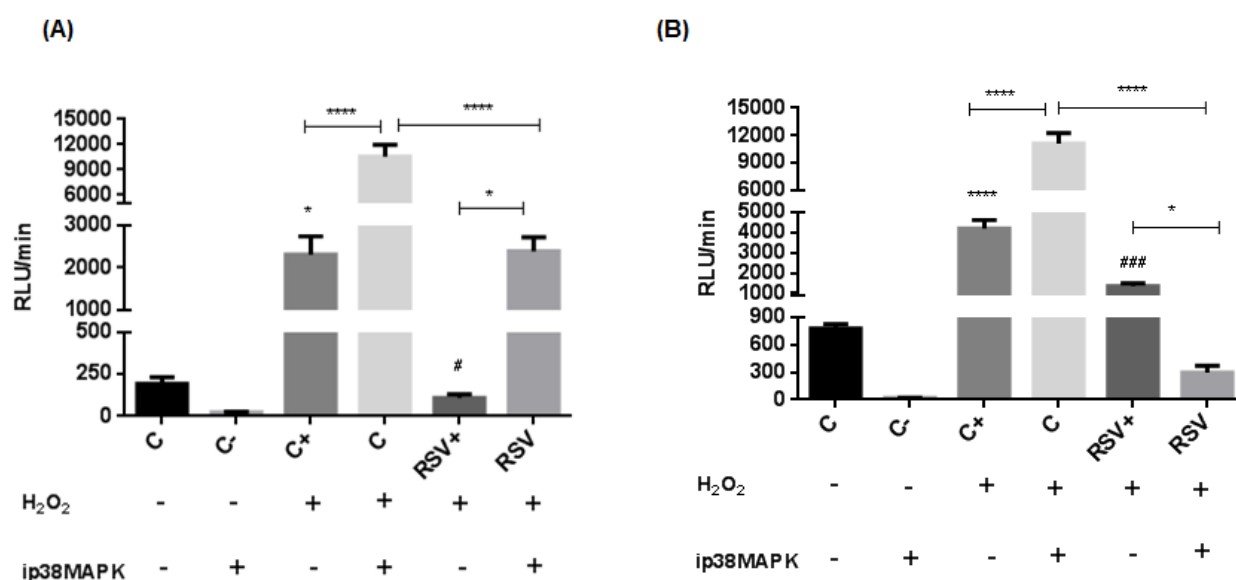


Figura 15: Avaliação comparativa do RSV sob a via de MAPK na produção de ERO em PBMC induzida por H_2O_2 . Paineis A= Grupo de meia idade /Painel B= Grupo de idosos. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. * e # $p < 0.05$; ### e **** $p < 0.0001$ significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Bonferroni's Comparation. **** e *: em relação ao grupo C; ### e #: em relação ao grupo C⁺. (A): grupo RSV⁻ (sem H_2O_2 e sem MAPK): $22,77 \pm 2,05$ RLU/min; grupo RSV⁺ (sem H_2O_2 e com MAPK): $20,90 \pm 1,38$ RLU/min. (B): grupo RSV⁻ (sem H_2O_2 e sem MAPK): $19,43 \pm 1,46$ RLU/min; grupo RSV⁺ (sem H_2O_2 e com MAPK): $20,84 \pm 1,41$ RLU/min. $n = 24$.

Baseando-se nos resultados apresentados na **figura 15**, foi possível verificar que assim como as vias de sinalização analisadas anteriormente, a via de MAPK apresentou-se no nosso ensaio com um perfil antioxidante visto que, em PBMC tratadas apenas com H_2O_2 houve um aumento significativo das ERO após o acréscimo do inibidor p38 MAP Kinase Inhibitor III,

em ambas as faixas etárias (**figura 15 – painel A e B**) comparando-se com o tratamento constando apenas o estímulo com o H₂O₂.

Mesmo após a inibição da via de MAPK, o resveratrol manteve a sua atividade antioxidante em ambos os grupos etários, de modo que a diferença estatística existente entre o tratamento em que houve estímulo com H₂O₂ e acréscimo do RSV sem inibição da via com o tratamento após a adição do inibidor, nos dois grupos etários, demonstra que tal via de sinalização promove a regulação da atividade do RSV em PBMC.

Curiosamente tal regulação foi realizada de modo diferente nos grupos etários, de forma que nos indivíduos de meia idade (**figura 15 – painel A**) após a inibição da via, o RSV perdeu a sua capacidade antioxidante e a produção de ERO se igualou a produção destas espécies apenas com H₂O₂ 0,64% v/v. Já na faixa etária dos idosos verificamos que após a inibição da via da MAPK o RSV aumentou a sua capacidade antioxidante diminuindo a produção de ERO que atingiu o patamar de inibição abaixo do valor basal (**figura 15 – painel B**).

PARTE III

4.3- Estudo dos Efeitos do RSV Sobre os Biomarcadores do Processo Inflamatório Crônico Subclínico

4.3.1 Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Dosagem da IL-6 em Células Mononucleares Humanas

Com a finalidade de avaliar a intervenção causada pelo RSV sobre a quantidade das interleucinas pró e anti-inflamatórias realizamos a dosagens destas em sobrenadantes das PBMC de doadores nas faixas etárias: meia idade (A) e idosos (B) sendo os resultados apresentados na **Figura 16**.

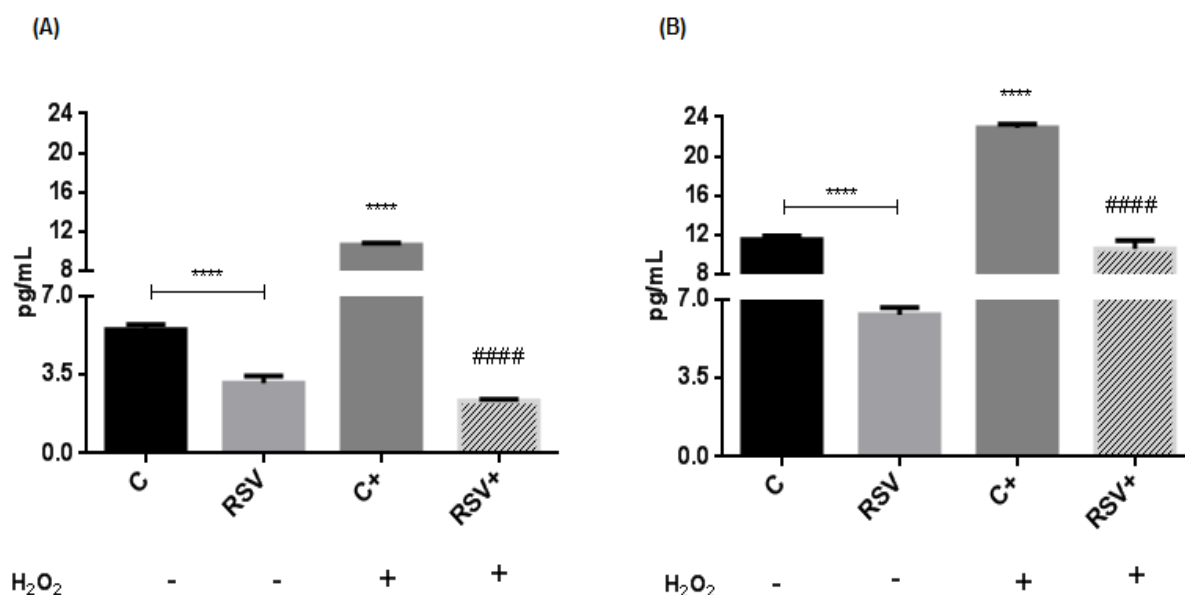


Figura 16: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL-6 em PBMC. Painel A= Grupo de meia idade e Painel B= Grupo de idosos. A atividade foi medida em pg/mL (picogramas/mililitros). **** e #### p<0.0001 significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. ****: em relação ao grupo C; ####: em relação ao grupo C⁺. n = 15.

Por intermédio da **figura 16**, é possível observar que a concentração de IL-6 referente ao valor celular basal encontra-se duas vezes maior nos indivíduos idosos (**figura 16 - painel B**) em relação aos indivíduos de meia idade (**figura 16 - painel A**). Conjuntamente ocorreu uma redução significativa de 43,12% desta interleucina pró-inflamatória no grupo de meia idade quando o RSV 5µM foi unicamente adicionado em relação ao tratamento celular basal, enquanto que no grupo de idosos tal redução ocorreu pela metade. Quando adicionado este composto polifenólico em concomitância com 0,64 %v/v H₂O₂, o mesmo foi capaz de promover uma redução significativa de 77% a concentração de IL-6 no grupo de meia idade comparado ao grupo em que houve apenas o estímulo com H₂O₂. Contudo no grupo de idosos tal diminuição foi menos expressiva, de maneira que comparando esses mesmos grupos tratados com RSV este promoveu a diminuição de 45,1% da concentração de IL-6 quando adicionado unicamente em relação ao controle basal, ao passo que foi responsável pela redução de 53,7% desta interleucina ao ser adicionado juntamente com o 0,64 %v/v H₂O₂ ao ser comparado com o tratamento que continha apenas 0,64 %v/v H₂O₂.

4.3.2- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Dosagem da TNF em Células Mononucleares Humanas

Por se tratar de uma citocina pró-inflamatória envolvida em diversos processos inflamatórios, foi realizada uma análise com o intuito de estimar se RSV promove alteração na concentração de TNF sob as condições pré-estabelecidas, utilizando as faixas etárias: meia idade (A) e idosos (B) de modo que os resultados foram exibidos na **Figura 17**.

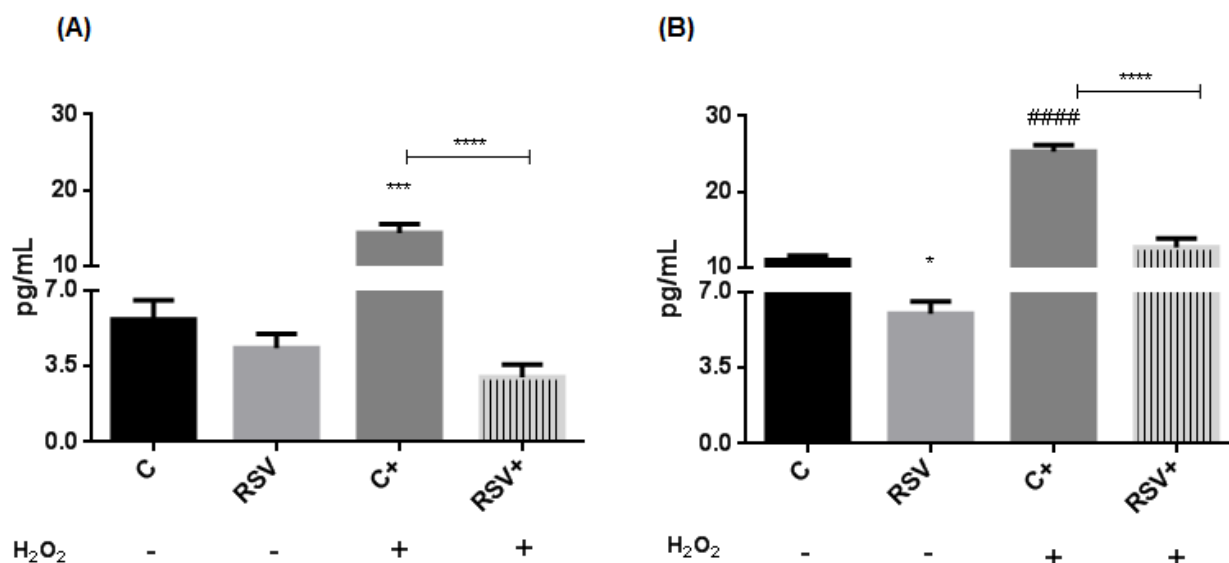


Figura 17: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de TNF em PBMC. Painel A= Grupo de meia idade e Painel B= Grupo de idosos. A atividade foi medida em pg/mL (picogramas/mililitros). * $p < 0.05$; ***, **** e ##### $p < 0.0001$ significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. *** e *: em relação ao grupo C; ####: em relação ao grupo C. $n = 9$.

Os dados expressos na **figura 17** nos mostram que a concentração de TNF no estado basal também encontra-se aproximadamente o dobro na faixa etária de idosos (**figura 17 - painel B**) em relação a faixa etária de meia idade (**figura 17 - painel A**). Quando compararmos a concentração desta citocina pró-inflamatória no estado celular basal com o tratamento onde houve adição de RSV 5 μ M apenas, vimos que não houve uma diminuição significativa no grupo de meia idade (A) enquanto que essa redução ocorreu no grupo de idosos em 45,4%. Porém tratando-se da ação do RSV quando adicionado no tratamento juntamente com 0,64 %v/v H₂O₂ o mesmo foi capaz de diminuir significativamente a concentração de TNF em ambas as faixas etárias, sendo para tanto mais eficaz no grupo de meia idade promovendo a diminuição de 79% da concentração desta citocina, frente a redução de 50% no grupo de idosos se comparado ao tratamento onde há apenas o estímulo com 0,64 %v/v H₂O₂.

4.3.3- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Dosagem da IL-10 em Células Mononucleares Humanas

Foi avaliada a interferência causada pelo RSV sobre a atividade da interleucina anti-inflamatória IL-10 sob as condições pré-estabelecidas, utilizando as faixas etárias: meia idade (A) e idosos (B) de modo que os resultados foram apresentados na **Figura 18**.

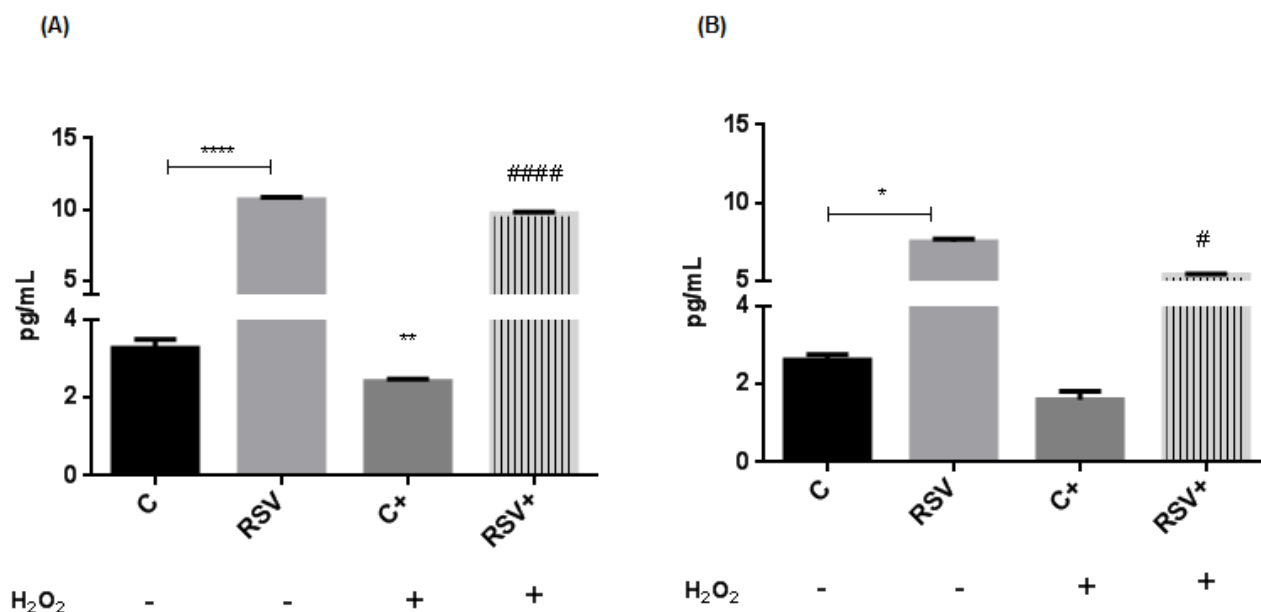


Figura 18: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL-10 em PBMC. Painel A= Grupo de meia idade e Painel B= Grupo de idosos. A atividade foi medida em pg/mL (picogramas/mililitros). * e # $p < 0.05$; **** e #### $p < 0.0001$ significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. . **: em relação ao grupo C; #### e #: em relação ao grupo C⁺. n = 15.

Mediante a **figura 18**, foi possível delinear o seguinte perfil: O nível de concentração de IL-10 no estado celular basal não apresentou uma diferença entre as duas faixas etárias, estando diminuído em apenas 20% no grupo de idosos (**figura 18- painel B**) em relação à concentração da interleucina no grupo de meia idade (**figura 18- painel A**). Adicionalmente o RSV 5 μ M foi capaz de aumentar de modo significativo a concentração de IL-10 tanto na faixa etária de meia idade (A) quanto na faixa etária de idosos (B), entretanto na primeira o composto aumentou 225% concentração da interleucina, frente ao aumento de 186,2% a concentração da mesma ocorrido no segundo grupo comparando-se em relação a concentração de IL-10 nas células no seu estado basal. Adicionalmente tal composto fenólico também foi capaz de promover um aumento significativo da concentração desta interleucina anti-inflamatória quando adicionado conjuntamente ao estímulo pró-oxidante H₂O₂ 0,64 %v/v, causando um

aumento de 300,8% no grupo de meia idade e no grupo de idosos aumentando em 236,2% da concentração de IL-10 em relação ao tratamento contendo exclusivamente H_2O_2 .

Parte IV

4.4- Estudo dos Resveratrol sobre os biomarcadores de complicações cardiometabólicas - estudos *in vitro* e intervencional

4.4.1- Avaliação Comparativa das Faixas Etárias pelo Método de Griess do Efeito do RSV em Células Mononucleares Humanas Induzidas por H_2O_2

Com a finalidade de mensurar a concentração de NO, sendo esta uma molécula que exerce um efeito importante no processo inflamatório, bem como avaliando a ocorrência de uma possível modificação causada pela adição do RSV foi realizada a análise, utilizando os tratamentos contidos na **tabela 4**, na qual os resultados encontram-se expostos na **Figura 19**. Ao passo que os resultados da viabilidade celular realizada através do Ensaio de Exclusão pelo Azul de Trypan estão exibidos na **tabela 13**. Neste ensaio também mantiveram-se as condições pré-estabelecidas, utilizando as faixas etárias: meia idade (A) e idosos (B).

Tabela 11: Viabilidade celular obtida através do teste de Azul de Tripán dos grupos do ensaio de Óxido Nítrico

Tratamentos	Viabilidade Celular (%)	
	Grupo de meia idade	Grupo de idosos
Basal	99	99
H_2O_2 0,25% v/v	97	96
H_2O_2 0,25v/v + RSV 5 μ M	98	96
RSV 5 μ M	99	100

Não há diferença significativa entre os grupos. ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. Viabilidade encontrada pelo cálculo de média aritmética dos valores individuais. n=37.

Em relação à concentração de NO, a **figura 19** nos mostra que não houve nenhuma alteração significativa na concentração desta molécula tanto após o estímulo com H_2O_2 quanto após a adição do RSV 5 μ M em ambas as faixas etárias (**figura 19 – painel A e B**). Analisando o grupo de idosos (**figura 19 – painel B**), é possível observar um aumento (não significa-

tivo) da concentração do NO no tratamento com acréscimo de RSV, o qual reverteu a concentração deste composto a um nível similar ao basal, após o mesmo ter sofrido uma redução no tratamento onde havia apenas o estímulo com H_2O_2 .

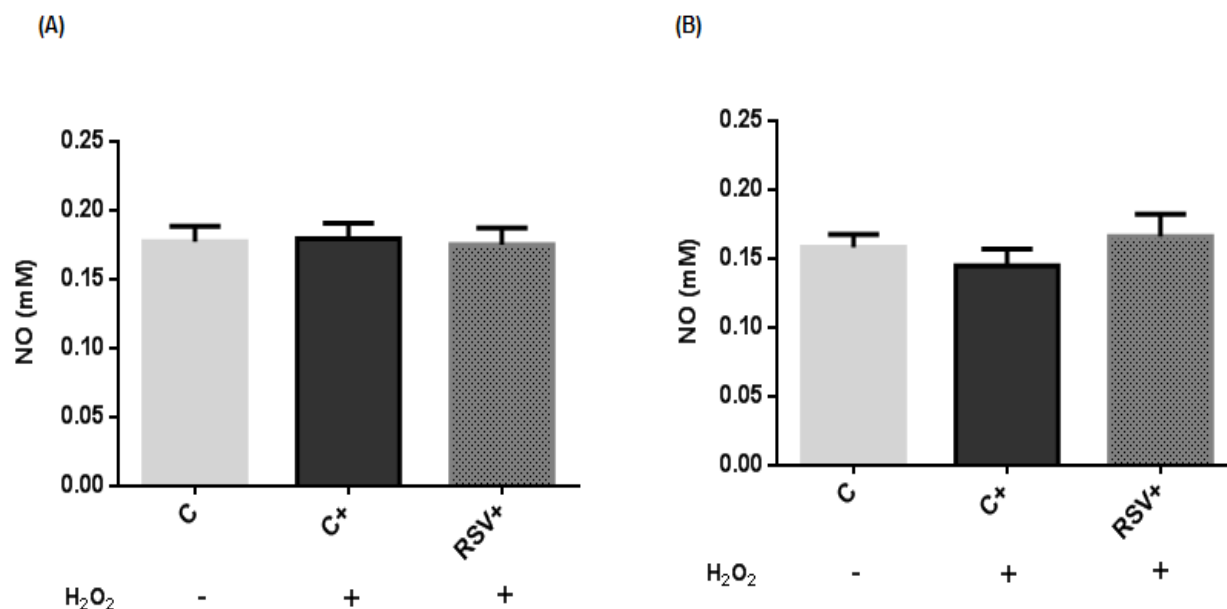


Figura 19: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em PBMC. Painel A= Grupo de meia idade e Painel B= Grupo de idosos. A geração de NO foi expressa em mM. Não há diferença significativa entre os grupos por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. Resultados controle faixa etária 20-39 anos: basal (C) = $0,16 \pm 0,05$ mM; C + H_2O_2 (0,64% v/v) = $0,09 \pm 0,002$ mM; C + H_2O_2 + RVS (0,64% v/v) = $0,31 \pm 0,09$ mM ($p < 0,05$). n = 37.

4.4.2- Avaliação Comparativa Entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Atividade da Lipoproteína A [Lp(a)] em Plasma Humano.

A partir do estudo intervencional, realizado por meio da ingestão diária de 30 mg de RSV por indivíduos das duas faixas etárias: meia idade (A) e idosos (B), foi possível delinear a concentração dos níveis plasmáticos da lipoproteína A [Lp(a)] nesses dois grupos em três períodos de estudo: 0, 3 e 6 meses. De maneira que os resultados se encontram na **figura 20** a seguir.

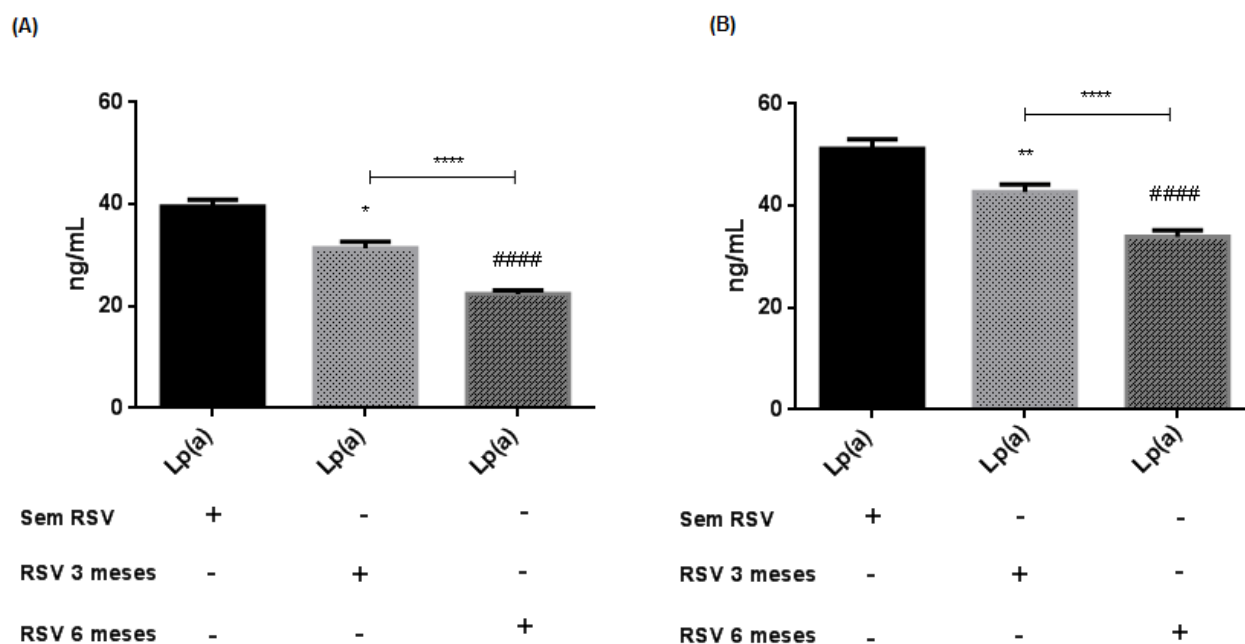


Figura 20: Avaliação comparativa da eficácia do RSV na modificação dos níveis plasmáticos de Lp(a) na duas faixas etárias. PAINEL A= Grupo de meia idade/PAINEL B= Grupo de idosos. O nível plasmático de Lp(a) se expressa em ng/mL. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$ significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Dunn's Comparasion. .*, ** e ####: em relação ao grupo Sem RSV. $n=40$.

Conforme mostra a **figura 20**, os níveis plasmáticos de Lp(a) no início do estudo, ou seja, sem a intervenção do RSV, encontram-se aumentados na faixa etária de idosos comparando-se com a faixa etária de meia idade. Sendo que estes foram significativamente diminuídos em ambos os grupos, meia idade (**figura 20 – painel A**) e idosos (**figura 20 – painel B**), após três meses de intervenção com o RSV quando comparado ao grupo tratado que caracteriza a não adição de tal composto polifenólico, ou seja, o início do estudo. De modo que esta diminuição foi menos expressiva ao apresentar um percentual de 20% e 16% no grupo de meia idade e idosos respectivamente. Trantando-se dos dados referentes a seis meses de ingestão do polifenol, houve um aumento progressivo da eficiência do RSV ao ocasionar a diminuição de 28% e 16% de Lp(a) nos grupos de meia idade e idosos se comparamos ao tratamento no período de três meses.

Apesar de ocorrer redução citoplasmática de Lp(a), o RSV obteve maior eficácia no grupo de meia idade no qual houve 43,4% de diminuição deste biomarcador de cardiopatia frente a redução de 33,7% no grupo de idosos, comparando o início da pesquisa até o período de seis meses.

4.4.3- Avaliação Comparativa entre as Faixas Etárias do Efeito do RSV Sobre a Atividade da Fosfolipase A₂ em Plasma Humano.

Dando continuidade ao estudo de verificação da eficácia do RSV em interferir nos níveis plasmáticos de biomarcadores de cardiopatia, foi realizada uma análise nos níveis de fosfolipase A₂ de pacientes das faixas etárias já padronizadas, meia idade (A) e idosos (B), após adição diária de 30 mg do composto polifenólico, em três períodos de estudo: 0, 3 e 6 meses. Os resultados são apresentados na **figura 21**.

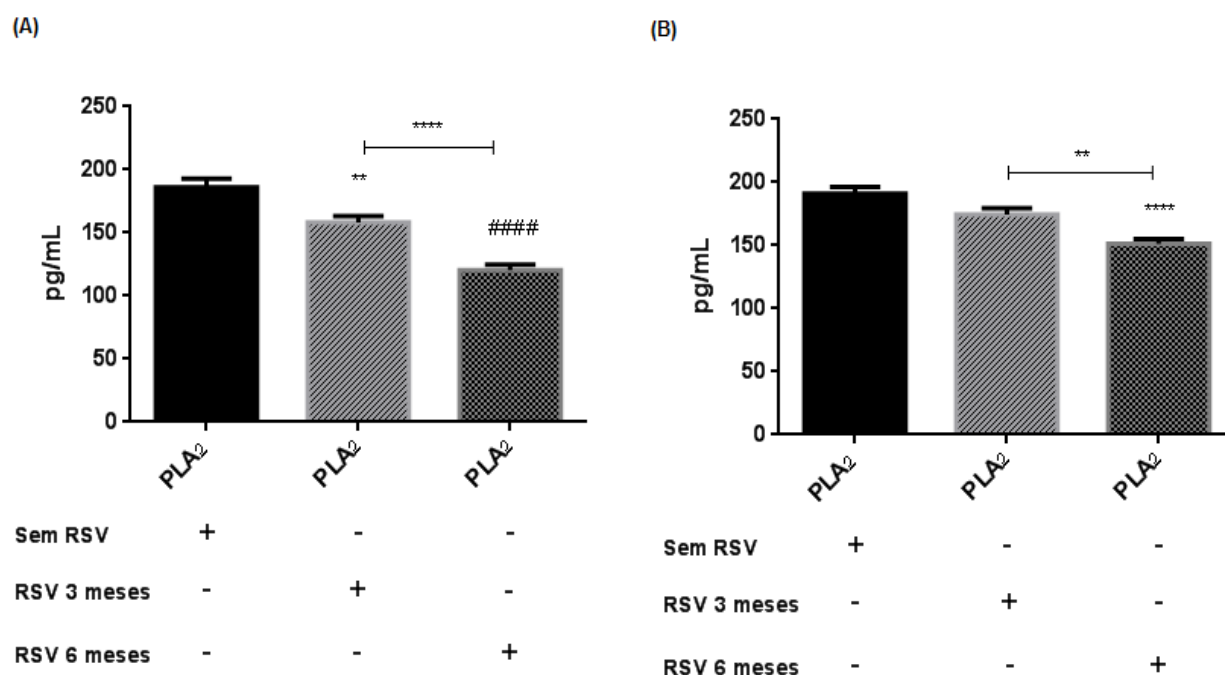


Figura 21: Avaliação comparativa da eficácia do RSV na modificação dos níveis plasmáticos de PLA₂ nas duas faixas etárias. Painel A= Grupo de meia idade Painel B= Grupo de idosos. O nível plasmático de LPA₂ se expressa em ng/mL. **p <0.005; **** e ##### p<0.0001 significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Dunn's Comparasion. **, ****e ##### : em relação ao grupo Sem RSV. n=40.

Através dos resultados da **figura 21** foi possível verificar que no grupo de meia idade (**figura 21 – painel A**), o RSV foi capaz de reduzir de maneira significativa, precisamente em 15%, os níveis plasmáticos da fosfolipase A₂ após três meses de ingestão do mesmo comparado ao início do estudo, ao passo que no grupo de idosos (**figura 21 – painel B**) essa diminuição não ocorreu tratando-se do mesmo período de tratamento. No entanto após o período de seis meses ocorreu uma diminuição significativa de PLA₂ através da ação do RSV em ambas as faixas etárias (**figura 21 – painel A e B**), contudo no grupo de meia idade o RSV manteve-se mais efetivo, promovendo uma diminuição de 35% nos níveis plasmáticos da PLA₂ frente

a redução de 20% no grupo de idosos comparando-se ao início do tratamento no qual não houve a ingestão do RSV pelos indivíduos.

4.4.4- Avaliação Comparativa do Efeito Antioxidante e/ou Anti-inflamatório do RSV nas Faixas Etárias de Meia Idade e Idosos

Tendo como objetivo uma comparação sobre o efeito do RSV nos testes realizados na faixa etária de meia idade e na faixa etária de idosos, segue a **Tabela 12** abaixo.

	Meia idade	Idosos
Produção de ROS	↓↓	↓
Atuação sob a via de PKA	n.s.	n.s.
Atuação sob a via de AKT/PKB	n.s.	n.s.
Atuação sob a via de MAPK	↓	↑
Dosagem de IL-6	↓↓	↓
Dosagem de TNF	↓↓	↓
Dosagem de IL-10	↑↑	↑
Geração de NO	n.s.	n.s.
Atividade de [Lp(a)]	↓↓	↓
Atividade de PLA ₂	↓↓	↓

Tabela 12: Avaliação comparativa do efeito antioxidante e anti-inflamatório do RSV em células PBMC. ↑: aumento; ↓: diminuição; n.s: ausência de efeito.

5- DISCUSSÃO

O envelhecimento caracteriza-se por uma diminuição do funcionamento celular, acarretando também alterações a nível sistêmico, no qual ocorrem mudanças progressivas e persistentes na funcionalidade, de maneira dependente do tempo e diretamente relacionada com a probabilidade de aumento da morbidade e mortalidade (HOHN, A. *et al.* 2017). Apesar de existirem diversas teorias a cerca do processo de envelhecimento, nenhuma destas foi capaz de abranger em sua totalidade os aspectos ocorrentes no mesmo, de modo que não há até então nenhum mecanismo molecular particular que venha explicar o declínio na funcionalidade que promove a alteração de sistemas de órgãos distintos em indivíduos mais velhos, e sua relação com o tempo (MAYNARD, S. *et al.* 2015).

Dentre as diversas teorias que tentam explicar o mecanismo de envelhecimento, a teoria dos radicais livres segue sendo uma das mais bem aceitas. Denominada também de “Teoria do Estresse Oxidativo do Envelhecimento”, esta baseia-se na hipótese que as ERO/ ERN estão relacionados com as perdas funcionais no decorrer da idade, desencadeadas devido ao acúmulo destas espécies reativas que podem gerar danos oxidativos a macromoléculas como lipídios, DNA e proteínas (LIGUORI, I. *et al.* 2018).

Apesar da formação dessas espécies reativas serem consideradas prejudiciais, existem diversos estudos que apontam para a sua importância em várias funções celulares. As ERO são responsáveis por funções importantes nos momentos iniciais do surgimento de processos patológicos tais como isquemia, aterosclerose, diabetes e doenças Neurodegenerativas. Durante a inflamação, por exemplo, essas espécies estão envolvidas no combate a microrganismos invasores de forma que as mesmas podem direcionar o recrutamento de células leucocitárias até o local da inflamação na tentativa de conter o processo inflamatório (LOPES, F. *et al.* 2011). Adicionalmente em baixos níveis ERO medeiam diversas funções biológicas como a angiogênese pós-esquemia, regulação da mitogênese, indução de uma resposta adaptativa levando a melhoria de mecanismos de defesa. Porém em altas concentrações e associados à ineficiência dos mecanismos de defesas antioxidantes, os mesmos conduzem o surgimento de condições patológicas no envelhecimento, de maneira que alguns estudos sustentam que o desenvolvimento dessa condição pode ser resultante da desregulação da sinalização de ERO e não propriamente dito dessas espécies reativas (URAO, N. *et al.* 2013; COSTA, J. *et al.* 2016).

Gerado naturalmente através da redução parcial da molécula de oxigênio em vários processos celulares como no metabolismo oxidativo mitocondrial, o H_2O_2 juntamente com o $\text{O}_2^{\cdot -}$ e o $\text{HO}^{\cdot}$ são classificados como ERO e participam da maioria das reações redox. Sendo resultado da rápida conversão do $\text{O}_2^{\cdot -}$ pela enzima superóxido desmutase, o H_2O_2 é uma espécie oxidante quimicamente mais estável, porém caracteriza-se pela sua capacidade de se difundir mais facilmente através das membranas biológicas fato que implica no seu potencial em afetar várias biomoléculas (MCMURRAY, F. *et al.* 2016).

Apesar do mecanismo exato que explica tal indução ainda não estar claro, acredita-se que o aumento dos níveis dessas espécies reativas leva a um estado de senescência celular, processo no qual as células passam a adquirir um fenótipo característico associado à secreção de diversos fatores inflamatórios, denominado fenótipo secretor irreversível associado à senescência (SASP) (LIGUORI, I. *et al.* 2018).

Neste contexto, o principal resultado observado é a diminuição da imunidade adaptativa e aumento em baixo grau, do estado inflamatório crônico, que têm sido referido como: “Inflammaging”. Dentro dessa perspectiva, a carga antigênica crônica e “Inflammaging” são fortes candidatos como principais forças motrizes da taxa de envelhecimento e da patogênese das principais doenças relacionadas à idade (LARBI *et al.*, 2008).

Diante do exposto, nosso estudo procurou compreender os mecanismos de atuação do Resveratrol ao longo do processo de envelhecimento através de uma possível regulação desse composto antioxidante através de vias de sinalização, como também a sua interferência nos mecanismos de produção de citocinas pro e anti-inflamatórias e a sua capacidade de alterar biomarcadores cardiometabólicos. Além disso, se este comportaria de maneira similar ou distinta quando avaliado em faixas etárias distintas. Na tentativa de simular um ambiente de estresse oxidativo, típico das células que apresentam o fenótipo que caracteriza o estado de senescência, foi utilizado exogenamente o composto H_2O_2 como via de estímulo de produção de espécies reativas.

De acordo com alguns estudos esta molécula configura-se como o principal precursor de ERO, e por conta disso é amplamente utilizada como indutor de danos oxidativos em estudos *in vitro* para simular tais condições de estresse, visto que pode desencadear diversas atividades em diferentes alvos celulares (MORABITO, R. *et al.* 2017; CHEONG, C. *et al.* 2016). Deste modo as células mononucleares humanas foram expostas a concentração de 0,64 %v/v

H₂O₂, concentração esta obtida por meio de uma curva Concentração-Resposta nos quais houve maior estímulo de estresse oxidativo e as células permaneceram com a viabilidade acima de 70% (**figura 7, figura 8 e figura 9**).

O Resveratrol tem sido associado a inúmeras propriedades farmacológicas, de modo que diversos estudos comprovam o potencial anti-inflamatório, antioxidante e imunomodulador deste polifenol. Sendo que tais propriedades estão relacionadas à capacidade do mesmo de agir no combate a determinadas condições como doenças metabólicas, câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento (PANNU, N; BHATNAGAR, A. 2019). Em relação ao seu potencial anti-inflamatório há vários relatos na literatura que retratam a diminuição da inflamação na artrite, inibição da agregação plaquetária em doenças cardiovasculares e regulação de citocinas inflamatórias (ZONG, Y. *et al.* 2012; DONG, W. *et al.* 2015).

Para a realização do nosso estudo o RSV foi utilizado numa concentração de 5 µM, sendo obtida através da curva Concentração-Resposta (**figura 10**) por LARA *et al.*, 2018 corroborando o estudo feito por ZUNINO *et al.*, no qual o RSV 5 µM foi capaz de provocar um aumento de linfócitos B do tipo CD19 + obtidos através de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) *in vitro* (ZUNINO, S; STORMS, D. 2009).

Diversos estudos apontam para atuação do RSV frente ao combate no acúmulo de espécies reativas, sendo que já é de senso comum entre os pesquisadores que tais compostos oxidantes podem gerar um dano oxidativo em células e tecidos que ocorrem no decorrer da vida gerando o processo de envelhecimento no qual esse novo perfil celular, agora denominado senescência, também é caracterizado pela participação de um grande número de fatores inflamatórios como as citocinas e as quimiocinas pró-inflamatórias, promovendo uma grande ligação entre o envelhecimento e a inflamação (SARUBBO, F. *et al.* 2018; LIAO, C; KENNEDY, B. 2016; LASRY, A; BEN-NERIAH, Y. 2015).

Sem alterações significativas na viabilidade celular através do ensaio de MTT (**figura 11**), iniciamos nosso estudo avaliando a atividade do RSV 5 µM, diante de um ambiente de estresse oxidativo, analisando assim a sua capacidade de interferência na produção e acúmulo de ERO em células mononucleares humanas abordando faixas etárias distintas (meia idade e idosos) através do teste quimioluminescência dependente de luminol. Os nossos resultados (**figura 12 e tabela 8 e 9**) apresentam-se em acordo com os dados da literatura que apontam uma forte ligação entre o estresse oxidativo e o envelhecimento, sendo que foi possível cons-

tatar que estando a célula no seu estado basal há uma produção de ERO, três vezes maior nos indivíduos pertencentes ao grupo de idosos (**figura 12 - painel B**) do que os de meia idade (**figura 12 - painel A**), de forma quando houve o estímulo de estresse oxidativo através do H_2O_2 tais grupos etários seguiram este mesmo perfil ocorrendo uma produção de ERO duas vezes maior no grupo de idosos se comparado ao de meia idade.

Tal alteração no perfil oxidativo entre os indivíduos de meia idade e idosos se encontra em conformidade com os achados de CHAVES *et al* 1998 e 2000, estudando granulócitos humanos na faixa etária de 20-80 anos, como também de CALABRIA *et al*, em que num estudo comparativo entre células sanguíneas de indivíduos de meia idade e idosos verificou-se neste último um aumento no número de neutrófilos, sendo estes responsáveis pela produção de ERO bem como uma regulação negativa de genes mitocondriais relacionados ao complexo I da cadeia de transporte de elétrons, sabendo-se que o envelhecimento é bem caracterizado pelo funcionamento alterado da mitocôndria (CALABRIA, E. *et al*. 2016)

Em relação à capacidade antioxidante do RSV, tais resultados demonstraram que o composto fenólico foi capaz de reduzir a produção de ERO em ambas as faixas etárias, porém com uma maior eficiência (92,6%,) na faixa de meia idade (**figura 12 - painel A**) em comparação com a faixa etária de idosos (**figura 12 - painel B**) em que apresentou 76,7% de eficiência. Fato que nos indica que tal composto exibe melhor atividade na faixa etária que apresentam um efeito menor do estresse oxidativo, de modo que esses dados encontram-se de acordo com o estudo realizado por LARA, 2018, no qual o RSV 5 μM apresentou uma maior eficiência na redução das espécies reativas em células neuronais N2-A quando utilizado numa situação de pré-estímulo ao H_2O_2 frente ao seu uso num quadro de pós-estímulo pelo H_2O_2 , ou seja, o RSV apresentou melhor atividade como agente preventivo se comparado ao seu uso como agente de tratamento (LARA, 2018)

Após inúmeros estudos ao longo de uma década demonstrando a vasta gama de atividades biológicas atribuídas ao RSV, surgiu a necessidade de elucidar quais seriam as vias metabólicas pelos quais esse composto fenólico exerce a sua atividade. Frente a isso, a maioria das pesquisas apontam para participação das vias de sinalização de AMPK e SIRT1 como principais responsáveis pelas atividades farmacológicas do mesmo, porém também existem evidências que contradizem tal afirmação visto que o RSV pode exercer suas funções de modo indireto e independente dessas duas vias (YE, X. *et al*, 2017; GARCIA, D.; SHAW, R. J, 2017; TENNEN, R. I.; MICHISHITA-KIOI, E.; CHUA, K, 2012).

Desse modo, existem mecanismos adicionais que podem justificar a ocorrência de tantos efeitos biológicos por parte do RSV, sendo que alguns já encontram-se em estudo tais como as vias de sinalização PKA, AKT/PKB, MAPK além de fatores de transcrição de resposta inflamatória como NF- κ B, receptores de estrogênio entre outros (KULKARNI, S; CANTÓ, C. 2015).

A via de sinalização PKA, dependente de AMPc, é conhecida atualmente por sofrer ativação de um grande número de receptores diferentes, os quais através do acoplamento via proteína G ativam esta proteína quinase através da geração de AMPc, de modo que tal ativação pode desencadear a regulação de vários mecanismos celulares como metabolismo, regulação gênica e diferenciação celular (SKALHEGG, B. S.; TASKEN, K. 2000). Sabendo-se que alguns processos do metabolismo celular como biogênese mitocondrial e transcrição gênica estão intimamente ligados ao estresse oxidativo e a inflamação, somados ao grande número de atividade celulares reguladas através de PKA, relatos da literatura apontam a participação desta via nestes mecanismos ora agindo como antioxidante/anti-inflamatória ora agindo como oxidante/pró-inflamatório (SASSONE-CORSI, P. 2012).

Ao analisarmos a interferência do RSV na via de PKA num ambiente de estresse oxidativo, através do ensaio de quimioluminescência sob a introdução do inibidor desta via, H89, foi possível observar (**figura 13**) que no padrão estabelecido no estudo, tal via assumiu um caráter antioxidante dado que em ambas as faixas etárias (**figura 13- painel A e B**) após o estímulo com o H₂O₂ houve um aumento significativo da produção de ERO quando a via foi inibida pelo H89. Nossos dados estão em conformidade com um estudo feito por WANG *et al.*, no qual PKA foi capaz de suprimir a expressão Nox2 principal fonte de ERO vascular, em células de músculo liso aórtico de ratos (WANG, Y. *et al.* 2012).

Em outro estudo realizado por SRINIVASAN *et al.*, em um ambiente de inflamação e hipóxia, a ativação de PKA induziu a perda de atividade do complexo IV cadeia de transporte de elétrons e aumento de ERO em células de macrófagos e coração de camundongos, ao passo que curiosamente em condições normóticas a ativação da via aumentou a atividade de tal complexo (SRINIVASAN, Satish *et al.* 2013).

Portanto, a tendência da via de PKA de agir como antioxidante ou pró-oxidante parece estar relacionado com as condições celulares sejam elas num ambiente anormal/patológico, ou num ambiente celular considerado fisiológico.

Nossos resultados também mostraram que o RSV continuou exercendo a sua atividade antioxidante nos dois grupos etários (**figura 13 - painel A e B**), fato verificado através da redução significativa da produção de ERO frente à adição do inibidor H89. Outro fato verificado, apesar de não ter se mostrado significativo, foi que na faixa de meia idade a inibição da via de PKA proporcionou um aumento da geração de ERO enquanto na faixa etária dos idosos verificamos que a mesma inibição gerou uma queda destas espécies reativas de oxigênio (**figura 13 - painel A e B**).

Nossos resultados corroboram com os de DONG *et al.*, numa pesquisa sobre a ação neuroprotetora do RSV em que o composto fenólico inibiu a corrente Kv2.2, associada a descargas epileptiformes, através do estímulo da atividade de PKC mas não foi capaz de alterar a atividade de PKA sobre a corrente Kv2.1 (DONG, W. *et al.* 2013). Já estudos realizados por ZHAO, *et al.*, mostraram que o RSV juntamente com metformina inibiram o mecanismo de lipólise no tecido adiposo hipoxêmico via redução dos níveis de AMPc/PKA em tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta rica em gordura (ZHAO, W. *et al.* 2016).

Este conflito de resultados pode ser parcialmente elucidado pela descoberta do mecanismo de atuação do resveratrol dependente de várias enzimas fosfodiesterases. Park *et al.*, acharam a conexão entre o RSV e AMPK. Eles demonstraram que o RSV inibe diretamente várias enzimas fosfodiesterases (PDE), o que aumenta os níveis do segundo mensageiro AMPc, a ativação do fator de troca do nucleotídeo guanina dependente de AMPc (Epac 1) e um aumento do cálcio intracelular que ativa a quinase CamKK β , que fosforila e ativa AMPK (**Figura 22**) – (PARK, S. *et al.* 2012).

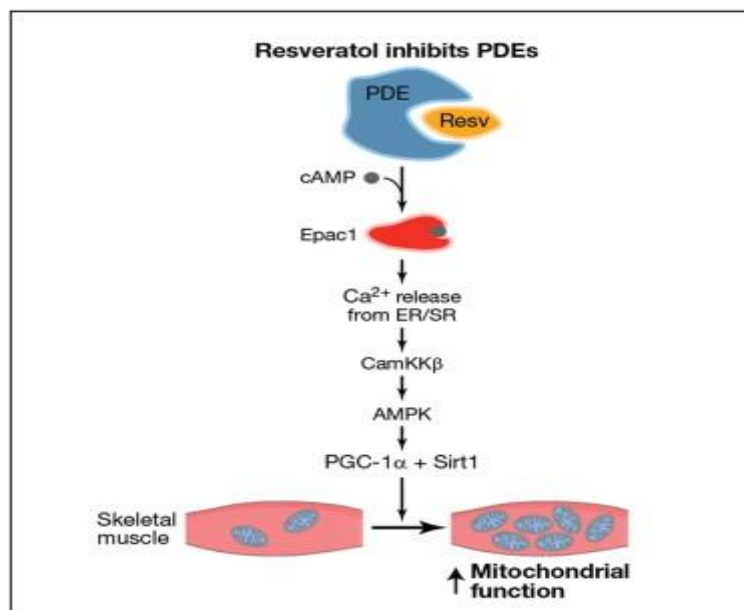


Figura 22: Novo mecanismo de interação entre AMPc, EPAC1, SIRT1, AMPK e o RSV. **Fonte:** Park *et al.*, 2012.

Desta forma, elucidando este mecanismo, a ativação resultante de Epac1, uma proteína efetora de AMPc, aumenta os níveis intracelulares de Ca^{2+} e activa a via $\text{CamKK}\beta$ -AMPK através da fosfolipase C e do canal de libertação de Ca^{2+} do receptor de rianodina. Como consequência, o resveratrol aumenta o NAD^+ e a atividade de SIRT1. A inibição da PDE4 com o rolipram reproduz todos os benefícios metabólicos do resveratrol, incluindo a prevenção da obesidade induzida por dieta e um aumento na função mitocondrial, resistência física e tolerância à glicose em camundongos.

Portanto, a administração de inibidores de PDE4 pode também proteger contra e melhorar os sintomas de doenças metabólicas associadas ao envelhecimento (PARK, S. *et al.* 2012). Já, Tennen, Michishita-Kioi e Chua (2012) demonstraram que o RSV além de ativar a via AMPc /Epac 1/CamKK β /AMPK, ativa uma via paralela. O aumento dos níveis de AMPc pela inibição direta dos PDE pelo RSV, ativa a proteína quinase A (PKA) que diretamente fosforila e ativa SIRT1 (**Figura 23**).

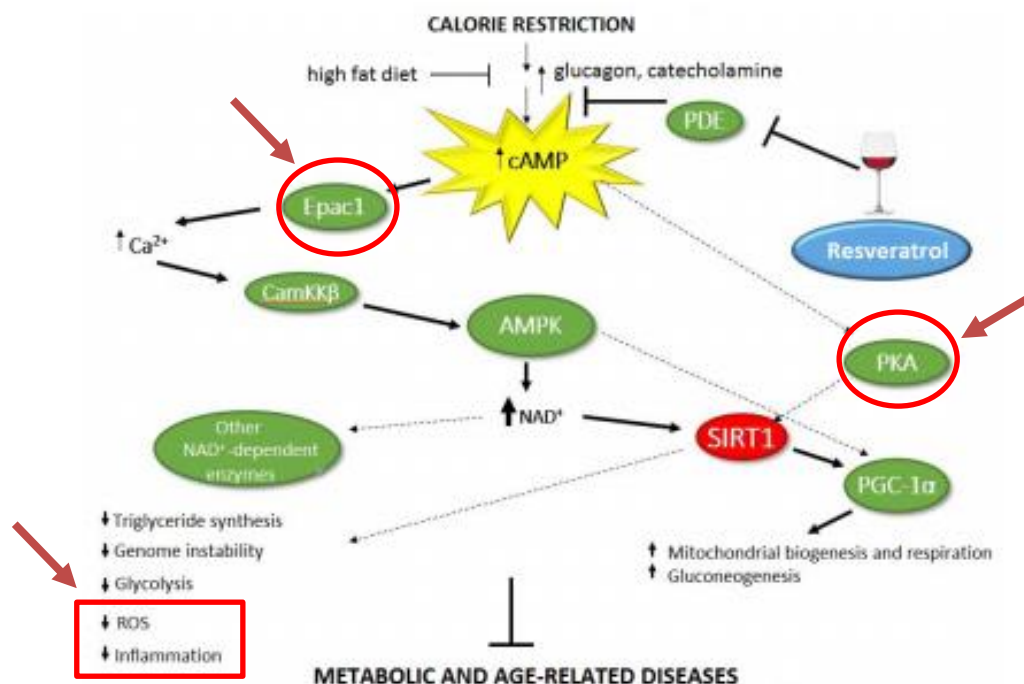


Figura 23: Novo mecanismo de interação entre as vias de SIRT1 e AMPK e o RSV. **Fonte:** GERZON; RODACKA; PUCHALA, 2014.

Neste contexto, os nossos resultados mostram que para o RSV exercer os seus efeitos biológicos no processo de envelhecimento é necessária uma comunicação eficaz de vias metabólicas que vai depender de vários fatores dentre eles o estresse oxidativo e inflamação.

A segunda proteína quinase analisada em nossa pesquisa é a proteína quinase B (via AKT/PB), uma serina-treonina que é bastante conhecida pelo seu papel de regulação da sobrevivência, proliferação celular, metabolismo energético e desenvolvimento tumoral (LOS, Marek *et al.* 2009). Através das nossas observações a cerca desta via, foi possível constatar que a mesma também apresentou um perfil antioxidante e/ou anti-inflamatório (**figura 14**) em ambas as faixas etárias (**figura 14 - painel A e B**), pois quando adicionado o Akt Inhibitor no tratamento com H₂O₂ foi verificado um aumento significativo de ERO nesses grupos.

Esta via de sinalização desempenha um papel essencial na regulação no metabolismo da glicose, combatendo o desenvolvimento de desordens metabólicas que estão intimamente associadas com o estresse oxidativo e a inflamação como o diabetes mellitus. Sendo que tal ação caracteriza-se pelo aumento da captação da glicose por meio da translocação de GLUT-4 para a membrana celular, bem como a inibição da enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) promovendo a síntese de glicogênio induzida pela insulina (MACKENZIE, R; EL-

LIOTT, B. 2014; ZHANG, X. *et al.* 2011). De forma complementar, foi constatado que a via de AKT/PKB exerce um efeito cardioprotetor, de modo que sua ativação promoveu a redução da apoptose em cardiomiócitos modelos de isquemia transitória *in vivo* (MATSUI, T. *et al.* 2001).

Adicionalmente, foi possível observar que o RSV manteve a sua capacidade de diminuir ERO mesmo após a adição do inibidor da via AKT/PKB nas duas faixas etárias (**figura 14 - painel A e B**). Quando foi introduzido o inibidor da via AKT/PKB verificamos uma possível restauração do estresse oxidativo na faixa etária de meia idade em contrapartida com uma redução deste estresse na faixa etária dos idosos (resultado não significativo) (**figura 14 - painel A e B**). Estes dados, mostram que na faixa etária de meia idade os mecanismos antioxidantes da via de AKT/PKB ainda podem permanecer ativos que de forma adversa estão sendo perdidos durante o processo de envelhecimento. Ainda podemos verificar que a geração de um estresse oxidativo gerado na população idosa, verificado na **figura 12** em conjunto com a Tabela demográfica (**Anexo 1**), na qual a população estudada está dentro dos padrões glicêmicos normais nos mostram que mudanças precoces na alteração do padrão de sinalização desta via, pode corroborar para o desenvolvimento de desordem metabólicas precoces.

Além disto, Chi-Chien *e cols.*, 2017, verificaram que para o Resveratrol exercer os seus efeitos de neuroproteção, atenuação de desordens metabólicas e ser cardioprotetor (todos estes relacionados a alteração dos padrões glicêmicos) é necessário que três vias estejam realizando uma conversa metabólica eficiente a saber: AKT, AMPK e SIRT1 (Figura 24) -(Chi-Chien, *et al.* 2017) . Neste contexto, Caldeira, 2019 verificou que no processo de envelhecimento há uma mudança no contexto celular caracterizada pelo silenciamento do caráter antioxidante da via AMPK (CALDEIRA, C. 2019). Além disso, a atuação do RSV é alterada no envelhecimento, já que a sua influência na via da SIRT1 é cessada.

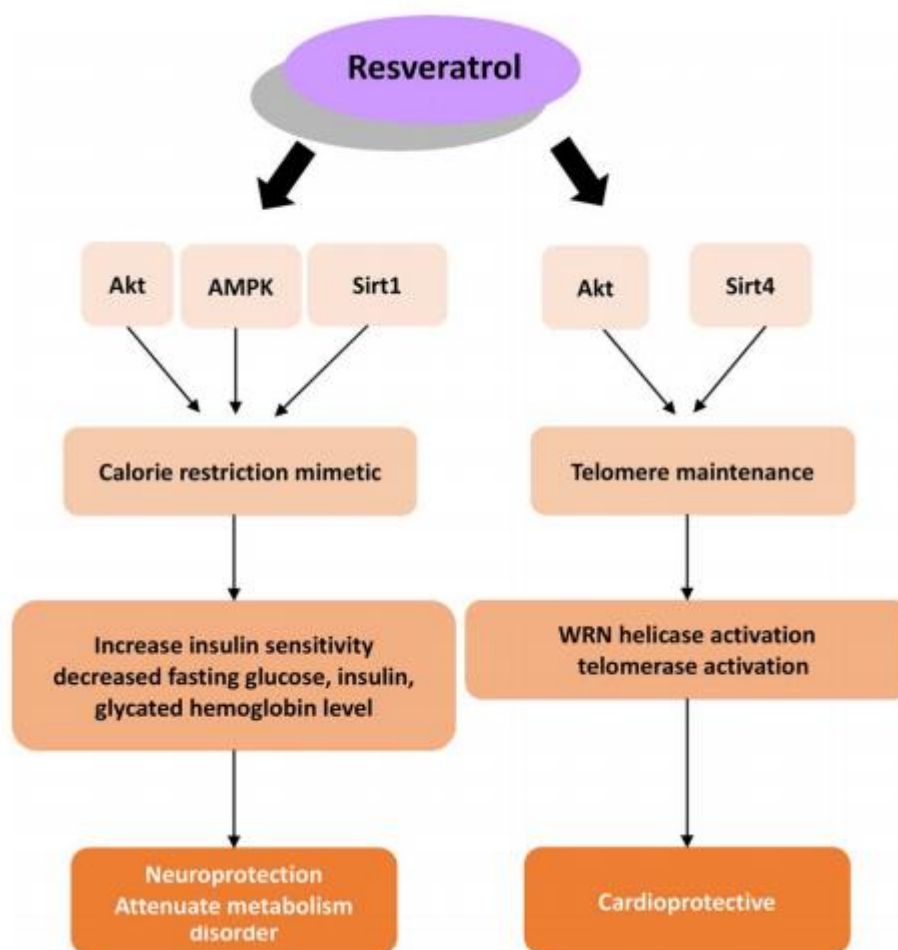


Figura 24: Efeito do Resveratrol sobre doenças correlacionadas ao envelhecimento: necessidade de interação de vias metabólicas: **Fonte** Chi-Chien *et al.*, 2017.

As MAPKs são proteínas quinases pertencentes a uma das principais vias associadas ao mecanismo de transdução de sinal intracelular, devido a isso essas moléculas sinalizadoras tem demonstrado exercer um papel importante em vários processos fisiológicos. Diversos tipos de estímulos podem ativar os subgrupos das MAPKs, sendo que geralmente, os fatores de crescimento são responsáveis preferenciais pela ativação de ERK-1 e ERK-2, enquanto que os JNKs e p38 MAPKs são ativados pelo estresse celular, incluindo ERO, radiação UV e γ (KYRIAKIS, J; AVRUCH, J. 2012).

O subgrupo definido pela p38MAPK, caracteriza-se pela alta correlação com o processo de inflamação. Pesquisas apontam que este tipo de proteína quinase atua na indução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF e IL-6, bem como na expressão de enzimas como COX-2 estando por isso associada a doenças de origem inflamatória tais como a Artrite

reumatoide e doença de Alzheimer. Adicionalmente existem evidências científicas que relatam consolidação do fenótipo celular senescente ocorre de maneira dependente da ação da p38MAPK em resposta ao encurtamento dos telômeros e H_2O_2 (ZARUBIN, T; JIAHUAI, H. 2005).

Tendo consciência da grande associação desta via de sinalização com estresse oxidativo assim como os agentes que participam do processo inflamatório, foi de interesse do nosso estudo amplificar a compreensão acerca dos mecanismos de ação pelos quais o RSV desempenha as suas atividades biológicas, analisando para tanto se tal atividade estaria associada à via de MAPK.

Baseado em tal colocação, nossos resultados (**figura 15**) demonstraram que a via de MAPK apresentou um perfil igualitário nas faixas etárias estudadas (**figura 15- painel A e B**), caracterizada por um aumento significativo na produção de ERO nos dois grupos estudados (**figura 15- painel A e B**) após ter sido inibida pela adição do p38 MAPKinase Inhibitor III, comparando com o controle em que não houve incubação com o inibidor. Portanto nas condições induzidas pelo ensaio a via de MAPK proporcionou um ambiente antioxidante.

Estes resultados podem parecer a princípio contraditórios com os dados da literatura que mostram uma regulação positiva na produção de ERO através da ativação da via em questão. Num estudo recente, foi demonstrado que após a pré-incubação com inibidor de p38MAPK em macrófagos, houve inibição da produção de ERO estimulada por LPS (OH, H. *et al*, 2018). Em adição, os achados de BORODKINA, *et al.*, demonstraram que quando incubadas com um inibidor seletivo de p38MAPK, células estaminais mesenquimais derivadas do endométrio humano (hMESECs) que sofrem senescência prematura em resposta ao estímulo H_2O_2 , ocorreu uma inibição da produção dessa molécula oxidante (BORODKINA, A. *et al.* 2014).

Entretanto, quando se estuda sinalização celular em faixas etárias e levando em conta um ambiente de estresse oxidativo outros fatores tem que se levados em conta. Neste contexto, sabemos que em condições com estresse oxidativo baixo as ERO ativadas por agentes estressantes (ex: H_2O_2 , fatores de crescimento, citocinas e várias tensões) são rapidamente removidas por proteínas antioxidantes intracelulares. Uma vez que o produto de ERO excede a capacidade das moléculas antioxidantes, estas podem induzir modificação oxidativa das proteases de sinalização das MAPK (por exemplo, RTK e MAP3K), conduzindo assim a ativação

de MAPK. As ERO podem também inibir as vias da MAPK via inibição e/ou degradação de MKP (Fosfatase da via das MAPK) (**Figura 25**) – (SON, Y. *et al.* 2011). Diante deste fato, podemos verificar que existem dois caminhos de sinalização que poderiam explicar os nossos dados, onde no processo de envelhecimento com um estresse oxidativo alto pelo desbalanço dos mecanismos oxidantes em detrimento dos antioxidantes levaria ao invés da ativação clássica da via um caminho alternativo ao qual levaria a degradação da MKPs e consequentemente a inativação da via de MAPK e esta já inativada levaria um aumento de ERO intracelular (**Figura 25**). Ao colocarmos o inibidor da via clássica favorecemos então o percurso alternativo reforçando assim o quadro já apresentado no processo de envelhecimento e como consequência o aumento de ERO.

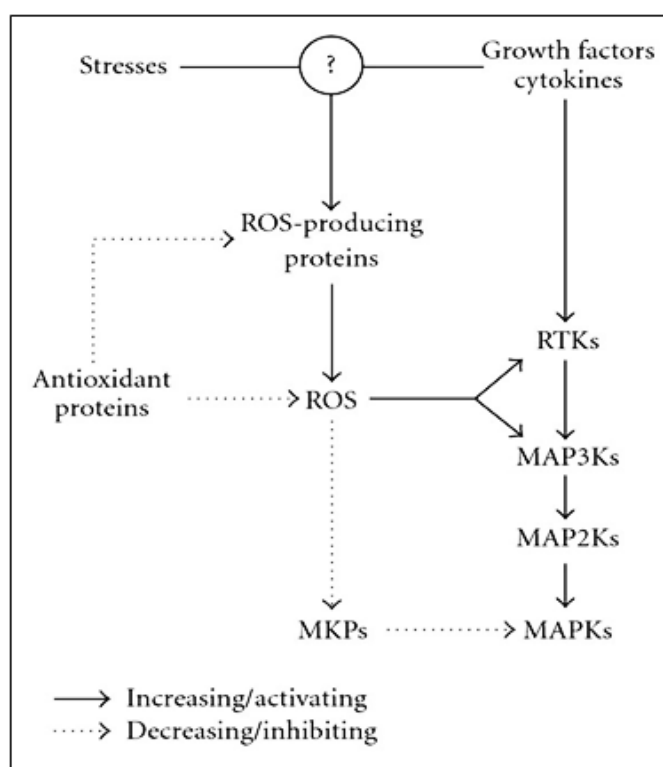


Figura 25: Mecanismos para ativação e inibição mediada por ERO das vias de MAPK. **Fonte:** SON, Y. *et al.* 2011.

Outro ponto a ser observado a partir dos nossos dados foi a permanência da atividade antioxidante do RSV no experimento, o qual manteve tal ação em ambos os grupos etários (**figura 15 – painel A e B**) quando incubado juntamente com o inibidor de MAPK após o estímulo com H_2O_2 , comparando-se ao grupo controle sem inibidor. Tratando-se ainda do comportamento do RSV frente a via de sinalização de MAPK, nossos experimentos demonstraram a regulação desta via sobre a atividade do composto fenólico nos dois grupos etários,

ao passo que a diferença estatística existente no tratamento com estímulo via H_2O_2 e acréscimo do RSV após adição do inibidor em relação ao respectivo controle sem inibição demonstrou tal evento de interação entre o RSV e MAPK.

Em concordância com os nossos achados, existem relatos que demonstram a interação do RSV com a via de p38MAPK, de modo que o composto fenólico melhorou as funções cardíacas, através da diminuição do estresse oxidativo e inibição da fosforilação desta via no modelo pós- insuficiência cardíaca em ratos (RIBA, A. *et al.* 2017). Em adição, ZONG, *et al.*, demonstraram que o RSV foi capaz reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios em resposta ao LPS em células RAW 264.7, através da inibição da via de CREB e MAPKs tendo a sua ação anti-inflamatória mediada pela ativação indireta de AMPK e expressão de SIRT1 via PI3K/AKT (ZONG, Y. *et al.* 2012).

Verificamos também nos indivíduos de meia idade (**figura 15 – painel A**) que após a inibição da via, o RSV perdeu a sua capacidade antioxidante e a produção de ERO se igualou a produção destas espécies apenas com H_2O_2 0,64% v/v. Já na faixa etária dos idosos verificamos que após a inibição da via da MAPK o RSV aumentou a sua capacidade anti-oxidante diminuindo a produção de ERO que atingiu o patamar de inibição abaixo do valor basal (**figura 15 – painel B**).

O aumento na efetividade do RSV no grupo de idosos após a inibição da via de MAPK pode ter ocorrido pela alteração da ação desta via, na faixa etária em questão de acordo com estudos. Um estudo realizado por LARBI e *cols.*, constatou que a alteração da ativação da MAPK em PMN de idosos resulta na maior susceptibilidade a infecções assim como uma maior facilidade a adquirir um fenótipo pró-apoptótico através da modulação negativa do fator de crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) – (LARBI, A. *et al.* 2005). Através destes dados também podemos inferir que o resveratrol possivelmente possa ser eficaz em restaurar a via de sinalização clássica nesta faixa etária.

Após a análise acerca do efeito do RSV sobre as vias de sinalização PKA, AKT/PKB e MAPK, em que foi demonstrado que o composto fenólico sofreu um tipo de regulação apenas através da via de MAPK, pode-se inferir que apesar de existirem evidências sobre tal interação, no ambiente imposto pelo nosso ensaio o RSV pode ter exercido sua função antioxidante e/ou anti-inflamatória através de outros fatores tais como as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias as quais também fizeram parte da nossa proposta, bem como através da

superexpressão das vias já comprovadamente moduladas por este composto fitoquímico, como a SIRT1 e AMPK.

O estresse oxidativo e o envelhecimento estão diretamente ligados à fisiopatologia de diversas desordens inflamatórias e doenças degenerativas crônicas, desencadeadas pelo recrutamento de células inflamatórias e indução da produção de várias citocinas pró-inflamatórias causadas pelo acúmulo de ERO ao longo da vida (Inflammaging) (HE, Y, *et al.* 2015; FRANCESCHI, C; CAMPISI, J. 2014). Com base nisto, damos sequência ao nosso estudo buscando verificar o impacto causado pelo RSV no perfil da inflamação na faixa etária de meia idade e idosos. Sendo que para tanto foi feita a dosagem das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF, assim como da citocina anti-inflamatória IL-10.

A frente da regulação destas citocinas pró-inflamatórias, assim como quimiocinas e moléculas de adesão está o fator nuclear κ B (NF- κ B). A atividade deste fator de transcrição é regulada por proteínas I κ B, que em condições fisiológicas normais promovem a inibição de NF- κ B no citoplasma, porém após a indução através de fatores como as ERO, ocorre a ativação da proteína quinase IKK sendo que essa por sua vez promove a fosforilação de outra quinase I κ B que irá efetuar a translocação de NF- κ B do citoplasma para o núcleo. No núcleo, o NF- κ B irá se ligar a regiões que promover a transcrição e intensificação de genes específicos para a resposta inflamatória. Desse modo a ativação da via do NF- κ B regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células inflamatórias, que contribuem para a resposta inflamatória (ANKER, S; VON HAEHLING, S. 2004; CHEN, L. *et al.* 2018).

Apesar do mecanismo de inflamação envolver uma cascata com participação de diversos mediadores pró-inflamatórios, a IL-6 caracteriza-se como um dos mediadores mais estudados. Pesquisas associam o aumento da concentração desta interleucina com o passar da idade e apontam para o seu efeito negativo quando em altos níveis por tempo prolongado, estando associada a diversas doenças tais como aterosclerose, doença cardiovascular, obesidade, diabetes mellitus e declínio cognitivo em indivíduos idosos (BETTSCHER, B. *et al.* 2014).

Baseado nisto, após a dosagem desta citocina (**figura 16**) foi possível constatar que o nível da concentração no estado basal de IL-6 foi duas vezes maior em indivíduos do grupo de idosos (**figura 16 - Painel B**) em relação ao grupo de meia idade (**figura 16 - painel A**) corroborando um estudo de FABBRI, *et al* em que os indivíduos idosos acompanhados durante 9 anos num estudo longitudinal apresentaram níveis basais mais elevados de IL-6 de forma que

esse aumento nos níveis da interleucina ao longo do tempo foram associados com o desenvolvimento acelerado de morbidades (FABBRI, E. *et al.* 2014).

Adicionalmente, o RSV foi capaz de promover a redução dos níveis da IL-6 nos dois grupos etários testados, porém destaca-se o fato do mesmo ter sido mais efetivo na faixa etária de meia idade (**figura 16 - painel A**) apresentando uma redução significativa de 77% desta interleucina frente a redução de 53,7% na faixa etária de idosos (**figura 16 - painel B**). LOU *et cols.*, demonstrou que o RSV foi capaz de reduzir os níveis de expressão de mRNA de IL-6 em aortas de ratos diabéticos (LOU, X. *et al.* 2014).

O fator de necrose tumoral (TNF) define-se como uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel importante como mediador do mecanismo de inflamação. Ao TNF atribui-se a participação na iniciação, regulação e perpetuação da resposta inflamatória. A relação do envelhecimento com esta citocina pró-inflamatória já é bastante conhecida, sendo que o aumento de TNF- α em idosos promove a indução de autoanticorpos, e está ligado ao surgimento de doenças associadas a idade, como aterosclerose e demência (BOREN, E; GERSHWIN, M. 2004).

Tratando-se do estudo sobre TNF, nossos achados na **figura 17** demonstraram que semelhante a IL-6, a concentração basal celular de TNF foi duas vezes superior na faixa etária de idosos (**figura 17- painel B**) se comparada a faixa etária de meia idade (**figura 17- painel A**). Esse aumento de concentração de TNF, interligado com a idade também foi verificado por KIM *et al*, em que ratos idosos expostos à dieta rica em gordura apresentaram aumento na fibrose hepática e renal, concomitantemente a elevação expressões dos níveis de mRNA de TNF em comparação com o grupo de meia idade (KIM, I. *et al.* 2016).

Quando comparamos a concentração desta citocina pró-inflamatória após adição do RSV juntamente com o estímulo H_2O_2 **figura 17**, o mesmo apresentou um comportamento similar ao apresentado na dosagem de IL-6, de maneira que foi capaz de diminuir significativamente a concentração de TNF de forma mais eficaz no grupo etário de meia idade (**figura 17- painel A**) com 79% de inibição desta citocina ao passo que no grupo etário de idosos (**figura 17- painel B**) tal inibição ocorreu em 50%, se comparado ao tratamento onde há apenas o estímulo com H_2O_2 .

Esse perfil de variação na efetividade do RSV frente à concentração destas duas citocinas pró-inflamatórias relacionado com a idade, encontra-se em concordância com um estu-

do realizado por TUNG *et. al* no qual em células hepáticas de ratos idosos o RSV não foi capaz de reverter o aumento da expressão de IL-6 e TNF (TUNG *et. al.* 2015).

Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias desempenham um papel essencial no re-estabelecimento da homeostase imune. Elas atuam no combate a progressão da resposta inflamatória e no estabelecimento de patologias relacionadas ao surgimento do estado da inflamação crônica. Dentre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 é uma das mais conhecidas por atuar na supressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-8, IL-6, TNF e IL-1. A regulação negativa da produção dessas citocinas foi verificada num estudo em células mononucleares de sangue periférico estimuladas por LPS de pacientes com Insuficiência cardíaca congestiva (OUYANG, W. *et al* 2011; BOLGER, A. *et al.* 2002).

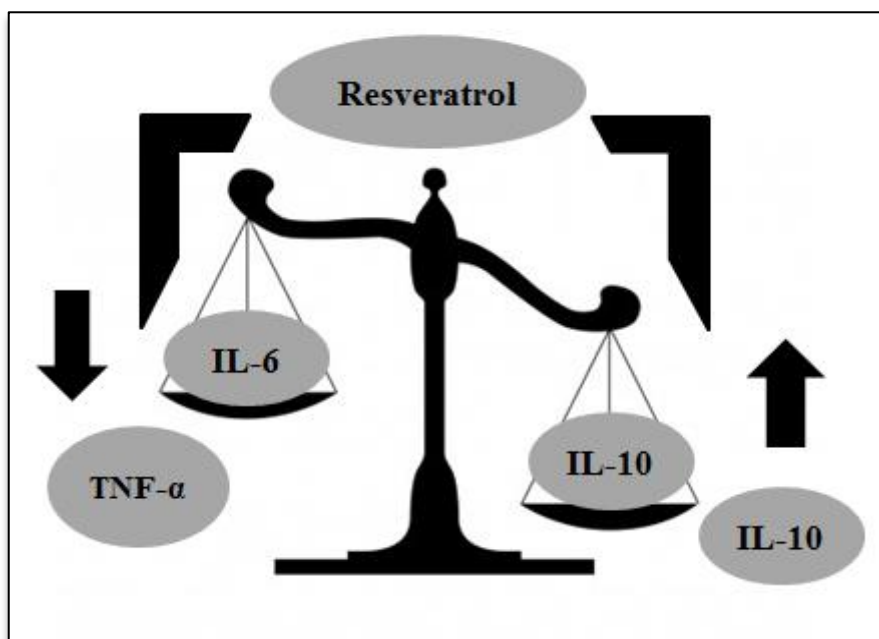
Foi observado também uma função protetora associada ao envelhecimento e a resistência à insulina, de forma que a inflamação no músculo esquelético foi diminuída em camundongos idosos com superexpressão muscular específica de IL-10 (DAGDEVIREN, S. *et al.* 2016). A associação da atividade de IL-10 com o estresse oxidativo foi avaliada por MEDINA *e cols.*, em que a interleucina anti-inflamatória inibiu a produção de ROS por granulócitos de indivíduos saudáveis (MEDINA, L. *et al.* 2007)

Diferentemente das duas citocinas pró-inflamatórias utilizadas no nosso estudo, após a dosagem de IL-10 (**figura 18**) nas células PBMC das faixas etárias padronizadas, em seu estado basal foi possível observar que os indivíduos idosos (**figura 18- painel B**) apresentaram níveis de concentração desta interleucina diminuídos em 20% comparado a concentração expressa em indivíduos de meia idade (**figura 18- painel A**). Dado consistente com uma pesquisa realizada em PBMC de indivíduos saudáveis de uma faixa etária de 20 a 90 anos, em houve uma taxa de declínio na concentração de IL-10 relacionado à idade (HIROKAWA, K. *et al.* 2013).

Quando avaliamos a produção de IL-10 sobre a influência do RSV associado ao estímulo com H₂O₂, verificamos que o RSV foi capaz de aumentar a concentração desta citocina anti-inflamatória em ambas as faixas etárias, entretanto manteve-se mais efetivo no grupo de meia idade (**figura 18- painel A**) ao promover um aumento de 300,8% na concentração de IL-10 diante do aumentando em 236,2% ocorrido no grupo de idosos (**figura 18- painel B**), comparando-se ao tratamento contendo exclusivamente H₂O₂. Tal observação encontra-se em coerência com PALACZ-WROBEL. *et al.*, no qual o RSV provocou um aumento da secreção

e expressão de mRNA de IL-10 em cultura de células de macrófagos, num efeito mais pronunciado quando introduzido pré-estímulo com LPS reforçando assim os nossos achados anteriores a cerca do potencial preventivo do RSV. Curiosamente foi visto que concentrações maiores de RSV, a partir de 30 μ M, provocaram um efeito contrário, causando a diminuição da secreção de IL-10 (PALACZ-WROBEL, M. *et al.* 2017).

Através da análise sobre a influência do RSV na concentração das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e o TNF, bem como na citocina anti-inflamatória, IL-10 nas células PBMC é possível inferir que o composto fenólico exerce sua atividade de forma benéfica para o estabelecimento da homeostase do sistema imune (**Esquema 2**), promovendo a redução dos mediadores pró-inflamatórios e aumentando a concentração do anti-inflamatório seguindo os preceitos estudados na teoria do Inflammaging (balanço metabólico das citocinas). Corroborando assim TAO *et al*, no qual o RSV reduziu a dor neuropática em ratos, promovendo a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF , IL-1 β e IL-6, concomitantemente ao aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (TAO, L. *et al.* 2016).



Esquema 2: Manutenção do sistema imune homeostático através do RSV. Criado por: Almeida & Chaves, 2019.

Prosseguindo nossos estudos sabemos que o Resveratrol tem como funções fisiológicas proteção contra eventos cardiometabólicos. Assim, foi de nosso interesse verificar a sua possível atuação em biomarcadores precoces destes eventos que já são utilizados pela clínica médica.

No decorrer de inúmeras pesquisas a respeito do estresse oxidativo somado a sua associação com a inflamação no desencadeamento de várias doenças de cunho inflamatório, surgiram diversos biomarcadores que estão relacionados direta ou indiretamente com a formação de espécies oxidantes, sejam elas ERO ou ERN, sendo aplicadas como uma forma de mensurar a ocorrência de um processo inflamatório. Dentre estes biomarcadores, o NO, a lipoproteína A Lp(a) e a fosfolipase A₂ têm sido sugeridos como marcadores específicos de ricos cardiometabólicos precoces (ROSSI, W. *et al.* 2016).

O NO, assim como as demais moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, desempenha um papel biológico importante em concentrações consideradas fisiológicas. Vários autores apontam que a produção de níveis adequados desse composto no endotélio vascular é crítica para a regulação do fluxo sanguíneo e da vasodilatação (TEJERO, J. *et al.* 2018). Por outro lado, o NO pode contribuir no processo de manutenção do fluxo sanguíneo em tumores, exercendo um papel significativo na neovascularização tumoral (FUKUMURA, D; JAIN, R. 1998).

O RSV melhora a função endotelial, exerce efeitos anti-hipertensivos, anti-ateroscleróticos e antihiperlipidêmicos e aumenta a sensibilidade a insulina. Parte dos efeitos protetores do RSV são atribuídos ao NO. O RSV melhora a disponibilidade do NO ao estimular sua produção e por prevenir sua inativação mediada pelo O₂^{•-} (XIA, N; FÖRSTERMANN, U; LI, H. 2014).

Confirmando a função do RSV nos níveis de NO, os resultados de Lara (2018) demonstraram que o RSV atua como protetor neural quando elevou a geração de ON nas células N2-A na forma de Pré-estímulo; e como neuro-regenerador quando o fez no Pós-estímulo. Gonzalez-Vicente, Cabral e Garvin (2014) comprovaram que o RSV aumenta a produção de NO em membros ascendentes de ratos saudáveis (LARA, R. 2018; GONZALEZ-VICENTE, A; CABRAL, P; GARVIN, J. 2014).

Em contrapartida, KIMBROUGH *et al.*, comprovaram que o RSV diminui a produção de NO, os níveis de mRNA e a expressão protéica da óxido nítrico sintase induzida em hepatócitos de ratos induzidos por citocinas. HOSHINO *et al.*, demonstraram que sulfatos de RSV podem inibir a produção de NO em células RAW 264.7. Já SHI, *et al.*, elucidaram que a produção de NO não mudou (em relação ao grupo controle) em células endoteliais F-2 incubadas com RSV em concentrações até 20 mM. Porém, em concentrações de 50 e 100mM, a produ-

ção de NO foi aumentada. Neste contexto, Chaves *et al.*, (2000) mostraram também que em granulócitos humanos ocorre um aumento da produção de NO em função da idade (KIM-BROUGH, C. *et al.* . 2015; HOSHINO, J. *et al.* 2010; SHI, Y. *et al.* 2014; CHAVES, 2000).

Os resultados apresentados na **figura 19** revelam que no grupo de meia idade não houve um aumento da quantidade de NO nas PBMC estimuladas com RSV, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao H₂O₂. Esse resultado está de acordo com o resultado apresentado por SHI, *et al.*, 2014. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC expostas ao H₂O₂ em relação às células sem estímulo. Perfil semelhante ao proposto por Soydinç, *et al.* 2007, e Maziak *et al.* 1998. Já no grupo dos idosos, percebe-se que não houve um aumento da quantidade de NO nas PBMC estimuladas com RSV, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo (perfil semelhante ao observado por SHI, *et al.*) porém houve um aumento (não significativo) em relação as células expostas ao H₂O₂. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC sem estímulo em relação às expostas ao H₂O₂. Portanto, o RSV conseguiu restaurar a quantidade de NO das células expostas ao H₂O₂ (que estava reduzida) a níveis basais. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Lara (2018) e Gonzalez-Vicente, Cabral e Garvin (2014) em relação à atividade do RSV e também estão de acordo com os apresentados por GRUBER *et al.*, e BEN ANES *et al.*, em relação a interação entre níveis reduzidos de NO e EO (SOYDINÇ, S. *et al.* 2007; MAZIAK, W. *et al.* 1998; LARA, R. 2018; GONZALEZ-VICENTE, A; CABRAL, P; GARVIN, J. 2014; GRUBER, J *et al.* 2007; BEN ANES, A *et al.* 2014)

Portanto, infere-se que nos idosos que já apresentam um nível basal de estresse oxidativo maior que o apresentado pelo grupo de meia idade; ao expor as PBMC ao H₂O₂ cria-se um ambiente de EO elevado que interfere nos níveis de NO (reduzidos) e que o RSV consegue atuar, restaurando-os aos níveis basais. Essa atuação do RSV em relação aos níveis de NO provavelmente ocorre devido a sua ação antioxidante (**figura 19 – painel A e B**) nas PBMC de idosos.

Dando sequência a análise de biomarcadores ligados à inflamação e o estresse oxidativo, avaliamos a intervenção do RSV na concentração dos níveis plasmáticos da lipoproteína A [Lp(a)] nas faixas etária padronizadas após um período de tratamento preconizado pelo estudo.

A Lp (a) é uma partícula lipídica considerada como um fator de risco independente para doença cardiovascular prematura. Existe uma vasta gama de estudos que apontam os efeitos pró-aterogênicos desta lipoproteína, de maneira que há evidências em que Lp(a) pode adentrar a parede das artérias estimulando desse modo a ativação das células endoteliais e a inflamação da parede vascular, através deposição de colesterol, resultando na sua participação em processos patológicos como aterosclerose e na formação de trombose (DANGAS, G. *et al.* 1998; PIRRO, M. *et al.* 2017).

Adicionalmente, existem relatos a cerca da associação existente entre a Lp (a) e várias desordens cardíacas, tais como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e estenose da valva aórtica calcificada, revelados através de metanálises e estudos genômicos (GENCER, B. *et al.* 2017).

De acordo com a análise realizada na dosagem **(figura 20)**, os níveis plasmáticos da Lp(a), antes da intervenção com RSV, encontraram-se numa concentração mais alta em idosos **(figura 20 – painel B)**, tratando-se da comparação com os indivíduos da faixa de meia idade **(figura 20 – painel A)**.

Esse aumento de nível plasmático da Lp(a) relacionado com a idade que foi verificado na nossa abordagem, pode não estar correlacionado direta ou unicamente de acordo com a literatura (WU, J. 2011). De acordo com MARANHÃO, *et al.*, num estudo com vários grupos étnicos, a variação na concentração de Lp(a) foi influenciada em grande parte pelo polimorfismo dessa lipoproteína, sendo consistente com outros dados reportados que mostraram pouco efeito de fatores como idade e sexo (MARANHÃO, R. *et al.* 2014).

Por outro lado, em um estudo conduzido por ARAI, *et al.*, foi encontrado uma elevação na concentração de Lp(a) em centenários japoneses, associada a uma regulação positiva com a proteína C reativa, suportando que a resposta inflamatória pode contribuir para a elevação da lipoproteína nesses indivíduos (ARAI, Y. *et al.* 2001).

Portanto, apesar da concentração de Lp(a) ser influenciada em grande parte pelo seu grande polimorfismo genético, diante dos dados que indicam a sua associação com os fatores inflamatórios, pode-se inferir que a concentração da mesma encontra-se aumentada em idosos, por haver um estado de inflamação crônica neste grupo etário.

Quando o RSV foi introduzido na dieta diária dos indivíduos participantes da pesquisa, já foi verificada uma diminuição significativa os níveis plasmáticos da Lp(a) em ambos os grupos etários (**figura 20 – painel A e B**) após três meses de intervenção, quando comparado ao concentração desta lipoproteína no início do estudo. Porém após seis meses de intervenção com o composto fenólico houve uma redução em 28% e 16% no perfil de Lp(a) nos indivíduos de meia idade (**figura 20 – painel A**) e idosos (**figura 20 – painel B**), respectivamente. Verificou-se então um aumento progressivo da eficiência do RSV, em relação do tempo de tratamento.

Tal qual os nossos resultados, o efeito positivo do RSV sobre a concentração de Lp(a) foi observado por Cho, *et al.*, no qual após uma dieta rica em lipídios aplicada em hamsters machos sírios, a inserção de 0,025% de RSV por um período de 2 meses causou uma redução de 60% dos níveis plasmáticos desta lipoproteína quando comparados com o grupo controle (Cho, *et al.* 2008).

Por fim, foi analisada a interação do RSV com o terceiro biomarcador de cardiopatia, a fosfolipase A₂, com o intuito de avaliar qual seria o perfil dos indivíduos participantes em concentração de aos níveis plasmáticos de PLA₂, após o período de intervenção com RSV proposto pela pesquisa.

A fosfolipase A₂ está intimamente associada a propagação do processo de inflamação, ao passo que duas das cinco principais classes desta enzima estão ligadas a progressão de processos ateroscleróticos. Estudos apontam que a sPLA₂ caracteriza-se como um fator de risco para a progressão, desestabilização e ruptura da placa aterosclerótica, além de atuar como biomarcador da doença (CORSON, M. 2009).

Há estudos que abordam a ligação entre PLA₂ e o mecanismo de envelhecimento, sendo que foi relatado em células humanas primárias que a senescência precoce pode ser induzida através da expressão do receptor A2 desta fosfolipase tal qual quando o receptor foi noutreado houve retardamento da senescência, por um fator dependente do telômero e estresse oxidativo (GRIVEAU, A. *et al.* 2018).

Apesar de diversos estudos abordarem a participação negativa da PLA₂ nas doenças inflamatórias, pesquisadores apontam para a sua importância no combate a Doença de Alzheimer. A PLA₂ pode estar envolvida no processamento e secreção da proteína precursora de amiloide (PPA), de modo a sua inibição acarreta na redução da PPA. Porém quando a PLA₂ é

ativada favorece a liberação de PPA, conduzindo assim a diminuição do peptídeo β -amilóide um dos principais causadores da patologia (FRIDMAN, C. *et al.* 2004).

No que se refere à análise da concentração da PLA₂ frente a interferência do RSV, nossos resultados mostraram **(figura 21)** que o composto fenólico apresentou uma resposta mais rápida no grupo de meia idade **(figura 21 – painel A)** dado que somente nesta faixa etária o mesmo foi capaz de induzir uma redução significativa dos níveis plasmáticos da PLA₂ após 3 meses de intervenção no indivíduos tratados. Entretanto após o período de 6 meses o RSV também promoveu a redução nos níveis plasmáticos da PLA₂ no grupo de idosos **(figura 21 – painel A)**. De maneira que ao final do período de tratamento o RSV foi responsável por uma inibição mais efetiva no grupo de meia idade do que no grupo de idosos.

No que diz respeito à capacidade do RSV de reduzir a concentração de PLA₂, nosso achado encontra-se em conformidade com o relato de LEE *e cols.*, no qual observou-se que o pré-tratamento com derivados do RSV reduziu a expressão de cPLA₂ induzida por TNF em células mesangiais de ratos (RMCs), num estudo de avaliação sobre os efeitos deste composto fenólico em lesões renais (LEE, I. *et al.* 2019).

Deste modo, os resultados do presente estudo demonstram fortes indicativos a cerca da capacidade antioxidante e anti-inflamatória do RSV numa concentração de 5 μ M em células PBMC. Fato verificado através da capacidade do mesmo em reduzir a produção de ERO, exercer seu efeito através da interação com a via de MAPK, promover a diminuição de interleucinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF mantendo o equilíbrio homeostático imune ao aumentar a concentração de IL-10 somado a redução de importantes biomarcadores de cardiopatia como a Lp(a) e PLA₂. Por fim, por ter apresentado uma maior efetividade em todas as funções citadas, na faixa etária de meia idade nossos estudos apontam para os seus efeitos biológicos mais acentuados em PBMC através do seu uso como fonte preventiva.

6- CONCLUSÃO

Através do nosso estudo observamos que o RSV apresenta uma melhor atividade antioxidante e anti-inflamatória de forma preventiva em células PBMC humanas e a sua atuação é alterada no envelhecimento pela participação da alteração do padrão de sinalização da via de MAPK.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 336, 2014.
- AFONSO, M. S. *et al.* Interaction between natural antioxidants and reactive oxygen species in cardiovascular diseases: perspectives to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) contribution. **Nutrire-Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 35, n. 1, p. 129-148, 2010.
- AHMED, T. *et al.* Resveratrol and Alzheimer's disease: mechanistic insights. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 2622-2635, 2017.
- ALBERTIN, R. *et.al.* Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. Educação. 1998.
- ALONSO-FERNÁNDEZ, P.; DE LA FUENTE, M. Role of the immune system in aging and longevity. **Current aging science**, v. 4, n. 2, p. 78-100, 2011.
- ANKER, S. D.; VON HAEHLING, S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. **Heart**, v. 90, n. 4, p. 464-470, 2004.
- ARAI, Y. *et al.* Lipoprotein metabolism in Japanese centenarians: effects of apolipoprotein E polymorphism and nutritional status. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 49, n. 11, p. 1434-1441, 2001.
- BARTBERGER, M. D. *et al.* The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 17, p. 10958-10963, 2002.
- BAUER, M. E. Desvendando a Imunossenescência Humana: Implicações para o Envelhecimento de Sucesso. **O Desafio da Gerontologia Biomédica**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2016. cap. 2, p. 29-56.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, David A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 6, p. 493, 2006.
- BEN ANES, A *et al.* Increased oxidative stress and altered levels of nitric oxide and peroxy-nitrite in Tunisian patients with chronic obstructive pulmonary disease: correlation with disease severity and airflow obstruction. **Biological trace element research**, v. 161, n. 1, p. 20-31, 2014.
- BETTCHER, B. M. *et al.* Interleukin-6, age, and corpus callosum integrity. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. 1- 7, 2014.
- BHULLAR, K. S.; HUBBARD, B. P. Lifespan and healthspan extension by resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1209-1218, 2015.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

- BISWAS, S. K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- BOLGER, A.P. *et al.* Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. **The American journal of cardiology**, v. 90, n. 4, p. 384-389, 2002.
- BORODKINA, A. *et al.* Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. **Aging (Albany NY)**, v. 6, n. 6, p. 481- 495, 2014.
- BRITO, C. J. *et al.* Exercício físico como fator de prevenção aos processos inflamatórios decorrentes do envelhecimento. **Motriz: Revista de Educação Física**, v.17 n.3, p.544-555, 2011.
- BRUUNSGAARD, H. *et al.* Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and atherosclerosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 121, n. 2, p. 255-260, 2000.
- BULLONE, M.; LAVOIE, J. The Contribution of Oxidative Stress and Inflamm-Aging in Human and Equine Asthma. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2612- 2635, 2017.
- CABELLO-VERRUGIO, C. *et al.* Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p.1-2, 2016.
- CALABRIA, E. *et al.* Aging: a portrait from gene expression profile in blood cells. **Aging (Albany NY)**, v. 8, n. 8, p. 1802-1821, 2016.
- CALDEIRA, Camila Amaro. Resveratrol: Mudança do Padrão de Sinalização da SIRT1 e AMPK Durante o Processo de Envelhecimento. 2019. 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2019.
- CANCELA, D. M. G. O processo de envelhecimento. Trabalho realizado no Estágio de Complemento ao Diploma de Licenciatura em Psicologia pela Universidade Lusíada do Porto, v. 3, 2007.
- CECÍ, K. *et al.* Imunossenescência. **Geriatrics, Gerontology and Aging**, v. 5, n. 3, p. 163-169, 2011.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p. 417-423, 2002.
- CETRULLO, S. *et al.* mTOR, AMPK, and Sirt1: key players in metabolic stress management. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 25, n. 1, p. 59-75, 2015.
- CHACHAY, V. S. *et al.* Resveratrol—pills to replace a healthy diet?. **British journal of clinical pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 27-38, 2011.

- CHANDEL, N. S. *et al.* Role of oxidants in NF- κ B activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 1013-1021, 2000.
- CHAVES, M. *et al.* Host defenses in the aged: Evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. **Mechanism of ageing and development**, v. 104, p. 103-109, 1998.
- CHAVES, M. *et al.* Role PKA and p38 MAPK on ROS production in neutrophil age-related: lack of IL-10 effect in older subjects. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, p. 588-591, 2009.
- CHAVES, M. *et al.* Increased of reactive (ROS) and nitrogen (RNS) species generation by phagocytosing granulocytes aged related. **Mechanism of Aging and Development**, v. 119, p. 1-8, 2000.
- CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218 2018.
- CHO, I. J. *et al.* Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 367, n. 1, p. 190-194, 2008.
- CIOSAK, S. I. *et al.* Senescência e senilidade: novo paradigma na atenção básica de saúde. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, p. 1763-1768, 2011.
- COELHO, O.B. *et al.* Aging: functional metabolic balance among cAMP, cGMP and reactive oxygen intermediate generation by human granulocytes. **Gerontology (Basel)**, v. 51, p. 363-368, 2005.
- COPPÉ, J. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 5, p. 99-118, 2010.
- CORSON, M. A. Phospholipase A2 inhibitors in atherosclerosis: the race is on. **The Lancet**, v. 373, n. 9664, p. 608-610, 2009.
- COSTA, J. P. *et al.* A synopsis on aging—theories, mechanisms and future prospects. **Ageing research reviews**, v. 29, p. 90-112, 2016.
- CROTTY, G. F.; ASCHERIO, A. ; SCHWARZSCHILD, M. A. Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. **Experimental neurology**, v. 298, p. 210-224, 2017.
- CUNHA, G. L.; JECKEL-NETO, E. A. Teorias Biológicas do Envelhecimento. In: CANÇADO, F. A. X.; FREITAS, E. V.; GORZONI, M. L.; PY, L.; NERI, A. L. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.p. 13-19.
- DAGDEVIREN, S. *et al.* IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 2, p. 701-710, 2016.
- DANGAS, G. *et al.* Lipoprotein (a) and inflammation in human coronary atheroma: association with the severity of clinical presentation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 7, p. 2035-2042, 1998.

- DONG, W. *et al.* Resveratrol inhibits Kv2. 2 currents through the estrogen receptor GPR30-mediated PKC pathway. **American Journal of Physiology-Cell Physiology** v.305, n.5, p.547-557., 2013.
- DONG, W. *et al.* Resveratrol pretreatment protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury partly via a NALP3 inflammasome pathway. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 8, p. 8731- 8741, 2015.
- DUSSE, L. M. S. *et al.* Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**, v. 39, n. 4, p. 435-50, 2003.
- FABBRI, E. *et al.* Aging and the burden of multimorbidity: associations with inflammatory and anabolic hormonal biomarkers. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 1, p. 63-70, 2014.
- FARFEL, José Marcelo. Fatores relacionados à senescência e à senilidade cerebral em indivíduos muito idosos: um estudo de correlação clinicopatológica. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**. v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.
- FIGUEROA, G. *et al.* Characterization of human Monocyte-derived Dendritic cells by imaging flow Cytometry: a comparison between two Monocyte isolation protocols. **Journal of visualized experiments**, v. 11, n. 116, p.1-9, 2016.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.
- FONSECA, L. J. S. *et al.* Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-14, 2014.
- FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n.1, p. 54-59, 2014.
- FRIDMAN, C. *et al.* Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 19-25, 2004.
- FRIES, A. T.; PEREIRA, D. C. Teorias do envelhecimento humano. **Revista Contexto & Saúde**, v. 11, n. 20, p. 507-514, 2011.
- FRIJHOFF, J. *et al.* Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 14, p. 1144-1170, 2015.
- FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 17, n. 1, p. 77-89, 1998.

- GAMBINI, J. *et al.* Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 1-14, 2015.
- GARCIA, D.; SHAW, R. J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell*, v. 66, p. 789–800, 2017.
- GENCER, B. *et al.* Lipoprotein (a): the revenant. **European heart journal**, v. 38, n. 20, p. 1553-1560, 2017.
- GERSZON, J.; RODACKA, A.; PUCHAŁA, M. Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 97-117, 2014.
- GIOVANNINI, S. *et al.* Interleukin-6, C-reactive protein, and tumor necrosis factor-alpha as predictors of mortality in frail, community-living elderly individuals. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 59, n. 9, p. 1679-1685, 2011..
- GONZALEZ-VICENTE, A.; CABRAL, P. D.; GARVIN, J. L. Resveratrol increases nitric oxide production in the rat thick ascending limb via Ca^{2+} /calmodulin. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. 1679–1685, 2014.
- GRIESS, J. XVIII. On a new series of bodies in which nitrogen substituted for hydrogen. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, n. 154, p. 667-731, 1864.
- GRIVEAU, A. *et al.* Targeting the phospholipase A2 receptor ameliorates premature aging phenotypes. **Aging cell**, v. 17, n. 6, p. 12835- 12847, 2018.
- GRUBER, J. A. N.; TANG, S. Y.; HALLIWELL, B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 1, p. 530-542, 2007.
- HE, Y. *et al.* Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked?. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9183-9213, 2015.
- HEERMEIER, K. *et al.* Oxidative stress mediates apoptosis induced by oxidized low-density lipoprotein and oxidized lipoprotein (a). **Kidney international**, v. 56, n. 4, p. 1310-1312, 1999.
- HIROKAWA, K. *et al.* Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population. **Immunity & Ageing**, v. 10, n. 1, p. 19- 29, 2013.
- HÖHN, A. *et al.* Happily (n) ever after: aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox biology**, v. 11, p. 482-501, 2017.
- HOLDSWORTH, S. R.; GAN, P. Cytokines: names and numbers you should care about. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 12, p. 2243-2254, 2015.
- HOSHINO, J. *et al.* Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 13, p. 5033-5043, 2010.
- HUANG, B. K.; SIKES, H.D. Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. **Redox biology**, v. 2, p. 955-962, 2014.

- HUANG, Y. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 and oxidized low-density lipoprotein in young patients with acute coronary syndrome in China. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16092- 19099, 2017.
- JARDIM, F. R. *et al.* Resveratrol and brain mitochondria: A review. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 2085-2101, 2018.
- JĘŚKO, H. *et al.* Sirtuins and their roles in brain aging and neurodegenerative disorders. **Neurochemical research**, v. 42, n. 3, p. 876-890, 2017.
- KHAN, N. S. *et al.* Cytosolic Phospholipase A2 α Is Critical for Angiotensin II–Induced Hypertension and Associated Cardiovascular Pathophysiology. **Hypertension**, v. 65, n. 4, p. 784-792, 2015.
- KIM, I. H. *et al.* Aging increases the susceptibility of hepatic inflammation, liver fibrosis and aging in response to high-fat diet in mice. **Age**, v. 38, n. 4, p. 291-302, 2016.
- KIMBROUGH, C. W. *et al.* Resveratrol decreases nitric oxide production by hepatocytes during inflammation. **Surgery**, v. 158, n. 4, p. 1095-1101, 2015.
- KOTANI, K. ; SAKANE, N. Association between lipoprotein (a) and oxygen reactive metabolite in asymptomatic subjects. **Polish Archives of Internal Medicine**, v. 121, p. 247-252, 2011.
- KULKARNI, S. S.; CANTÓ, C. The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1114-1123, 2015.
- KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. **Physiological reviews**, v. 92, n. 2, p. 689-737, 2012.
- LARA, Raquel Cunha. “ESTRESSE OXIDATIVO: Avaliação *in vitro* da capacidade moduladora do Resveratrol em células da linhagem Neuro 2-A”. 2018. 95 f. Tese (Doutorado em Neurociências) - Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2018.
- LARBI, A. *et al.* Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology*, v. 23, n. 2, p. 64-74, 2008.
- LARBI, A. *et al.* The role of the MAPK pathway alterations in GM-CSF modulated human neutrophil apoptosis with aging. **Immunity & Ageing**, v. 2, n. 1, p. 6- 16, 2005.
- LASRY, A.; BEN-NERIAH, Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. **Trends in immunology**, v. 36, n. 4, p. 217-228, 2015.
- LEE, I. *et al.* Protective mechanisms of resveratrol derivatives against TNF- α -induced inflammatory responses in rat mesangial cells. **Cytokine**, v. 113, p. 380-392, 2019.
- LI, Y.; LI, S.; LIN, C. Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. **Biofactors**, v. 44, n. 1, p. 69-82, 2018.

- LIAO, C.; KENNEDY, B. K. SIRT6, oxidative stress, and aging. **Cell research**, v. 26, n. 2, p. 143- 144, 2016.
- LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v. 13, p. 757- 772, 2018.
- LOPES, F. *et al.* Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 9, p. 2651-2660, 2011.
- LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; FORTUNATO, J. S. Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications. **Acta médica portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2008.
- LOS, M. *et al.* Switching Akt: from survival signaling to deadly response. **Bioessays**, v. 31, n. 5, p. 492-495, 2009.
- LOU, X. *et al.* Effects of resveratrol on the expression and DNA methylation of cytokine genes in diabetic rat aortas. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 62, n. 4, p. 329-340, 2014.
- MACKENZIE, R. W. A.; ELLIOTT, B. T. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 7, p. 55- 64, 2014.
- MARANHÃO, R. C. *et al.* Lipoprotein (a): structure, pathophysiology and clinical implications. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 103, n. 1, p. 76-84, 2014.
- MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; NETO, T. L. B. Efeitos benéficos da atividade física na aptidão física e saúde mental durante o processo de envelhecimento. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 5, n. 2, p. 60-76, 2000.
- MATSUI, T. *et al.* Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia *in vivo*. **Circulation**, v. 104, n. 3, p. 330-335, 2001.
- MAYNARD, S. *et al.* DNA damage, DNA repair, aging, and neurodegeneration. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 10, p. a025130- 18 pgs, 2015.
- MAZIAK, W. *et al.* Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, n. 3, p. 998-1002, 1998.
- MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.
- MCMURRAY, F.; PATTEN, D. A.; HARPER, M. Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity—recent findings and empirical approaches. **Obesity**, v. 24, n. 11, p. 2301-2310, 2016.
- MEDINA, L. O. *et al.* Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diabetes research and clinical practice**, v. 77, n. 2, p. 193-197, 2007.
- MELLO, A.P. Doença de Alzheimer: estudo da produção de estresse oxidativo e citocina pró e anti-inflamatória induzidos por Hidrocortisona, Resveratrol e Noradrenalina em leucócitos.

2015. 28 f. Monografia (Graduação) - Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2015.
- MENDES, J. L. V. *et al.* O Aumento da População Idosa no Brasil e o Envelhecimento nas Últimas Décadas: Uma Revisão da Literatura. **REMAS-Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde**, v. 8, n. 1, p. 13-26, 2018.
- MENEZES, J. N. R. *et al.* A Visão do Idoso Sobre o Seu Processo de Envelhecimento. **Revista Contexto & Saúde**, v. 18, n. 35, p. 8-12, 2018.
- MINCIULLO, P. L. *et al.* Inflammaging and anti-inflammaging: the role of cytokines in extreme longevity. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 64, n. 2, p. 111-126, 2016.
- MOSMANN, T. *Journal of Immunological Methods*. v. 65, p. 56-63, 1996.
- MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P. A.; DUARTE, J. A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Revista portuguesa de ciências do desporto**, v. 4, n. 1, p. 81-110, 2004.
- NOVELLE, M. G. *et al.* Resveratrol supplementation: where are we now and where should we go?. **Ageing research reviews**, v. 21, p. 1-15, 2015.
- OH, H. J. *et al.* YJ1-7 suppresses ROS production and expression of inflammatory mediators via modulation of p38MAPK and JNK signaling in RAW 264.7 macrophages. **Biomolecules & therapeutics**, v. 26, n. 2, p. 191- 200, 2018.
- OLDENBURGER, A. *et al.* Anti-inflammatory role of the cAMP effectors Epac and PKA: implications in chronic obstructive pulmonary disease. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012.
- OLIVEIRA, L; DIAS, S. *Imunologia, imunopatologia, alergias métodos*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 236 p., 1970.
- ORSÓ, E.; SCHMITZ, G. Lipoprotein (a) and its role in inflammation, atherosclerosis and malignancies. **Clinical research in cardiology supplements**, v. 12, n. 1, p. 31-37, 2017.
- OUYANG, W. *et al.* Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.
- PALACZ-WROBEL, M. *et al.* Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 93, p. 1205-1212, 2017.
- PANGENI, R. *et al.* Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 11, n. 8, p. 1285-1298, 2014.
- PANNU, N.; BHATNAGAR, A. Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2237-2251, 2019.

- PARK, J. *et al.* Akt attenuates apoptotic death through phosphorylation of H2A under hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells and hippocampal neurons. **Scientific reports**, v. 6, p. 21857- 21868, 2016.
- PARK, S. *et al.* Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 421-433, 2012.
- PATEL, K. R. *et al.* Clinical trials of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 161-169, 2011.
- PENDYALA, G.; THOMAS, B.; KUMARI, S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 12, n. 3, p.79–83, 2008.
- PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015
- PINTI, M. *et al.* Aging of the immune system: focus on inflammation and vaccination. **European journal of immunology**, v. 46, n. 10, p. 2286-2301, 2016.
- PIRRO, M. *et al.* Lipoprotein (a) and inflammation: A dangerous duet leading to endothelial loss of integrity. **Pharmacological research**, v. 119, p. 178-187, 2017.
- RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.
- RIBA, A. *et al.* Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 1-10, 2017.
- ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 9, p. 1237–1247, 2012.
- ROSSI, W. M.; GARRIDO, G.; SELLÉS, A. J. N.. Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 2, p. 62-83, 2016.
- SARKAR, F. H. *et al.* NF- κ B signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. **International reviews of immunology**, v. 27, n. 5, p. 293-319, 2008.
- SARUBBO, F. *et al.* Effects of resveratrol and other polyphenols on SIRT1: Relevance to brain function during aging. **Current neuropharmacology**, v. 16, n. 2, p. 126-136, 2018.
- SASSONE-CORSI, P. The cyclic AMP pathway. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 12, p. 1-4, 2012.
- SCHELLER, J. *et al.* The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.
- SHI, Y.; LÜSCHER, T. F.; CAMICI, G. G. Dual role of endothelial nitric oxide synthase in oxidized LDL-induced, p66Shc-mediated oxidative stress in cultured human endothelial cells. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 1-10, 2014.

- SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. **Redox biology**, v. 11, p. 613-619, 2017.
- SILVEIRA, L. R. et al. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812-822, 2004.
- SKALHEGG, B. S.; TASKEN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, n. 5, p. 678-693, 2000.
- SMOLIGA, J. M.; VANG, O.; BAUR, J. A. Challenges of translating basic research into therapeutics: resveratrol as an example. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 67, n. 2, p. 158-167, 2011.
- SON Y. *et al.* Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. **Methods in enzymology. Academic Press**, v. 528, p. 27-48, 2013.
- SON, Y. *et al.* Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?. **Journal of signal transduction**, v. 2011, p. 1-6, 2011.
- SOYDINÇ, S. *et al.* The relationship between oxidative stress, nitric oxide, and coronary artery disease. **European Journal of General Medicine**, v. 4, n. 2, p. 62-66, 2007.
- SRINIVASAN, S. *et al.* Oxidative stress induced mitochondrial protein kinase A mediates cytochrome c oxidase dysfunction. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. 1-15, 2013.
- SWEPSON, C. *et al.* Cocaine enhances HIV-1 transcription in macrophages by inducing p38 MAPK phosphorylation. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 823- 837, 2016.
- TALARSKA, D. *et al.* Determinants of Quality of Life and the Need for Support for the Elderly with Good Physical and Mental Functioning. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 24, p. 1604–1613, 2018.
- TALMUD, P. J.; HOLMES, M. V. Deciphering the causal role of sPLA2s and Lp-PLA2 in coronary heart disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 35, n. 11, p. 2281-2289, 2015.
- TAO, L. *et al.* Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice. **International immunopharmacology**, v. 34, p. 165-172, 2016.
- TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 311-379, 2018.
- TENNEN, R. I.; MICHISHITA-KIOI, E.; CHUA, K. F. Finding a target for resveratrol. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 387-389, 2012.
- TILSTRA, J. S. *et al.* NF- κ B in aging and disease. **Aging and disease**, v. 2, n. 6, p. 449–465, 2011.

- TONET, A. C.; NÓBREGA, O. T. Immunosenescence: the association between leukocytes, cytokines and chronic diseases. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 11, n. 2, p. 259-273, 2008.
- TSAI, H.; HO, C.; CHEN, Y. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 1, p. 134-147, 2017.
- TSIMIKAS, S. Lp (a) as a new target for reduction of risk of cardiovascular disease and emergence of novel therapies to lower Lp (a). **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 23, n. 2, p. 157, 2016.
- TUNG, B.T. *et al.* Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 27, p. 775-783, 2015.
- URAK, R. *et al.* *In vivo* Akt inhibition promotes the generation of potent CD19CAR T cells for adoptive immunotherapy. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 5, n. 1, p. 26, 2017.
- URAO, N. *et al.* Critical role of endothelial hydrogen peroxide in post-ischemic neovascularization. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2013.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VASTO, S. *et al.* Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. **Mechanisms of ageing and development**, v. 128, n. 1, p. 83-91, 2007.
- VERAS, R. Fórum. Envelhecimento populacional e as informações de saúde do PNAD: demandas e desafios contemporâneos. Introdução. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 2463-2466, 2007.
- VIOLA, A. M. C. Resveratrol: do laboratório à clínica. 2016.
- VOLP, A. C. *et al.* Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537-549, 2008.
- VOLP, A. C. P. *et al.* Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 581-590, 2010.
- WANG, Y.; KURO-O, M.; SUN, Z. Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. **Aging cell**, v. 11, n. 3, p. 410-417, 2012.
- WEINERT, Brian T.; TIMIRAS, Poala S. Invited review: Theories of aging. **Journal of applied physiology**, v. 95, n. 4, p. 1706-1716, 2003.
- WU, J. H. Lipoprotein (a) in vascular disease, cancer and longevity. **Chang Gung Med J**, v. 34, n. 6, p. 555-64, 2011.

XIA, Ning; FÖRSTERMANN, Ulrich; LI, Huige. Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules*, v. 19, n. 10, p. 16102-16121, 2014.

YE, X. et al. Sirtuins in glucose and lipid metabolism. *Oncotarget*, v. 8, p. 1845-1859, 2017.

Yu B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

ZARUBIN, T.; JIAHUI, H. A. N. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell research**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2005.

ZHANG, J *et al.* Histamine inhibits adhesion molecule expression in human monocytes, induced by advanced glycation end products, during the mixed lymphocyte reaction. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 6, p. 1378-1386, 2010.

ZHANG, J. *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

ZHANG, J; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, X. *et al.* Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 11, p. 1978-1986, 2011.

ZHAO, W. *et al.* Metformin and resveratrol ameliorate muscle insulin resistance through preventing lipolysis and inflammation in hypoxic adipose tissue. **Cellular signalling**, v. 28, n. 9, p. 1401-1411, 2016.

ZONG, Y. *et al.* Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. 1-13, 2012.

ZUNINO, S. J.; STORMS, D. H. Resveratrol alters proliferative responses and apoptosis in human activated B lymphocytes *in vitro*. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 8, p. 1603-1608, 2009.

ANEXO

Anexo 1 – Características Demográficas da população do estudo.

População	Homens		Mulheres
Parâmetros	(média ± D.P.)		(média ± D.P.)
Faixas Etárias (anos)			
40-59	52,1 ± 4	ns	50,2 ± 5
60-80	76,3 ± 7	ns	66,9 ± 6
TOTAL	64,2 ± 6	ns	58,5 ± 5
Índice de massa corporal (kg/m²)			
40-59	18,8 ± 2	ns	17,5 ± 3
60-80	23,4 ± 3	ns	24,5 ± 4
TOTAL	21,1 ± 2	ns	21,0 ± 2
Glicose Sanguínea (mg/dl)			
40-59	83,4 ± 8,6	ns	85,5 ± 9,1
60-80	102,6 ± 11,3	ns	105,6 ± 10,6
TOTAL	93,0 ± 7,5	ns	95,5 ± 9,4
Triglicérides (mg/dL)			
40-59	130,0 ± 57	ns	127,7 ± 43
60-80	164,3 ± 20	ns	153,5 ± 23
TOTAL	132,2 ± 38	ns	127,7 ± 32
Creatina sérica (mg/dL)			
40-59	0,63 ± 0,02	ns	0,68 ± 0,12
60-80	0,74 ± 0,17	ns	0,79 ± 0,17
TOTAL	0,68 ± 0,18	ns	0,73 ± 0,21
Complicações vasculares			
40-59	Não		Não
60-80	Não		Não

ns= não significativo pelo teste de Mann-Whitney.

Faixa de índice de massa corporal = 18,5 – 24,99kg/m² (World Health Organization, 2000)

Glicose sanguínea : Valor normal inferior a 99mg/dL (American Diabetes Association, 2011)

Triglycerides: Faixa Normal < 150mg/dL (American Heart Association, 2017)

Creatina sérica: Faixa normal: 0,5-1,5 mg/dL para homens and 0,6 – 1,2 mg/dL para Mulheres (NCCLS, 2000)

Anexo 2: Características estabelecidas no desenho piloto para a dosagem dos níveis plasmáticos de Lp(a) e PLA₂ após tratamento com RSV.

• Considerações iniciais para o uso do Resveratrol	O RSV foi utilizado baseado em estudos de toxicidade e segurança realizados por PATEL <i>et al.</i> , e NOVELLE <i>et al</i> bem como estudos de biodisponibilidade realizados por CHACHAY, V. <i>et al.</i> e SMOLIGA, J. <i>et al.</i> . De modo que a estratégia para o aumento de tal parâmetro farmacológico baseou-se em relatos de AHMED, T. <i>et al.</i> e BHULLAR, K; HUBBARD, B. 2015.
• Divisão das faixas etárias em dois grupos paralelos	- Faixa etária de 40 – 59 anos - Faixa etária de 60 – 80 anos
• População do Estudo	- 20 indivíduos para cada faixa etária
• Ingestão diária do Resveratrol	- Via oral: Cápsula de 30 mg. Dose utilizada baseando-se em estudos feitos por VIOLA. A, 2016.
• Esquema Posológico	- Tomar 1 cápsula , uma vez/dia pela manhã antes do café
• Duração do tratamento	- 6 meses, com 3 medições dos níveis plasmáticos da lipoproteína A Lp(a) e Fosfolipase A₂ : Início do tratamento, 3 meses de tratamento e 6 meses de tratamento
• Crítérios de inclusão do estudo	Idade dentro da faixa previamente descrita, análises aos parâmetros bioquímicos metabólicos e sanguíneos e eletrocardiograma 6 meses antes do começo do ensaio, doses estáveis de todas as medicações 1 mês antes do ensaio e durante a duração do estudo.

• Critérios de exclusão do estudo	- Qualquer doença ou medicação concomitante que, na opinião do investigador, impeça a participação do doente neste estudo: • Gravidez ou aleitamento, fumar no momento da seleção ou nos últimos 12 meses, demência ou outra doença psiquiátrica ou outra doença que impeça o consentimento informado, incapacidade legal ou capacidade legal limitada, ingestão de alimentos contendo RSV 30 dias antes.
• Endpoints	- Esquema temporal: • medição 0, 03 e 06 meses.
• Primários	- Medição de mudanças nos valores plasmáticos da Lp(a) e PLA2, comparando com os valores de referência e da medição inicial (Mês 0) para verificar a influência do resveratrol.