

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Luciana de Cássia Cardoso

**DOENÇA DE ALZHEIMER: MODIFICAÇÃO NA FUNCIONALIDADE E NA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO RESVERATROL PELA ALTERAÇÃO NAS
VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR SIRT1 E AMPK**

Belo Horizonte
2022

Lucana de Cássia Cardoso

Doença de Alzheimer: modificação na funcionalidade e na capacidade antioxidante do resveratrol pela alteração nas vias de sinalização celular SIRT1 e AMPk

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Orientadora: Prof. Dra. Miriam Chaves Schultz

Co-orientadora: Dra. Glaucy Rodrigues de Araújo

Belo Horizonte
2022

043 Cardoso, Luciana de Cássia.
Doença de Alzheimer: modificação na funcionalidade e na capacidade antioxidante do resveratrol pela alteração nas vias de sinalização celular SIRT1 e AMPk [manuscrito] / Luciana de Cássia Cardoso. – 2021.
147 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Miriam Chaves Schultz. Co-orientadora: Dra. Glaucy Rodrigues de Araújo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Doença de Alzheimer. 3. Envelhecimento. 4. Estresse Oxidativo. I. Schultz, Miriam Chaves. II. Araújo, Glaucy Rodrigues de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENEUROCIÊNCIAS

ATA DE DEFESA DE TESE DA ALUNA

LUCIANA DE CÁSSIA CARDOSO

Realizou-se, no dia 02 de dezembro de 2021, às 14:00 horas, Defesa Online, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 89ª defesa de tese, intitulada *Doença de Alzheimer: modificação na funcionalidade e na capacidade antioxidante do resveratrol pela alteração nas vias de sinalização celular SIRT1 e AMPK*, apresentada por LUCIANA DE CÁSSIA CARDOSO, número de registro 2016707016, graduada no curso de FISIOTERAPIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Miriam Chaves Schultz - Orientadora (UFMG), Prof(a). Glaucy Rodrigues de Araujo (UFMG), Prof(a). Paola Caroline Lacerda Leocadio (UFMG), Prof(a). Aline Silva de Miranda (UFMG), Prof(a). Thais Santos Contenças (Universidade Federal Juiz de Fora), Prof(a). Gabriela Silveira Nunes Abreu (Universidade Federal Juiz de Fora - GV).

A Comissão considerou a tese: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 02 de dezembro de 2021.

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Prof(a). Miriam Chaves Schultz (Doutora)

Prof(a). Glaucy Rodrigues de Araujo (Doutora)

Prof(a). Paola Caroline Lacerda Leocadio (Doutora)

Prof(a). Aline Silva de Miranda (Doutora)

Prof(a). Thais Santos Contenças (Doutora)

Prof(a). Gabriela Silveira Nunes Abreu (Doutora)



Documento assinado eletronicamente por **Thais Santos Contenças, Usuário Externo**, em 02/12/2021, às 19:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Silveira Nunes Abreu, Usuário Externo**, em



03/12/2021, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 03/12/2021, às 19:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paola Caroline Lacerda Leocádio, Usuária Externa**, em 03/12/2021, às 22:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Chaves Schultz, Chefe**, em 06/12/2021, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glaucy Rodrigues de Araújo, Usuário Externo**, em 16/12/2021, às 18:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1113079** e o código CRC **843B1D6E**.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”
(Marthin Luther King)

DEDICATÓRIA

À minha mãe Lúcia, ao meu amado filho Lucas, razão do meu viver, ao Roberto, meu pai (*in memoriam*), que por mais de duas décadas sofreu na pele as conseqüências de uma doença neurodegenerativa e que bravamente lutou e procurou não desistir e que a tão pouco tempo nos deixou, saudades...

Dedico ainda, aos idosos participantes deste estudo, que de forma tão altruísta cederam seu tempo de forma tão carinhosa!

A vocês, a minha eterna gratidão!

E, pai... honro a sua herança: a EDUCAÇÃO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas novas chances e recomeços.

À Professora Miriam, a minha gratidão pela paciência, compreensão e apoio nos momentos mais delicados, o meu muito obrigada!

À querida Glaucy, pela dedicação e suporte sempre presentes nesta trajetória, você foi essencial!

Em especial, a minha gratidão a um amigo que ganhei nesta jornada, Filipe, por tantas horas de trabalho, parceria e amizade, você sabe que mora no meu coração e que poderá sempre contar comigo.

Aos meus colegas de laboratório “Bioquímica e Imunologia do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas” o meu carinho e minha amizade: Gláucia, Camila, Milena, Alessandra, Alexandre, Bárbara, Raquel e Professora Eliane, obrigada pelo apoio de sempre!

À querida enfermeira Ítala pela disponibilidade e carinho sempre demonstrados...

Aos proprietários e profissionais do Lar de Longa Permanência “Plenitude”, agradeço a confiança e empenho, sempre demonstrados!

Aos meus amigos e familiares que sempre estiveram me apoiando nos momentos mais difíceis!

Em especial à querida Alessanda que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais desafiadores, à Josiane, irmã de alma que tanto me apoiou; a você Gerusa amiga recente, mas tão presente, a minha gratidão!

À minha querida amiga Schirley, agradeço pelos momentos de leveza e paz que acolheram minha alma!

O meu agradecimento sincero e amoroso aos meus irmãos, Roberta e Mateus, companheiros de jornada e o meu amor em forma de gratidão aos meus sobrinhos amados Yuri, Sarah e Bruninha, me perdoe pelo meu afastamento, estou voltando...

Aos funcionários do ICB; aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, o meu muito obrigada.

Grata à UFJFGV e a UFMG por terem me proporcionado a realização desta pesquisa!

Agradeço a todos os médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, nutricionistas, terapeutas e psicólogos, que não me deixaram desistir e cuidaram e ainda cuidam de mim em momentos dolorosos durante esta jornada, em especial aos profissionais da Oncoleste, da Oncocentro, da Oncomed e da clínica NEO.

Agradeço ainda ao pai do meu filho, Renato, por cuidar do nosso anjo em momentos que precisei me ausentar...

Aos amigos inseparáveis: Beto, Mel e Nina, anjos em forma de pets, que me apoiaram em todos os momentos!

Aos meus colegas de Departamento da Faculdade de Fisioterapia da UFJF e UFJFGV meu muito obrigada, em especial a Érica e Camila que tanto me apoiaram!

Às amigas Larissa e Lélia minha gratidão pelo apoio!

À Fernanda, o meu coração, que ainda é pouco para agradecer a força e amizade que me amparou nesta trajetória!

Aos alunos e ex alunos agradeço por me incentivarem a continuar na busca incessante do conhecimento, também é por vocês, que aqui estou!

E, não poderia deixar de agradecer a todos os idosos e seus familiares que gentilmente cederam seu valioso tempo em prol da pesquisa, principalmente aos acometidos pela Doença de Alzheimer!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas da Universidade Federal de Minas Gerais com o auxílio financeiro da FAPEMIG, PRPq/UFMG, CAPES, CNPq, UFMG.

RESUMO

A Doença de Alzheimer, considerada a demência mais prevalente no envelhecimento, apresenta declínio cognitivo e funcional, justificado pela neuroinflamação, como resultado do acúmulo de placas senis, beta amilóide e emaranhado da proteína tau, exacerbado pelo acúmulo de Radicais Livres (RL), através das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e de Nitrogênio (RNS). O aumento dessas espécies e/ou desequilíbrio das defesas antioxidantes, como as enzimas Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), podem ocasionar o Estresse Oxidativo (EO). Diversos estudos apontam que este sistema antioxidante pode falhar, principalmente na presença de doenças crônico-degenerativas. Observa-se ainda neste quadro, a Inflamação Crônica Subclínica (ICS), observada através do aumento das citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL6 e TNF (presentes neste estudo) e pela diminuição de citocinas anti-inflamatórias, como a IL10. Neste contexto, o resveratrol, um composto polifenólico, que se apresenta como um potente antioxidante e anti-inflamatório, tem sido objeto de estudo na clínica médica, porém, se faz necessário conhecer suas vias de ativação, na presença da Doença de Alzheimer. Assim, o objetivo foi verificar se o perfil antioxidante do resveratrol permanece o mesmo em leucócitos de doadores com Alzheimer (idosos acima de 60 anos), por meio da análise de CAT e GPx e das vias SIRT1 e AMPk. Além, de verificar o grau de acometimento da capacidade funcional comparado aos dados basais relacionados ao EO e ICS, através do Índice de Katz (funcionalidade). Nossos resultados mostram que houve redução de ROS nas células estimuladas com o resveratrol também na presença de Alzheimer. Pode-se observar que o resveratrol apesar de atuar no grupo com Alzheimer, teve seu poder antioxidante reduzido, no combate a ROS e ao RNS, comparado ao grupo sem a doença. O polifenol foi capaz de aumentar a atividade da GPx nas células expostas a este composto, em ambos os grupos. Analisando as vias bioquímicas, observou-se um comportamento antioxidante ativo da AMPk em leucócitos dos idosos com Alzheimer, porém, foi observado o silenciamento da via SIRT1 neste mesmo grupo. Os valores basais de Óxido Nítrico (NO) se mostraram mais elevados e do Peroxinitrito (ONOO^-) diminuídos no grupo com a doença. O grupo com Alzheimer se mostrou mais dependente quanto ao índice de Katz. Observamos assim, que o EO e a ICS predisõem a um aumento da perda da autonomia e independência em idosos com a presença da DA.

Palavras-chave: Envelhecimento, Alzheimer, Estresse Oxidativo, Neuroinflamação, Sinalização Celular, Capacidade Funcional.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD), considered the most prevalent dementia in aging, presents cognitive and functional decline, justified by neuroinflammation, as a result of the accumulation of senile plaques, beta amyloid and tau protein tangles, exacerbated by the accumulation of Free Radicals (RL), through Reactive Oxygen (ROS) and Nitrogen (RNS) Species. The increase of these species and/or imbalance of antioxidant defenses, such as the enzymes Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx), may cause Oxidative Stress (EO). Several studies indicate that this antioxidant system can fail, especially in the presence of chronic degenerative diseases. It is also observed in this condition, the Subclinical Chronic Inflammation (ICS), observed through the increase of pro-inflammatory cytokines, such as: IL6 and TNF (present in this study) and by the decrease of anti-inflammatory cytokines, such as IL10. In this context, resveratrol, a polyphenolic compound, known as a potent antioxidant and anti-inflammatory, has been the object of study in clinical medicine currently, however, it is necessary to know its activation pathways in Alzheimer's Disease. Thus, the aim of this study was to verify whether the antioxidant profile of resveratrol remains the same in leukocytes from donors with Alzheimer's (aged over 60 years), through the analysis of CAT and GPx and the SIRT1 and AMPk pathways. In addition to verifying the degree of functional capacity compared to baseline data related to EO and ICS, through the Katz Index (functional capacity). Our results show that there was a ROS reduction in cells stimulated with resveratrol also in the presence of Alzheimer's. It can be observed that resveratrol, despite acting in the group with Alzheimer's, had its antioxidant power reduced, particularly ROS and RNS, compared to the group without the disease. Polyphenol was able to increase GPx activity in cells exposed to this compound, in both groups. Analyzing the biochemical pathways, an active antioxidant behavior of AMPk was observed in leukocytes of elderly patients with Alzheimer's, however, silencing of the SIRT1 pathway was observed in this same group. Baseline values for Nitric Oxide (NO) were higher and Peroxynitrite (ONOO-) decreased in the group with the disease. The Alzheimer's group was more dependent on the Katz index. So, EO and ICS predispose to an increase in the loss of autonomy and independence.

Keywords: Aging, Alzheimer, Oxidative Stress, Neuroinflammation, Cell Signaling, Functional Capacity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população mundial em 2000 e uma projeção para 2060. | 26 |
| Figura 2: Comparação entre um Radical livre e uma molécula estável. | 22 |
| Figura 3: Exemplos de ROS. | 33 |
| Figura 4: Exemplos de RNS. | 34 |
| Figura 5: Principais fontes de ROS e RNS no organismo humano. | 34 |
| Figura 6: Fatores externos responsáveis pela formação de RL. | 35 |
| Figura 7: Representação da formação do EO. | 36 |
| Figura 8: Principais enzimas antioxidantes e seus substratos. | 36 |
| Figura 9: Causas relacionadas com o inflammaging. | 40 |
| Figura 10: Citocinas relacionadas com o inflammaging no envelhecimento. | 43 |
| Figura 11: Estrutura química da molécula de RSV. | 44 |
| Figura 12: Atuação do antioxidante nas vias SIRT 1 e AMPk. | 47 |
| Figura 13. Padronização da concentração de H ₂ O ₂ . | 65 |
| Figura 14. Curva Dose-Concentração de Resveratrol em Leucócitos Humanos. | 66 |
| Figura 15. Viabilidade dos leucócitos isolados de doadores sem e com Alzheimer através do ensaio de MTT. | 67 |
| Figura 16: Avaliação do efeito do RSV na produção de ROS em leucócitos humanos induzidos por H ₂ O ₂ . | 70 |
| Figura 17: Avaliação comparativa do RSV sobre a via SIRT1 na produção de ROS em leucócitos sem e com DA. | 73 |
| Figura 18: Avaliação comparativa do RSV sob a via AMPk na produção de ROS em leucócitos sem e com a DA induzida por H ₂ O ₂ . | 76 |
| Figura 19: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em Leucócitos. | 78 |
| Figura 20: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em leucócitos de acordo com as vias AMPk e SIRT1 | 80 |
| Figura 21: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO ⁻ em leucócitos humanos. | 84 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 22: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO- em leucócitos, de acordo com as vias AMPk e SIRT 1. | 86 |
| Figura 23: Avaliação comparativa da atividade de CAT e do efeito do RSV em leucócitos humanos. | 90 |
| Figura 23: Avaliação comparativa da atividade de GPx e do efeito do RSV em leucócitos humanos. | 92 |
| Figura 25: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL-6 em leucócitos de idosos com ausência ou presença de DA. | 94 |
| Figura 26: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de TNF citocinas em leucócitos de idosos com ausência ou presença de DA. | 96 |
| Figura 27: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL10 em leucócitos de idosos com ausência ou presença de DA. | 98 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Características demográficas da população do estudo. | 55 |
| Tabela 2: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de MTT em Leucócitos humanos | 57 |
| Tabela 3: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em Leucócitos dos idosos | 57 |
| Tabela 4: Disposição dos grupos controles sem células no Ensaio de Quimioluminescência em Leucócitos Humanos | 58 |
| Tabela 5: Disposição dos grupos e seus tratamentos na análise de produção de NO e ONOO- em Leucócitos | 59 |
| Tabela 6: Disposição dos grupos e seus tratamentos na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes em Leucócitos Humanos | 60 |
| Tabela 7: Disposição dos grupos controles com inibidor sem células e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência | 62 |
| Tabela 8: Disposição dos grupos com inibidor e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em Leucócitos Humanos | 62 |
| Tabela 9: Disposição dos grupos e seus tratamentos na avaliação das citocinas em leucócitos humanos | 63 |
| Tabela 10: Viabilidade dos leucócitos isolados de doadores sem e com a Doença de Alzheimer através do ensaio de MTT. | 68 |
| Tabela 11: Efeito Comparativo de RLU/min na presença e ausência de células do Ensaio de Quimioluminescência. | 69 |
| Tabela 12: Efeito Comparativo do RSV em leucócitos de doadores sem e com a Doença de Alzheimer do Ensaio de Quimioluminescência | 71 |
| Tabela 13: Comparação sem e com células no ensaio de quimioluminescência com inibidores em leucócitos de doadores sem e com a Doença de Alzheimer. | 72 |
| Tabela 14: Efeito Comparativo do RSV pelo Ensaio de Quimioluminescência com inibidor da via SIRT1 em leucócitos sem e com a Doença de Alzheimer. | 74 |
| Tabela 15: Efeito Antioxidante do RSV pelo Ensaio de Quimioluminescência com inibidor da via AMPk. | 77 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 16: Análise comparativa de NO entre os idosos sem e com a Doença de Alzheimer e o efeito do RSV | 79 |
| Tabela 17: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO com inibidor da via AMPk em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer. | 81 |
| Tabela 18: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO com inibidor da via SIRT1 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer. | 83 |
| Tabela 19: Análise comparativa de ONOO ⁻ entre os idosos se, e com a Doença de Alzheimer e o efeito do RSV. | 85 |
| Tabela 20: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO ⁻ com inibidor da via AMPk em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer. | 87 |
| Tabela 21: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO ⁻ com inibidor da via SIRT1 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer. | 89 |
| Tabela 22: Avaliação comparativa da dosagem de Catalase em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer estimulados com Resveratrol. | 91 |
| Tabela 23: Avaliação comparativa da dosagem de Glutaciona Peroxidase em leucócitos de idosos sem e com Alzheimer estimulados com Resveratrol | 93 |
| Tabela 24: Avaliação comparativa da dosagem de IL-6 em leucócitos de doadores sem e com Alzheimer estimulados com Resveratrol. | 95 |
| Tabela 25: Avaliação comparativa da dosagem de TNF em leucócitos de doadores com e sem Alzheimer estimulados com Resveratrol. | 97 |
| Tabela 26: Avaliação comparativa da dosagem de IL-10 em leucócitos de doadores com e sem Alzheimer estimulados com Resveratrol. | 99 |
| Tabela 27: Resumo dos principais efeitos do RSV nos leucócitos de doadores sem e com Alzheimer | 100 |
| Tabela 28: Análise da Funcionalidade pelo Índice de Katz nos grupos de Idosos sem e com Alzheimer | 101 |
| Tabela 29: Análise Comparativa da Capacidade Funcional e dos Parâmetros da Neuroinflamação em idosos sem e com Alzheimer | 102 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------|-----------------------------------------------------------|
| ADP | Adenosina difosfato |
| ABVD | Atividade Básica de Vida Diária |
| AIVD | Atividade Instrumental de Vida Diária |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| AMPk | Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato |
| APP | Proteína beta amiloide |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AVD | Atividade de Vida Diária |
| β A | Peptídeo beta amiloide |
| Ca^{2+} | Cálcio |
| CAMKK2 | Quinase ativada por Ca^{2+} (Cálcio)/calmodulina |
| cAMP | Adenosina-monofosfato-cíclico |
| CAT | Catalase |
| COEP | Comitê de Ética e Pesquisa |
| COX-2 | Ciclooxigenase-2 |
| Cu | Cobre |
| DA | Doença de Alzheimer |
| DCG | Declínio da Capacidade Cognitiva |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| EO | Estresse oxidativo |
| FOXO | Fatores de transcrição Forkhead box |
| GSH | Glutationa |
| GPx | Glutationa peroxidase |
| GSR | Glutationa redutase |
| GSS G | Glutationa Oxidada |
| GST | Glutationa S-transferase |
| hT | Hiperfosforilação da proteína tau |
| H_2O | Água |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrogênio |
| $\text{HO}_2\cdot$ | Radical hidroperoxil |

| | |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| ICS | Inflamação Crônica Subclínica |
| IL6 | Interleucina (citocina) 6 |
| IL10 | Interleucina (citocina) 10 |
| iNOS | sintase induzida |
| LKB1 | Quinase supressor de tumor |
| Luminol | 5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| MIP-1 α | Quimiocina |
| MFF | Fator de fisão mitocondrial |
| Mn | Manganês |
| MTT | 3-(4,5 dimethylazol-2yi)-2,5 diphenyltetrazolium bromide |
| NAD ⁺ | Dinucleotídeo de adenina nicotinamida (oxidado) |
| NADH | Dinucleotídeo de adenina nicotinamida (reduzido) |
| NADPH | Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida |
| Nfe2 | Fator nuclear eritróide 2 |
| NF- κ B | Fator nuclear Kb |
| NO | Óxido nítrico |
| NO ₂ [•] | Dióxido de nitrogênio |
| Nrf2 | Fator nuclear derivado de eritróide 2 |
| O ₂ | Oxigênio |
| O ₂ ^{•-} | Ânion superóxido |
| OH [•] | Radical hidroxil |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |
| p300 | Histona acetiltransferase |
| P53 | Fosfoproteína nuclear de 53 quilo Daltons |
| PBMCs | Células mononucleares humanas de sangue periférico |
| PBS | Solução tampão fosfato salina sem células e magnésio |
| PFA | Paraformaldeído |
| PGC-1a | Coativador de receptor g ativado por proliferador de peroxissomo |
| PKA | Proteína quinase A |
| Raptor | Proteína regulatória associada a mTOR |
| RL | Radicais Livres |
| RLU | Unidade relativa de luz |

| | |
|------------------|--------------------------------------------------|
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensageiro |
| RNS | Espécie Reativa de Nitrogênio |
| ROS | Espécie Reativa de Oxigênio |
| rpm | Rotações por minuto |
| RSV | Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) |
| SI | Sistema Imunológico |
| SIRT | Proteínas sirtuinas |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| TALE | Termo de Assentimento Livre e Esclarecido |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| Thr | Tirosina |
| TNF/TNF α | Fator de necrose tumoral |
| ULK1 | Quinase essencial para a indução da autofagia |
| VEGF | Fator de crescimento celular endotelial vascular |
| Zn | Zinco |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 23 |
| 2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO | 26 |
| 2.1 Envelhecimento, a Doença de Alzheimer e Incapacidade Funcional | |
| 2.2. Estresse oxidativo e o processo inflamatório na DA | 30 |
| 2.3. O resveratrol e as vias antioxidantes na Doença de Alzheimer | 44 |
| 3. OBJETIVOS | 49 |
| 3.1 Objetivo geral | 49 |
| 3.2 Objetivos específicos | 49 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 51 |
| 4.1 Material | 51 |
| 4.2 Equipamentos | 51 |
| 4.3 Kits comerciais | 51 |
| 4.4 Preparo de soluções | 52 |
| 4.5 Seleção de Doadores | 54 |
| 4.6 Obtenção de Leucócitos de humanos | 55 |
| 4.7 Ensaio para Definição da concentração H ₂ O ₂ utilizada no estudo | 55 |
| 4.8 Ensaio para Definição da concentração de RSV utilizada no estudo | 56 |
| 4.9 Ensaio de MTT | 56 |
| 4.10 Ensaio de Quimioluminescência | 56 |
| 4.11 Ensaio para análise da concentração de Óxido Nítrico (NO) e Peroxinitrito (ONOO ⁻) | 58 |
| 4.12 Avaliação das enzimas antioxidantes | 59 |
| 4.12.1. <i>Catalase</i> | 60 |
| 4.12.2 <i>Glutathione Peroxidase</i> | 60 |
| 4.13 Quimioluminescência com inibidores da via de SIRT1 (Sirtinol) e de AMPk (Compound C) | 61 |
| 4.14 Quantificação da produção de citocinas TNF, IL-6 e IL-10 | 62 |
| 4.15 Avaliação da Funcionalidade através do Índice de Katz | 63 |
| 4.16 Análise estatística | 63 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. RESULTADOS | 65 |
| 5.1. Padronização da concentração de H ₂ O ₂ utilizada em Leucócitos Humanos | 65 |
| 5.2. Padronização da concentração de RSV utilizada em Leucócitos Humanos através de Curva Dose – Concentração | 66 |
| 5.3. Viabilidade dos Leucócitos aos tratamentos | 67 |
| 5.4. Efeito do RSV em idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 68 |
| 5.5. Efeito do RSV na modulação das vias SIRT1 e AMPk nos idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 71 |
| 5.5.1 <i>Efeito do RSV sobre a via de sinalização de SIRT 1</i> | 72 |
| 5.5.2 <i>Efeito do RSV sobre a via de sinalização de AMPk</i> | 75 |
| 5.6. Efeito do RSV na concentração de NO em leucócitos de idosos sem ou com a presença da Doença de Alzheimer | 78 |
| 5.6.1 <i>Efeito do RSV nos níveis de NO sobre as vias SIRT1 e AMPk em leucócitos de idosos sem e com a presença da Doença de Alzheimer</i> | 79 |
| 5.7 Efeito do RSV na produção de ONOO ⁻ nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 83 |
| 5.7.1 <i>Efeito do RSV nos níveis de ONOO⁻ com os inibidores das vias SIRT1 e AMPk, nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer</i> | 85 |
| 5.8 Efeito do RSV na atividade da Enzima Catalase (CAT) nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 89 |
| 5.9 Efeito do RSV na atividade da Enzima Glutaciona Peroxidase (GPx) nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 91 |
| 5.10 Análise do perfil inflamatório do RSV em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 93 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.10.1 Efeito do RSV nos níveis de IL-6 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 93 |
| 5.10.2 Efeito do RSV nos níveis de TNF em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 95 |
| 5.10.3 Análise comparativa do efeito do RSV nos níveis de IL-10 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 97 |
| 5.11 Análise do perfil funcional de idosos sem e com a Doença de Alzheimer | 100 |
| 5.12 Comparação da Funcionalidade e dos Biomarcadores entre os idosos sem e com Alzheimer. | 101 |
| 6. DISCUSSÃO | 103 |
| 7. CONCLUSÃO | 124 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 125 |
| 9. ANEXOS | 140 |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O fenômeno do envelhecimento tem sido alvo de investigação por parte de diversos pesquisadores, tal processo tem sido percebido de forma exponencial, já que se percebe um aumento gradativo da expectativa de vida em âmbito mundial. Portanto, são observadas mudanças relacionadas à demografia populacional, cuja proporção de indivíduos mais velhos está aumentando rapidamente, devido à diminuição das taxas de nascimento e o declínio da mortalidade (MARTIN; SHEAFF, 2007). Tal mortalidade tem sido retardada consideravelmente como resultado não só de avanços revolucionários em atrasar o processo de envelhecimento, mas também, devido ao progresso contínuo de melhoria da saúde (VAUPEL, 2010). No Brasil, este fenômeno acompanha as mesmas tendências, já que tais projeções indicam que a população idosa irá ultrapassar um número de 53 milhões de habitantes em 2060 (MENDES *et al.*, 2018).

As diversas teorias geradas através de dados epidemiológicos, demográficos e biológicos, tentam explicar o processo de envelhecimento e suas consequências como um mecanismo complexo e multifatorial, sendo que para tanto, estas diferentes teorias não apresentam exclusividade, podendo descrever tal processo de forma isolada ou de forma combinada com outras (TOSATO *et al.*, 2007).

Como uma das causas do envelhecimento, a teoria de radicais livres pode prever que estes estão diretamente relacionados às modificações genéticas, comportamentais e postula que as reações com radicais livres são envolvidas nas desordens relacionadas à idade, como é o estresse metabólico celular.

Ainda fazendo parte do quadro de envelhecimento, podemos encontrar o declínio da capacidade cognitiva (DCG), que decorre dos processos fisiológicos do envelhecimento normal ou de um estágio de transição para demências (FICHMAN *et al.*, 2005). Sendo a demência, uma síndrome clínica que está relacionada às perdas neuronais e danos à estrutura cerebral, levando o indivíduo a apresentar alterações cognitivas e funcionais que se manifestam nas atividades de vida diária (AVDs), já que representa uma das principais doenças neurodegenerativas relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC). A Doença de Alzheimer (DA) se apresenta como a forma mais prevalente de demência e segundo os dados epidemiológicos internacionais, até

2050, este número tende a dobrar na Europa e a triplicar em todo o mundo (SCHELTENS *et al.*, 2021).

Além dos aspectos comportamentais típicos da instalação da DA, estudos realizados especialmente na última década evidenciaram a ocorrência de um complexo processo inflamatório no tecido neuronal. Assim, torna-se relevante estudar a neuroinflamação no contexto da instalação, progressão e severidade da doença, pois são observados mecanismos de ativação do sistema imune e de células-chave, que ao disparo da cascata inflamatória no SNC, são observadas ativação da micróglia e dos astrócitos (GOMES *et al.*, 2013).

Com o intuito de buscar um equilíbrio metabólico celular, diversos autores pesquisam a atuação dos antioxidantes, que atuam em substâncias presentes em pequenas quantidades comparadas com outros substratos oxidativos, que retardam ou inibem de forma significativa a oxidação destes. Elas defendem o organismo dos radicais livres e mantêm a homeostase. A maior fonte de antioxidantes é proveniente da alimentação, incluindo a família dos polifenóis (CHAVES *et al.*, 2000).

Dentre os polifenóis destaca-se o resveratrol (RSV), que tem sido amplamente estudado, por agir na biogênese mitocondrial e por demonstrar um alto poder anti-inflamatório, anti-diabético e anti-cancerígeno; além de ativar as vias de sinalização de AMPk e as sirtuínas, como a SIRT1 (SOUZA, 2020). Fazendo parte deste balanço, destacam-se as sirtuínas, que são desacetilases NAD-dependentes e estão envolvidas com o estado metabólico da célula, sendo que a SIRT1 faz a mediação de diferentes respostas ao estresse, em particular a inflamação que é uma das maiores causas do envelhecimento e doenças relacionadas ao mesmo. (ALBERTONI *et al.*, 2015).

Desse modo, sabendo que pode existir uma inter-relação entre os mesmos, baseados nos antecedentes científicos acima referidos, a partir deste estudo procuramos preencher uma lacuna que ainda existe sobre o conhecimento fisiopatológico do indivíduo idoso com esta demência e estreitar os conhecimentos em relação ao estresse oxidativo, o processo inflamatório e o possível declínio da capacidade funcional em suas AVDS, além, de analisar a resposta de ambos sob a atuação do resveratrol *in vitro*. Assim, nosso estudo pode cooperar para a geração de novas terapias associadas à manutenção ou melhora da autonomia, num contexto

interdisciplinar, incluindo a fisioterapia e deste modo, proporcionar melhor qualidade de vida.

Por isso, a avaliação da capacidade funcional e da aptidão física nos idosos são fundamentais para orientar as intervenções específicas, além de auxiliar no combate das dependências preveníveis e auxiliar na promoção de uma vida mais ativa possível. A detecção do grau de dependência do idoso nos diferentes componentes, no âmbito de sua aptidão física, possibilita selecionar intervenções adequadas, aplicadas tanto individualmente quanto em grupo, com vistas à melhora da capacidade funcional, principalmente no desempenho das atividades de vida diária.

Tais avaliações e intervenções, sistematizadas em instituições de longa permanência para idosos não representam, ainda, um procedimento usual, como também são poucos os estudos que avaliam as condições físicas e funcionais dos idosos institucionalizados. Com relação à aptidão física, as pesquisas ainda são escassas.

Portanto, avaliar a capacidade funcional e a aptidão física dos idosos institucionalizados e verificar sua possível comparação com as alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo são requisitos essenciais para implantar um adequado programa de exercícios e atividades físicas, com ênfase nos diferentes componentes da aptidão dos residentes em instituições de longa permanência para idosos.

Assim, dada a importância do envelhecimento nos tempos atuais, como este processo influencia a capacidade funcional dos indivíduos e as consequências biológicas do mesmo, o nosso estudo tem como objetivo a avaliação *in vitro* de leucócitos de idosos, residentes em lar de longa permanência, na faixa etária entre 60 e 100 anos, que apresentavam a Doença de Alzheimer, na tentativa de verificar os efeitos moduladores do resveratrol sobre células imunológicas, procurando esclarecer por quais mecanismos de atuação este composto polifenólico poderia reduzir os danos celulares e teciduais causados pelos radicais livres.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1. Envelhecimento, a Doença de Alzheimer e a Incapacidade Funcional

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o envelhecimento tem início entre 60 e 65 anos, porém, o envelhecimento depende de três fatores: biológicos, psicológicos e sociais (PEREIRA *et al.*, 2005, apud Lara). Esses fatores acarretam mudanças de forma progressiva nas demandas médicas e nos cuidados em saúde que podem gerar alterações contínuas, acompanhando o desenvolvimento social e econômico, a melhoria da renda e o progresso tecnológico médico. Assim, o impacto do envelhecimento populacional, nas despesas médicas, tem-se tornado um grande desafio para o sistema de saúde (WANG *et al.*, 2017).

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea, fenômeno que ocorreu inicialmente em países desenvolvidos, de forma mais acentuada. No Brasil, o número de idosos (≥ 60 anos de idade) passou de 3 milhões em 1960, para 7 milhões em 1975 e 14 milhões em 2002 (um aumento de 500% em quarenta anos) e atualmente está perto de 32 milhões, podendo chegar a 53 milhões em 2060 (SOUZA, 2017). A **Figura 1** ilustra a situação etária mundial em 2000 e as projeções para 2060 por sexo.

A população geriátrica é o grupo etário que mais cresce no Brasil e no mundo. Este fenômeno traz uma preocupação, pois gera problemas a diversos setores públicos e sem dúvida, implicará a necessidade de adequações nas políticas sociais, particularmente aquelas voltadas a atender crescentes demandas nas áreas de saúde, previdência e assistência social.

Fonte: IBGE
Data: 2017

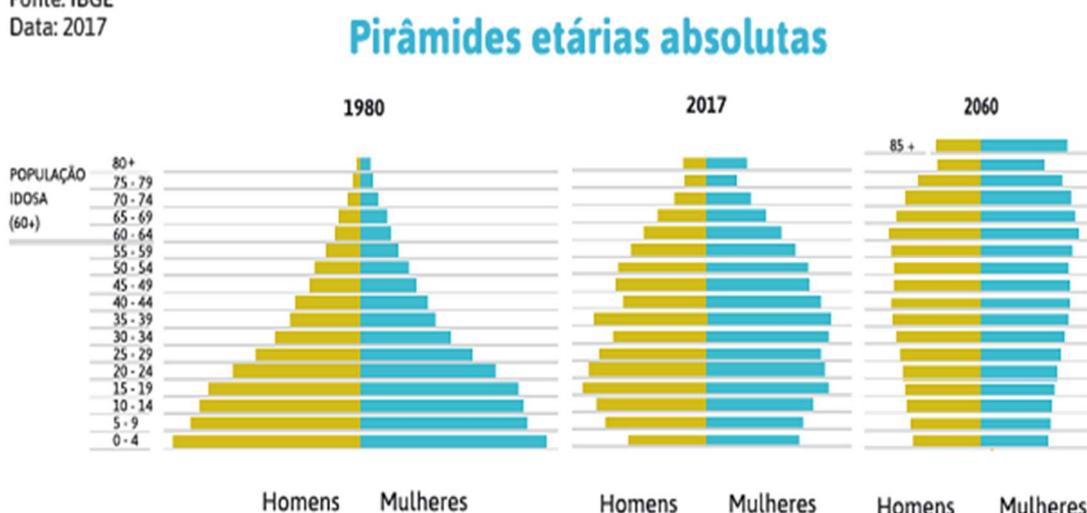


Figura 1: Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população mundial em 2000 e uma projeção para 2060. Fonte: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) 2017.

O envelhecimento é caracterizado pela perda progressiva da integridade fisiológica, causando comprometimento de diversas funções do organismo. Desta forma, pensando no processo que envolve o envelhecimento fisiológico, observa-se uma classificação de acordo com as inúmeras alterações orgânicas decorrentes do avançar da idade no organismo humano. Tais modificações podem culminar na perda da capacidade em manter o equilíbrio homeostático, ocasionando um declínio das funções fisiológicas, de modo que em indivíduos identificados em condições normais, esse processo de envelhecimento irá acontecer de forma adaptativa a esse novo fenótipo biológico. Entretanto, quando tal indivíduo se encontra em situações que perturbam a homeostase pode ocorrer uma disfunção dos sistemas fisiológicos, acarretando processos patológicos (MIRANDA, 2016).

Com base em tais constatações, surge o conceito de senescência e senilidade no qual o primeiro é definido 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 este 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 (CIOSAK *et al.*, 2011; FARFEL, 2008).

A senescência é definida amplamente como um processo multifatorial relacionado a um declínio progressivo e dependente do tempo em organismos vivos

da função celular e dos órgãos, levando à maior vulnerabilidade a doenças crônicas e à morte (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

Portanto, vale ressaltar que o envelhecimento é amplamente definido como um processo multifatorial, relacionado ao declínio progressivo e dependente do tempo em organismos vivos, da função celular e dos órgãos, o que leva à maior vulnerabilidade a doenças crônicas, como a demência, que pode ser considerada como uma das principais doenças crônico-degenerativas prevalentes na população idosa. Em termos genéricos, a demência é descrita como uma condição clínica provocada por inúmeras causas, caracterizada por declínio cognitivo adquirido e manifestado a partir de um determinado padrão prévio estável. Essas mudanças cognitivas são frequentemente acompanhadas por transtornos de humor e do comportamento (GRANZOTTO; ZATTA, 2014). Tais alterações podem ser explicadas devido à redução da ação de neurotransmissores, juntamente com a degradação de neurônios colinérgicos em diversas áreas do Sistema Nervoso, que podem culminar nas chamadas demências, que se apresentam como uma forma incapacitante de doença, observada principalmente no envelhecimento (VIEGAS *et al.*, 2011).

O declínio cognitivo é observado na maioria dos tipos de doenças neurodegenerativas, porém, destaca-se, a Doença de Alzheimer (DA), a prevalente entre os idosos, principalmente com base na definição biológica da DA (SCHELTENS *et al.*, 2021). Tem como principal característica anatomopatológica cerebral, a presença de placas senis, principalmente do peptídeo beta-amilóide (β A), juntamente com emaranhados neurofibrilares intracelulares, compostos pela hiperfosforilação da proteína tau (H τ) (VINGTDEUX *et al.*, 2010; VINGTDEUX *et al.*, 2008; GRANZOTTO; ZATTA, 2014). Em termos fisiológicos encontrados na DA, o córtex e o hipocampo são afetados, o que faz com que ocorra uma piora progressiva da função cognitiva no indivíduo, resultando em deficiências na fala, reconhecimento de palavras e objetos, bem como a incapacidade de realizar movimentos voluntários. (SOUZA *et al.*, 2020).

Diversos autores têm investigado a associação de todos os tipos de demência, incluindo a DA, em relação à citotoxicidade promovida por β A e o estresse oxidativo, como resultado de um desequilíbrio entre a produção e a remoção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Altos níveis desta espécie reativa, podem levar à destruição de proteínas, ácidos nucleicos e peroxidação lipídica, bem como deficiências na integridade da membrana celular. Assim, este aumento de ROS, pode

ocorrer devido à redução das defesas antioxidantes, tornando-se responsável pela neurodegeneração mediada pelo estresse oxidativo (SOUZA *et al.*, 2020).

Como mencionado anteriormente, estudos demonstram uma ativação nos mecanismos do processo neuroinflamatório na DA, como ativação da micróglia e astrócitos, tanto na instalação, progressão e severidade da doença (SOUZA *et al.*, 2020). Tal ativação pode fazer com que aumente a resposta inflamatória aos depósitos de β A extracelulares, caracterizado por uma fase de resposta aguda local mediada por citocinas, através da ativação da cascata complemento e indução, de um sistema enzimático inflamatório, como NO sintase induzida (iNOS), aumentando assim a síntese do óxido nítrico (NO), um importante neurotransmissor, além da geração de cicloxigenase-2 (COX-2) (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os astrócitos, por sua vez, participam da degradação e remoção do β A, servindo de barreira protetora entre os depósitos de β A e os neurônios. O caráter multifatorial da resposta inflamatória é caracterizado pela ocorrência de uma grande diversidade de mediadores pró e antiinflamatórios, sendo muitos destes responsáveis pela promoção de mecanismos neurodegenerativos, enquanto outros podem limitar o avanço da inflamação ou exercer efeitos neurotróficos benéficos. Portanto, não será um único mediador, mas um conjunto de agentes inflamatórios que determinarão a prevalência de efeitos deletérios ou benéficos durante a evolução da DA (VIEGAS *et al.*, 2011).

Além do processo inflamatório, a incapacidade funcional e o declínio cognitivo podem também ocorrer como agravamento do quadro demencial, refletindo na diminuição da capacidade em manter as habilidades físicas e mentais necessárias a uma vida independente e autônoma. Sua prevalência pode ser mensurada por meio da incapacidade em realizar as Atividades de Vida Diária (AVDS), como as Atividades Básicas de Vida Diária (ABVD) e as Atividades Instrumentais de Vida Diária (AIVD). As ABVDs, descritas como atividades de autocuidado como tomar banho, pentear os cabelos, alimentar-se, usar o banheiro, atitudes essenciais à sobrevivência diária. As AIVDs são ações que envolvem a organização da rotina diária como vestir-se, comer, preparar uma pequena refeição, caminhar dentro de casa ou pela vizinhança, fazer compras, emitir julgamentos, ler e escrever, discar ou atender telefone, sendo todas as atividades necessárias para sustentar uma vida independente, na comunidade (FERREIRA *et al.*, 2012).

Ressalta-se que as atividades funcionais ocorrem diariamente e estão diretamente relacionadas ao autocuidado, ao cuidado de seu entorno e à participação social, constituindo, portanto, um fator importante para a saúde e o bem-estar dos idosos.

Como o estado funcional é uma dimensão base para a avaliação gerontológica, muitos instrumentos específicos para determinação da avaliação das AVDs são propostos e amplamente utilizados, com destaque para o Índice de Katz, que avalia as ABVDs, e para o Índice de Lawton-Brody, que avalia as AIVD. Esses instrumentos, entretanto, ainda são utilizados de forma assistemática no Brasil (MARRA *et al.*, 2007). O Índice de Katz tem sido um dos mais utilizados em estudos que verificaram a influência e relação do declínio da marcha, dos membros superiores e das funções executivas sobre a funcionalidade e outras variáveis, como a qualidade de vida, depressão e ansiedade de pacientes com demência (DUARTE *et al.*, 2012).

Portanto, no que tange ao envelhecimento cerebral, trata-se de um fenômeno intrincado, caracterizado pelo estresse oxidativo, pelo acúmulo de macromoléculas danificadas em seu contexto bioquímico e pelas alterações na estrutura e função dos neurônios, que aumentam ainda mais o fator de risco para a maioria das doenças neurodegenerativas (VITALE *et al.*, 2013; NICOLAI *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2018).

2.2. Estresse oxidativo e o processo inflamatório na DA

Para aprofundar na investigação biomolecular relacionada à DA, diversos autores procuram estudar os biomarcadores emergentes em nível periférico, já que seguindo um conceito amplamente aceito de que as células sanguíneas periféricas possam ser uma "janela", dentro do SNC, este estudo pode implementar as estratégias de diagnóstico e/ou terapêutica na abordagem desta doença. (CLEMENTE, 2017). Assim, os leucócitos poderiam ser razoavelmente considerados para a busca de marcadores inflamatórios, potencialmente associados à neurodegeneração (BRAM, 2017).

Fazendo parte do envelhecimento, percebe-se que as funções relacionadas com estresse oxidativo, como aderência, produção de radicais livres ou citocinas pró-

inflamatórias que se encontram aumentadas com a idade, podem ocasionar o que chamamos de processo inflamatório crônico (FILIPPIN, 2008).

Particularmente a neuroinflamação poderia contribuir no processo da DA, justamente por alterar a resposta à infecção, aumentando assim, a liberação de citocinas periféricas, causando efeitos citotóxicos nos neurônios. (VIEGAS, 2011). Tal fenômeno ocorre como resposta do sistema nervoso central, aos distúrbios homeostáticos típicos das doenças neurológicas, onde na DA é encontrada em 1 entre 9 idosos, o que corresponde a 70% dos casos isolados ou combinados de distúrbios cerebrovascular (LAI *et al.*; 2017).

Sob a ótica da teoria dos radicais livres, incluindo o que ocorre com as doenças neurodegenerativas, o destaque na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ROS e RNS) pode ter causa exógena ou endógena, sendo comum para vários tipos de células com perfil redutor deficitário. Sabe-se que na produção basal de ROS (célula em repouso), a célula utiliza preferencialmente a via mitocondrial e quando ativada, a célula utiliza a via da NAD (P) H-oxidase (RABÊLO, 2010). Quando a geração de ROS e RNS ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, dá-se o nome de estresse oxidativo. Deste modo, CHAVES e cols. (1998 e 2000) demonstraram em granulócitos, um aumento de ROS a partir dos 40 anos e de RNS a partir dos 50 anos. Concomitantemente com este aumento, tais autores observaram uma diminuição significativa do poder antioxidante, sugerindo um desequilíbrio celular metabólico no envelhecimento.

No envelhecimento é importante destacar a Teoria dos Radicais Livres (RL), amplamente estudada, mas muito rebatida por outros que contradizem essa ideia. De forma geral, esses estudos procuram argumentar contra o papel universal do dano oxidativo no envelhecimento. Por essa razão, muitos pesquisadores mudaram para um conceito mais amplo que várias formas de dano servem como fatores causais no processo de envelhecimento, como o ROS representando uma das principais causas, mas não a única (GLADYSHEV, 2014).

O RL pode se apresentar como um átomo, uma molécula ou como composto com um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada mais externa e altamente reativos. Por conta de sua alta reatividade, tentam parear com outras moléculas ou até mesmo com elétrons individuais para criar um composto estável. Para que consiga

se estabilizar, podem “buscar” um átomo de hidrogênio de outra molécula, se ligar a outra molécula ou interagir através de várias formas com outros de sua natureza. Essa configuração instável cria energia que é liberada através de reações com moléculas adjacentes, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (**Figura 2**).

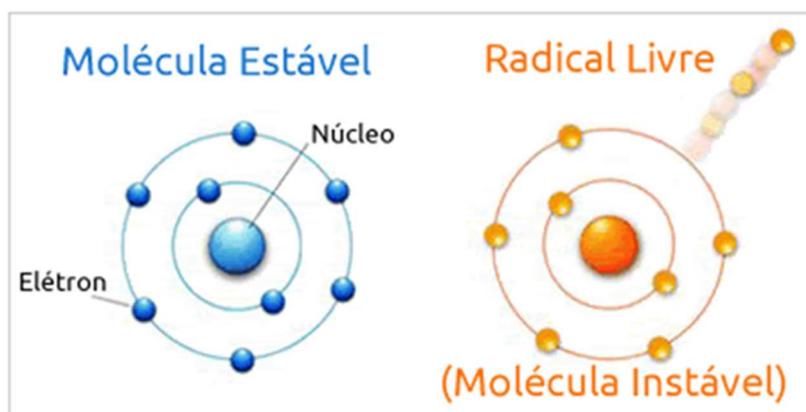


Figura 2: Comparação ente um Radical livre e uma molécula estável. Fonte: Modificado de ZAU, 2016.

A maioria dos RL que danifica os sistemas biológicos é derivada do oxigênio e referida geralmente como ROS. Exemplos são ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}). Mas também podem ser moléculas não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem também as espécies reativas de nitrogênio (RNS) que podem ser radicalares como o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) e espécies não-radicalares como o peroxinitrito ($ONOO^-$) (**Figura 3**).

Vale lembrar que ROS podem apresentar toxicidade para as células porque podem reagir com a maioria das macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídeos e DNA e gerarem diferentes tipos de radicais secundários como radicais de lipídeo, radicais derivados de açúcar e de base, radicais de aminoácido e radicais de tiol (CALDEIRA, 2019; CHANDRASEKARAN; SOSA; MELENDEZ, 2017; BHATTACHARYA, 2015; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; RÓDENAS; MITJAVILA; CARBONELL, 1998).

| Espécie | Nome |
|------------------|--------------------------|
| $O_2^{\bullet-}$ | Ânion radical superóxido |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrogênio |
| HO^{\bullet} | Radical hidroxila |
| RO^{\bullet} | Radical alcoxila |
| 1O_2 | Oxigênio singlete |
| HClO | Ácido hipocloroso |

Figura 3: Exemplos de ROS. Fonte: Exercício e Estresse Oxidativo, RAMIRES, 2019. DocPlayer.

O Óxido Nítrico (NO) uma das principais RNS, ou seja, um RL, se apresenta no estado gasoso, inorgânico e incolor. Pode se caracterizar como um neurotransmissor, que auxilia na plasticidade sináptica (capacidade de modulação e adaptação das sinapses para transmissão do impulso nervoso), além de facilitar a liberação de outros neurotransmissores e hormônios (BARRETO; CORREIA, 2005). Ainda, atua como vasodilatador, sendo o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas o que o faz ser a mais importante molécula reguladora do sistema imune; além de inibir a agregação plaquetária, regular a pressão sanguínea e possuir ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microorganismos, parasitas e células tumorais (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Sua produção excessiva pode gerar um ambiente propício ao acúmulo em excesso de $O_2^{\bullet-}$ na mitocôndria, o que pode ser acompanhado pela geração de quantidades significativas de Peróxido Nitrito ($ONOO^-$), gerando assim, danos nos componentes da cadeia transportadora de elétrons, além da despolarização irreversível de organelas e ocasionar disfunção mitocondrial, gerando apoptose. $ONOO^-$ causa dano oxidativo, nitração e S-nitrosilação de biomoléculas (proteínas, lipídeos e DNA) (DANYLOVYCH; BOHACH, 2018) (**Figura 4**).

| | |
|------------------|-----------------------|
| NO^{\bullet} | Óxido nítrico |
| NO_2^{\bullet} | Dióxido de nitrogênio |
| $ONOO^-$ | Peroxinitrito |

Figura 4: Exemplos de RNS. Fonte: Exercício e Estresse Oxidativo, RAMIRES, 2019. DocPlayer.

Quanto ao ROS, podem em doses baixas a médias, serem considerados essenciais para a regulação das funções fisiológicas normais envolvidas no desenvolvimento como a progressão do ciclo celular e proliferação, diferenciação, migração e morte celular (COVARRUBIAS *et al.*, 2008). Eles também têm um importante papel no sistema imune e na manutenção do balanço redox (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). E de acordo com Caldeira (2019), esta espécie reativa ainda tem sido relacionada com a ativação de várias vias de sinalização celular e com fatores de transcrição incluindo a quinase fosfoinositol 3 (PI3K)/Akt, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) e fator nuclear κ B (NF- κ B) (ZHANG *et al.*, 2016). Já o seu excesso pode se tornar deletério, pois sua produção exacerbada pode estar associada com o desenvolvimento de várias patologias como câncer, diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; HALLIWELL, 2011).

O vazamento de elétrons na mitocôndria pode ser uma das principais formas de produção de ROS. Outras fontes endógenas de produção de ROS são fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) oxidases e xantina oxidases (BAE *et al.*, 2011). A produção de ROS pelas NADPH oxidases é chamada de explosão respiratória e é crítica para a ação bactericida de fagócitos (FORMAN; TORRES, 2002) (**Figura 5**).

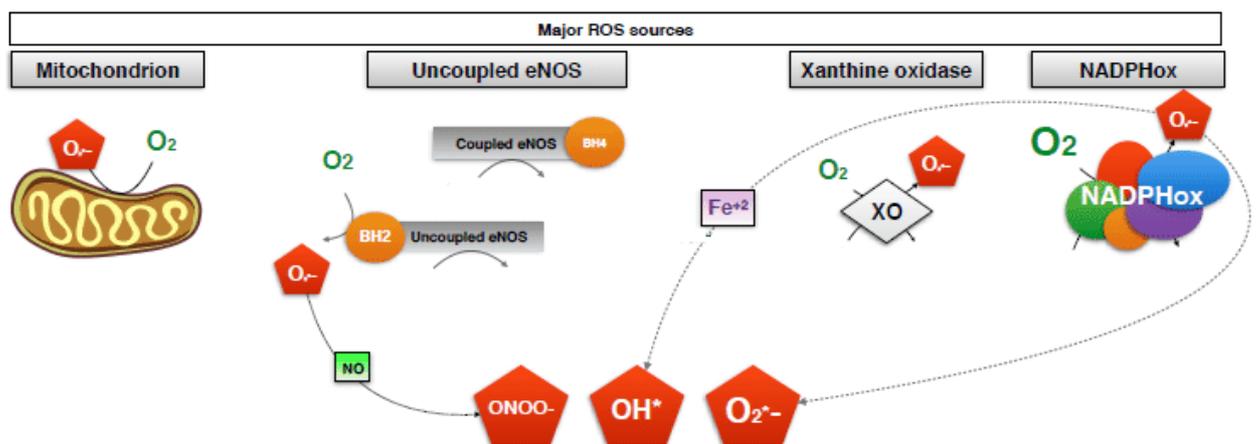


Figura 5: Principais fontes de ROS e RNS no organismo humano. Adaptado de Ramón et al, 2017.

Quanto aos fatores exógenos, na produção de ROS, tem-se a radiação ultravioleta e a radiação ionizante, compostos quinona, químicos encontrados na fumaça do cigarro, toxinas ambientais e vários agentes farmacêuticos (**Figura 6**) (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

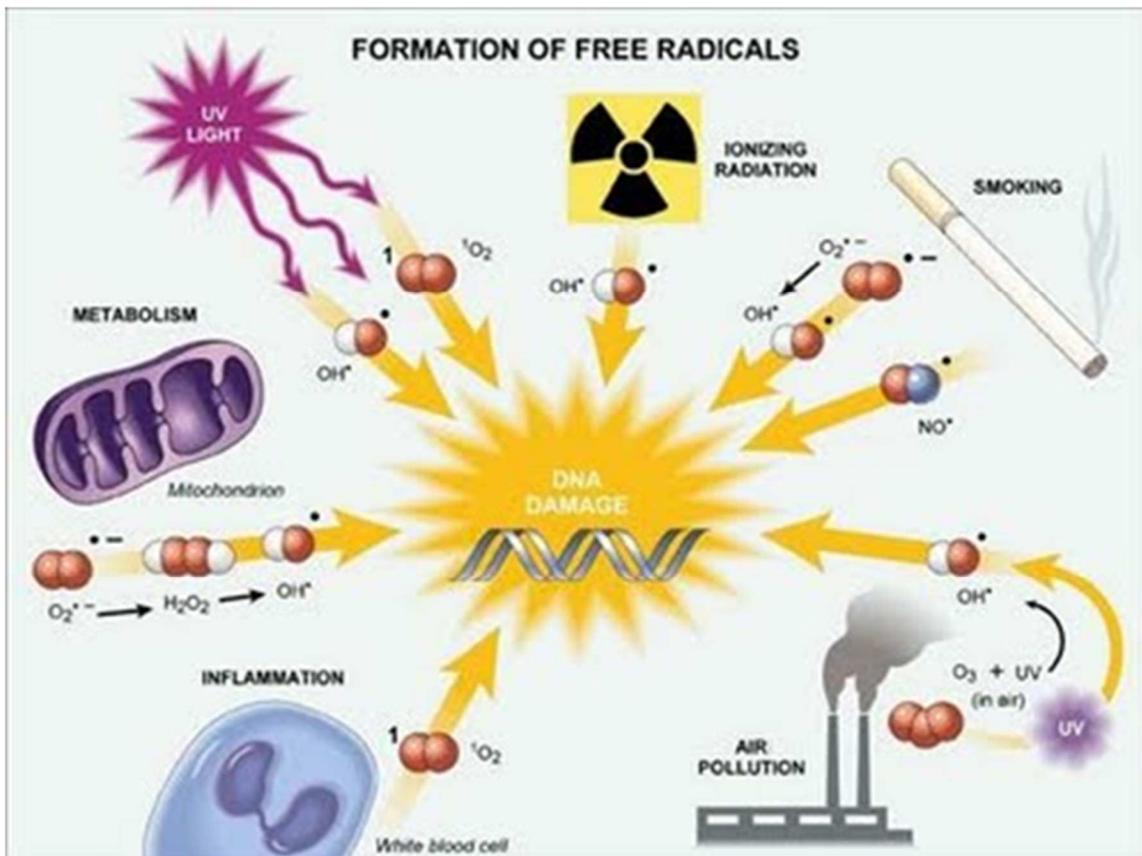


Figura 6: Fatores externos responsáveis pela formação de RL. Fonte: Modificado, site saúde, 2010.

Em nível celular, observa-se um equilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de ROS, sendo que as moléculas antioxidantes constituintes da defesa antioxidante em sistemas vivos agem em níveis diferentes (**Figura 7**). Esses níveis podem ser a prevenção, captura e reparo do dano gerado pelos RL.

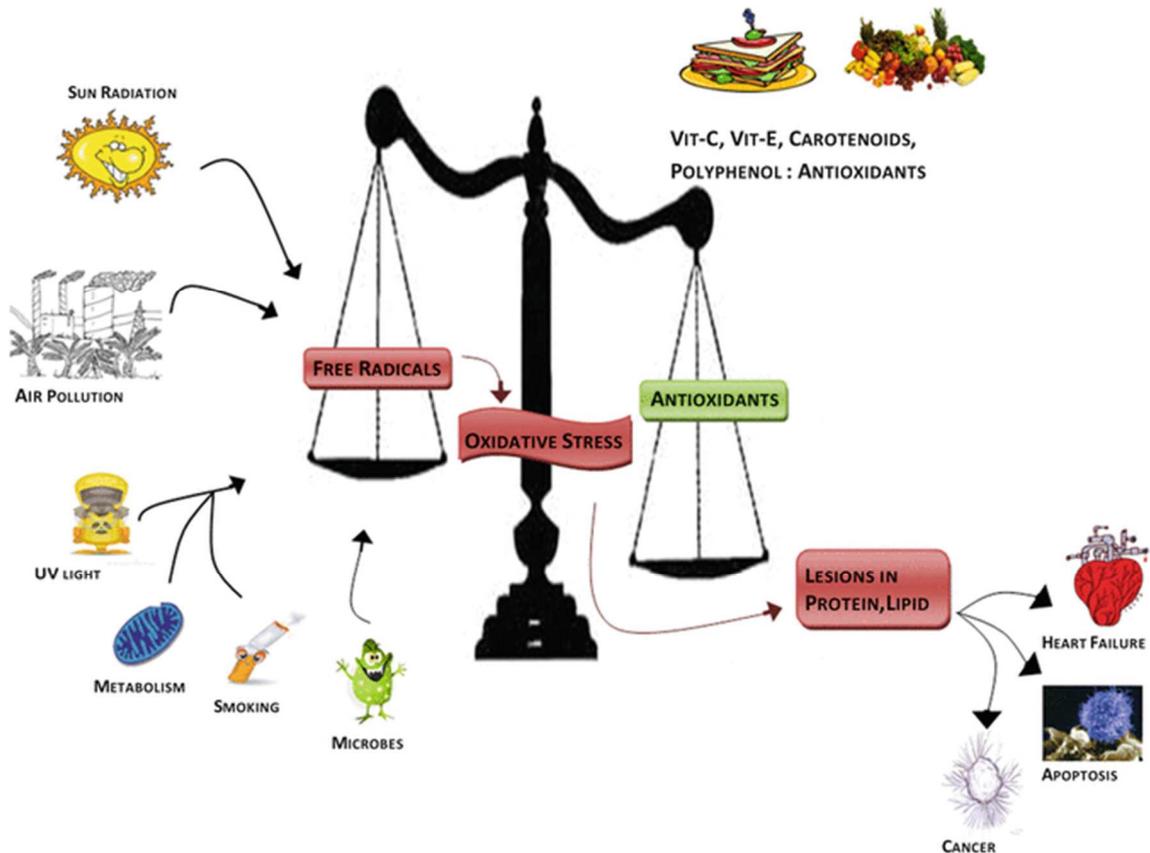


Figura 7: Representação da formação do EO. Fonte: Islam e Shekhar, 2015.

Na base da linha de defesa, os antioxidantes podem ser categorizados como antioxidantes de primeira linha, de segunda linha, terceira linha e quarta linha. Mesmo as defesas antioxidantes sendo diferentes de espécie para espécie, a presença delas é universal. E essas defesas antioxidantes incluem antioxidantes enzimáticos, como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), peroxirredoxinas e sestrinas, como também antioxidantes não enzimáticos, como vitamina C e E, glutathione (GSH), ácido lipóico, carotenóides, polifenóis. Antioxidantes enzimáticos agem quebrando e removendo os RL (**Figura 8**). Antioxidantes não enzimáticos interrompem a cadeia de reações dos RL (HALLIWELL, 2011; NIMSE; PAL, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

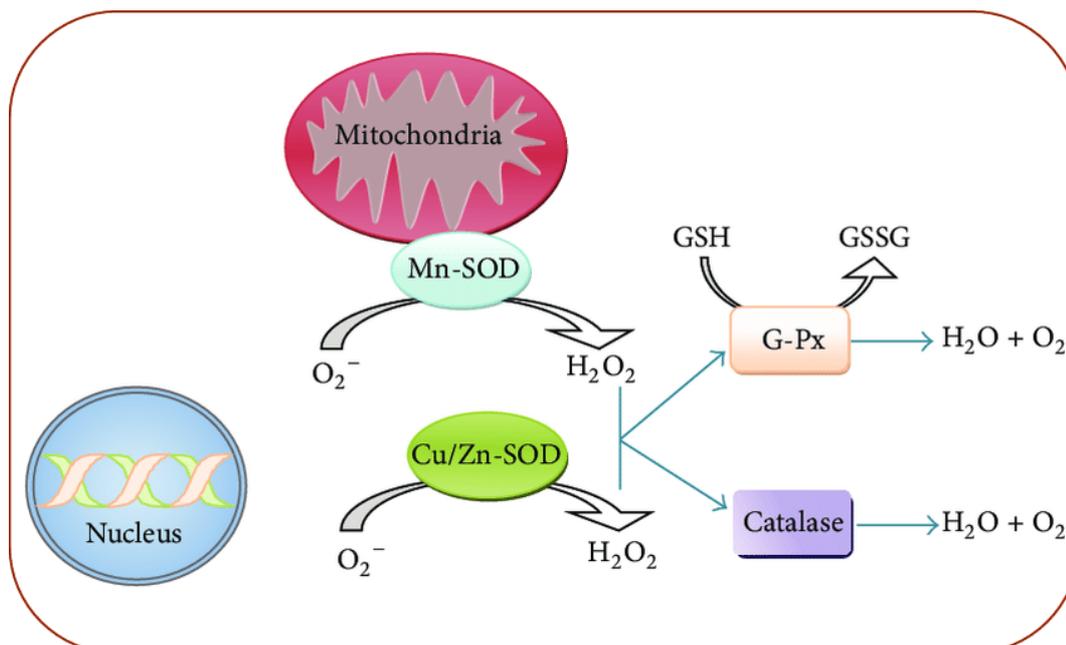


Figura 8: Principais enzimas antioxidantes e seus substratos. Fonte: Moret-Tatay, 2016.

Portanto, observa-se um grupo de antioxidantes caracterizados como de primeira linha de defesa que agem suprimindo ou prevenindo a formação de RL nas células. Percebe-se que são muito rápidos em neutralizar qualquer molécula com o potencial de gerar um RL ou qualquer RL com a habilidade de induzir a produção de outros RL. Três enzimas chaves: SOD, CAT e GPx estão no centro dessa primeira linha. A enzima SOD, localizada no citosol e na mitocôndria, converte cataliticamente o O_2^- em O_2 e H_2O_2 em presença de cofatores metálicos como cobre (Cu), zinco (Zn) ou manganês (Mn). A associação entre a deficiência de SOD e um número de patologias tem sido observado em animais e humanos. Lebovitz *et al.*, (1996) apud Caldeira (2019), notaram que a neurodegeneração, lesão no miocárdio e morte perinatal em camundongos com deficiência na SOD.

A enzima CAT presente no peroxissomo converte H_2O_2 em O_2 e H_2O . Zámoch e Koller (1999) associaram dano oxidativo ao DNA e subsequente risco de suscetibilidade ao câncer em indivíduos com polimorfismo genético e alteração na expressão gênica/atividade da CAT. Khanet *et al.* (2010), também relacionaram o desenvolvimento de desordens mentais a polimorfismos no gene codificador da CAT. Adicionalmente Góth, Rass e Páy (2004) concluíram que humanos com baixos níveis de CAT estão mais predispostos ao diabetes mellitus tipo 2. A enzima GPx é encontrada tanto no citoplasma quanto extracelularmente em quase todo tecido

humano. Converte H_2O_2 em H_2O . A enzima peroxirredoxina cataliza a redução de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e $ONOO^-$ (NIMSE; PAL, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A considerável formação de ROS aumentada pelo sistema de transporte de elétrons dentro da mitocôndria sob condições estressantes e no envelhecimento constitui um risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA). O cérebro de pacientes que sofrem de DA apresenta uma extensão significativa de dano oxidativo associado ao acúmulo anormal marcado de βA e à deposição de emaranhados neurofibrilares, como mencionado anteriormente. Os danos oxidativos mais comuns encontrados na DA, como a oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica por radicais livres, é significativa na DA. A oxidação de proteínas cerebrais pode afetar enzimas críticas para as funções neuronais e gliais e os fosfolipídios da membrana cerebral são particularmente vulneráveis aos ataques dos radicais livres. As ligações duplas presentes nestes ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios de membrana permitem a remoção de íons de hidrogênio e aumento da peroxidação lipídica, que é a característica mais proeminente na mudança degenerativa no cérebro com DA (TSALUCHIDU S, 2008; CHRISTEN Y, 2000, MARKESBERY, 1997). Assim, elevados níveis de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas ou ácidos nucleicos e produtos finais de glicação avançada mostraram estar presentes no cérebro em regiões relevantes para DA que têm lesões neuropatológicas, principalmente hipocampo e córtex entorrinal (LOVELL E MARKESBERY, 2007).

Além do estresse oxidativo já demonstrado em inúmeros estudos como um dos fatores proeminentes para o aparecimento da DA, a neuroinflamação também exerce um papel crucial no desenvolvimento e progressão da doença. De acordo com diversos autores, com destaque para Leite (2020), o aspecto imunológico tem uma relação direta com a neuroinflamação encontrada na DA, visto que as citocinas pró-inflamatórias como IL6 e TNF mostram-se elevadas, e as citocinas anti-inflamatórias, tais como IL10 mostram-se em baixas concentrações. Tal fenômeno pode ser explicado pois o Sistema Imunológico (SI) é regulado por neurotransmissores, proteínas, citocinas e hormônios e se comunica de maneira constante e extensiva com o Sistema Nervoso Central (SNC); participando, desta forma, da modulação do comportamento e de outras funções neurológicas críticas ao longo da vida. Os diversos estímulos captados pelo cérebro durante diferentes situações podem agir de

maneira benéfica ou prejudicial sobre o SI, desencadeando uma série de reações com consequências importantes (BAUER, 2005; ALVES, 2007).

No envelhecimento, a associação da deterioração progressiva encontrada na imunidade inata e na adaptativa, além do aumento da inflamação crônica (em baixo grau), é denominada “Imunossenescência”. Tais mudanças levam à desregulação imunológica, aumentando, dessa forma, a frequência e a gravidade das doenças em idosos. Este conjunto de alterações ligadas ao SI, ativação imune inata crônica, alterações significativas nas funções de alguns leucócitos, juntamente com monócitos inflamatórios, aumento de citocinas pró-inflamatórias e de ROS/RNS contribuem para um processo inflamatório crônico sub-clínico, denominado “Inflammaging” (HOFFMANN; PYRIDOPOULOS, 2015; HEFFNER, 2011; DE LA FUENTE; MIQUEL, 2009; BENEDETTO *et al.*, 2017).

O “Inflammaging” pode ser a causa de uma série de doenças debilitantes, neurodegenerativas, pois acredita-se que esse fenômeno seja o responsável por muitos cânceres, bem como, aterosclerose, doença de Alzheimer e doença inflamatória intestinal (ELISIA *et al.*, 2017) (**Figura 9**).

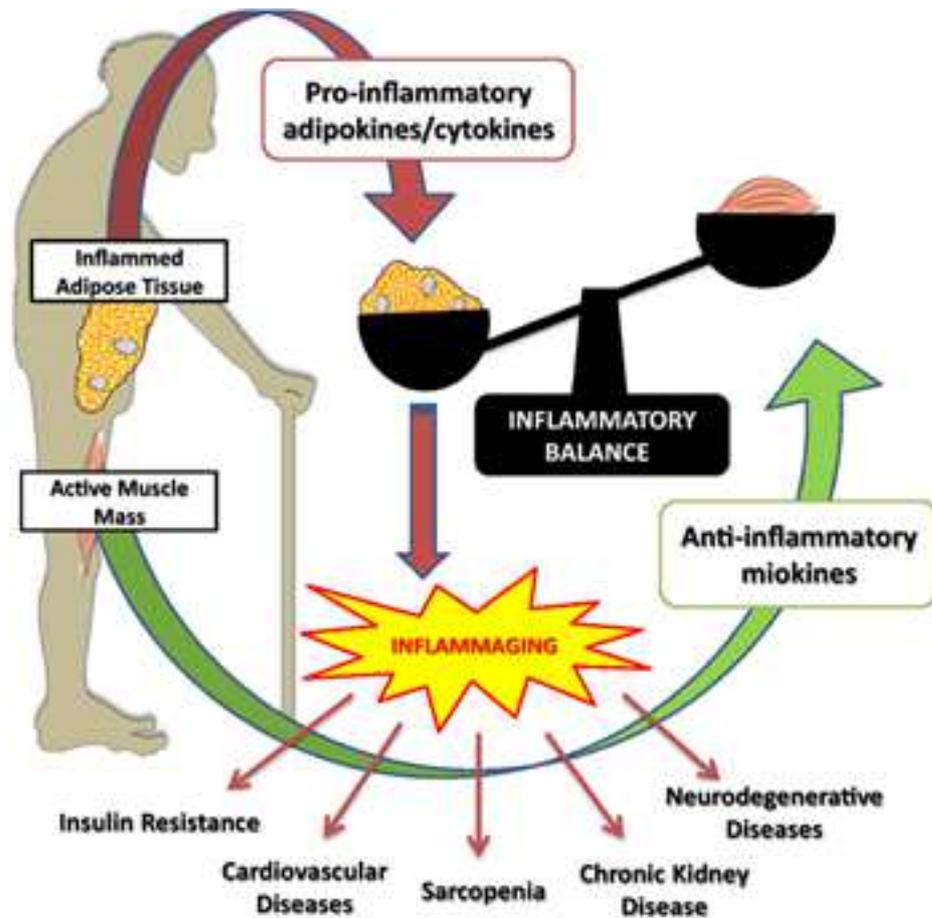


Figura 9: Causas relacionada com o inflammaging. Fonte: Muller *et al.*, (2019). Journal of Science in Sport and Exercise.

De acordo com Areza-Fegyveres; Caramelli; Nitrini, R (2005); Wilhelm *et al.*, (2017), a neuroinflamação pode estar associada com a micróglia e em menor escala com os astrócitos, que também pode estar vinculado ao ROS, que podem atuar como mediadores-chave no processo de desacoplamento neurovascular e alterações do complexo juncional endotelial cerebral no envelhecimento, além de desencadearem a secreção de citocinas inflamatórias.

A primeira evidência de que a DA tem um componente neuroinflamatório surgiu há duas décadas, a partir de estudos de imunohistoquímica mostrando a presença de proteínas, expressando micróglia ativada dos principais complexos de histocompatibilidade, citocinas inflamatórias e proteínas do complemento, que estão associadas a placas amilóides em regiões cerebrais vulneráveis de pacientes com DA (AKIYAMA *et al.*, 2000; ROGER *et al.*, 1988). Acredita-se que a neuroinflamação na

DA seja desencadeada pela β A e/ou pelas substâncias liberadas pelos neurônios em morte, causando ativação da micróglia (EIKELENBOOM *et al.*, 2010; WYSS-CORAY *et al.*, 2006). A micróglia ativada desencadeia o recrutamento e proliferação de astrócitos que estimulam ativamente o processo inflamatório em resposta aos depósitos extracelulares de β A. Este componente neuroinflamatório componente da DA é ainda caracterizado por um acúmulo local de citocinas mediando a resposta de fase aguda, ativação do complemento cascata e indução de sistemas de enzimas inflamatórias tais como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e COX-2 (MCGEER AND MCGEER, 2010 E BROWN AND BAL-PRICE, 2006).

No cérebro de pacientes com DA, níveis aumentados de várias citocinas e quimiocinas foram identificadas, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF, IL-8, TGF- β , MIP-1 α , em comparação com indivíduos com a mesma idade sem a presença de DA (AKIYAMA *et al.*, 2000 SOKOLOVA *et al.*, 2009).

As citocinas fazem parte da família dos peptídeos e são consideradas proteínas solúveis, liberadas pelas células imunes, representando os principais reguladores do protótipo: resposta imune inata e adaptativa à infecção. Elas podem modular a atividade e a viabilidade neuronal de maneira indireta, promovendo a liberação de moléculas neuroativas na glia ou no endotélio, (por exemplo: NO⁻, glutamato, prostaglandinas, neurotrofinas) e de forma direta, ativando receptores neurais no cérebro ou medula espinhal. (VEZZANI; VIVIANI, 2015).

Podem ser classificadas em duas categorias: inflamatórias e anti-inflamatórias; as citocinas inflamatórias clássicas, tais como: Interleucina 1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interleucina 6 (IL-6), ativam seus receptores cognatos nas células-alvo, induzindo vias que diferem dependendo do tipo de célula, que em muitas condições, resultam em efeitos fisiopatológicos divergentes. Quanto ao sistema nervoso, possuem funções fisiológicas como as observadas nas neurites, na neurogênese, na sobrevivência neuronal, nas podas sinápticas durante o desenvolvimento do cérebro, além, de regularem a força da transmissão e plasticidade sináptica (MACHADO *et al.*, 2020). Porém, a hiperprodução e liberação em excesso de citocinas, ou sua presença prolongada no tecido, podem estar associadas às disfunções neuronais, como por exemplo, dor neuropática, transtornos psiquiátricos, doenças neurodegenerativas e epilepsia (VEZZANI *et al.*, 2011 ZHANG *et al.*, 2014).

Vale destacar que de acordo com as citocinas pró-inflamatórias, as mesmas podem ser responsáveis por vários distúrbios inflamatórios, em que se destaca TNF- α ou simplesmente TNF. Sua inibição de forma ativa, tem sido estudada como uma terapia promissora para diversas doenças inflamatórias (BAHIA; SILAKARI, 2010). Além disso, é um mediador fundamental de reações inflamatórias sistêmicas agudas e crônicas; não somente por induzir a sua própria secreção, mas também, por estimular a produção de outras citocinas inflamatórias, como por exemplo, a IL-6 (CHU, 2013). Esta tem efeitos nocivos sobre o envelhecimento e foi proposta como um marcador confiável para o declínio funcional, como preditor de morbidade e mortalidade na velhice. Possui atividade redundante e pleiotrópica que medeia uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (GIOVANNINI *et al.*, 2011; KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003).

Quanto às citocinas antiinflamatórias, IL-10 é a citocina mais potente, devido ao seu poder de bloquear as respostas imunes em diferentes níveis, agindo de forma direta e indireta nos braços inato e adaptativo do sistema imune. Conseqüentemente, pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (LARA, 2017; SAXENA *et al.*, 2015). Níveis elevados da mesma foram encontrados em idosos centenários (SALVIOLI *et al.*, 2009).

Desta forma, pode-se inferir que o envelhecimento é caracterizado por uma inflamação crônica de baixo grau que provavelmente contribui significativamente para a morbidade e mortalidade em idosos (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014). Deste modo, a imunossupressão periférica e a inflamação podem promover a neuroinflamação por meio da modulação das células gliais em direção a um estado pró-inflamatório mais ativo, levando à perda da função neuroprotetora, à disfunção neuronal e acúmulo de dano tecidual cerebral (BENEDETTO *et al.*, 2017), o que resulta em aumento do risco de comprometimento cognitivo, distúrbios neurológicos e neurodegenerativo (GOLDECK *et al.*, 2016) (**Figura 10**).

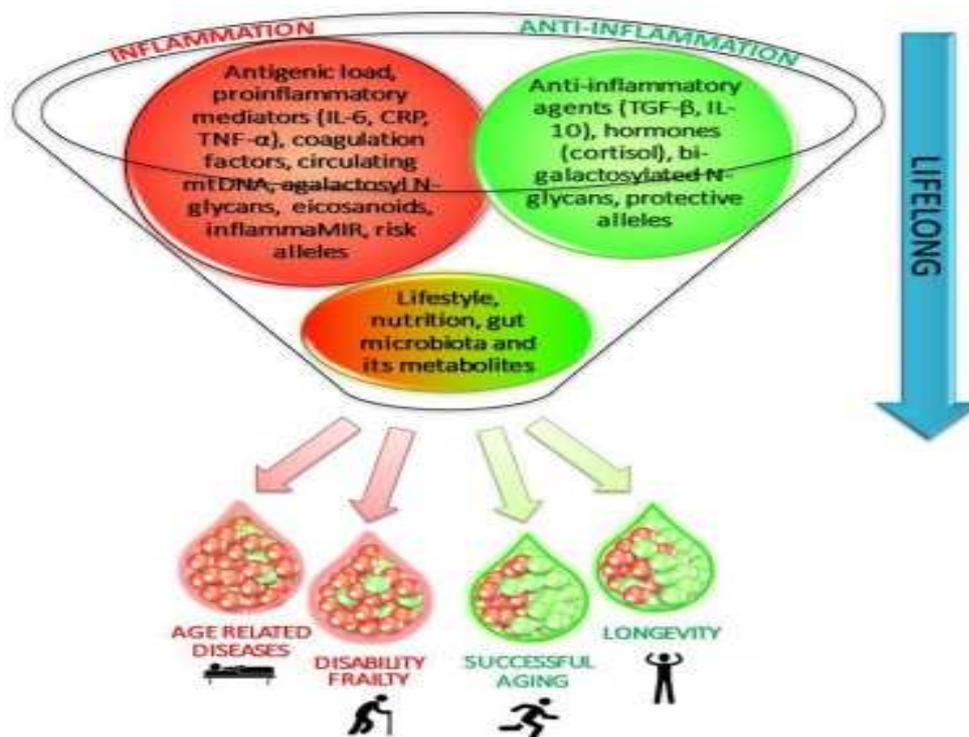


Figura 10: Citocinas relacionadas com o inflammaging no envelhecimento. Fonte: [sciencedirect.com/](https://www.sciencedirect.com/) Inflammaging and human longevity in the omics era.

Neste contexto, pode ser observada maior alteração quanto ao surgimento de doenças neurodegenerativas no idoso, que pode ser caracterizado pelo estímulo oxidante de ROS supracitado, advindo de maior produção de forma prolongada de citocinas pró-inflamatórias no cérebro envelhecido, demonstrando a importância das citocinas no envelhecimento e na neuroinflamação (BARRIENTOS *et al.*, 2015; FRANCESCHI *et al.*, 2017).

2.3. O resveratrol e as vias antioxidantes na Doença de Alzheimer

De acordo com Souza (2020), apesar de atualmente não haver cura para a DA, a adoção de um estilo de vida mais saudável tem sido associada à redução do declínio cognitivo, da deficiência e até mesmo do risco de demência (incluindo a DA). As estratégias incluem dieta hipocalórica, exercício físico e ingestão de alimentos antioxidantes, que estão associados aos mecanismos neuroprotetores.

Para que haja um equilíbrio entre os aspectos oxidantes x antioxidantes, tem sido estudado o resveratrol (RSV), onde alguns estudos têm demonstrado seus inúmeros efeitos biológicos e farmacológicos (CALDEIRA, 2019; IM *et al.*, 2017). Tais

efeitos incluem os cardioprotetores, o anticâncer, o antiobesidade, os neuroprotetores, os anti inflamatórios, os antidiabéticos e os antioxidantes (CHANG *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; RAJ; ZIEROTH; NETTICADAN, 2015; SU; PU; HU, 2016; SZKUDELSKI; SZKUDELSKA, 2015; YUN *et al.*, 2014).

O resveratrol (**Figura 11**) é um polifenol encontrado em uvas vermelhas, vinho tinto e outros alimentos vegetais, e está recebendo cada vez mais atenção devido ao seu potencial terapêutico. O acúmulo de evidências dos efeitos neuroprotetores do vinho tinto envolve várias moléculas bioativas, incluindo quercetina, miricetina, catequinas, taninos, antocianidinas, ácido ferúlico e resveratrol (CARUANA *et al.*, 2016).

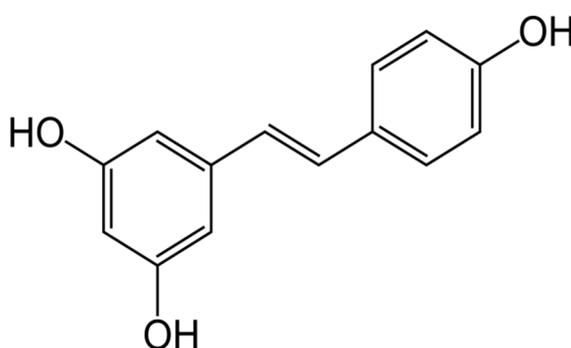


Figura 11: Estrutura química da molécula de RSV. Fonte: Caldeira, 2019; MALAGUTI:HRELIA; ANGELONI, 2013.

Estudos pré-clínicos indicam que o resveratrol atravessa a barreira hematoencefálica, resultando em concentrações detectáveis, entretanto baixas, da molécula no cérebro, enquanto concentrações muito maiores de metabólitos de resveratrol são encontradas no sangue. Uma vez que os animais são incapazes de sintetizar polifenóis, eles devem ser ingeridos por meio de uma dieta rica em vegetais para alcançar efeitos farmacológicos (AHMED *et al.*, 2016). Os polifenóis têm propriedades antiinflamatórias e antioxidantes potentes que podem afetar a função cerebral (PATHA *et al.*, 2013). O resveratrol aumenta a dilatação da arteríola cerebral em ratos, potencialmente por meio da ativação da vasodilatação mediada pelo NO, melhorando assim, a perfusão cerebral pós-isquêmica (RITZ *et al.*, 2008)

Segundo Turner *et al.*, (2015), apesar do seu metabolismo ser rápido, o polifenol e seus principais metabólitos foram identificados no plasma e no liquor dos

indivíduos estudados, demonstrando sua capacidade para cruzar a barreira hematoencefálica e estabilizar os níveis de β A.

Recentemente, no trabalho de Feng *et al.*, (2020), foi observado o efeito do RSV na desagregação de peptídeos β A, já que sua agregação tem sido fortemente associada com a patogênese da DA. Observou-se ainda, que este composto promoveu a inibição da formação e destruição de agregados pré-formados, além da minimização da citotoxicidade promovida por β A, ou seja, uma importante estratégia terapêutica para a DA.

Quanto ao aspecto antioxidante, o RSV tem um efeito dual: aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione S-transferase (GST) e a glutathione reductase (GSR) e pode agir diretamente com os RL, removendo-os (STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016). Inclusive, outros efeitos já descritos deste polifenol, estão sendo relacionados com a sua ação em enzimas antioxidantes. Estudos de Mokni *et al.*, (2007) comprovaram que o RSV reduz a peroxidação lipídica em cérebros de ratos e aumenta simultaneamente a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e da Catalase (CAT), confirmando, deste modo, seu efeito neuroprotetor. Em outros estudos, realizados por Szkudelski e Skudelska (2011) foram observadas melhoras do açúcar em níveis sanguíneos de ratos diabéticos, tratados com RSV, além de se observar a redução dos níveis de ROS no plasma e tecido pancreático em conjunto com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, catalase, GPx), reafirmando seu efeito antidiabético.

Outro possível mecanismo pelo qual o RSV medeia a neuroproteção é através da ativação da via sirtuina 1 (SIRT1), que desempenha um papel essencial na regulação do funcionamento celular pela desacetilação de substratos importantes em doenças neurodegenerativas, que por sua vez também inibe a ativação da via de sinalização NF- κ B, no qual através desta supressão, SIRT1 é também capaz de proteger os neurônios contra a toxicidade de β A (SOUZA *et al.*, 2020). Como o RSV mostrou que afeta a SIRT1, então é provável que possa ter efeitos benéficos em doenças afetadas por controle metabólico anormal, tais como na inflamação e em defeitos do ciclo celular (BERMAN *et al.*, 2017).

Outros estudos relacionados à neuroinflamação na DA, têm demonstrado que o RSV ativa a via antioxidante AMPk (Proteína quinase ativada por adenosina

monofosfato), mais conhecida como um sensor de estado de energia em células de vertebrados. Possui, ainda, a capacidade de suprimir a inflamação, através da inibição de de NF- κ B, prevenindo o estresse oxidativo (SOUZA, 2020).

As vias moleculares que regulam o envelhecimento estão sendo intensamente estudadas e demonstram que o envelhecimento por si só é geneticamente e farmacologicamente modificável em muitas espécies de animais de laboratório (normalmente com expectativa de vida e/ou saúde como pontos finais). Curiosamente, muitos, mas não todos, esses genes e vias implicam a sinalização da insulina e o metabolismo de glicose / energia (SAWDA *et al.*, 2017).

Incluídas entre essas vias estão as sirtuínas (em mamíferos SIRT1–7), uma família de desacetilases dependentes do dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NAD). Estão envolvidas também com o estado metabólico da célula, e regulam o metabolismo energético e a função mitocondrial (BERMAN *et al.*, 2017; WEISKIRCHEN, 2017). Esta via da SIRT1 faz a mediação de diferentes respostas ao estresse, em particular a inflamação que é uma causa muito importante do envelhecimento e doenças neurodegenerativas, como a demência (NAKAGAWA; GUARENTE, 2011; JÉSKO *et al.*, 2017

A via regulada pela SIRT1 afeta o metabolismo, a resistência ao EO, a sobrevida e senescência celular, a função imuno-inflamatória, funções endoteliais e ritmos circadianos. Sua expressão varia em condições fisiológicas, resultando em sua indução em estados de baixa energia e repressão durante estados de alta energia, como por exemplo, em jejum quando há um aumento da sua expressão, enquanto em dietas ricas em gordura ocorre uma redução de sua expressão (HOUTKOOPE; PIRINEN; AUWERX, 2016).

Com relação à DA, a superexpressão de SIRT1 no cérebro reduz as patologias da DA do SNC por meio de dois mecanismos. Em primeiro lugar, SIRT1 direciona a clivagem do precursor da proteína β amiloide (APP) para longe da produção de β A, ativando a α -secretase (clivando APP dentro da sequência de β A). Em segundo lugar, SIRT1 desacetila tau, visando assim sua ubiquitinação e clivagem proteossomal e reduzindo emaranhados (Guarente e Franklin, 2011). Em apoio a esta ideia, camundongos que superexpressam β A e SIRT1 demonstram uma carga amilóide do SNC diminuída (HAASS e SELKOE, 2007).

Por meio da ativação de SIRT1, o resveratrol pode proteger os neurônios de espécies reativas de oxigênio (ROS), radicais livres de peróxido de hidrogênio, NO, β A e outras toxinas intra e extracelulares associados a doenças neurodegenerativas (ALABANI *et al.*, 2010; ANEKONDA, 2006; GRAFF *et al.*, 2013)

De acordo com o estudo de Howitz *et al.*, (2003), o RSV pôde estender o tempo de vida de organismos inferiores pela ativação da família de proteínas sirtuínas (SIRT) implicada o controle do envelhecimento, e ainda pôde exercer efeitos neuroprotetores através da ativação de *Proteína quinase ativada por Monofosfato de Adenosina* (AMPk) (**Figura 12**). AMPk tem sido investigada como um fator chave com a capacidade de regulação metabólica do corpo todo, podendo também promover “turnover” mitocondrial, assim, aumentando a produção de energia em níveis otimizados com redução da geração de ROS pelas mesmas vias (CETRULLO *et al.*, 2015).

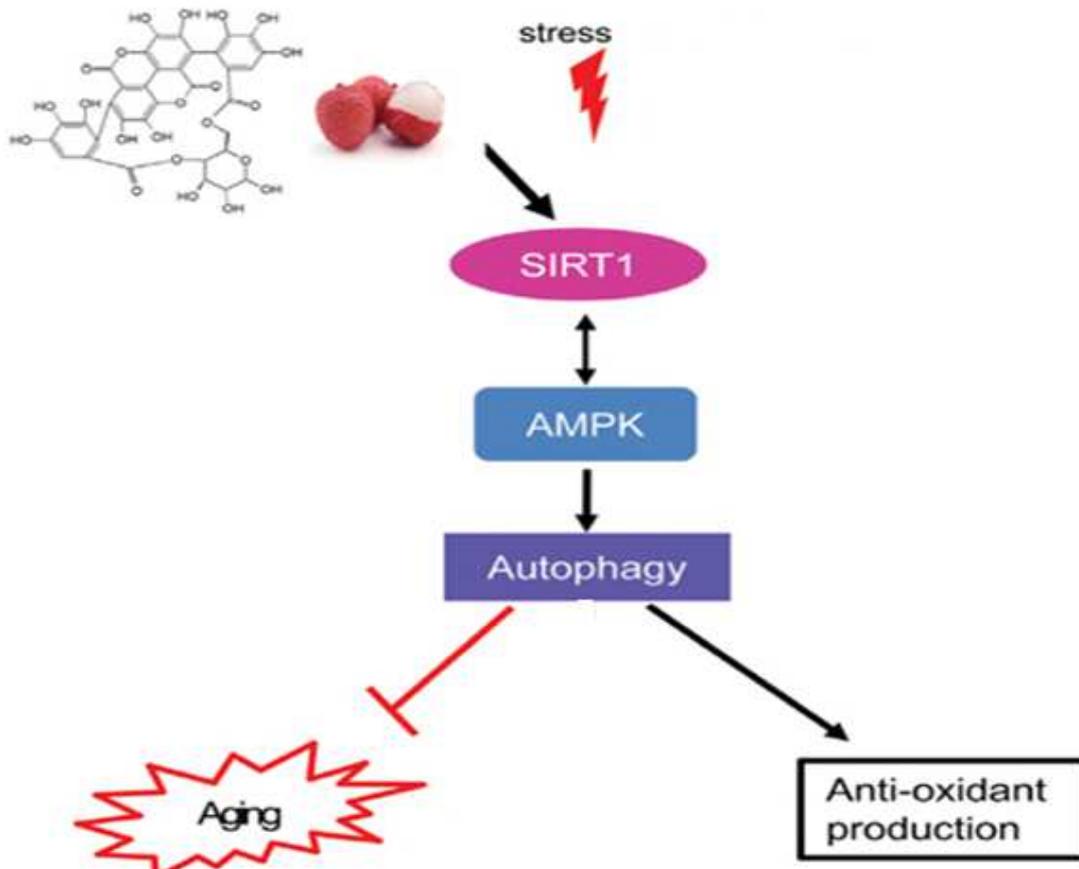


Figura 12: Atuação do antioxidante nas vias SIRT 1 e AMPk. Fonte: site researchgate.

A AMPk é um complexo heterotrímérico composto por uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ (GOWANS *et al.*, 2013). A via de

AMPk ativa vias catabólicas que fornecem rotas alternativas para gerar ATP enquanto inibe vias anabólicas e outros processos que consomem ATP que não são essenciais para a sobrevivência a curto prazo das células (HARDIE, 2014). Exemplos de processos catabólicos ativados pela AMPk são a entrada de glicose e ácidos graxos nas células, a glicólise e oxidação de ácidos graxos. Já os exemplos de processos anabólicos inibidos pela AMPk são a gliconeogênese, lipogênese, síntese de proteínas, síntese de ácidos nucléicos e formação de colesterol (HERZIG; SHAW, 2018; HARDIE, 2007; HARDIE, 2018).

Estudos têm demonstrado que a AMPk está envolvida na regulação da DA como um sensor metabólico celular. Por exemplo, ativação de AMPk pode melhorar o metabolismo de energia no cérebro e regular a clivagem da proteína precursora de amilóide (APP) pela inibição da expressão da enzima de clivagem de proteína precursora de amilóide (BACE1), de modo a reduzir a produção e acúmulo de β A (LU *et al.*, 2010). Além disso, AMPk pode regular a fosforilação de tau através da ativação de SIRT1. Portanto, AMPk, um importante regulador de metabolismo energético é um candidato atraente para DA.

O Resveratrol (RSV), portanto, tem sido um dos pioneiros quanto a sua ação anti-inflamatória e antioxidante, podendo atuar na neuroinflamação, ou até mesmo retardar tal fenômeno. Desta forma, podemos utilizá-lo com o intuito de entender seu mecanismo de ação, além, das possíveis vias metabólicas de atuação, em leucócitos dos idosos com a presença da Doença de Alzheimer. Assim, neste trabalho, avaliamos o efeito antioxidante *in vitro* do RSV em leucócitos de idosos com DA, e as possíveis vias metabólicas envolvidas neste efeito, AMPk e SIRT1. Como mencionado anteriormente, a DA pode acarretar ou surgir de uma neuroinflamação, por isso também avaliamos o efeito do RSV nas mesmas condições sobre citocinas pró e anti-inflamatórias. Além disso, neste trabalho foi possível comparar a funcionalidade com os parâmetros oxidativos e inflamatórios na DA, permitindo assim, uma análise mais profunda da relação da inflamação crônica subclínica e o declínio da funcionalidade observada nos idosos com DA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o estresse oxidativo e marcadores da inflamação crônica subclínica em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer e sua comparação com a funcionalidade, e o possível efeito modulador e/ou neuroprotetor do Resveratrol nesses marcadores.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliação da Viabilidade Celular através de MTT

Avaliar a viabilidade celular por ensaio de MTT.

Todos os experimentos foram realizados em Leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer, na ausência ou presença de RSV.

3.2.2 Avaliação dos compartimentos oxidativos e redutores

Avaliar a Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Avaliar a produção de Óxido Nítrico (NO).

Avaliar a produção de Peróxido Nitrito (ONOO⁻)

3.2.3 Avaliação da atividade enzimática

Avaliar a atividade da CAT

Avaliar a atividade da GPx

3.2.4 Avaliação de vias de sinalização na liberação de ROS

Avaliar a produção de ROS na ausência ou presença de inibidor de via de sinalização celular, Compound C: Inibidor de AMPk e Sirtinol: Inibidor específico da SIRT1.

3.2.5 Avaliação da liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias

Avaliar a concentração de IL6 e TNF em leucócitos de idosos sem e com DA.

Avaliar a concentração de IL 10 em leucócitos de idosos sem e com DA.

3.2.6 Avaliação da Capacidade Funcional em idosos sem e com Alzheimer e sua comparação com o estresse oxidativo e inflamação crônica subclínica (inflammaging) em leucócitos humanos

Avaliar as Atividades Básicas de Vida Diária (ABVDs) dos idosos com o instrumento de avaliação: Índice de Katz.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 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), Microscópio de Fluorescência (OLYMPUS IX70-SOFTWARE IMAGE PRO PLUS), Centrífuga de lâminas (EXCELSA 3400- FANEM), Centrífuga de eppendorfs (EXCELSA® II MODELO 206-BL-FANEM), Luminômetro (Berthold Lumat LB 9501), Capela (PERMUTION, E.J. Krieger, Cia LTDA), Balança semi analítica (MARTE), pHMETRO (Nalgon), Capela de fluxo laminar (VECO).

4.2 Reagentes

Resveratrol, Ácido Fosfórico 85%, Azul de Trypan, meio RPMI-1640 com L-GLUTAMINA E 25MM HEPES ISENTO DE BICARBONATO DE SÓDIO, gelatina de pele suína- tipo A, Dimetilsulfoxido (DMSO), Hidroxido de sódio, Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione*), MTT *3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide*), Paraformaldeído (PFA), Naftiletlenodiamida e 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). Telebrix 30 Meglumina foi obtido pela Guerbet. In solution™ AMPk Inhibitor, Compound C/Dorsomorphin foi obtido pela Calbiochem (Darmstadt, Germany). Finalmente, SIRT1 Inhibitor, Sirtinol foi obtido pela Tocris Bioscience (MN, USA).

4.3 Kits Comerciais

EnzyChrom™ Catalase Assay Kit (ECAT-100); GPx da Cayman; Human –IL10 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences; Human-IL6 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences; Human-TNF- α Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences.

4.4 Preparo das soluções

Leucopaque

Para o preparo da gelatina 3% foram pesados 3 gramas da gelatina, diluída em 100 mL de água deionizada. Posteriormente, foram feitas alíquotas de 40 mL dessa solução em tubos falcon. Para o preparo do Telebrix L, utilizou-se o volume todo do frasco de Telebrix puro que foi solubilizado em 16 mL de água deionizada. Posteriormente, foram feitas alíquotas de 20 mL dessa solução em tubos falcon. A junção dessas duas soluções (nos volumes alíquotados) resulta no Leucopaque.

Solução de H₂O₂ 150µM

Para solução estoque, 3 mL de H₂O₂ concentrado foi adicionado em 7 ml de água miliQ. Durante os experimentos, essa solução foi diluída a 10mM ou 1mM com solução tampão fosfato salina e magnésio (PBS). Posteriormente o conteúdo foi homogeneizado e adicionado em cada tratamento o volume necessário de acordo com a concentração padronizada.

Solução de RSV 80 µM

Para solução estoque, o conteúdo do frasco (100mg) foi diluído em 10 mL de DMSO. Esta solução (43.810µM) 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 80 µM.

Solução de 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.

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.

Meio de Cultura HANKS

Um frasco de HANKS foi diluído em 900 mL de água Mili-Q. Em seguida foram adicionados 0,35g 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 Sufanilamida 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 Sufanilamida 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.

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.

4.5 Seleção de Doadores

O projeto de pesquisa foi submetido à Plataforma Brasil e concomitantemente, ao Comitê de Ética (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no qual foi aprovado dentro das normas do comitê em questão com o número CAAE 14846619.7.0000.5149. A pesquisa de campo foi realizada na Instituição Plenitude - Casa Dia Hospedagem para Idosos, na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais. Para a análise experimental, a partir dos prontuários previamente preenchidos pelo médico responsável pelos idosos residentes, Dr Rafael Pacheco Terra (CRM:45302), foram selecionados indivíduos idosos (acima de 60 anos), de ambos os sexos, acometidos pela Doença de Alzheimer em qualquer nível, selecionados por uma triagem dos prontuários. Para compor o grupo-controle, foram selecionados idosos de ambos os sexos, também residentes na Instituição já mencionada. Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: fumantes, portadores de infecção, inflamação, malignâncias, desordens lipoproliferativas, aterosclerose, insuficiência cardíaca, uso de medicamentos que influenciassem diretamente na função imunológica. O controle (idosos sem Alzheimer) não deveria apresentar incapacidade cognitiva, independente da etiologia (depressão, doença mental ou delirium) e nem apresentar história familiar de depressão. Aqueles que estivessem aptos à participação, foram submetidos à assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). E os responsáveis pelos pacientes com a Doença de Alzheimer, assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE). O sangue foi coletado e levado para as análises bioquímicas do Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, situado no ICB, na UFMG.

As características demográficas da população em estudo estão ilustradas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Características demográficas da população do estudo.

| Parâmetros | Sem Alzheimer | | Alzheimer |
|-----------------------------------------------|---------------|----|---------------|
| | Média ± DP | | Média ± DP |
| Idade (anos) | 76,3 ± 7 | ns | 78 ± 5,4 |
| Índice de massa corporal (kg/m ²) | 23,4 ± 3 | ns | 25,5 ± 4 |
| Glicose sérica (mg/dL) | 102,6 ± 11,3 | ns | 105,6 ± 10,6 |
| Triglicerídeos séricos (mg/dL) | 164,3 ± 20 | ns | 153,5 ± 23 |
| Creatinina sérica (mg/dL) | 0,741 ± 0,17 | ns | 0,994 ± 0,169 |
| Complicações vasculares | Não | | Não |

ns = não significativo pelo teste de Mann-Whitney. Faixa de índice de massa corporal = 18,5–24,99 kg/m² (Martin McKee, 2000). Glicose sérica: valor normal inferior a 99 mg / dL (Alexandria et al., 2011). Triglicerídeos: níveis normais <150 mg / dL (American Heart Association, 2017). Creatina sérica: níveis normais de 0,5-1,5 mg / dL para homens e 0,6-1,2 mg / dL para mulheres (Koch., 2000). n = 10 grupo controle e n = 10 grupo Alzheimer.

4.6 Obtenção de Leucócitos de humanos

Em suma, 4 mL de sangue heparinizado foram adicionados sobre 3 mL de gradiente Leucopaque (densidade= 1,12) em tubos de vidro. Após a centrifugação a 2200 rpm por 15 minutos foram obtidas duas fases distintas separadas por dois anéis interfásicos, no qual, o plasma, correspondente à primeira fase formada após centrifugação, foi descartado. Os leucócitos foram acondicionados em um tubo de vidro, que teve seu volume completado com PBS para duas sessões de lavagem a 2200 rpm por 10 minutos cada. Logo após, as células foram ressuspensas 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.

4.7 Ensaio para Definição da concentração H₂O₂ utilizada no estudo

As concentrações de H₂O₂ utilizadas no estudo foram seguidas com base no estudo de Emamgholipour *et al.*, (2016). Os Leucócitos foram estimulados com concentrações crescentes de H₂O₂: 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M; 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M e 500 μ M, por 1 hora 37°C. O ensaio de MTT foi utilizado para conferir a viabilidade

celular e posteriormente foi realizado teste de Quimioluminescência para algumas das concentrações que apresentaram viabilidade celular dentro dos parâmetros aceitáveis (>70%).

4.8 Ensaio para Definição da concentração de RSV utilizada no estudo

A concentração de RSV (5 μM) escolhida para ser usada nos leucócitos foi baseada em uma Curva Dose-Concentração através de ensaio de MTT. As concentrações foram previamente escolhidas por estudos de Juan *et al.*, (2005), sendo: 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μM . A absorbância, a fim de verificar o potencial redutor do resveratrol nas células foi medida através da mudança na intensidade da coloração à 570 nm em Leitor de microplacas. A concentração escolhida foi a que apresentou um pico de absorbância e que esteve de acordo com a dosagem fisiológica descrita na literatura.

4.9 Ensaio de MTT

O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais denominadas succinato-desidrogenases, transformando um composto amarelo em um composto violeta (Formazan). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é viabilidade celular (MOSMANN, 1983). 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 2. Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 1 hora. Posteriormente, acrescentou-se 20 μL 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 100 μL de DMSO homogeneizando para dissolução dos cristais de formazan gerados. A absorbância foi lida a 570nm no leitor de microplacas.

Tabela 2: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de MTT em Leucócitos humanos

| | Célula (5x10⁵) | H₂O₂ (1mM) | RSV (80µM) | RPMI |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-------------|
| Placa de 96 poços Basal | 50 µL | | | 130 µL |
| H₂O₂ (150µM) | 50 µL | 27 µL | | 102,5 µL |
| H₂O₂ (150 µM)+ RSV (5 µM) | 50 µL | 27 µL | 11,25 µL | 91,75 µL |
| RSV (5 µM) | 50 µL | | 11,25 µL | 118,75 µL |

4.10 Ensaio de Quimioluminescência

Esta técnica baseia-se na reação entre luminol 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 ROS produzidas, passam a emitir a luminescência amplificada (SANTOS *et al.*, 2021).

Um total 1x10⁶ de leucócitos humanos de idosos foram divididos em quatro grupos (1x10⁶ células/grupo) com tratamentos diferentes, como descrito na tabela 3. Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 500µL de luminol 10⁻⁴M para completar o volume final de 700µL. 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-se novo tubo para leitura. O processo foi repetido em todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo.

Tabela 3: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em Leucócitos dos idosos

| | Célula (5x10⁶) | H₂O₂ (10mM) | RSV (80µM) | RPMI |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| Tubos Basal | 100 µL | | | 100 µL |
| H₂O₂ (150µM) | 100 µL | 10,5 µL | | 89,6 µL |
| H₂O₂ (150 µM)+ RSV (5 µM) | 100 µL | 10,5 µL | 43,75 µL | 45,75 µL |
| RSV (5 µM) | 100 µL | | 43,75 µL | 56,25 µL |

Foram realizados dois controles sem células (tratamentos descritos na tabela 4) no intuito de conferir se os H_2O_2 150 μM e o RSV 5 μM precisam da maquinaria celular para atuar ou podem reagir inespecificamente entre si e/ou com o Luminol. Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 500 μL de luminol 10^{-4}M para completar o volume final de 700 μL . 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-se novo tubo para leitura. O processo foi repetido em todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo. Para cada controle foram realizadas cinco corridas.

Tabela 4: Disposição dos grupos controles sem células no Ensaio de Quimioluminiscência em Leucócitos Humanos

| Tubos | H_2O_2 (10mM) | RSV (80μM) | RPMI |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|
| H_2O_2 (150μM) | 10,5 μL | | 189,5 μL |
| H_2O_2 (150 μM)+ RSV (5 μM) | 10,5 μL | 43,75 μL | 145,75 μL |

4.11 Ensaio para análise da concentração de Óxido Nítrico (NO) e Peroxinitrito (ONOO^-)

Foi avaliada a quantificação de nitrito segundo reação de Griess (GRIESS, 1864) para observar a produção de NO por Leucócitos no qual segue o seguinte protocolo: quatro grupos (1×10^6 células/grupo, tratamentos descritos na tabela 5) foram incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem do nitrito. Já o *pellet* foi ressuspenso em 100 μL de PBS.

Para dosagem do nitrito, foram utilizados 100 μL de sobrenadante, dispostos em placas de 96 poços. Aos sobrenadantes, foram adicionados 100 μL de solução de Griess, 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 540nm. A concentração de nitrito

foi calculada por regressão linear, utilizando-se a curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1 mM e meio de cultura RPMI.

A quantificação de ONOO^- foi avaliada de acordo com a técnica de *Hughes & Nicklin, 1996*. Para observar a produção desse oxidante pelos leucócitos humanos, o pellet foi ressuspensão em 500 μL de H_2O MilliQ e agitados em vórtex por 1 minuto. Tal conteúdo foi medido e quantificado em um espectrômetro de placa no comprimento de onda de 302 nm.

Tabela 5: Disposição dos grupos e seus tratamentos na análise de produção de NO e ONOO^- em Leucócitos

| Tubos | Célula (1×10^6) | H_2O_2 (1mM) | RSV (80μM) | RPMI |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|
| Basal | 100 μL | | | 200 μL |
| H_2O_2 (150μM) | 100 μL | 45 μL | | 155 μL |
| H_2O_2 (150 μM)+ RSV (5 μM) | 100 μL | 45 μL | 18,75 μL | 136,25 μL |
| RSV (5 μM) | 100 μL | | 18,27 μL | 181,25 μL |

4.12 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

As enzimas CAT e GPx foram dosadas através de kits específicos. Para isso, os leucócitos (1×10^6) foram previamente incubados por 1 hora de acordo com os tratamentos descritos na Tabela 6. Após esse período, as células foram centrifugadas a 4200 rpm por 2 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS frio. Esse processo foi repetido com o diferencial de que as células foram ressuspensas em tampão de lise frio (proveniente dos Kits). As células foram armazenadas por 10 min em gelo e centrifugadas por 20 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi coletado e deu-se início aos procedimentos descritos nos kits específicos usados para a dosagem das enzimas.

Tabela 6: Disposição dos grupos e seus tratamentos na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes em Leucócitos Humanos

| Tubos | Célula (1x10⁶) | H₂O₂ (1mM) | RSV (80µM) | RPMI |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-------------|
| Basal | 100 µL | | | 200 µL |
| H₂O₂ (150µM) | 100 µL | 45 µL | | 155 µL |
| H₂O₂ (150 µM)+ RSV (5 µM) | 100 µL | 45 µL | 18,75 µL | 136,25 µL |
| RSV (5 µM) | 100 µL | | 18,27 µL | 181,25 µL |

4.12.1. Catalase

O ensaio CAT da Bioassay (EnzyChrom™ Catalase Assay Kit (ECAT-100)) melhora as medidas diretas do ensaio da degradação de H₂O₂ pela CAT, utilizando-se um corante redox. A mudança na intensidade da cor a 570 nm é diretamente proporcional à atividade da CAT na amostra. Para isso, foram transferidos 10 µL da amostra ou do padrão (controle positivo, contendo CAT) em poços separados da placa de 96 poços. Adicionalmente, para cada corrida do ensaio foi preparado um poço de branco que continha 10 µL do tampão de ensaio. Posteriormente, adicionado 90 µL do substrato (H₂O₂ a 50 µM) a esses poços. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionados 100 µL de reagente de detecção (corante) por poço das amostras e do controle positivo. A placa foi novamente incubada por 10 minutos e seu conteúdo, analisado por leitor de microplacas. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

4.12.2 Glutathione Peroxidase

O ensaio GPx da Cayman mede a atividade da enzima de forma indireta, necessitando de uma reação acoplada com a Glutathione Redutase (GR). A Glutathione Oxidada (GSSG) produzida através da redução de hidroperóxido pela GPx é reciclada ao seu estado reduzido pela GR e por NADPH. A oxidação de NADPH para NADP⁺ é acompanhada por um aumento na absorvância a 340nm.

Para isso, foram transferidos 20 µL da amostra + 50 µL do tampão de ensaio + 50 µL de Co-substrato + 50 µL de NADPH em cada poço. Posteriormente, realizados os controles negativos e positivos, sendo o primeiro na ausência de amostra e o segundo com a troca para 20 µL de GPX presente no kit. Em seguida, foram

adicionados rapidamente 20 μL de Cumene Hidroperóxido em todos os poços e a absorbância foi lida a 340 nm nos primeiros 5 minutos. Os cálculos também foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

4.13 Quimioluminescência com inibidores da via de SIRT1 (Sirtinol) e de AMPk (Compound C)

A concentração dos inibidores Sirtinol e Dorsomorphin foi baseada na literatura. A concentração de 10 μM do Sirtinol foi baseada nos experimentos realizados por KOZAKO e colaboradores (2012) e a concentração de Compound C foi baseada nos experimentos realizados por BULDAK e colaboradores (2014).

Dois tipos de controles foram realizados nesse experimento. Controle sem células (tratamentos descritos na tabela 7), no intuito de conferir se os inibidores precisam da maquinaria celular para atuar ou podem reagir inespecificamente com o RSV e/ou o H_2O_2 . E controle com células (tratamentos descritos na tabela 2) com a finalidade de se comparar com os grupos com o inibidor para inferir sobre sua atuação.

Além dos grupos-controles, foi realizado o experimento com os grupos com o inibidor. 100 μL das células a 1×10^6 foram incubadas com 100 μL do inibidor (Sirtinol a 10 μM e Compound C a 20 μM) em banho-maria a 37°C por 30 minutos, ressaltando que os inibidores foram adicionados nos seus respectivos grupos, separadamente, em relação ao outro inibidor. Posteriormente, esses grupos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, o pellet foi descartado e os tratamentos foram adicionados (tabela 8).

Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 500 μL de luminol 10^{-4}M para completar o volume final de 700 μL . 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-se novo tubo para leitura. O processo foi repetido em todos os tubos. Foi realizada a média dos minutos de cada tubo.

Tabela 7: Disposição dos grupos controles com inibidor sem células e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência

| Tubos | Inibidor | H₂O₂ (1mM) | RSV (80µM) | RPMI |
|--------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------|
| H₂O₂ (150µM) | 100 µL | 30 µL | | 70 µL |
| H₂O₂ (150 µM)+ RSV (5 µM) | 100 µL | 30 µL | 12,5 µL | 57,5 µL |

Tabela 8: Disposição dos grupos com inibidor e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em Leucócitos Humanos

| Tubos | Célula (1x10⁶) | H₂O₂ (10mM) | RSV (80µM) | RPMI |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|-------------------|-------------|
| Basal | 100 µL | | | 200 µL |
| H₂O₂ (150µM) | 100 µL | 75 µL | | 125 µL |
| H₂O₂ (150 µM)+ RSV (5 µM) | 100 µL | 75 µL | 43,75 µL | 81,25 µL |
| RSV (5 µM) | 100 µL | | 43,75 µL | 156,25 µL |

4.14 Quantificação da produção de citocinas TNF, IL-6 e IL-10

Os leucócitos foram inicialmente incubados em banho-maria a 37°C por 24 horas na concentração de 1x10⁶, seguindo o padrão de análise com quatro grupos nos quais o tratamento encontra-se descrito na tabela x. Após esse tempo, 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 atividade das citocinas: Human –IL10 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences; Human-IL6 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences; Human-TNF- α 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.

Tabela 9: Disposição dos grupos e seus tratamentos na avaliação das citocinas em leucócitos humanos

| Tubos | Célula (1x10⁶) | H₂O₂ (10mM) | RSV (80µM) | RPMI |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| Basal | 100 µL | | | 100 µL |
| H₂O₂ (150µM) | 100 µL | 3,33 µL | | 96,67 µL |
| H₂O₂ (150 µM)+ RSV (5 µM) | 100 µL | 3,33 µL | 6,25 µL | 90,42 µL |
| RSV (5 µM) | 100 µL | | 6,25 µL | 93,75 µL |

4.15 Avaliação da Funcionalidade através do Índice de Katz

A capacidade funcional do idoso pode ser realizada por testes de rastreamento da funcionalidade, a partir das atividades básicas de vida diária – ABVD, avaliando-se, assim, seu grau de independência e autonomia.

Com o objetivo de avaliar a habilidade em desempenhar suas atividades cotidianas, as ABVD indicam se existe, independência ou dependência (parcial ou total) para sua realização. Deste modo, as atividades investigadas estão relacionadas com o banho, com o vestir, em como utilizar o banheiro, como controlar o esfíncter e como se alimentar) que de acordo com a pontuação recebe uma classificação quanto à funcionalidade, através de perguntas realizadas com os idosos ou seu cuidador. O instrumento pode apresentar adaptações de acordo com a classificação de sua dependência (moderada, alta) e independência. Sua pontuação varia de 0 a 6, onde 6 (pontuação máxima), expressa a total independência, e 0 (pontuação mínima), a total dependência (FERREIRA *et al.*, 2014)

4.16 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio 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. A comparação entre a funcionalidade e os parâmetros bioquímicos em níveis basais dos grupos sem e com a doença de Alzheimer foi realizada através do teste Mamm-Whitney. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas, utilizando-se o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (San Diego, California, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Padronização da concentração de H₂O₂ utilizada em Leucócitos Humanos

A utilização de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) para mimetizar um ambiente de estresse oxidativo é amplamente utilizada em diversos estudos. As concentrações de H₂O₂ podem variar conforme a célula utilizada, a metodologia empregada e o período de exposição. Assim, é de extrema importância avaliar qual concentração deve ser utilizada em cada estudo. No contexto do nosso estudo, avaliamos o efeito da exposição de leucócitos humanos em 8 concentrações de Peróxido de Hidrogênio (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500 µM), durante uma hora, sobre a viabilidade celular, através do ensaio colorimétrico de MTT. Essas concentrações foram escolhidas com base no trabalho de EMAMGHOLIPOUR *et al.*, (2016). Observa-se na **Figura 13A** que os leucócitos permaneceram com viabilidade acima de 80% em todas as concentrações avaliadas (0-500 µM). Assim, após confirmarmos que nenhuma das concentrações testadas afetava significativamente a viabilidade celular, procuramos verificar se algumas destas concentrações eram capazes de criar um ambiente de estresse oxidativo. Foram avaliados os níveis de produção de ROS pelo ensaio de quimioluminescência as concentrações de 50 µM, 150 µM e 250 µM. É possível observar na **Figura 13B** que as concentrações de 150 µM e 250 µM induziram um aumento na produção de ROS de forma significativa em relação ao controle (0µM). Entretanto, apesar de não termos observado diferenças significativas entre as concentrações de 150 µM vs 250 µM, verificamos que esta última apresentou um declínio na produção de ROS, o que nos fez optar pela concentração de 150µM para a realização dos demais ensaios deste estudo.

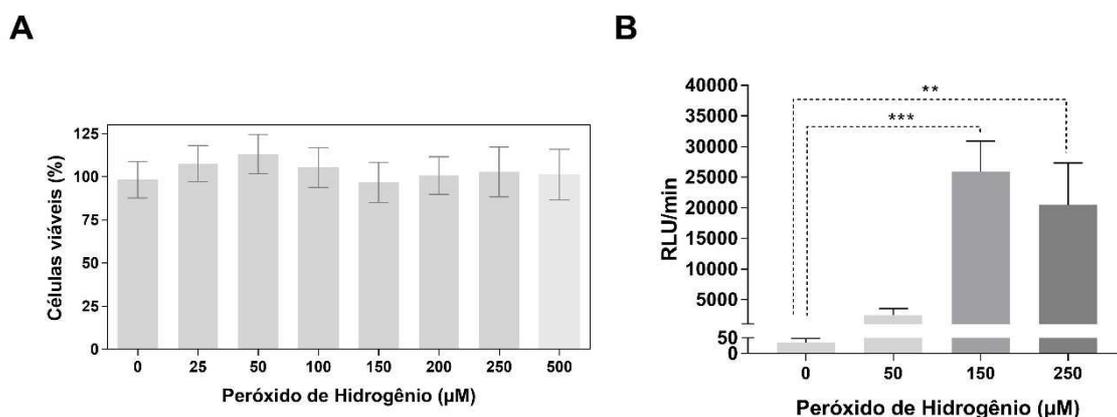


Figura 13: Padronização da concentração de H₂O₂. (A) Viabilidade celular de leucócitos humanos estimulados com diferentes concentrações de H₂O₂. Os leucócitos foram estimulados com concentrações crescentes de H₂O₂ por 1 hora (0 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM e 500 µM) e a viabilidade dos mesmos foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT. De acordo com a ISO10993-5, para ser considerado viável, as células devem apresentar pelo menos 70% de viabilidade. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração (n=15). (B) Avaliação da produção de ROS induzida por H₂O₂ através do ensaio de Quimioluminescência. A geração de ROS foi expressa em RLU/min durante 10 minutos. Sendo **p<0,01 e ***p<0,001 resultado significativo seguindo o teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=6).

5.2. Padronização da concentração de RSV utilizada em Leucócitos Humanos através de Curva Dose – Concentração

A concentração de resveratrol utilizada nos ensaios foi definida através do ensaio de metabolização do MTT. Como demonstrado na **Figura 14** - Curva de Dose-Concentração, entre as concentrações testadas, 5µM apresentou maior capacidade de metabolização do MTT, com maior pico de absorvância. Essa concentração está de acordo com estudos da literatura, correspondendo a níveis celulares fisiológicos após a ingestão de diferentes concentrações de *trans*-resveratrol, que variam de 25-500 mg/dia (KURSVIETIENE *et al.*, 2016; RAMÍREZ-GARZA *et al.*, 2018). Portanto, esta foi a concentração de escolha para os demais ensaios deste estudo.

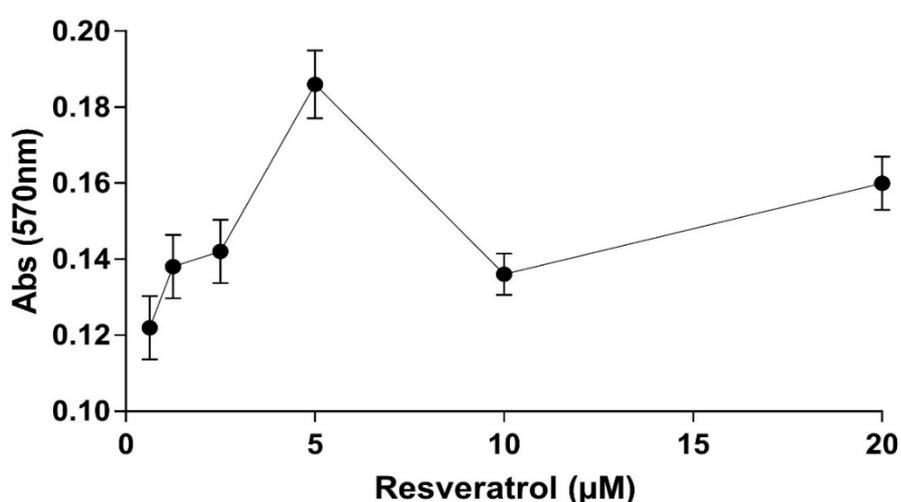


Figura 14: Curva Dose-Concentração de Resveratrol em Leucócitos Humanos. Os leucócitos foram estimulados por concentrações crescentes de resveratrol (0,63 µM; 1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM e 20 µM) e a absorvância foi medida por mudança na intensidade da coloração à 570 nm em leitor de microplacas através do ensaio de MTT. A concentração

escolhida foi 5 μM , a qual apresentou um pico de absorvância e corresponde a dosagem fisiológica. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração ($n=8$).

5.3. Viabilidade dos Leucócitos aos tratamentos

O ensaio de MTT também foi usado para avaliar a viabilidade dos leucócitos frente aos diferentes tratamentos. Vale ressaltar que o ensaio foi realizado num período de 24h, sendo este o tempo máximo de tratamento dos diferentes experimentos do nosso estudo. Os leucócitos, neste ensaio, foram expostos ao RSV e ao H_2O_2 , simultaneamente, mimetizando todos os outros experimentos do nosso trabalho. Em geral, a **Figura 15** e **Tabela 10** mostram que nenhum tratamento afetou a viabilidade celular. Os leucócitos permaneceram com valores de viabilidade acima de 70% para todos os grupos avaliados (sem e com Alzheimer). Segundo a ISO 10993-5, a redução da viabilidade celular em mais de 30% (ou seja, viabilidade abaixo de 70%) é considerada um efeito citotóxico para células aos compostos naturais. Portanto, as condições de tratamento estão de acordo com os padrões internacionais para estudo (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

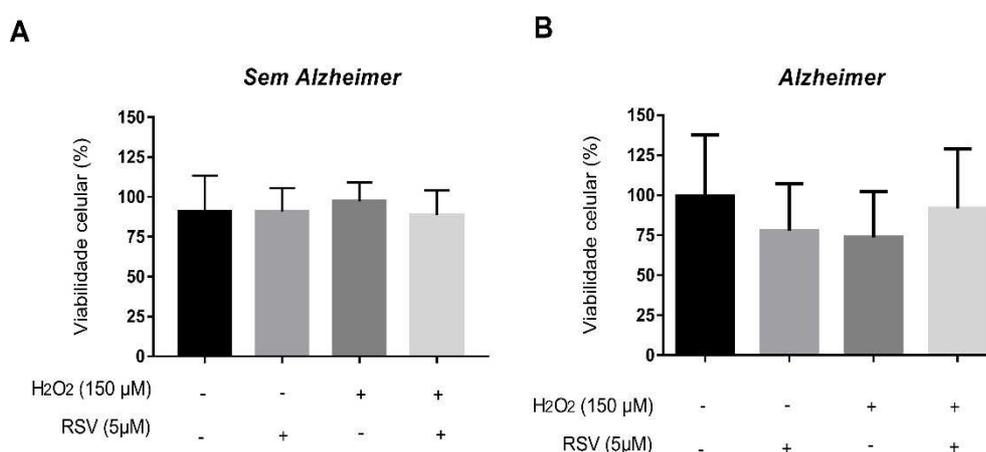


Figura 15: Viabilidade dos leucócitos isolados de doadores sem e com Alzheimer através do ensaio de MTT. Os leucócitos (5×10^3 /poço) foram adicionados em placa de 96 poços e incubados por 1h ou 24h com resveratrol (5 μM) e/ou H_2O_2 (150 μM). Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células viáveis \pm desvio padrão. Os experimentos foram realizados em triplicata/poço ($n=6$ /grupo). As células se mantiveram com viabilidade $> 70\%$ e não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Tabela 10: Viabilidade dos leucócitos isolados de doadores sem e com a Doença de Alzheimer através do ensaio de MTT

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | Alzheimer (A) Média ± DP |
|----------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------|
| Célula + Meio | 90,64 ± 10,16 | 99,31 ± 22,23 |
| Célula + RSV | 90,87 ± 6,58 | 77,64 ± 17,01 |
| Célula + H ₂ O ₂ | 97,18 ± 5,38 | 73,64 ± 16,52 |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 88,54 ± 6,92 | 91,67 ± 21,61 |

Viabilidade celular através do ensaio MTT. Os leucócitos obtidos dos doadores com ou sem Alzheimer foram expostos aos seguintes tratamentos: Basal, H₂O₂ (150µM) e/ou RSV (5µM) por 24h. Sem Alzheimer (n=9); Alzheimer (n=6). ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

5.4. Efeito do RSV em idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Após a definição das concentrações de H₂O₂ e de resveratrol e comprovada a viabilidade celular, foi realizado ensaio de quimioluminescência em leucócitos de indivíduos, sem e com Alzheimer, para verificar comparativamente a capacidade antioxidante do resveratrol. O primeiro passo foi avaliar se o H₂O₂ e o resveratrol necessitam da célula para reagir ou se essa reação ocorre de forma inespecífica. Os resultados obtidos na **Tabela 11** mostram que houve diferença estatística na produção de ROS comparando os controles sem e com células tratadas com H₂O₂ e resveratrol. Ou seja, mecanismos celulares são necessários para promover sua atividade, uma vez que a produção de ROS sem a presença de células está abaixo dos valores obtidos quando se utilizam H₂O₂ e resveratrol em leucócitos.

Tabela 11: Efeito Comparativo de RLU/min na presença e ausência de células do Ensaio de Quimioluminescência

| Tratamento | Sem células Média ± DP | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | Alzheimer (A) Média ± DP |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| H ₂ O ₂ | 58,54 ± 5,78 | | |
| H ₂ O ₂ + RSV | 14,34 ± 2,21 | | |
| H ₂ O ₂ | | 13.791±1.245**** | 3.367±456**** |
| H ₂ O ₂ + RSV | | 1.640± 178#### | 968± 42#### |

**** Diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo H₂O₂ 150 µM sem célula e #### diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo H₂O₂ (150µM) + RSV(5µM) sem célula através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo). Sem Alzheimer (n = 10); Alzheimer (n = 8). Os controles sem células foram realizados em quintuplicata.

Quando os leucócitos do grupo sem Alzheimer (**Figura 16 - Painel A**) foram expostos isoladamente ao H₂O₂, houve um aumento de aproximadamente 3.055% na produção de ROS em relação ao grupo sem nenhum estímulo e ao ser adicionado RSV no mesmo ambiente mimetizado, a geração de ROS foi reduzida de forma significativa (88%).

Quanto à análise dos leucócitos dos idosos com Alzheimer (**Figura 16 - Painel B**), ao serem expostos de forma isolada ao H₂O₂ ocorreu um aumento de aproximadamente 196% na produção de ROS em relação ao grupo sem nenhum estímulo, o que se modificou com a adição de RSV, fazendo com que ROS reduzisse em 71% em relação aos leucócitos estimulados com H₂O₂.

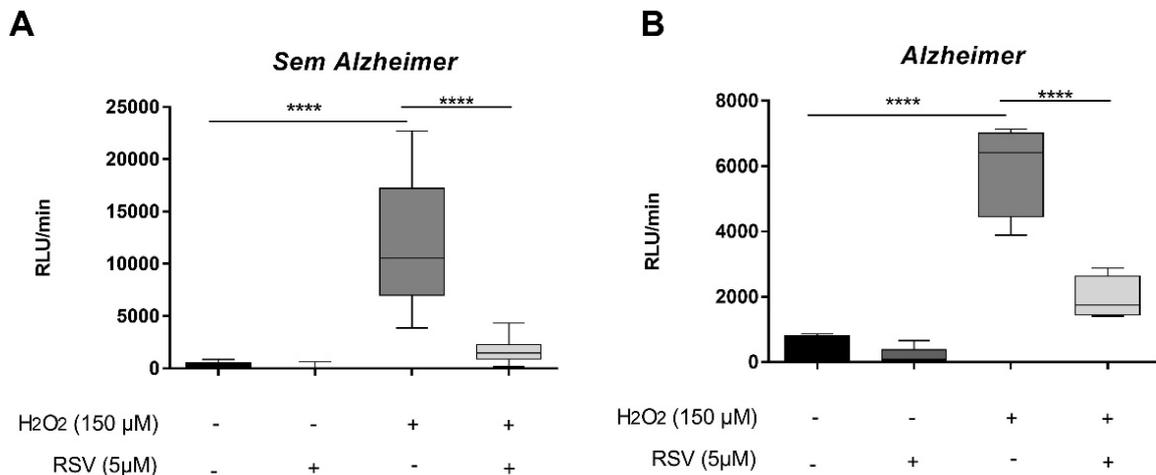


Figura 16: Avaliação do efeito do RSV na produção de ROS em leucócitos humanos induzidos por H₂O₂. Painel A= Idosos sem Alzheimer (n=8); Painel B = Idosos com Alzheimer (n=6). A geração de ROS foi expressa em RLU/min. Sendo ****p< 0,0001. ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

Ao fazermos uma análise comparativa, verificamos que, em condições basais, os leucócitos de doadores com Alzheimer foram capazes de produzir 160% a mais de ROS do que leucócitos de doadores sem Alzheimer. Nas mesmas condições verificamos que mesmo com o tratamento com resveratrol, os leucócitos de doadores com Alzheimer apresentaram 827% a mais na produção de ROS, comparado ao grupo sem Alzheimer. Ao analisarmos em condições de estresse oxidativo, mimetizado pelo estímulo com H₂O₂, verificamos, novamente, menor efeito do RSV em doadores com Alzheimer (40%) em comparação com os sem Alzheimer (**Tabela 12**).

Tabela 12: Efeito Comparativo do RSV em leucócitos de doadores sem e com a Doença de Alzheimer do Ensaio de Quimioluminescência

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP RLU/min | % | Alzheimer (A) Média ± DP RLU/min | % | % A/SA |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------------------------|-------|-----------|
| Célula + Meio | 437,00 ± 56 | | 1.137 ± 114 | | 160 ↑ |
| Célula + RSV | 46,25 ± 5,8 | | 429 ± 67 | | 827 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 13.791 ± 1.245**** | *3.055↑ | 3.367 ± 456**** | *196↑ | 75 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 1.640 ± 178#### | #88↓ | 968 ± 42#### | #71↓ | 40 ↓ |

**** Diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo Célula+Meio e #### diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo Célula+H₂O₂ (150 μ M), através do teste de normalidade Kolmogorov –Smirnov. ANOVA one way e pós –teste Dunnet. Sem Alzheimer (n = 10); Alzheimer (n = 8). As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

5.5. Efeito do RSV na modulação das vias SIRT1 e AMPk nos idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Prosseguindo nosso estudo, avaliamos duas vias de sinalização (SIRT1 e AMPk) que segundo muitos estudos, como mencionado anteriormente, modulam a ação antioxidante do resveratrol, assim como se comportam ao longo do processo de envelhecimento e suas comorbidades. Conforme citado nos materiais e métodos, o comportamento dessas vias foi analisado através do ensaio de quimioluminescência com ausência e presença de seus respectivos inibidores. Inicialmente, para verificarmos se o sirtinol (inibidor da via da SIRT1) ou o compound C (inibidor da via da AMPk) necessitam da maquinaria celular ou se reage de forma inespecífica com H₂O₂ e/ou com o resveratrol, também foram realizados experimentos na ausência e presença dos leucócitos, ilustrados na **Tabela 13**. De forma geral, podemos observar que houve diferença estatística em todos os grupos com célula e inibidor quando comparado aos grupos ausentes de células. Portanto, reafirmamos que mecanismos celulares são necessários para promover uma resposta significativa neste ensaio.

Tabela 13: Comparação sem e com células no ensaio de quimioluminescência com inibidores em leucócitos de doadores sem e com a Doença de Alzheimer.

| Tratamento | RLU/min (Média \pm DP) | | |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| | <i>Sem células</i> | <i>Sem Alzheimer</i> | <i>Alzheimer</i> |
| Sirtinol + H ₂ O ₂ | 81,33 \pm 9,81 | | |
| Sirtinol + H ₂ O ₂ + RSV | 61,63 \pm 0,24 | | |
| Sirtinol + H ₂ O ₂ + células | | 16.796 \pm 2.376#### | 3.102 \pm 1.122## |
| Sirtinol + H ₂ O ₂ + RSV + células | | 1.640 \pm 178### | 268 \pm 42#### |
| Comp. C+ H ₂ O ₂ | 142,30 \pm 17,11 | | |
| Comp. C + H ₂ O ₂ + RSV | 503,5 \pm 115,2 | | |
| Comp. C + H ₂ O ₂ + célula | | 19.345 \pm 1.268#### | 36.114 \pm 1.895#### |
| Comp. C + H ₂ O ₂ + RSV + células | | 1.640 \pm 178#### | 968 \pm 42## |

**** Diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao respectivo grupo sem célula e #### diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao respectivo grupo sem célula através do teste

de normalidade Kolmogorov –Smirnov. ANOVA one way e pós –teste Dunnett. Sem Alzheimer (n =8); Alzheimer (n = 8). Os controles sem célula foram realizados em quintuplicata.

5.5.1 Efeito do RSV sobre a via de sinalização de SIRT 1

Desta forma, os leucócitos de ambos os grupos dos idosos já supracitados foram estimulados com RSV e H₂O₂, de forma isolada e em conjunto, além, do inibidor da via de SIRT1, sirtinol.

Como podemos observar na **Figura 17**, ilustrados na **Tabela 14**, percebe-se que quando os leucócitos do grupo sem Alzheimer (Painel A) foram expostos isoladamente ao H₂O₂, houve um aumento significativo na produção de ROS (3.055%) em relação ao grupo sem nenhum estímulo. Já ao ser adicionado RSV no mesmo ambiente mimetizado (presença de H₂O₂, a geração de ROS foi reduzida de forma também significativa (88%) em relação aos leucócitos somente estimulados com H₂O₂.

Ainda em relação ao grupo sem a presença de DA (Painel A), quando os leucócitos foram tratados com o inibidor sirtinol e posteriormente estimulados com H₂O₂, observou-se um aumento na produção de ROS, de forma significativa (22%), ao ser comparado com o grupo estimulado exclusivamente com H₂O₂. E quando os leucócitos foram tratados com sirtinol e posteriormente expostos ao RSV e H₂O₂ percebeu-se uma redução significativa de aproximadamente 81% na produção de ROS, ao ser comparado com o grupo tratado com sirtinol e posteriormente estimulado com H₂O₂.

Quanto ao grupo com a presença de DA (Painel B), inicialmente este manteve um padrão similar em relação ao grupo sem a doença. Foi possível observar, nos níveis de ROS, um aumento significativo em sua produção (196%) ao estimularmos os leucócitos com H₂O₂, quando comparado com o grupo basal – sem nenhum estímulo. No grupo tratado com RSV e estimulado com H₂O₂, houve uma redução (92%) na produção de ROS nas células quando comparadas às células somente estimuladas com H₂O₂.

Neste mesmo grupo com Alzheimer observou-se uma redução de ROS de forma significativa de em média 8%, quando as células foram tratadas previamente com sirtinol e posteriormente estimuladas com H₂O₂, ao ser comparado com o grupo que recebeu apenas H₂O₂. Nos leucócitos tratados com sirtinol (10µM) e

posteriormente estimulados com RSV e H₂O₂ observamos também uma redução na produção de ROS, nestas células, de aproximadamente 80%, o mesmo padrão observado nos leucócitos dos doadores sem a presença de DA.

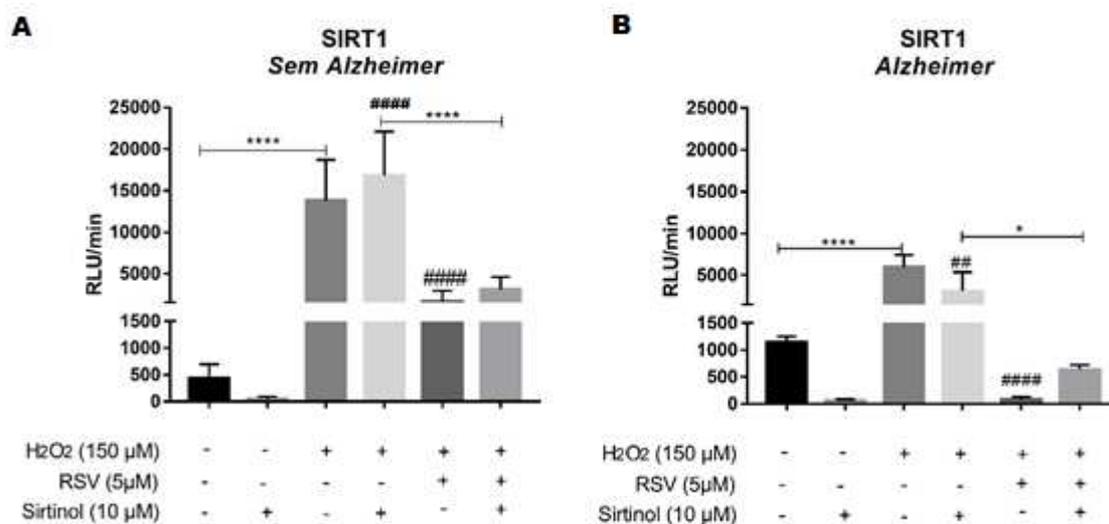


Figura 17: Avaliação comparativa do RSV sobre a via SIRT1 na produção de ROS em leucócitos sem e com DA. Painel A = Idosos sem Alzheimer (n=8); Painel B = Idosos com Alzheimer (n=8). Resultados significativos por ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey comparado às células que não foram expostas ao RSV. Sendo ****p < 0,0001; * p < 0,05 e ##### p < 0,0001; ## p < 0,001 referente ao grupo H₂O₂.

Ao compararmos ambos os grupos de acordo com o inibidor da via SIRT1 (sirtinol-10 μM), percebe-se que os leucócitos dos doadores com Alzheimer apresentam uma produção de ROS 44% maior quando estimulados apenas com sirtinol; ainda, uma redução de aproximadamente 81% de ROS, quando os leucócitos são expostos com H₂O₂ e sirtinol, além, de uma redução de 79% na produção de ROS no grupo das células estimuladas com H₂O₂ e sirtinol, e tratado com RSV.

Tabela 14: Efeito Comparativo do RSV pelo Ensaio de Quimioluminescência com inibidor da via SIRT1 em leucócitos sem e com a Doença de Alzheimer.

| Treatamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % | % A/SA |
|-------------|----------------------------------|---|-----------------------------|---|-----------|
| | | | | | |

| | | | | | |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|------|
| Célula + Meio | 437,00 ± 56 | | 1.137 ± 114 | | 160↑ |
| Célula + Sirtinol | 247,20 ± 17,09 | | 356,28 ± 14,01 | | 44↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 13.791 ± 1245 ^{aaaa} | ^a 3.055 ↑ | 3.367 ± 456 ^{aaaa} | ^a 196 ↑ | 75 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + Sirtinol | 16.796 ± 2.376 ^{bbbb} | ^b 22↑ | 3.102 ± 1.122 ^{bb} | ^b 8↓ | 81↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 1.640 ± 178 ^{bbbb} | ^b 88↓ | 268 ± 42 ^{bbbb} | ^b 92↓ | 83↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV + Sirtinol | 3.068 ± 536 ^{cccc} | ^c 81↓ | 637,9 ± 40,81 ^c | ^c 80↓ | 79↓ |

Avaliação comparativa do RSV sob a via SIRT1 na produção de ROS em leucócitos na presença ou ausência de DA. Sendo: ^{aaaa}(p<0,0001) e vs Célula+Meio; ^{bbbb}(p<0,0001) e ^{bb}(p<0,01) vs Célula+H₂O₂; ^{cccc}(p<0,0001) e ^c(p<0,05) vs Célula+H₂O₂+Sirtinol através do teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey comparado às células que não foram expostas ao RSV. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (a, b, c).

5.5.2. Efeito do RSV sobre a via de sinalização de AMPk

De maneira similar, também avaliamos o efeito do RSV sobre a via de sinalização de AMPk, utilizando RSV e H₂O₂, porém, com o Inibidor de AMPk (Compound C).

De acordo com a **Figura 18** ilustrados na **Tabela 15**, quando os leucócitos do grupo sem Alzheimer (Painel A) foram expostos isoladamente ao H₂O₂, houve um aumento significativo na produção de ROS (3.055%) em relação ao grupo sem nenhum estímulo. Ao ser adicionado RSV e expostas estas células ao H₂O₂, a geração de ROS reduziu de forma também significativa (88%) em relação aos leucócitos previamente estimulados somente com H₂O₂.

Ainda no mesmo grupo, quando o inibidor da via AMPk (compound C) foi adicionado juntamente com H₂O₂ (150µM), observou-se um aumento significativo na produção de ROS de aproximadamente 40%, quando comparado com o grupo estimulado exclusivamente com H₂O₂. Entretanto, quando os leucócitos foram previamente tratados com o inibidor de AMPk (compound C) e posteriormente estimulados com RSV e H₂O₂, percebeu-se uma redução (não significativa) na produção de ROS comparando-se o grupo estimulado com o grupo tratado com o inibidor compound C e estimulado com H₂O₂.

Quanto ao grupo com Alzheimer (Painel B), houve um aumento significativo na produção de ROS nos leucócitos estimulados com H₂O₂ de em média 196%, comparativamente ao grupo basal. Observamos ainda uma redução significativa nos níveis de produção de ROS ao tratarmos os leucócitos dos pacientes com DA com RSV e estimulados com H₂O₂, comparados aos leucócitos somente estimulados com H₂O₂ de aproximadamente 71%.

Percebeu-se, ainda, no mesmo grupo (com Alzheimer), de forma similar ao grupo sem DA, um aumento significativo na produção de ROS nos leucócitos expostos ao inibidor compound C (20µM) e estimulados com H₂O₂ (972%), em relação ao grupo que foi exposto apenas ao H₂O₂. Porém, ao estimularmos os leucócitos dos doadores com DA com o inibidor de AMPk (compound C) e posteriormente tratá-los com RSV e estimulá-los com H₂O₂, observamos uma redução significativa dos níveis de ROS (68%) comparados aos leucócitos com a via inibida e expostos posteriormente ao H₂O₂, assim, como ocorrido no grupo sem a patologia.

Porém, o que os diferenciou neste caso, foi o aumento significativo na produção de ROS (1.066%) nos leucócitos do grupo estimulado com os três componentes (compound C, RSV e H₂O₂), quando comparado ao grupo estimulado com apenas RSV e H₂O₂. Deste modo, a capacidade antioxidante do resveratrol foi reduzida no grupo dos idosos com Alzheimer quando a via AMPk foi inibida, ou seja, esta via de sinalização se apresenta como antioxidante no grupo de idosos com Alzheimer, neste estudo em particular.

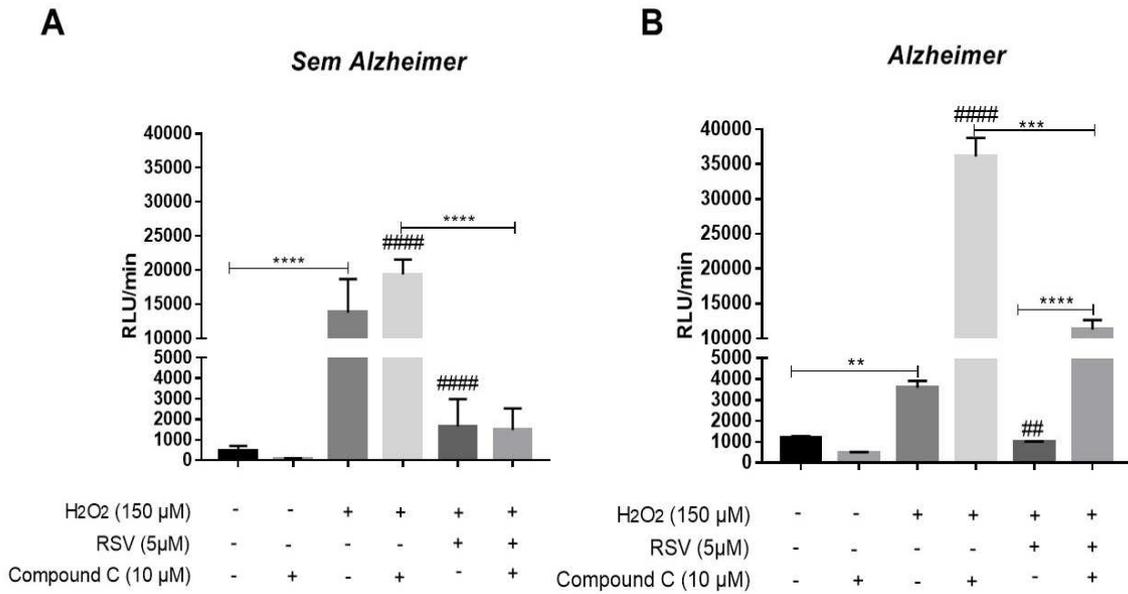


Figura 18: Avaliação comparativa do RSV sob a via AMPk na produção de ROS em leucócitos sem e com a DA induzida por H₂O₂. Painel A = Idosos sem Alzheimer (n=8); Painel B = Idosos com Alzheimer (n=8). ANOVA teste, seguido pelo pós-teste de Tukey comparado às células que não foram expostas ao RSV. Sendo ****p <0.0001; ***p <0,001; ** p<0,01 e ##### p<0,0001; ## p<0,001 referente ao grupo H₂O₂.

Ao compararmos os dois grupos de acordo com o inibidor da via AMPk (compound C 20 μM), percebe-se que os leucócitos dos doadores com Alzheimer apresentam uma produção 215% maior de ROS quando estimulados apenas com compound C, um aumento de aproximadamente 87% de ROS quando os leucócitos são expostos com H₂O₂ e compound C, um aumento de 667% no grupo das células estimuladas com H₂O₂ e compound C, além de ser tratado com RSV.

Tabela 15: Efeito Antioxidante do RSV pelo Ensaio de Quimioluminescência com inibidor da via AMPk

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) | % | Alzheimer (A) | % | % A/SA |
|---------------------|--------------------|---|---------------|---|--------|
| | Média ± DP | | Média ± DP | | |
| Célula + Meio | 437,00 ± 56 | | 1.137 ± 114 | | 160↑ |
| Célula + Compound C | 146,25 ± 17,09 | | 462 ± 33,5 | | 215 ↑ |

| | | | | | |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------------|------|
| Célula + H ₂ O ₂ | 13.791 ± 1.245 ^{aaaa} | ^a 3.055↑ | 3.367 ± 456 ^{aa} | 196↑ | 75 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + Compound C | 19.345 ± 1.268 ^{bbbb} | ^b 40↑ | 36.114 ± 1.895 ^{bbbb} | 972↑ | 87↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 1.640 ± 178 ^{bbbb} | ^b 88 ↓ | 968 ± 42 ^{bbbb} | 71↓ | 40 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV + Compound C | 1.471 ± 33,45 ^{cccc} | ^c 10 ↓ | 11.288 ± 954 ^{cccc} ### | ^c 1.066↑ #68%↓ | 667↑ |

Avaliação comparativa do RSV sob a via AMPk na produção de ROS em leucócitos na presença ou ausência de DA. Sendo: ^{aaaa}(p<0,0001) e vs Célula+Meio; ^{bbbb}(p<0,0001) vs Célula+H₂O₂; ^{cccc}(p<0,0001) vs Célula+H₂O₂+Compound C; ^{###}(p<0,001) vs Célula+H₂O₂+Compound C+RSV através do teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey comparado às células que não foram expostas ao RSV. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (a, b, c, #).

5.6. Efeito do RSV na concentração de NO em leucócitos de idosos sem ou com a presença da Doença de Alzheimer

Após verificarmos que o RSV apresentou uma ação limitada em leucócitos dos doadores com DA na produção de ROS, tanto na condição basal, quanto na produção de leucócitos, quando comparados com os doadores sem DA, nosso próximo passo foi avaliar a produção de óxido nítrico (NO), visto que esta molécula tem importância como preditor de condição tanto anti como pró-oxidante. Assim, os leucócitos humanos foram estimulados de acordo com os tratamentos expostos na **Tabela 16**. Os resultados estão ilustrados na **Figura 19**.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com RSV foi capaz de aumentar significativamente a produção de NO em leucócitos de doadores sem Alzheimer em ambas as condições: não estimulada (75%) e estimulada com H₂O₂

(150 μ M) (230%). Quando avaliamos os leucócitos de doadores com Alzheimer, nossos resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos avaliados.

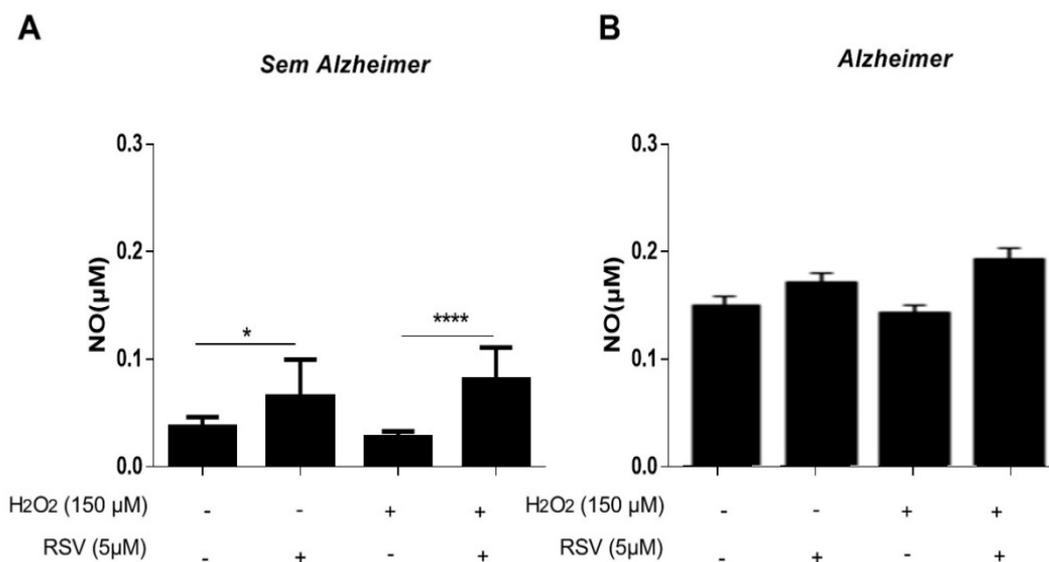


Figura 19: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em Leucócitos. Painel A: Idosos sem Alzheimer (n=8); Painel B: Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de NO foi expressa em μ M. ANOVA teste, seguido pelo pós-teste de Tukey. Sendo **** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$.

Além disso, quando comparamos a produção de NO entre os dois grupos (com e sem DA), verificamos que os leucócitos dos doadores com DA foram capazes de produzir uma quantidade maior de NO em todas as condições do estudo, sendo que, no grupo basal observamos um aumento de aproximadamente 308%. Na presença de RSV (5 μ M), houve um aumento em média de 2740%, além, de um aumento de 115%, quando as células foram expostas ao H₂O₂ e RSV.

Tabela 16: Análise comparativa de NO entre os idosos sem e com a Doença de Alzheimer e o efeito do RSV

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média \pm DP | % | Alzheimer (A) Média \pm DP | % A/SA |
|----------------------------------------|--------------------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------|
| Célula + Meio | 0,037 \pm 0,003 | | 0,151 \pm 0,026 | 308 \uparrow |
| Célula + RSV | 0,065 \pm 0,021* | *75 \uparrow | 0,173 \pm 0,025 | 2740 \uparrow |
| Célula + H ₂ O ₂ | 0,027 \pm 0,002 | | 0,142 \pm 0,018 | 425 \uparrow |

| | | | | |
|----------------------------------------------|-------------------|--------|---------------|-------|
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 0,089 ± 0,017#### | #230 ↑ | 0,192 ± 0,012 | 115 ↑ |
|----------------------------------------------|-------------------|--------|---------------|-------|

Avaliação comparativa de NO e o efeito do RSV em leucócitos de Idosos sem Alzheimer (n=8) e com Alzheimer (n=8). Sendo *p <0,05 vs Célula+Meio e #### p<0,0001 vs Célula+H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

5.6.1 Efeito do RSV nos níveis de NO sobre as vias SIRT1 e AMPk em leucócitos de idosos sem e com a presença da Doença de Alzheimer

Com o intuito de quantificar a dosagem de NO e analisar o efeito do RSV de acordo com a vias estudadas (SIRT1 e AMPk), para, em seguida, realizar a comparação existente entre os grupos estudados, com presença e ausência da Doença de Alzheimer, utilizamos o inibidor sirtinol e compound C, cujos dados estão apresentados na **Figura 20**.

De acordo com o painel abaixo, podemos observar que no grupo sem Alzheimer a dosagem de NO nos leucócitos além do aumento já demonstrado na **Tabela 17** observamos um aumento de 1000%, quando as células foram estimuladas com H₂O₂ (150µM) e o inibidor da via AMPk (compound C - 20 µM), comparativamente ao grupo exposto somente com H₂O₂. Percebemos um aumento significativo na produção de NO quando o grupo foi estimulado com a tríade (H₂O₂, RSV e o inibidor compound C) de aproximadamente 245%, quando comparado com o grupo estimulado com os mesmos componentes, exceto o inibidor.

Quanto ao grupo com Alzheimer, ao realizar a mesma avaliação, percebe-se que não houve diferença significativa na produção de NO, quando comparamos o grupo tratado com RSV e posteriormente exposto ao H₂O₂ em relação ao grupo exposto apenas com H₂O₂. Como ocorrido com o grupo sem a doença, nos leucócitos expostos ao inibidor de AMPk (compound C) e H₂O₂, observamos um aumento significativo (73%) quando comparado com o grupo exposto somente com H₂O₂. Ao compararmos o grupo que foi exposto ao H₂O₂, RSV e o inibidor compound C com o grupo que recebeu os mesmos componentes, exceto o inibidor de AMPk, observamos um aumento significativo na dosagem de NO de em média 67%.

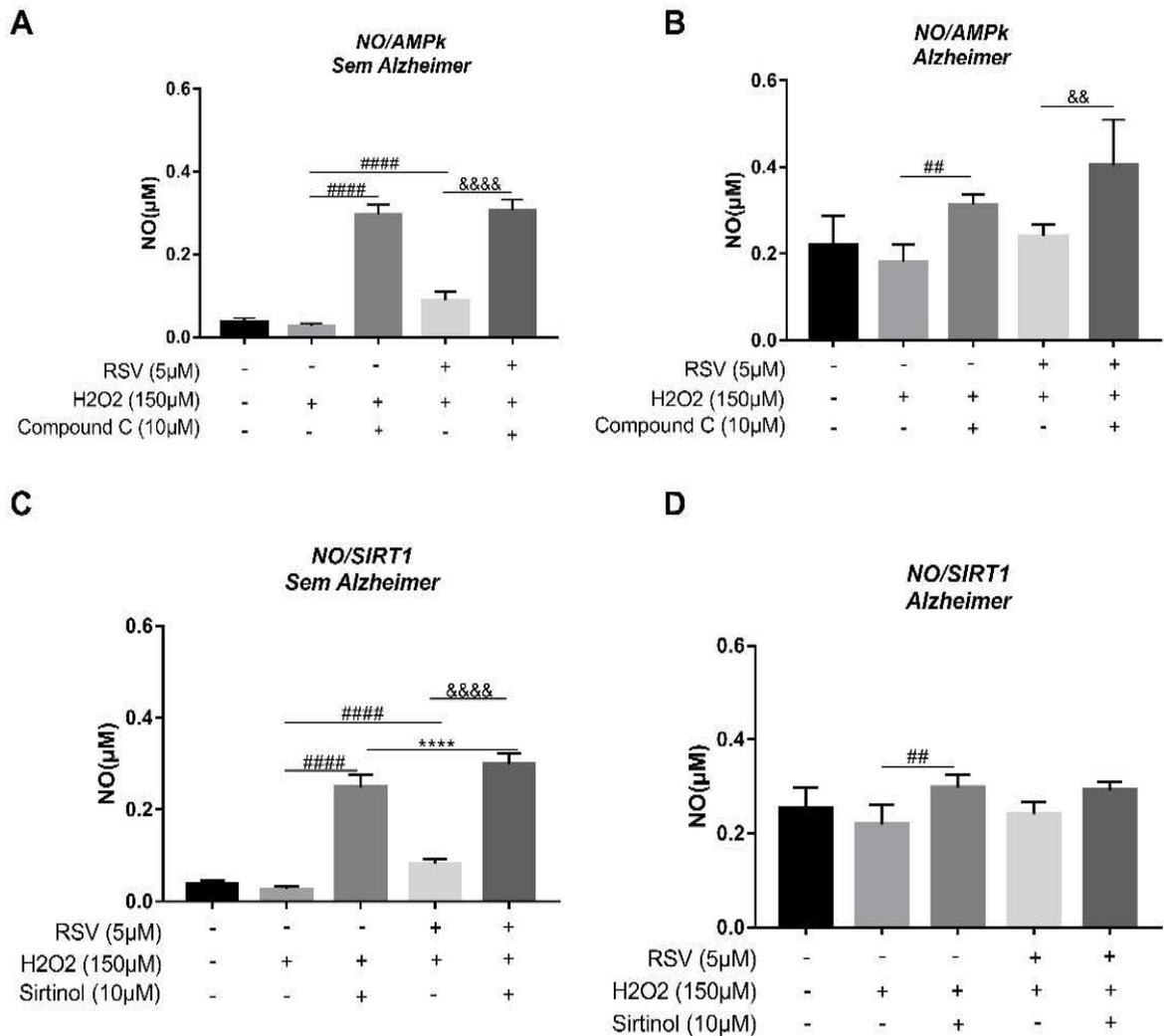


Figura 20: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em leucócitos de acordo com as vias AMPk e SIRT1. Painel A/C: Idosos sem Alzheimer (n=8); Painel B/D: Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de NO foi expressa em μM. ANOVA teste, seguido pelo pós-teste de Tukey comparado às células que não foram expostas ao RSV. Sendo ****p < 0.0001; ##### p < 0,0001 e ## p < 0,01 referente ao grupo H₂O₂ e &&&& p < 0.0001.

Ao compararmos ambos os grupos, percebe-se que no grupo com Alzheimer, os leucócitos foram capazes de aumentar a produção de NO em 6% a mais que o grupo sem a doença, quando expostos ao H₂O₂ na presença de compound C; além,

de aumentar em aproximadamente 31% a mais a mesma produção na presença do H₂O₂, RSV e o inibidor compound C, do que o grupo sem Alzheimer.

Tabela 17: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO com inibidor da via AMPk em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % | % A/SA |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|---------|-----------------------------|-------|-----------|
| Célula + Meio | 0,037 ± 0,003 | | 0,219 ± 0,026 | | 490↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 0,027 ± 0,002 | | 0,181 ± 0,018 | | 570↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + Compound C | 0,297 ± 0,008#### | #1000 ↑ | 0,313 ± 0,009## | #73 ↑ | 6 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 0,089 ± 0,007#### | #229 ↑ | 0,241 ± 0,011 | | 170 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV + Compound C | 0,307 ± 0,009&&&& | &245↑ | 0,404 ± 0,043&& | &67↑ | 31 ↑ |

Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em leucócitos de acordo com a via AMPk. Idosos sem Alzheimer (n=8); Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de NO foi expressa em μM. ANOVA teste, seguido pelo pós-teste de Tukey comparado às células que não foram expostas ao RSV. Sendo: ####(p<0,0001), ##(p<0,01) vs Célula+H₂O₂; &&&&(p<0,0001), &&(p<0,01) vs Célula+H₂O₂+RSV. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (# e &).

Na análise da via SIRT1, de acordo com a Figura 20 – Painéis C e D acima e a **Tabela 18**, podemos observar que no grupo sem Alzheimer a dosagem de NO nos leucócitos teve um aumento significativo (203%) ao ser exposto com H₂O₂ e tratado com RSV, quando comparado ao grupo exposto somente com H₂O₂; o aumento também foi percebido (20%) quando as células foram estimuladas com H₂O₂ e o inibidor da via SIRT1 (sirtinol -10 μM), comparativamente ao grupo exposto somente com H₂O₂. Ocorreu um aumento significativo na produção de NO quando o grupo foi

estimulado com a tríade (H_2O_2 , RSV e sirtinol) de aproximadamente 165%, quando comparado com o grupo estimulado com os mesmos componentes, exceto o inibidor.

No grupo com a Doença de Alzheimer, houve um aumento significativo de NO (36%) no grupo exposto com H_2O_2 e sirtinol, quando comparado ao grupo exposto somente com H_2O_2 . Não foi observada diferença estatística na produção de NO quando houve a presença do inibidor sirtinol juntamente com H_2O_2 e RSV, comparados ao grupo exposto ao H_2O_2 e sirtinol.

Quando comparamos os grupos pesquisados, percebe-se que a concentração de NO em leucócitos de doadores com Alzheimer apresenta valores basais mais elevados em relação ao grupo sem a doença. O grupo sem estímulos apresenta 20% a mais na produção de NO na presença do inibidor sirtinol e H_2O_2 , quando comparado ao grupo sem a doença. E na presença do mesmo inibidor (sirtinol) com H_2O_2 e RSV, a produção de NO se apresenta 2% reduzida quando comparado ao grupo sem Alzheimer.

Portanto, mesmo na presença de sirtinol (10 μM), a produção de NO se encontra elevada no grupo com DA, principalmente na presença do inibidor juntamente com H_2O_2 .

Tabela 18: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO com inibidor da via SIRT1 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % | % A/SA |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------------|------|-----------|
| Célula + Meio | 0,037 ± 0,003 | | 0,253 ± 0,019 | | 583 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 0,027 ± 0,002 | | 0,219 ± 0,017 | | 710↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + Sirtinol | 0,249 ± 0,011#### | #822↑ | 0,297±0,011## | #36↑ | 20 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 0,082 ± 0,003#### | #203↑ | 0,241 ± 0,012 | | 194↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV + Sirtinol | 0,299 ± 0,009#### &&&& | #20 ↑ &165 ↑ | 0,293 ± 0,007 | | 2 ↓ |

Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em leucócitos de acordo com a via SIRT1. Idosos sem Alzheimer (n=8); Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de NO foi expressa em μM . Sendo: ####(p<0,0001), ##(p<0,01) vs Célula+H₂O₂; &&&&(p<0,0001) vs Célula+H₂O₂ +RSV através do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (# e &).

5.7 Efeito do RSV na produção de ONOO⁻ nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Com o intuito de quantificar a produção de ONOO⁻, um importante oxidante nos leucócitos humanos dos idosos em questão, ambos os grupos foram estimulados sob as mesmas condições, utilizando o RSV, como antioxidante e o H₂O₂ como principal estressor oxidativo. Os resultados foram apresentados na **Figura 21** e **Tabela 19**.

Observou-se no grupo de leucócitos do grupo sem Alzheimer, que ao serem estimulados com H₂O₂, houve um aumento significativo na produção deste potente oxidante, ONOO⁻ (26%), comparado às mesmas células sem nenhum estímulo.

Porém, houve uma redução significativa na produção de ONOO^- nos leucócitos (40%) quando houve o estímulo destas células com H_2O_2 e RSV.

Contudo, o mesmo não se pôde afirmar no grupo de idosos que apresenta a doença em questão, já que não foi encontrada nenhuma alteração significativa entre os grupos submetidos às diferentes condições de tratamento.

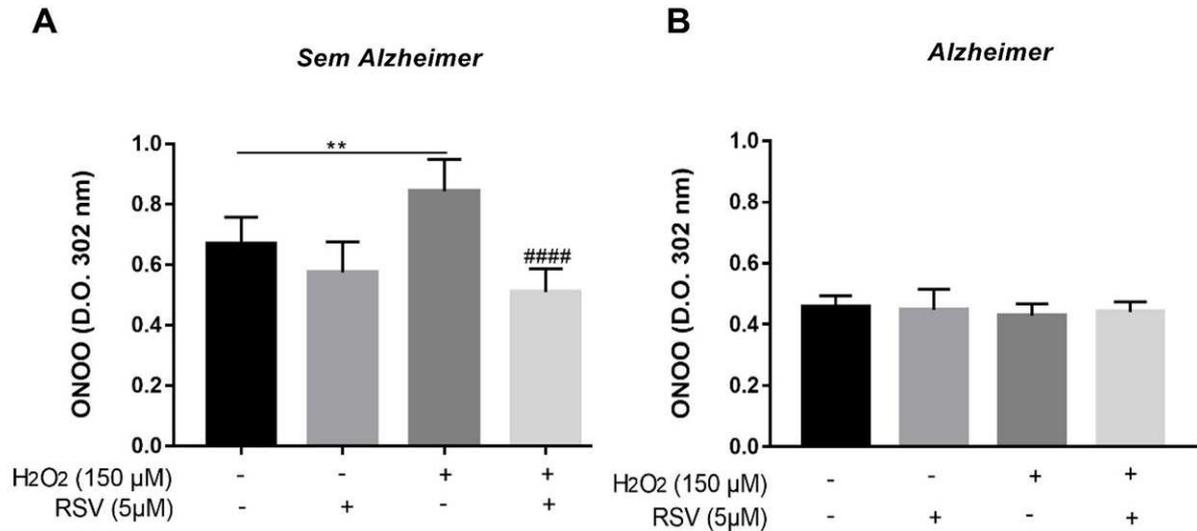


Figura 21: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO^- em leucócitos humanos. Painel A: Idosos sem Alzheimer (n=8); Painel B: Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de ONOO^- foi expressa D.O. em 302 nm. Sendo **p < 0.01; e ##### p < 0,0001 vs H_2O_2 através do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Vale ressaltar que na avaliação entre os grupos (**Tabela 19**), pôde-se observar que, no grupo sem Alzheimer, todas as concentrações de ONOO^- se mantiveram mais elevadas em relação ao grupo com Alzheimer.

Tabela 19: Análise comparativa de ONOO⁻ entre os idosos se, e com a Doença de Alzheimer e o efeito do RSV.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % A/SA |
|----------------------------------------------|----------------------------------|-------|-----------------------------|-----------|
| Célula + Meio | 0,668 ± 0,033 | | 0,456 ± 0,013 | 32 ↓ |
| Célula + RSV | 0,574 ± 0,038 | | 0,448 ± 0,002 | 22 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 0,843 ± 0,035** | *26 ↑ | 0,429 ± 0,015 | 49 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 0,509 ± 0,025 ### | #40 ↓ | 0,441 ± 0,013 | 13 ↓ |

Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO⁻ em leucócitos humanos de Idosos sem Alzheimer (n=8) e com Alzheimer (n=8). ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. Sendo **p < 0,01 vs célula+meio e #### p < 0,0001 vs H₂O₂. A geração de ONOO⁻ foi expressa D.O. em 302 nm. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

5.7.1 Efeito do RSV nos níveis de ONOO⁻ com os inibidores das vias SIRT1 e AMPk, nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Dando prosseguimento a análise do ONOO⁻, foi realizado com este componente oxidativo a sua quantificação, no intuito de não somente dosá-lo, mas também, de analisar o efeito do RSV de acordo com as vias estudadas (SIRT1 e AMPk), para posteriormente comparar ambos os grupos (supracitados), utilizando os inibidores sirtinol e compound C.

De acordo com o painel a seguir (**Figura 22**), podemos observar que no grupo sem Alzheimer a dosagem de ONOO⁻ nos leucócitos, além do aumento já demonstrado na Tabela 20, observamos uma redução de 40%, quando as células foram estimuladas com H₂O₂ e o inibidor da via AMPk (compound C 20 μM), comparativamente ao grupo exposto somente com H₂O₂. Observamos ainda, uma redução significativa na produção de ONOO⁻ quando o grupo foi estimulado com H₂O₂ e RSV de aproximadamente 40%, quando comparado com o grupo estimulado

somente com H₂O₂, porém, não foi observada nenhuma diferença quando as células foram tratadas com a tríade H₂O₂, RSV e compound C.

Quanto ao grupo com Alzheimer, ao realizar a mesma avaliação, percebe-se que houve um aumento significativo de 28% na produção de ONOO⁻, na presença de H₂O₂ e compound C, quando comparamos o grupo de células expostas apenas com H₂O₂.

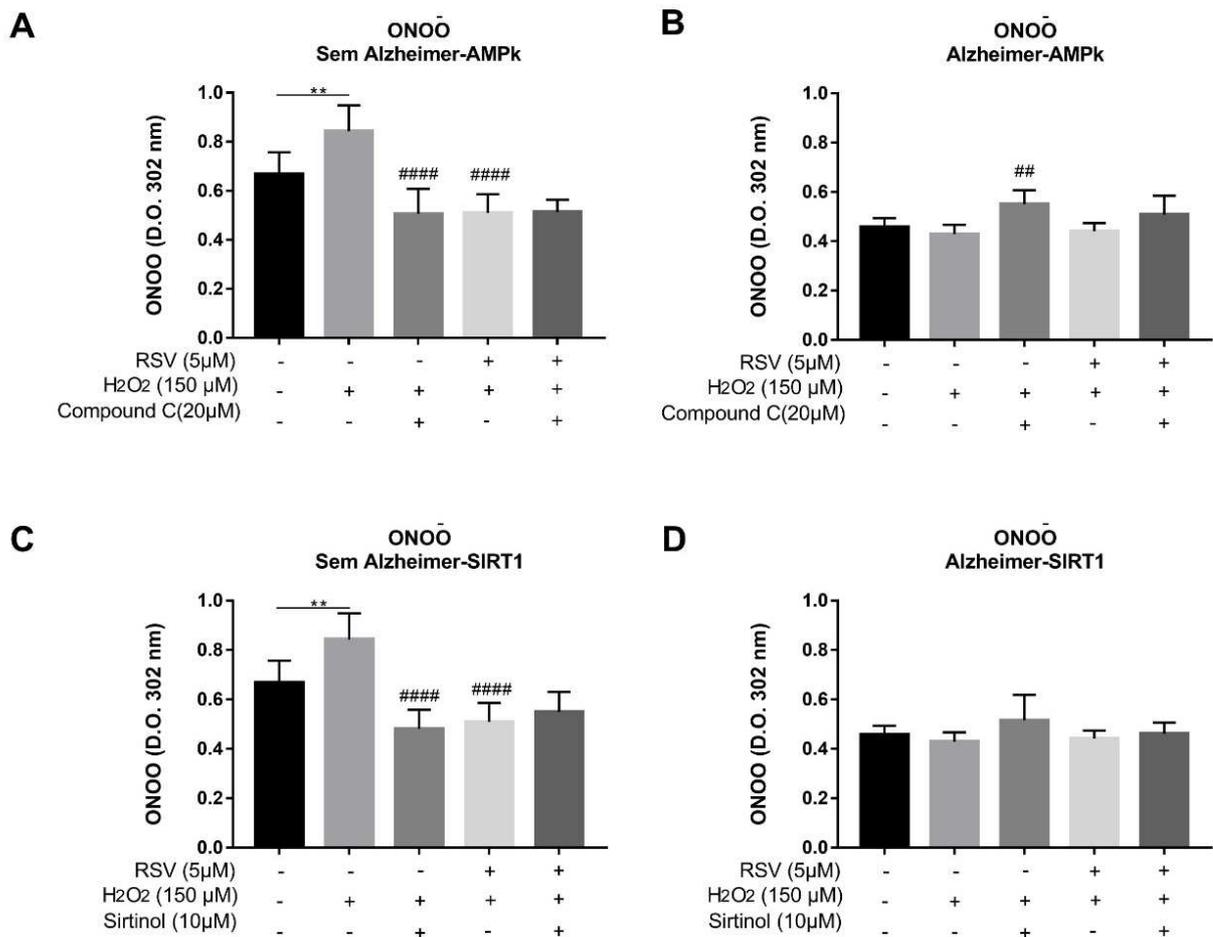


Figura 22: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO⁻ em leucócitos, de acordo com as vias AMPk e SIRT 1. Painel A/C: Idosos sem Alzheimer (n=8). Painel B/D: Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de ONOO⁻ foi expressa em D.O a 302 nm. Sendo **p <0.01; e #### p<0,0001 referente ao grupo H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Quando comparamos os dois grupos (**Tabela 20**), percebe-se que no grupo de células sem estímulos, o grupo com Alzheimer apresenta 32% a menos de produção de ONOO⁻, quando comparado ao grupo sem a doença. No grupo com Alzheimer,

quando as células foram expostas ao H₂O₂, a produção de ONOO⁻ ficou reduzida em 49%, quando comparados aos idosos sem Alzheimer. Já, quando os leucócitos dos doadores com Alzheimer foram estimulados com H₂O₂ e compound C, os valores de ONOO⁻ se apresentaram 9% mais elevados, em relação aos doadores sem Alzheimer. O RSV teve sua função antioxidante reduzida no grupo de doadores com Alzheimer, tanto na presença de H₂O₂, quanto na presença de H₂O₂ associado ao inibidor de AMPk (compound C), 13% e 1%, respectivamente.

Tabela 20: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO⁻ com inibidor da via AMPk em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % | % A/SA |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------|
| Célula + Meio | 0,668 ± 0,033 | | 0,457 ± 0,014 | | 32 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 0,843 ± 0,035** | *26 ↑ | 0,429 ± 0,016 | | 49 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + Compound C | 0,506 ± 0,039#### | #40 ↓ | 0,551 ± 0,025## | #28 ↑ | 9 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 0,509 ± 0,026#### | #40 ↓ | 0,441 ± 0,013 | | 13 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV + Compound C | 0,513 ± 0,019 | | 0,509 ± 0,034 | | 1 ↓ |

Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO⁻ em leucócitos de acordo com a via AMPk. Idosos sem Alzheimer (n=8) e Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de ONOO⁻ foi expressa em 302 mM. Sendo ** (p<0,01) vs Célula+Meio e #### (p<0,0001), ## (p<0,01) vs Célula+H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

Na análise da via SIRT1, de acordo com a **Figura 21** e a **Tabela 21**, podemos observar que no grupo sem Alzheimer a dosagem de ONOO⁻ nos leucócitos, teve uma redução significativa (40%) ao ser exposto com H₂O₂ e tratado com RSV, quando comparado ao grupo exposto somente com H₂O₂; a redução também foi percebida

(43%) quando as células foram estimuladas com H_2O_2 e o inibidor da via SIRT1 (sirtinol), comparativamente ao grupo exposto somente com H_2O_2 . E novamente, nenhuma diferença foi observada quando os leucócitos foram expostos aos três compostos (H_2O_2 , RSV e compound C) comparados ao grupo exposto somente ao H_2O_2 e compound C.

No grupo com a Doença de Alzheimer, não houve diferença significativa entre os grupos dos doadores de leucócitos sem e com estímulos.

Quando comparamos os grupos pesquisados, observamos que nos doadores com Alzheimer, a produção de ONOO⁻ se apresentou 32% menor que o grupo sem a doença; o mesmo perfil foi observado na presença de H_2O_2 , pois tal produção ficou reduzida em média 49% neste mesmo grupo de doadores. Ainda neste grupo de idosos (com Alzheimer), as células estimuladas com inibidor sirtinol e H_2O_2 , apresentou 7% a mais de ONOO⁻ do que o grupo de idosos sem Alzheimer. E na presença do mesmo inibidor (sirtinol) com H_2O_2 e RSV, a produção de NO se apresentou 15% reduzida quando comparado ao grupo sem Alzheimer.

O RSV teve sua função antioxidante reduzida no grupo de doadores com Alzheimer, tanto na presença de H_2O_2 , quanto na presença de H_2O_2 associado ao inibidor de Sirt1 (sirtinol), 13% e 15%, respectivamente, quando comparados ao grupo de doadores sem Alzheimer.

Tabela 21: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO⁻ com inibidor da via SIRT1 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % A-SA |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|-------|-----------------------------|-----------|
| Célula + Meio | 0,668 ± 0,033 | | 0,457 ± 0,014 | 32 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 0,843 ± 0,035** | *26 ↑ | 0,429 ± 0,016 | 49 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + Sirtinol | 0,481 ± 0,029#### | #43 ↓ | 0,516 ± 0,042 | 7 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 0,509 ± 0,026#### | #40 ↓ | 0,441 ± 0,013 | 13 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV +Sirtinol | 0,543 ± 0,031 | | 0,461 ± 0,018 | 15 ↓ |

Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO⁻ em leucócitos de acordo com a via SIRT1. Idosos sem Alzheimer (n=8) e Idosos com Alzheimer (n=8). A geração de ONOO⁻ foi expressa em D.O a 302 nm. Sendo ** (p<0,01) vs Célula+Meio e #### (p<0,0001) vs Célula+H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

5.8 Efeito do RSV na atividade da Enzima Catalase (CAT) nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Com o objetivo de avaliar o efeito do RSV sobre a atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT) em leucócitos humanos, tais células foram expostas aos mesmos componentes relacionados ao EO (H₂O₂ e RSV), como ilustrados na **Figura 23**.

Ao analisar o Painel A, no grupo de idosos sem Alzheimer, não observamos nenhuma diferença significativa quando comparamos o grupo sem estímulo ao grupo

exposto ao H_2O_2 e o grupo tratado com RSV. Também não houve diferença quando os leucócitos foram tratados com RSV e expostos posteriormente ao H_2O_2 .

Quanto à análise do grupo que apresenta Alzheimer, também não observamos nenhuma diferença significativa da atividade de CAT quando os leucócitos foram expostos ao polifenol, RSV, tanto de forma isolada quanto na presença de H_2O_2 , quando comparado ao grupo tratado apenas com RSV.

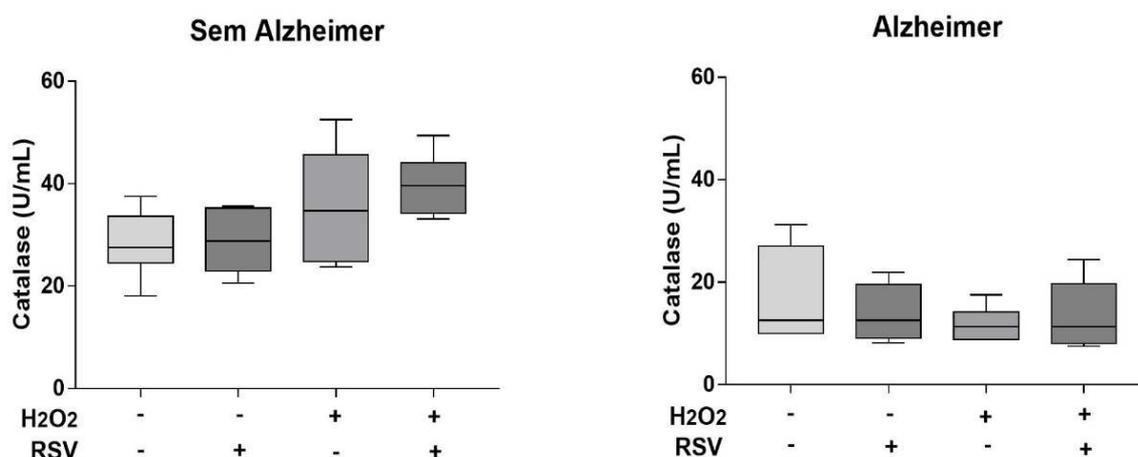


Figura 23: Avaliação comparativa da atividade de CAT e do efeito do RSV em leucócitos humanos. Painel A = idosos sem Alzheimer (n=10) e Painel B = Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em U/mL (Unidade de massa atômica/mL).

Além disso, quando comparamos a atividade desta enzima entre os dois grupos (com e sem DA), verificamos que os leucócitos dos doadores com DA apresentavam menor ação da catalase em todas as condições do estudo, como observados na Tabela 21, sendo que no grupo basal dos doadores de leucócitos com Alzheimer, observamos uma menor atividade de CAT (40%) em relação ao grupo sem a doença. Já na presença de RSV, neste mesmo grupo de doadores, o RSV teve sua ação reduzida em 52% (termos basais) e 66% quando estimulado com H_2O_2 , comparados ao grupo de doadores sem Alzheimer. Na presença de H_2O_2 , no grupo com Alzheimer a atividade enzimática apresentou uma redução de 59%, quando comparado ao grupo sem a doença (**Tabela 22**).

Tabela 22: Avaliação comparativa da dosagem de Catalase em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer estimulados com Resveratrol.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP U/mL | Alzheimer (A) Média ± DP U/mL | % A/SA |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------|
| Célula + Meio | 28,18 ± 1,83 | 16,98 ± 3,72 | 40 ↓ |
| Célula + RSV | 28,78 ± 2,024 | 13,85 ± 2,29 | 52 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 28,78 ± 2,024 | 11,77 ± 1,42 | 59 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 39,71 ± 2,049 | 13,44 ± 2,752 | 66 ↓ |

Avaliação comparativa da dosagem de Catalase em leucócitos de idosos sem e com Alzheimer estimulados com RSV. Idosos sem Alzheimer (n=10) e Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em U/mL (Unidade de massa atômica/mL).

5.9 Efeito do RSV na atividade da Enzima Glutathione Peroxidase (GPx) nos grupos de Idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Com o objetivo de verificar o efeito do RSV sobre a atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) em leucócitos dos idosos que apresentavam ou não Alzheimer, os mesmos foram estimulados com os tratamentos já demonstrados anteriormente e descritos na **Figura 24**.

Analisando o Painel A, que representa o grupo de idosos sem Alzheimer, notou-se que houve um aumento significativo (122%) na atividade da GPx nos leucócitos estimulados com RSV de forma isolada, quando comparados ao grupo sem nenhum estímulo. Não houve diferença significativa na dosagem da enzima no grupo exposto somente com H₂O₂, quando este foi comparado ao grupo basal. Também não houve diferença significativa quanto a atividade da GPx, no grupo estimulado com H₂O₂ e RSV, quando comparado ao grupo estimulado somente com H₂O₂.

De forma similar, observou-se o mesmo perfil no Painel B, representado pelo grupo de idosos com Alzheimer, pois quando as células foram expostas somente ao RSV, foi percebido um aumento significativo de 92% na atividade de GPx, quando comparado ao grupo sem nenhum estímulo. Seguindo a mesma análise, a tendência se manteve, pois, quando tais células foram expostas somente ao H₂O₂, não houve diferença significativa na dosagem enzimática, ocorrendo o mesmo quando na

exposição dos leucócitos com H₂O₂ e RSV, pois não houve diferença significativa na dosagem da GPx.

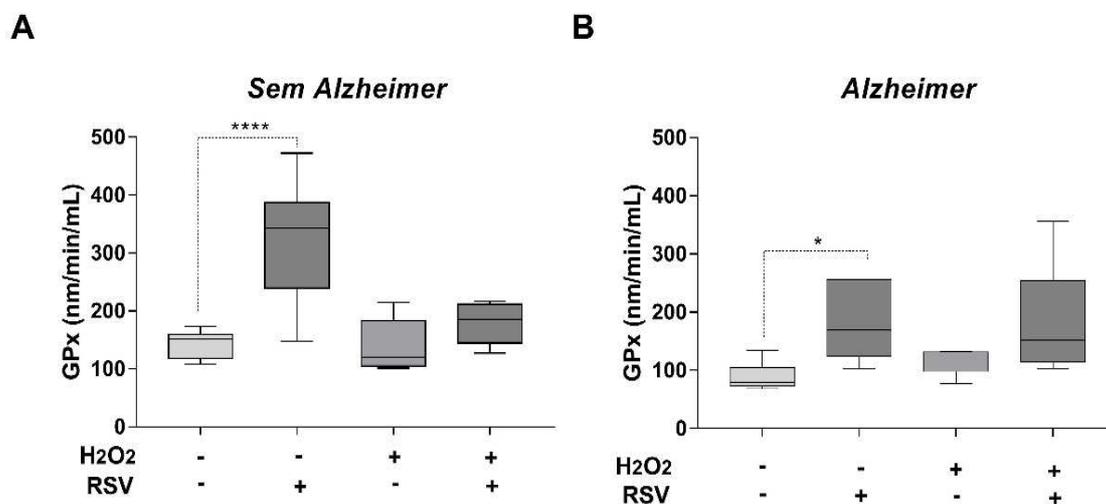


Figura 24: Avaliação comparativa da atividade de GPx e do efeito do RSV em leucócitos humanos. Painel A = idosos sem Alzheimer (n=12) e Painel B = Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em nm/min/mL. Sendo **** p<0,0001 e *p<0,05 através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Comparando os grupos dos idosos pesquisados, percebeu-se que o resveratrol teve seu poder antioxidante reduzido em 45% (apenas RSV) e 37% (H₂O₂ + RSV) nos leucócitos de doadores com a Doença de Alzheimer, quando comparado aos leucócitos dos doadores sem a doença. E de acordo com a **Tabela 23**, percebeu-se que o RSV foi capaz de aumentar a atividade da GPx nos idosos sem e com a Doença de Alzheimer, quando comparados aos grupos sem nenhum estímulo, sendo 122% Sem Alzheimer e 92% com Alzheimer.

Tabela 23: Avaliação comparativa da dosagem de Glutathione Peroxidase em leucócitos de idosos sem e com Alzheimer estimulados com Resveratrol

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % | % A/SA |
|----------------------------------------------|----------------------------------|--------|-----------------------------|-------|-----------|
| Célula + Meio | 144,7 ± 8,85 | | 91,51 ± 8,89 | | 37↓ |
| Célula + RSV | 321,7 ± 36,15**** | *122 ↑ | 176 ± 23,73* | *92 ↑ | 45 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 143,1 ± 14,54 | | 110,2 ± 7,706 | | 23↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 179,6 ± 16,08 | | 110,2 ± 7,706 | | 37↓ |

Avaliação comparativa da dosagem de Glutathione Peroxidase em leucócitos de idosos sem e com Alzheimer estimulados com RSV. Idosos sem Alzheimer (n=10) e Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade medida em nm/min/mL. Sendo **** p<0,0001, *p<0,05 vs Célula+Meio através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (*)

5.10 Análise do perfil inflamatório do RSV em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Com a finalidade de avaliar o perfil inflamatório dos idosos, avaliamos a concentração das interleucinas IL-6 e TNF (pró-inflamatórias) e IL-10 (anti-inflamatória), além, de sua possível alteração perante as dosagens dos componentes oxidantes e não oxidantes em leucócitos humanos, dos idosos sem e com Alzheimer.

5.10.1 Efeito do RSV nos níveis de IL-6 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Com o objetivo de verificar o efeito do RSV sobre a concentração da interleucina IL-6 em leucócitos dos idosos que apresentam ou não Alzheimer, os mesmos foram estimulados com os tratamentos já demonstrados anteriormente e os resultados são expressos na **Figura 25**.

De acordo com este estudo, na avaliação da atividade da citocina pró-inflamatória, IL-6, no grupo de idosos sem Alzheimer (Painel A), percebeu-se que ocorreu uma redução de 44% (de forma significativa), na dosagem de IL-6 em leucócitos, na presença de RSV, quando comparado ao grupo sem nenhum estímulo.

O que foi observado de forma inversa, quando tais células foram expostas somente com H₂O₂ houve um aumento significativo de 50% de IL-6, comparado ao grupo sem nenhum estímulo. Contudo ao serem expostos perante H₂O₂ e RSV, foi observada uma redução significativa de 51%, na concentração da citocina analisada quando comparada ao grupo somente estimulado com H₂O₂.

De maneira similar, observou-se o mesmo perfil quando analisamos o Painel B, representativo do grupo de idosos com Alzheimer, quando também ocorreu uma redução significativa de IL-6 (21%), ao serem expostos ao RSV, comparado ao grupo sem nenhum estímulo. Quanto ao grupo de leucócitos que foi exposto com H₂O₂ isoladamente, percebeu-se um aumento significativo dos níveis desta citocina inflamatória (33%). Contudo, quando houve interação de tais células com H₂O₂ e RSV, observou-se uma redução de 27% de tal concentração, quando comparado aos leucócitos somente estimulados com H₂O₂.

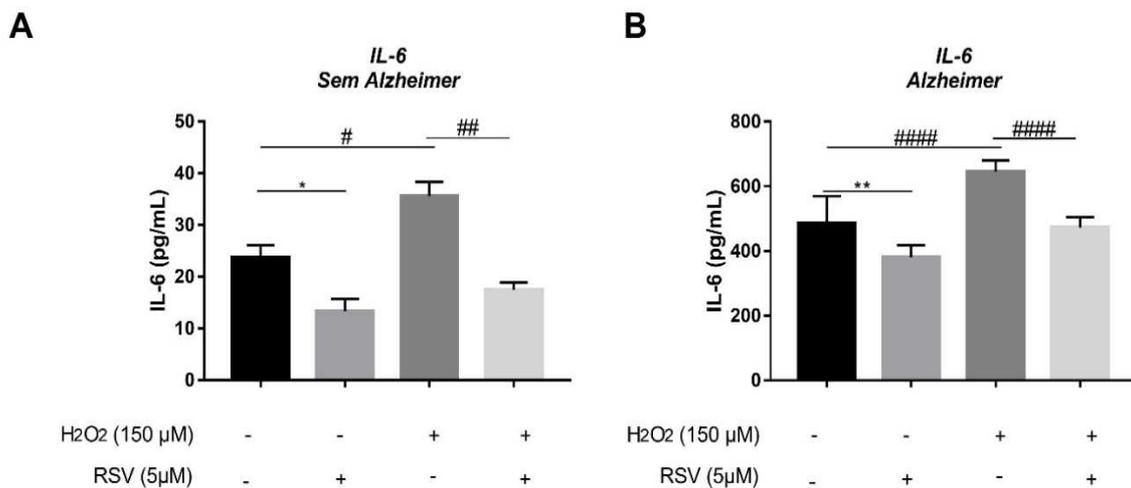


Figura 25: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL6 em leucócitos de idosos com ausência ou presença de DA. Painel A = idosos sem Alzheimer (n=7) e Painel B = Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em pg/mL. Sendo ** p <0,01; * p <0,05 e ##### p<0,0001; ## p<0,01; # p<0,05 referente ao grupo H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Neste estudo, observou-se que no grupo dos idosos com a doença, a concentração de IL-6 se manteve mais elevada em todos os grupos (**Tabela 24**), quando comparados com o grupo sem Alzheimer, o que se percebeu, por exemplo, é

que neste grupo, a citocina inflamatória em questão, se encontrava 1950% maior em níveis basais (comparados ao grupo sem a doença).

Tabela 24: Avaliação comparativa da dosagem de IL6 em leucócitos de doadores sem e com Alzheimer estimulados com Resveratrol.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP pg/mL | % | Alzheimer (A) Média ± DP pg/mL | % | % A/SA |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|-----------|
| Célula + Meio | 23,63 ± 0,94 | | 484,5 ± 32,25 | | 1950 ↑ |
| Célula + RSV | 13,30 ± 0,92* | *44 ↓ | 381,2 ± 14,09** | *21 ↓ | 2766 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 35,50 ± 1,06* | *50 ↑ | 645,1 ± 13,33**** | *33 ↑ | 1717 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 17,49 ± 0,53## | #51 ↓ | 472,3 ± 12,20#### | #27 ↓ | 2600 ↑ |

Avaliação comparativa da dosagem de IL-6 em leucócitos de idosos sem e com Alzheimer estimulados com RSV. Idosos sem Alzheimer (n=7) e Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em pg/mL. Sendo **** p <0,0001; ** p <0,01* p <0,05 vs Célula+Meio e #### p<0,0001; ## p<0,01 vs Célula+H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

5.10.2 Efeito do RSV nos níveis de TNF em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Com o mesmo objetivo apresentado anteriormente, procurou-se verificar o efeito do RSV sobre a atividade da interleucina TNF em leucócitos dos idosos que apresentam ou não Alzheimer, os mesmos foram estimulados com os tratamentos já citados anteriormente e os resultados são mostrados na **Figura 26**.

No painel A, representado pelo grupo de idosos sem Alzheimer, percebeu-se que houve uma redução de 25% (de forma significativa), na dosagem de TNF em leucócitos, na presença de RSV, quando comparado ao grupo sem estímulos. Em seguida, um aumento de TNF foi notado, quando tais células foram expostas somente com H₂O₂, o que representou um aumento significativo de 53%. Contudo, ao serem expostas perante H₂O₂ e RSV, foi observada uma redução significativa de 40%, na

concentração da interleucina TNF, comparado ao grupo somente estimulado com H₂O₂.

Quanto à análise do Painel B, grupo representativo dos idosos com Alzheimer, foi observado um perfil semelhante, pois também ocorreu uma redução significativa de TNF (41%) em leucócitos, ao serem expostos ao RSV comparada ao grupo sem estímulo. Quanto ao grupo de leucócitos que foi estimulado com H₂O₂ de forma isolada, notou-se um aumento significativo dos níveis desta citocina inflamatória (52%). Todavia, quando houve interação da tríade (células, H₂O₂ e RSV), observou-se uma redução de 30% de tal concentração, comparada ao grupo estimulado com H₂O₂.

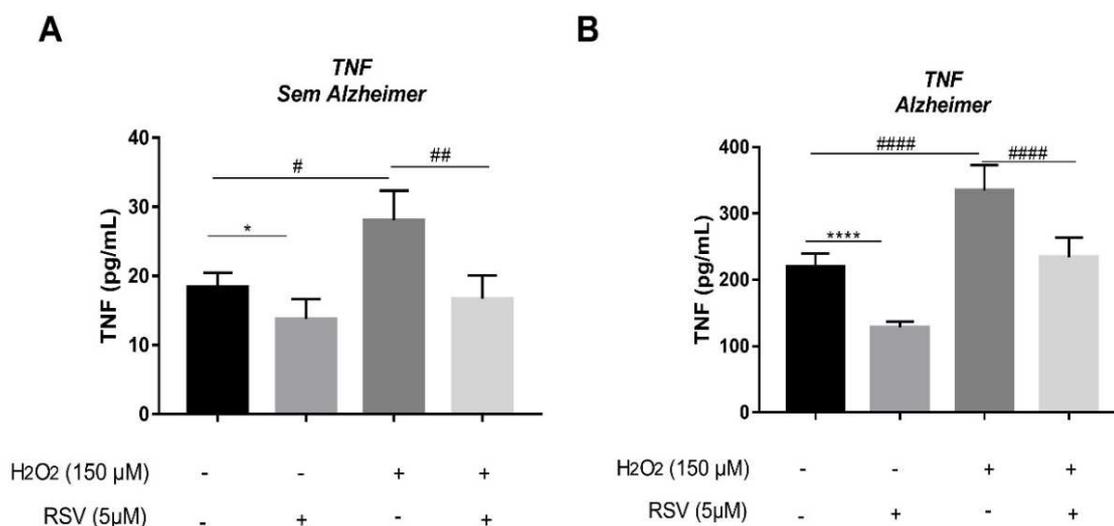


Figura 26: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de TNF citocinas em leucócitos de idosos com ausência ou presença de DA. Painel A = idosos sem Alzheimer (n=7) e Painel B = Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em pg/mL. Sendo **** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$ e ##### $p < 0,0001$; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ referente ao grupo H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Como ilustrados na **Tabela 25**, constata-se que neste estudo, os valores de TNF referentes ao grupo com a Doença de Alzheimer, se encontram praticamente 10 vezes mais elevadas quando comparados ao grupo sem a doença, com destaque para o grupo com ausência de estímulos (basal), no qual sua relação se aproxima a 1000%. Deste modo, podemos observar que na neuroinflamação, como é o caso de idosos com a Doença de Alzheimer, a concentração de citocinas pró-inflamatórias como TNF

e IL-6, pode se apresentar ainda mais elevada quando comparados com sua dosagem no grupo de idosos sem a doença estudada.

Tabela 25: Avaliação comparativa da dosagem de TNF em leucócitos de doadores com e sem Alzheimer estimulados com Resveratrol.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % | % A/SA |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------|
| Célula + Meio | 18,32 ± 0,82 | | 220 ± 7,54 | | 1100 ↑ |
| Célula + RSV | 13,77 ± 1,09* | *25 ↓ | 128,5 ± 3,25**** | *41 ↓ | 833 ↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 28,05 ± 1,62* | *53 ↑ | 334,9 ± 14,27**** | *52 ↑ | 1093↑ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 16,69 ± 1,28## | #40 ↓ | 234 ± 11,19#### | #30 ↓ | 1302 ↑ |

Avaliação comparativa da dosagem de TNF em leucócitos de idosos sem e com Alzheimer estimulados com RSV. Idosos sem Alzheimer (n=7) e Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em pg/mL. Sendo**** p <0,0001; * p <0,05 vs Célula+Meio; #### p<0,0001; ## p<0,01 vs Célula+H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

5.10.3 Análise comparativa do efeito do RSV nos níveis de IL-10 em leucócitos de idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Ainda investigando a concentração das interleucinas como elemento constituinte do perfil inflamatório, é importante destacar a IL-10, pois trata-se de importante citocina anti-inflamatória. Deste modo, avaliamos a influência do RSV sobre a atividade desta citocina, nos leucócitos, expondo-os também a um ambiente oxidativo mimetizado pelo H₂O₂. Os resultados são mostrados na **Figura 27**.

Ao analisar o Painel A representativo do grupo dos idosos sem Alzheimer, foi percebido que no grupo em que os leucócitos foram tratados com RSV, houve um aumento significativo de 53% em comparação ao grupo sem nenhum estímulo. Porém, quando tais células foram expostas ao H₂O₂, houve uma redução significativa (41%) na dosagem da interleucina em questão, quando realizada sua comparação com o grupo basal. Após a exposição dos leucócitos com H₂O₂ e RSV, percebeu-se

um aumento significativo de 153% na dosagem da citocina anti-inflamatória, quando comparada com o grupo estimulado apenas com H₂O₂.

Ao analisar o Painel B, representante dos idosos com Alzheimer, percebeu-se um perfil parecido com o do grupo sem a doença, quando foi constatado que na exposição das células junto ao RSV, ocorreu um aumento significativo de 77% da concentração de IL10, comparativamente ao grupo basal. Ao serem expostas ao H₂O₂, observou-se uma redução de 56% na concentração da citocina estudada, quando comparamos com o grupo sem nenhum estímulo. Houve ainda um aumento significativo de tal concentração (52%), no grupo estimulado com a tríade (célula, H₂O₂ e RSV), comparado com o grupo estimulado com H₂O₂.

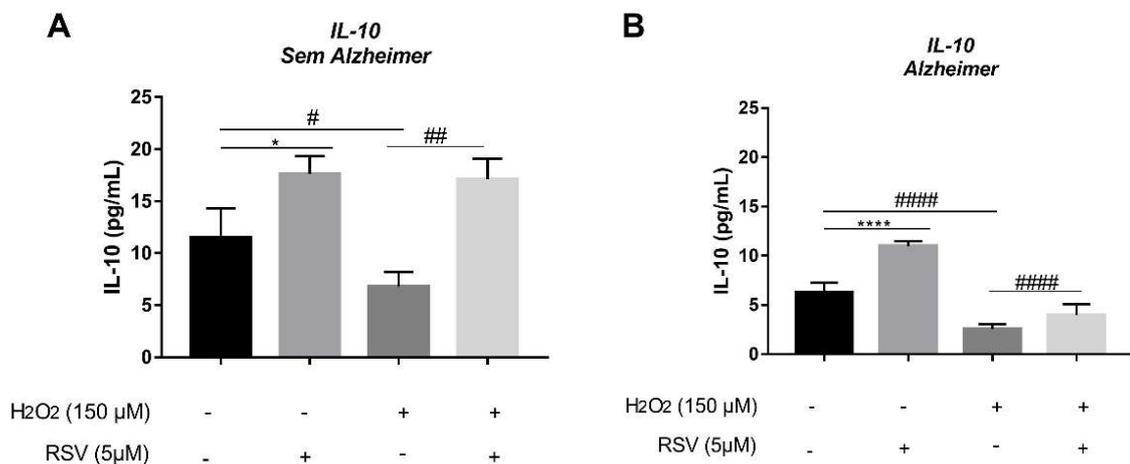


Figura 27: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL10 em leucócitos de idosos com ausência ou presença de DA. Painel A = idosos sem Alzheimer (n=7) e Painel B = Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em pg/mL. Sendo **** p <0,0001; * p <0,05 e ##### p <0,0001; ## p <0,01; # p <0,05 referente ao grupo H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Como apresentados na **Tabela 26**, constatou-se que neste estudo, os valores de IL-10 referentes ao grupo com a Doença de Alzheimer, se encontravam reduzidos em relação ao grupo de idosos sem a doença, com destaque para o grupo basal, que se encontra 45% reduzidos em relação ao grupo sem Alzheimer. De acordo com diversos autores, IL-10 pode estar reduzida ou até silenciada em condições neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, o que pode justificar tais resultados.

Tabela 26: Avaliação comparativa da dosagem de IL10 em leucócitos de doadores com e sem Alzheimer estimulados com Resveratrol.

| Tratamento | Sem Alzheimer (SA) Média ± DP | % | Alzheimer (A) Média ± DP | % | % A/SA |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|--------|-----------------------------|-------|-----------|
| Célula + Meio | 11,47 ± 1,07 | | 6,22 ± 0,18 | | 45 ↓ |
| Célula + RSV | 17,59 ± 0,66* | *53 ↑ | 11,04 ± 0,11**** | *77 ↑ | 37 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ | 6,77 ± 0,53* | *41 ↓ | 2,68 ± 0,10**** | *56 ↓ | 60 ↓ |
| Célula + H ₂ O ₂ + RSV | 17,11 ± 0,74## | #153 ↑ | 4,08 ± 0,21#### | #52 ↑ | 76 ↓ |

Avaliação comparativa da dosagem de IL10 em leucócitos de idosos sem e com Alzheimer estimulados com RSV. Idosos sem Alzheimer (n=7) e Idosos com Alzheimer (n=7). A atividade foi medida em pg/mL. ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Sendo**** p <0,0001; * p <0,05 vs Célula+Meio; ##### p<0,0001; ## p<0,01 vs Célula+H₂O₂ através do teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. As porcentagens são mostradas de acordo com a diferença estatística observada no mesmo grupo (* e #).

Podemos observar de forma comparativa (**Tabela 27**), os efeitos antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol tanto no grupo de idosos de doadores de leucócitos sem Alzheimer, quanto no grupo de doadores com Alzheimer. Assim, podemos inferir que mesmo no grupo de portadores da doença que apresentavam valores basais elevados como ROS, IL-6 e TNF (EO e ICS), o polifenol teve sua ação presente, e em casos em que a GPx e IL-10 estavam reduzidas quando comparadas com o grupo sem a doença, o RSV também exerceu sua função, neste estudo em particular. Além disso, em leucócitos de doadores com Alzheimer, o RSV parece atuar por meio da via AMPk, tanto na produção de espécies reativas de oxigênio quanto de nitrogênio.

Tabela 27: Resumo dos principais efeitos do RSV nos leucócitos de doadores sem e com Alzheimer

| Parâmetro | Efeito do Resveratrol | |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------|
| | Sem Alzheimer | Com Alzheimer |
| Produção de ROS | ↓↓↓ | ↓ |
| Atuação sob a via SIRT1 em ROS | - | - |
| Atuação sob a via AMPK em ROS | - | + |
| Produção de NO | ↑ | - |
| Atuação sob a via SIRT1 em NO | + | - |
| Atuação sob a via AMPK em NO | + | +++ |
| Produção de ONOO | ↓ | - |
| Atuação sob a via SIRT1 em ONOO | - | - |
| Atuação sob a via AMPK em ONOO | - | - |
| Atividade de Catalase | - | - |
| Atividade de Glutathiona Peroxidase | ↑↑↑ | ↑ |
| Níveis de IL-6 | ↓↓↓ | ↓ |
| Níveis de TNF | ↑↑↑ | ↑ |
| Níveis de IL-10 | ↑↑↑ | ↑ |

Efeitos do RSV (5 μ M) nos leucócitos de doadores sem e com Alzheimer. Sendo ↑= aumento; ↓=diminuiu; - = não houve efeito; + = houve efeito.

5.11 Análise do perfil funcional de idosos sem e com a Doença de Alzheimer

Com a finalidade de avaliar o perfil funcional dos idosos na ausência e presença da Doença de Alzheimer, utilizamos o instrumento Índice de Katz, cuja finalidade é classificar o indivíduo quanto a sua dependência (moderada ou muito dependente) ou quanto a sua independência. De acordo com a **Tabela 28**, é possível observar que no grupo dos idosos sem Alzheimer, sua classificação ficou entre 5 e 6, o que corresponde à Independência. Já no grupo com Alzheimer, observamos um perfil de dependência, visto que, 1 idoso foi classificado com “dependência moderada” (Katz=4) e os outros 7 idosos foram classificados com “muito dependentes” (Katz entre 0 e 1).

Tabela 28: Análise da Funcionalidade pelo Índice de Katz nos grupos de Idosos sem e com Alzheimer

| Índice de Katz | Nº de Idosos | |
|----------------|---------------|-----------|
| | Sem Alzheimer | Alzheimer |

| | | |
|------------|---|---|
| 0-2 | 0 | 7 |
| 3-4 | 0 | 1 |
| 5-6 | 8 | 0 |

A funcionalidade foi avaliada pelo Instrumento Índice de Katz, que classifica de forma numérica a capacidade funcional de acordo com as AVDs. 0 a 2 = muito dependente; 3 e 4 = dependente moderado; Independente = 5 e 6.

5.12 Comparação da Funcionalidade e dos Biomarcadores entre os idosos sem e com Alzheimer.

Para analisarmos a influência da Doença de Alzheimer na capacidade funcional e nos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e da inflamação crônica subclínica, comparamos os dados do índice de Katz e os valores basais em leucócitos dos doadores com a ausência e presença da doença.

Analisando os valores do Índice de Katz (**Tabela 29**), houve uma redução significativa da funcionalidade nos idosos com Alzheimer, quando comparados com os idosos sem a doença de Alzheimer.

Quanto aos parâmetros de EO (ROS- NO – ONOO-), percebemos que nos leucócitos dos doadores com Alzheimer, houve um aumento significativo nos valores basais de ROS e NO, enquanto houve uma redução nos valores de ONOO-, quando comparados com os leucócitos do grupo de doadores sem Alzheimer. Quanto às enzimas CAT e GPx, observa-se uma redução significativa nos leucócitos do idosos com Alzheimer, quando comparados com os idosos sem Alzheimer.

Quando analisamos o perfil inflamatório através da citocinas, percebe-se que os idosos com Alzheimer apresentam um quadro inflamatório mais acentuado comprovado pelo aumento significativo de IL-6 e TNF nos leucócitos, quando comparados com os leucócitos dos doadores sem Alzheimer. Além disso, observa-se uma redução de IL-10 nos leucócitos dos doadores com Alzheimer quando comparados com o grupo sem a doença.

Tabela 29: Análise Comparativa da Capacidade Funcional e dos Parâmetros da Neuroinflamação em idosos sem e com Alzheimer

| Parâmetro | Grupo (Média ± DP) | | p valor |
|-----------|--------------------|---------------|---------|
| | Sem Alzheimer | Com Alzheimer | |

| | | | |
|-----------------|--------------|---------------|------------|
| Katz | 6 ± 0 | 0,875 ± 0,479 | ****<0,001 |
| ROS | 437,00 ± 56 | 1.137 ± 114 | **0,0012 |
| NO | 0,03 ± 0,00 | 0,189 ± 0,01 | ****<0,001 |
| ONOO- | 0,668 ± 0,00 | 0,456 ± 0,01 | ***0,0006 |
| Catalase | 28,18 ± 1,83 | 16,98 ± 3,72 | *0,0291 |
| GPx | 144,7 ± 8,85 | 91,51 ± 8,89 | **0,0023 |
| IL-6 | 23,63 ± 0,94 | 484,5 ± 32,25 | ***0,0006 |
| TNF | 18,32 ± 0,82 | 220 ± 7,54 | ***0,0006 |
| IL-10 | 11,47 ± 1,07 | 6,22 ± 0,18 | ***0,0006 |

Avaliação Comparativa dos Idosos sem e com Alzheimer em relação aos dados funcionais de acordo com o índice de Katz e quanto aos parâmetros bioquímicos. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 significante por ANOVA e teste de Mann-Whitney (n=10)

6. DISCUSSÃO

A Doença de Alzheimer, caracterizada como uma doença neurodegenerativa, considerada a forma mais prevalente das demências, está inserida no processo do envelhecimento e se apresenta de forma complexa e multifatorial, no qual se

manifesta de forma progressiva, podendo apresentar diminuição de memória e declínio severo da cognição, podendo ainda, acarretar prejuízos funcionais quando em seu estado mais avançado (devido a degradação de neurônios colinérgicos em diversas áreas do SNC), acompanhada de redução significativa de neurotransmissores, o que pode desencadear depressão, demência e levar o indivíduo à morte (SOUZA, 2020).

Observamos, neste quadro, a neuroinflamação, um processo inflamatório relevante no processo da instalação, progressão e severidade da doença, já que as células do sistema imune são ativadas, gerando um disparo da cascata inflamatória no SNC, como observado na micróglia que pode recrutar os astrócitos e assim, consequentemente aumentar tal resposta aos depósitos de β A extracelulares, que posteriormente, pode ainda, ocasionar uma resposta aguda local mediada por citocinas e assim, favorecer a indução da síntese de NO, espécie reativa estudada neste trabalho, classificada como um importante neurotransmissor. Os astrócitos participam também, da remoção e da degradação de β A, se transformando numa barreira protetora entre o depósito citado e os neurônios. Tal resposta inflamatória predispõe a ocorrência de mediadores pró e anti-inflamatórios, nos quais alguns destes são responsáveis pelos mecanismos neurodegenerativos, enquanto outros podem exercer efeitos neurotróficos benéficos. Assim, um conjunto de agentes inflamatórios pode determinar a prevalência de efeitos deletérios ou benéficos durante a evolução do Alzheimer (VIEGAS, 2011).

Outro ponto metabólico importante é a geração de estresse oxidativo pelo desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes. Deste modo, a teoria dos RL observada tanto no envelhecimento, quanto em suas patologias correlacionadas, posteriormente ficou conhecida como a teoria do estresse oxidativo, pautado na hipótese do dano estrutural que prediz que as perdas funcionais associadas ao envelhecimento são devido ao acúmulo do dano oxidativo às macromoléculas (lipídeos, DNA, proteínas) pelos ROS/RNS. Os termos ROS e RNS se referem a derivados não radicalares e radicalares do oxigênio e nitrogênio, respectivamente (LIGUORI *et al.*, 2018).

Um aumento da carga oxidativa já foi relatado em cérebros de idosos sem demência e/ou em pacientes com DA (Behl e Moosmann, 2002; Moosmann e Behl, 2002). Atualmente, muitos marcadores sanguíneos de estresse oxidativo foram

identificados em pacientes com DA ou modelos animais. No entanto, como e onde o estresse oxidativo se origina no DA são questões em aberto. Pesquisas têm sugerido que a disfunção mitocondrial, o acúmulo de metais, hiperfosforilação da proteína tau, inflamação e acúmulo de β -amiloide (β A) são os mecanismos básicos subjacentes à indução de estresse oxidativo (Zhao, 2013; Yan *et al.*, 2013; Ayton *et al.*, 2013; Greenough *et al.*, 2013, Dias-Santagata *et al.*, 2007; Candore *et al.*, 2010). Deficiência ou destruição de componentes do sistema antioxidante, como a Superóxido dismutase na mitocôndria (Mn-SOD ou SOD2) e citosol (Cu-Zn-SOD ou SOD1), glutathiona peroxidase (GPx), e catalase (CAT), também está envolvida na indução de estresse oxidativo (ANSARI e SCHEFF, 2010).

Assim, surge a necessidade de relacionar o EO com a Doença de Alzheimer, já que o interesse em aprofundar o estudo dos compostos antioxidantes aumentou nesta área e o RSV se destacou. Atualmente, diversos estudos envolvendo este polifenol procuram analisar seus efeitos biológicos, devido a sua diversidade, incluindo, dentre outras propriedades, a de ser antioxidante e atuar como anticâncer (SOUZA, 2020; STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016).

Neste cenário do envelhecimento, tanto do grupo com a ausência de Alzheimer, quanto no grupo com a doença, observa-se que em ambos, a viabilidade celular ficou acima de 70%, ou seja, todas estavam de acordo com as normativas internacionais para a realização dos tratamentos propostos neste estudo, como verificada na **Figura 15 e Tabela 10**.

Assim, de acordo com os resultados apresentados na **Figura 16** e na **Tabela 11** percebe-se que no grupo sem Alzheimer, H_2O_2 foi capaz de aumentar ROS em aproximadamente 3055% ao comparar com o grupo basal, já na presença do RSV estimulado com H_2O_2 , houve uma redução de ROS em 80%.

Quanto ao grupo dos doadores de leucócitos com Alzheimer, ROS aumentou em média 196% na presença de H_2O_2 ; e na presença H_2O_2 , tratado com RSV, houve uma redução de ROS de 71% nos leucócitos provenientes dos idosos com DA.

Corroborando os estudos que defendem o aumento de EO e Inflamação Crônica Subclínica (ICS) em doenças neurodegenerativas, neste estudo em particular, observa-se que no grupo com Alzheimer, ROS está 160% maior no grupo de células com meio (basal), somente ao H_2O_2 , o grupo com Alzheimer, o H_2O_2 teve sua ação

diminuída, ou seja, aumentou ROS 75% a menos do que o grupo sem Alzheimer. Infere-se que tal diferença pode ser observada devido ao grupo basal dos idosos com Alzheimer ter apresentado níveis ainda mais elevados de ROS, o que nos leva a pensar, que tal produção não foi tão elevada porque atingiu um pico máximo, que se fosse ultrapassado poderia ocasionar a morte celular. Souza *et al.*, (2020) encontraram uma associação entre citotoxicidade promovida por β A e estresse oxidativo como resultado de um desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Altos níveis de ROS podem levar à destruição de proteínas, ácidos nucleicos e peroxidação lipídica, bem como deficiências na integridade da membrana celular, redução do potencial de membrana da mitocôndria, e um aumento na permeabilidade a íons de cálcio na membrana plasmática. Este aumento de espécies reativas, devido à redução das defesas antioxidantes, é responsável pela neurodegeneração mediada pelo estresse oxidativo.

Quanto à ação antioxidante do RSV, percebe-se, neste estudo, em particular, que o polifenol exerceu seu poder nos dois grupos, em leucócitos estimulados com H_2O_2 , já que foi capaz de reduzir ROS em média 88% e 71% (sem e com Alzheimer) respectivamente. Ou seja, o RSV atuou de forma mais expressiva no grupo sem Alzheimer, pois seu poder antioxidante foi 40% menor no grupo com a doença, possivelmente explicado devido ao quadro de EO presente não somente no envelhecimento, mas associado à instalação da Doença de Alzheimer, já que neste caso é observado um quadro exacerbado de EO.

Tais resultados estão de acordo com os estudos de Lara (2018), que verificou a ação do RSV na linhagem celular Neuro-2A, as quais tiveram a redução da produção de ROS, quando estimuladas com RSV 5 μ M. Lin *et al.*, (2014) também mostraram que o pré-tratamento de astrócitos com RSV foi capaz de suprimir a geração de ROS, além de reduzir a taxa de morte celular, que havia sido induzida por glutamato. Bobermin *et al.*, (2012) também demonstraram a diminuição da produção de ROS induzida por amônia das células SH-SY5Y (linhagem de neuroblastoma humano) pré-incubadas com RSV. Caldeira (2019), também comprovou o perfil preventivo deste polifenol, quando constatou o efeito antioxidante do RSV em PBMCs no grupo de meia idade em relação ao grupo de idosos.

Além de verificarmos a atuação do RSV 5 μ M no EO de acordo com a ausência ou presença da DA no envelhecimento, verificamos também, por quais vias de

sinalização o RSV age nos leucócitos dos doadores participantes deste estudo, tanto no estresse basal, quanto no estresse induzido. As vias de sinalização escolhidas para o estudo foram as vias AMPk e SIRT1 por ser relatado na literatura o envolvimento da atuação do RSV por ambas as vias.

Como já citado anteriormente, o RSV é um ativador da SIRT1, ou seja, uma das formas existentes nos mamíferos, da família de proteínas sirtuínas e vale ressaltar, que SIRT1 desacetila proteínas histonas e não histonas, incluindo fatores de transcrição. Neste caso, as vias reguladas por SIRT1 afetam o metabolismo, a resistência ao EO, a sobrevivência celular, a senescência celular, as funções imunoinflamatórias, os ritmos circadianos, a biogênese mitocondrial e a estabilidade genômica (STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016; YE *et al.*, 2017).

Quanto a AMPk, tal via se apresenta como principal sensor do estado de energia celular em praticamente todas as células eucarióticas, pois é ativada em resposta ao estresse energético, quando por exemplo ao perceber um aumento na taxa de AMP: ATP e ADP: ATP, pode restaurar o balanço energético ao inibir os processos anabólicos (gliconeogênese, síntese de lipídeos) e proteínas que consomem ATP, enquanto promove outros processos catabólicos que geram ATP (entrada de glicose na células, glicólise, oxidação de ácidos graxos). Além disso, AMPk promove autofagia, homeostase mitocondrial (mitofagia, fissão mitocondrial, biogênese mitocondrial), resistência ao EO e regulação dos ritmos circadianos. Esta via pode ser ativada por vários compostos, dentre eles os compostos polifenólicos, se destacando o RSV (YE *et al.*, 2017; GARCIA; SHAW, 2017).

Quanto à interação das vias estudadas, sabe-se que AMPk pode ativar SIRT1 por um aumento indireto nos níveis de NAD⁺ celulares (CANTO *et al.*, 2010); ou ainda segundo Ivanov *et al.*, (2008) e Lan *et al.*, (2008) que demonstraram que SIRT1 desacetila a quinase LKB1, levando a um aumento da fosforilação e ativação de AMPk.

A conexão entre o RSV e AMPk foi apresentada por Park *et al.*, (2012), quando demonstraram que o RSV inibe diretamente várias enzimas fosfodiesterases (PDE), o que aumenta os níveis do segundo mensageiro cAMP, a ativação do fator de troca do nucleotídeo guanina dependente de cAMP (Epac 1) e um aumento do cálcio intracelular que ativa a quinase CamKKb, que fosforila e ativa AMPK.

Dasgupta e Milbrandt (2007) demonstraram que o RSV estimula AMPK independente de SIRT1 em neurônios. Hou *et al.*, (2008) e Shin, Cho e Kim (2009) demonstraram que o RSV ativa AMPk tanto de forma dependente como independente de SIRT1 em células de carcinoma hepatocelular.

Os resultados apresentados na **Figura 17** e **Tabela 14**, demonstram que SIRT1 não apresenta caráter antioxidante nos dois grupos de idosos (sem e com a presença de Alzheimer), porém, foi percebido o poder antioxidante preservado do RSV, observado em ambos os grupos de doadores. Contudo, o RSV teve seu poder antioxidante diminuído ao ter sua via inibida pelo sirtinol na presença de H₂O₂, em média 79%, no grupo com Alzheimer, quando comparado ao grupo sem Alzheimer, o que pode ser justificado pelo aumento de ROS que já se encontrava elevado no grupo basal, neste mesmo grupo de doadores (160%), em relação ao grupo sem a doença. Foi observado que neste estudo em particular, que o RSV não atua pela via SIRT1 no envelhecimento, independente da ausência ou presença da Doença de Alzheimer.

Corroborando este estudo, quanto ao efeito do RSV pela via SIRT1, segundo os achados de Souza *et al.*, (2020), o RSV (0, 2,5, 5, 7,5, 10 e 15 µM) foi capaz de proteger células de neuroblastoma contra o estresse oxidativo induzido, e foi capaz de aumentar sua viabilidade celular. No entanto, quando SIRT1 foi inibida com administração de sirtinol, a atividade antioxidante do resveratrol foi suprimida. Nas células PC12, o RSV (12,5, 25, 50 e 100 µM) aumentou a viabilidade celular, reduziu a apoptose e atenuou a neurotoxicidade induzida por βA.

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 18** e **Tabela 15**, a via AMPk apresentou um perfil diferenciado, pois apesar de não ter apresentado caráter antioxidante no grupo de doadores dos leucócitos sem DA, esta se apresentou como uma via antioxidante no grupo de doadores com Alzheimer, visto que, ROS foi aumentado em média 1220% quando o grupo das células foi exposto com a tríade (H₂O₂ e RSV e inibidor), quando comparado com o grupo de células expostas apenas com H₂O₂ e o inibidor. Deste modo, podemos verificar que o RSV não atua pela via AMPk no envelhecimento e que o caráter antioxidante dessa via esteja silenciado neste grupo em particular, porém, se torna ativa quando na presença de doença crônica neurodegenerativa, como a Doença de Alzheimer, provavelmente devido a presença da inflamação crônica subclínica e do aumento do EO.

Tais resultados corroboram os estudos de Yang *et al.*, (2020), no que tange ao tratamento da DA, proposta sugerida pela autora, ao defender que através da ativação da proteína quinase pela AMP (AMPK) pode ocorrer amplo efeito benéfico no que tange à neuroproteção, já que de acordo com as pesquisas sobre esta via voltadas para a DA, os resultados são promissores, visto que, a ativação de AMPK é positiva para promover autofagia, manter o controle de qualidade mitocondrial, reduzir a resistência à insulina e aliviar o estresse oxidativo, ou seja, que a AMPK pode ser um novo alvo para a DA por tratar agressivamente os fatores de risco no futuro.

Tais resultados nos levam a inferir que as vias SIRT1 e AMPk, deixam de interagir entre si, o que vai de encontro com os resultados apresentados por Xu *et al.*, (2017), já que ambas as vias interagem de forma positiva na DA, já que AMPk mesmo que de forma indireta, ocasiona a supressão da atividade de NF- κ B, (responsável pelo dano neuronal na DA), através dos mediadores downstream, como SIRT1, FOXO e PGC1-a, que subsequentemente podem reprimir a expressão de fatores inflamatórios.

Observamos na **Tabela 14** e **Tabela 15** a atuação do RSV, de forma heterogênea, já que teve seu perfil diferenciado de acordo com as vias, no grupo de idosos sem e com Alzheimer, evidenciada pelo aumento do EO, através de ROS. Já que em indivíduos idosos com Alzheimer a atuação do RSV (estimulados com H₂O₂ e inibidor) teve seu poder antioxidante reduzido em média 79% (em relação aos idosos sem Alzheimer), com base na SIRT1 e aumentado em 667% com base na AMPk, no mesmo grupo, ou seja, neste caso observamos que o RSV atuou de forma ainda mais eficiente atuando pela via AMPk na Doença de Alzheimer já que o RSV foi capaz de reduzir ROS em média 340% quando os leucócitos dos doadores foram expostos à tríade (H₂O₂ e RSV e inibidor), se comparados com o grupo exposto ao H₂O₂ e inibidor; o que não foi percebido pelo grupo sem a doença que não apresentou diferença estatística entre os grupos de células expostas com o inibidor.

Deste modo, os resultados supracitados podem fornecer uma justificativa com base no processo da neuroinflamação em que se baseia no EO e na ICS, devido ao silenciamento de uma via de caráter antioxidante (neste caso a SIRT1), o que pode provavelmente se manifestar como um dos agravantes que contribuam para maior EO descrito na Doença de Alzheimer o que corrobora os estudos de Muller *et al.*, (2018) que demonstrou a ativação reduzida de SIRT-1, justificando a redução da autofagia

no envelhecimento, o que pode gerar o acúmulo de detritos celulares, como agregados de proteínas e organelas, induzindo, deste modo, um processo inflamatório em diferentes tecidos e órgãos e ainda gerar maiores danos relacionados aos efeitos da DA.

Assim, os resultados deste estudo, em particular, nos indicam fortes evidências de que o RSV atue de forma individualizada no que tange aos diferentes perfis de acordo com a ausência ou presença do Alzheimer, pois no grupo sem Alzheimer, as duas vias não apresentam caráter antioxidante, ou seja, SIRT1 e AMPk estão inativas, ou seja, este deve ter exercido sua atividade antioxidante provavelmente por outra via. Já no grupo com Alzheimer, o RSV exerceu sua atividade antioxidante pela via AMPk, constatado pelo aumento de ROS de 1066% nos leucócitos de doadores com Alzheimer, quando estes foram expostos ao H₂O₂, RSV e inibidor, quando comparados com o grupo estimulado apenas com H₂O₂ e inibidor.

Como já mencionado anteriormente, os danos oxidativos gerados por ROS e RNS estão relacionados ao envelhecimento e principalmente quando já se encontra instalada a doença neurodegenerativa, como Alzheimer, assim, como ilustrados na **Figura 19 e Tabela 16**, verificamos a atuação do RSV no NO apenas do grupo sem DA, além, de verificarmos que tais níveis estariam mais elevados em dados basais no grupo com a presença da neuroinflamação, o que nos faz inferir que neste caso, esta espécie reativa também se comporte como um neuromodulador e que esteja em seu limite de ação.

Vale lembrar que o óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso de vida curta secretado pelo endotélio e que age como um mensageiro intracelular pleiotrópico, exercendo uma variedade de ações biológicas em condições fisiológicas e patológicas. Enquanto em baixas concentrações são benéficos para várias funções fisiológicas e celulares, como manter o tônus muscular, a coagulação e a inflamação bem balanceadas e controladas; porém, suas altas concentrações podem causar efeitos prejudiciais e deletérios (ASSMANN *et al.*, 2016).

Ainda segundo Machado *et al.*, (2020), ROS e RNS desempenham papel fundamental na neuroinflamação, encontrada no Alzheimer. Porém, Venturelli *et al.*, (2018) evidenciaram que em humanos a depleção da disponibilidade de NO está correlacionada à redução do fluxo sanguíneo cortical, extracranial e periférico durante

o envelhecimento e em paralelo com a severidade da doença de Alzheimer, o que foi de encontro aos nossos resultados.

O RSV melhora a função endotelial, exerce efeitos anti-hipertensivos, anti-ateroscleróticos e anti-hiperglicêmicos e aumenta a sensibilidade à 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 $O_2^{\cdot-}$ (XIA; FÖRSTERMANN; LI, 2014).

Confirmando a função do RSV nos níveis de NO, como encontrado nos resultados de Lara (2019), demonstrando que o RSV atua como protetor neural quando elevou a geração de NO nas células N2-A na forma de Pré-estímulo; e como neuro-regenerador quando o fez no Pós-estímulo. Neste contexto, Chaves *et al.*, (2000) mostraram que em granulócitos humanos ocorre um aumento da produção de NO em função da idade.

Deste modo, constatou-se que no grupo de doadores de leucócitos sem Alzheimer o RSV foi capaz de aumentar a produção de NO em média 75%, quando comparado com o grupo sem nenhum estímulo; e o mesmo polifenol (RSV) ainda foi capaz de aumentar em 230% a mesma produção quando houve a exposição das células na presença de H_2O_2 .

Contudo, o RSV conseguiu restaurar a quantidade de NO das células expostas ao H_2O_2 (que estava levemente reduzida em relação ao grupo basal) em níveis acima dos 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.*, (2008) e Anes *et al.*, (2014) em relação à interação entre níveis reduzidos de NO e EO.

Ressalta-se que no grupo com Alzheimer, não houve diferença estatística entre os grupos tratados, porém, de forma comparativa ao grupo sem a doença, todos se apresentaram com concentrações de NO de forma mais elevada, como observado, por exemplo, no grupo basal cuja produção de NO já se apresentava 308% mais exacerbada do que no grupo sem a doença, o que podemos constatar que neste caso, em especial, a produção de NO possa estar elevada devido à neuroinflamação, que devido ao excesso de ROS/RNS, tal espécie reativa que em condições desfavoráveis (em excesso) pode se apresentar de forma deletéria, podendo ocasionar

neurodegeneração e estar acentuando ainda mais o EO e a ICS, favorecendo, deste modo, ainda mais o acúmulo de β A, corroborando o estudo de Souza *et al.*, (2020), que confirma que a superprodução de NO foi associada à Doença de Alzheimer, resultando em danos ao DNA e à estrutura mitocondrial além de corroborar o estudo de Agostinho *et al.*, (2010) justificando que o estresse oxidativo e/ou outras substâncias tóxicas podem desencadear a superexpressão de óxido nítrico sintase (iNOS) levando a um aumento do óxido nítrico (NO) no sistema nervoso central, através da produção por meio da conversão catalítica de arginina em citrulina.

Percebe-se que o RSV 5 μ M não foi capaz de diminuir a produção de NO (que se encontrava elevada) no grupo com Alzheimer, possivelmente devido a apoptose, situação em que o polifenol já não consegue mais exercer a sua função antioxidante, o que pode ser justificado em estudos de Machado *et al.*, (2020), que cita o acúmulo da placa beta amiloide como um dos responsáveis pela inflamação crônica e ativação do sistema imune. Estudos similares corroboram este resultado, como o trabalho de Correia-Costa *et al.*, (2016), que evidenciaram um aumento do estado oxidante (levando ao maior risco cardiometabólico) e de NO (como impacto negativo na função renal) em crianças com sobrepeso e obesas. Corradi *et al.*, (1999) também encontraram que o NO exalado está aumentado em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica.

Portanto, infere-se que no grupo dos idosos com DA que já apresenta um pico máximo de EO decorrente do NO em níveis basais nas células, ao serem expostos ao H₂O₂ (num ambiente mimetizado de EO), este valor pouco se altera, justificando, assim, a ineficácia da atuação do RSV neste quadro, pois o polifenol neste estudo em particular não foi capaz de alterar os níveis de NO no grupo com Alzheimer.

Ainda de modo a quantificar a dosagem de NO neste trabalho, procurou-se justamente fazer a análise do efeito do RSV de acordo com as vias estudadas (SIRT1 e AMPk), apresentados na **Figura 20** e nas **Tabelas 17 e 18**. Deste modo, observamos que a produção de NO o grupo basal de doadores de leucócitos com Alzheimer apresentou valores mais elevados, e sofreram variações na presença de sirtinol e compound C, quando comparados com o grupo de doadores sem Alzheimer.

Assim, ao analisarmos sob a ótica da via AMPk, observamos que houve um aumento na produção de NO, nos grupos de leucócitos expostos ao H₂O₂ e compound

C, quando comparados com os grupos de células estimuladas com H₂O₂, em ambos os grupos (1000% e 73%), sem e com Alzheimer respectivamente.

De acordo com a ação antioxidante do RSV, em ambos os grupos, observou-se que quando as células foram expostas ao H₂O₂ e RSV juntamente com o inibidor (compound C), ocorreu um aumento de 245% e de 67% (sem e com Alzheimer) na produção de NO, comparados com o grupo das células estimuladas com H₂O₂ e tratadas com RSV. Inferimos que em relação ao grupo com Alzheimer, em especial, o polifenol não foi capaz de exercer sua atividade antioxidante através da via AMPk, possivelmente, por conta da neuroinflamação, já que o excesso de NO pode estar associado a outros mecanismos oxidantes como o aumento de ROS, neste grupo em particular.

Quanto à análise do efeito do RSV na produção de NO, de acordo com SIRT1, o grupo de células dos doadores sem Alzheimer, quando foram expostas ao grupo H₂O₂ e sirtinol, tiveram um aumento na produção de NO em média 822% e 36% (sem e com Alzheimer), respectivamente, quando comparados com o grupo de células expostas somente ao H₂O₂.

Ainda observamos que no grupo sem a doença, o RSV foi capaz de aumentar a produção de ROS em média 165% quando os leucócitos foram expostos à tríade já supracitada (H₂O₂, RSV e sirtinol) quando comparada com o grupo de células expostas ao somente ao H₂O₂ e RSV). Além de observarmos que no grupo de doadores sem a doença, houve um aumento na produção de NO de 20% quando as células foram expostas a tríade H₂O₂, RSV e sirtinol, comparado com o grupo de células expostas H₂O₂ e sirtinol.

Desse modo, infere-se que o RSV foi capaz de aumentar NO no grupo sem a doença, já que a produção desta espécie reativa se encontrava anteriormente em condições fisiológicas, diferente do perfil no grupo com Alzheimer quando a produção de NO já se encontrava de forma exacerbada (devido ao EO). Tais resultados podem ser justificados devido às condições do envelhecimento, que é caracterizado por um aumento no EO de acordo com a teoria dos radicais livres que nesta condição e por consequência poder haver uma menor produção de NO, podendo ser restabelecida com a presença do RSV. Outros estudos como o de Souza *et al.*, (2020); Machado *et al.*, (2020) descrevem que após a detecção de dano ou estímulo imunológico no

cérebro, como o causado por peptídeos βA , a microglia passa a ser ativada, liberando, então, mediadores pró-inflamatórios, como, por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 β (IL-1 β) e óxido nítrico (NO) em resposta a ele. O acúmulo desses mediadores contribuem para danos neuronais e doenças progressivas, como o Alzheimer.

Contribuindo com esta hipótese, o aumento de NO em quadros de doenças neurodegenerativas pode ser explicada pela produção de Peroxinitrito $ONOO^-$ por conta da reação com NO, pois segundo Pacher *et al.*, (2007), muitos efeitos tóxicos deletérios encontrados neste quadro podem ser mediados por seus produtos oxidados, do que pelo próprio NO. Evidências mais recentes indicam que a maior parte da citotoxicidade atribuída ao NO é proveniente do $ONOO^-$ produzido pela reação controlada de difusão entre o NO e outro RL, o $O_2^{\cdot-}$. $ONOO^-$ que interage com lipídeos, DNA e proteínas via reações oxidativas diretas ou via mecanismos indiretos mediados por radicais. Tais reações podem desencadear respostas celulares, variando de modulações sutis na sinalização celular, ao dano oxidativo intenso, levando as células à necrose ou apoptose.

Assim, de acordo com a **Figura 21** e **Tabela 19** observamos que no grupo de leucócitos do grupo sem Alzheimer, o aumento significativo (26%) na produção de $ONOO^-$ frente ao estímulo com H_2O_2 , comparado às mesmas células sem nenhum estímulo, além da redução significativa (40%) quando o RSV é inserido, nos faz inferir que o RSV exerce sua função antioxidante, pois é capaz de reduzir a produção de $ONOO^-$ em um ambiente mimetizado, neste estudo, em particular, no envelhecimento sem a presença de doença crônico-degenerativa, como o Alzheimer.

O grupo dos idosos sem Alzheimer teve sua produção de $ONOO^-$ amplificada pela adição de H_2O_2 , o que provavelmente ocorreu devido à maior produção de $O_2^{\cdot-}$ que ao reagir com NO produziu $ONOO^-$, reduzindo assim, a disponibilidade de NO nessa condição que foi restaurada devido à atividade antioxidante do RSV, observada na redução da produção de $ONOO^-$.

Porém, o grupo dos idosos com Alzheimer não teve o mesmo perfil, visto que, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos estimulados, ou seja, o RSV teve sua ação antioxidante alterada, neste caso em especial, já que não foi capaz de alterar a produção do $ONOO^-$. Vale ressaltar que todas as concentrações

de ONOO⁻ se mostraram diminuídas, em relação ao grupo sem Alzheimer, podendo ser justificado pelo fato de no quadro neuroinflamatório esta espécie reativa possa estar reduzida, pelo fato de ser um produto da reação do NO.

Na presença dos inibidores das vias pesquisadas neste estudo, analisando a concentração de ONOO⁻, observamos que o RSV teve sua função antioxidante reduzida no grupo de doadores com Alzheimer, tanto na presença de compound C, quanto na presença de sirtinol, quando foram estimulados juntamente com o H₂O₂ (1% e 13%, respectivamente).

Dando prosseguimento às características do perfil oxidativo e inflamatório encontrados na Doença de Alzheimer, não poderíamos deixar de citar as enzimas antioxidantes, já que a mudança no balanço redox, entre oxidantes/antioxidantes em favor dos oxidantes é nomeada como EO (BIRBEN *et al.*, 2012). Lembrando que os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que quando se apresentam em baixas concentrações inibem ou retardam a oxidação de uma molécula principalmente devido a sua capacidade em sequestrar ROS. Organismos aeróbicos tem sistemas antioxidantes integrados, que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que geralmente são efetivos em bloquear os efeitos deletérios de ROS (BIRBEN *et al.*, 2012; LOBO *et al.*, 2010; JEEVA *et al.*, 2015). SOD, GPx e CAT são as enzimas antioxidantes chave desse sistema de defesa pelo qual as ROS produzidas durante as reações metabólicas são removidas (JEEVA *et al.*, 2015).

Uma das atividades biológicas descritas do RSV envolve seu potencial antioxidante. O RSV é tanto um sequestrador de ROS quanto um potente antioxidante devido a sua habilidade de promover a atividade de muitas enzimas antioxidantes (DE LA LASTRA; VILLEGAS, 2007).

Além de analisarmos a atuação do RSV no EO (através da produção de ROS/RNS), analisamos também a atuação desse composto na atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx nos leucócitos dos idosos sem e com Alzheimer.

CAT nos mamíferos é um homotetramêro, conhecida por sua habilidade em converter H₂O₂ em H₂O e O₂ (atividade catalítica) e por sua atividade em oxidar álcool de baixo peso molecular na presença de baixas concentrações de H₂O₂. Essa enzima é uma das enzimas antioxidantes mais bem caracterizadas (JEEVA *et al.*, 2015).

Já, a enzima GPx é encontrada tanto no citoplasma quanto extracelularmente em quase todo tecido humano. Converte H_2O_2 em H_2O . A enzima catalisa a redução de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e $ONOO^-$ (NIMSE; PAL, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018)

Os resultados apresentados na **Figura 23** e **Tabela 22** revelaram que nos grupos de doadores sem e com Alzheimer, não houve alteração significativa da atividade de CAT nos leucócitos expostos ao H_2O_2 (ambiente de EO) em relação às células sem estímulo. Também não houve um aumento da atividade da CAT nos leucócitos estimulados com o RSV se comparados às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao H_2O_2 . Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por LARA (2018), no efeito do RSV na forma de Pré-estímulo em células N2-A. Comparando ambos os grupos de idosos, observa-se no grupo com Alzheimer uma redução da atividade da enzima CAT nos leucócitos destes doadores, o que *inferimos* que no quadro inflamatório crônico associado ao EO, na presença da Doença de Alzheimer, a atividade de CAT encontra-se mais reduzida quando comparado com o envelhecimento sem doença neurodegenerativa.

Sirivarasai *et al.*, (2015) revelaram que alguns polimorfismos existentes no gene que codifica a enzima CAT em eritrócitos podem ser responsáveis pela alteração da expressão e atividade dessa enzima na pressão sanguínea em uma população tailandesa. Emamgholipour, Hossein-Nezhad e Ansari (2016) demonstraram que a expressão do RNAm e a atividade da CAT aumentaram em PBMCs expostas ao EO induzido por H_2O_2 em comparação com células não tratadas.

Uma das atuais hipóteses sobre o mecanismo de dano oxidativo estimulado por β amilóide nas células em pacientes com Alzheimer, é que esta, interage diretamente com a catalase, ligando-se à proteína e desativando sua atividade catalítica, criando, assim, uma condição de EO. Portanto, a catalase tem uma relação direta com a patogênese da doença de Alzheimer (HABIB *et al.*, 2010; NANDI *et al.*, 2019).

Os resultados apresentados na **Figura 24** e **Tabela 23** revelam que nos grupos de doadores sem e com Alzheimer não houve alteração significativa da atividade de GPx nos leucócitos expostos ao H_2O_2 (ambiente de EO) em relação às células sem estímulo. Porém, tanto no grupo sem Alzheimer, quanto no grupo com Alzheimer,

houve um aumento significativo da atividade da GPx (122% e 92% respectivamente) nos leucócitos estimulados com o RSV, quando comparados aos mesmos sem nenhum estímulo.

Comparando ambos os grupos de idosos, observa-se que no grupo com Alzheimer, ocorre uma redução da atividade de GPx em média 37% menor do que o grupo sem a doença. O que podemos *inferir* que na Doença de Alzheimer a GPx pode ter sua atividade na neuroinflamação reduzida quando comparado ao envelhecimento sem a doença, devido ao possível aumento do EO observado no aumento basal de ROS e NO, podendo alterar a ação da enzima antioxidante neste quadro demencial. E ainda observamos que o RSV teve seu poder antioxidante reduzido em média 45% nos leucócitos dos doadores com a doença.

Concomitante aos resultados presentes na literatura relacionando a atividade da CAT e de GPx com o EO, há também estudos relacionando a atividade dessas enzimas com doenças crônicas degenerativas no envelhecimento (caracterizado com um aumento do EO), como no ilustrado por Srivastava (2017), que aponta o papel dos RL no envelhecimento demonstrando que o quadro de estresse oxidativo aumenta com a idade cronológica juntamente com a redução dos níveis e da atividade dessas enzimas antioxidantes.

Truong, Jun e Jeong (2018) demonstraram que o tratamento com RSV aumentou a expressão de CAT e GPx, em segmentos aórticos de ratos; como também, aumentou a capacidade antioxidante hepática via CAT, GPx e SOD.

Neste estudo em particular, os resultados das enzimas antioxidantes se assemelham a alguns resultados presentes na literatura, mas contradizem muitos outros. De acordo com Emamgholipour, Hossein-Nezhad e Ansari (2016) as células respondem ao desafio oxidativo com indução seletiva de enzimas antioxidantes, afirmando, também, que não há um consenso na literatura sobre o padrão de enzimas antioxidantes em resposta ao EO. O que provavelmente está relacionado com o tipo do modelo celular utilizado, o tipo e a concentração do agente oxidante utilizado, além do tempo de incubação.

Portanto, o caráter antioxidante do RSV confirmado pelos resultados apresentados nos ensaios de quimioluminescência não estão relacionados com a indução da CAT (nos dois grupos de idosos), porém, pode estar relacionada com GPx

(em ambos os grupos), assim, possivelmente a atividade antioxidante do RSV pode ser atribuída ao aumento da atividade da GPx, no envelhecimento, inclusive na Doença de Alzheimer.

Prosseguindo os nossos estudos, procuramos investigar a inflamação crônica subclínica, que é diretamente influenciada pelo estresse oxidativo, e encontrada nas doenças neurodegenerativas, como no Alzheimer.

Sabe-se que o envelhecimento é caracterizado por uma inflamação crônica de baixo grau que provavelmente contribui significativamente para a morbidade e mortalidade em idosos (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014). Deste modo, a imunossupressão periférica e a inflamação podem promover a neuroinflamação por meio da modulação das células gliais em direção a um estado pró-inflamatório mais ativo, levando à perda da função neuroprotetora, à disfunção neuronal e acúmulo de dano tecidual cerebral (BENEDETTO *et al.*, 2017), o que resulta em aumento do risco de comprometimento cognitivo, distúrbios neurológicos e neurodegenerativo (GOLDECK *et al.*, 2016).

Assim, quanto ao aspecto inflamatório, comumente associado ao EO nesta demência, investigamos esta característica através das concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF), assim como a concentração da citocina anti-inflamatória (IL-10), que de acordo com diversos estudos têm sido amplamente pesquisadas como marcadores da neuroinflamação em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer.

As citocinas fazem parte da família dos peptídeos e são consideradas proteínas solúveis, liberadas pelas células imunes, representando os principais reguladores do protótipo: resposta imune inata e adaptativa à infecção. Elas podem modular a atividade e a viabilidade neuronal de maneira indireta, promovendo a liberação de moléculas neuroativas na glia ou no endotélio, (por exemplo: NO⁻, glutamato, prostaglandinas, neurotrofinas) e de forma direta, ativando receptores neurais no cérebro ou medula espinhal (VEZZANI; VIVIANI, 2015).

Segundo Machado *et al.*, (2020) a ativação do sistema imune e inflamação desencadeadas no processo de lesão e destruição celular, no sistema nervoso central, nesta doença, provavelmente ocorre devido à deposição de peptídeo beta-amiloide, que acionam os astrócitos e a micróglia que podem induzir a

neuroinflamação, estimulando a liberação de citocinas pró inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF). Volp *et al.* (2010), descrevem que estas citocinas de caráter pró-inflamatório desempenham diversas atividades nos mecanismos imunes relacionadas à inflamação, especificamente pela mediação central da resposta de fase aguda.

Segundo Zhang *et al.*, (2007), IL-10 se destaca pelo seu perfil anti-inflamatório nas reações imunológicas das quais participa. E, de acordo com Dagdeviren apud Almeida, (2019), esta citocina é produzida por macrófagos e atua prevenindo a amplificação da resposta inflamatória, por meio da inativação de macrófagos e bloqueio da apresentação de antígenos, pode também suprimir a atividade das citocinas pró inflamatórias como IL6 e TNF. Estudos verificaram que IL-10 possa estar reduzida na inflamação crônica em idosos (GAN *et al.*, 2016; CHAVES *et al.*, 2009).

Neste estudo, o compilado de resultados apresentados na **Figura 25** e na **Tabela 24** se assemelham a alguns resultados presentes na literatura.

Observamos que na avaliação da atividade da citocina pró-inflamatória, IL-6, no grupo de idosos sem Alzheimer, houve uma redução de 44% (de forma significativa) desta dosagem nos leucócitos, na presença do RSV, quando comparado ao grupo sem nenhum estímulo. Porém, um aumento de aproximadamente 50% desta atividade foi percebido ao expor tais células somente ao H₂O₂. Contudo, ao serem expostas perante ao H₂O₂ e RSV, foi observada uma redução significativa de 51%, em sua dosagem, quando comparado ao grupo somente estimulado com H₂O₂. O que nos leva a hipótese de que o RSV teve o poder de exercer seu papel anti-inflamatório em leucócitos de idosos, devido à redução da citocina pró-inflamatória (IL6).

De maneira similar, observou-se o mesmo perfil no grupo de idosos com Alzheimer, pois também foi observada uma redução significativa de IL-6 de em média 21% quando as células foram expostas ao RSV, ao ser comparado ao grupo sem nenhum estímulo. Quanto ao grupo de leucócitos que foi exposto com H₂O₂ isoladamente, percebeu-se um aumento significativo destes níveis de 33%. Contudo, houve uma redução de 27% de tal concentração nas células expostas ao H₂O₂ e RSV, quando comparados aos leucócitos somente estimulados com H₂O₂. Deste modo, o RSV também exerceu atividade anti-inflamatória mesmo na presença da Doença de Alzheimer.

Neste estudo, observou-se que no grupo dos idosos com a doença, a concentração de IL-6 se manteve mais elevada em todos os grupos, quando comparados com o grupo sem Alzheimer, o que foi percebido por exemplo, que neste grupo, a citocina inflamatória em questão, se encontrava aumentada 1950 % a mais do que aquele, sem a doença. Ao analisar a ação anti-inflamatória do RSV, percebe-se que este polifenol teve seu poder reduzido no grupo de doadores de leucócitos com Alzheimer, pois ao compararmos com o grupo sem Alzheimer, constata-se uma redução de IL-6 em 21% no grupo basal dos doadores com DA e uma redução de 44% de IL-6 no grupo sem a doença, quando foram comparados aos grupos sem nenhum estímulo, além, de uma redução de 27% de IL-6 quando os leucócitos foram estimulados com H₂O₂ e tratados com RSV e de uma redução de 51% na mesmas condições no grupo sem Alzheimer. Ou seja, o RSV, apesar de manter seu poder anti-inflamatório no grupo com Alzheimer, mostrou-se, ainda, mais eficiente quando a doença neurodegenerativa não estava manifestada, corroborando os estudos realizados em roedores com envelhecimento acelerado, que demonstraram prejuízo de cognição e maior expressão de moléculas pró-inflamatórias como TNF e IL-6 (MACHADO *et al.*, 2020).

Portanto, tanto no envelhecimento quanto nas doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, ambas apresentam um aumento de IL-6, corroborando autores que defendem o fenômeno do “inflammaging”, já descrito anteriormente, ao provarem que tais citocinas se encontrariam elevadas e favoreceriam doenças limitantes, principalmente no envelhecimento, defendidos por diversos autores que descrevem o “Inflammaging” como possível causa de uma série de doenças debilitantes, neurodegenerativas, pois acredita-se que esse fenômeno seja o responsável por muitos cânceres, bem como, aterosclerose, doença de Alzheimer e doença inflamatória intestinal (ELISIA *et al.*, 2017).

Seguindo o mesmo perfil, a citocina inflamatória TNF apresentou características similares, mostrados na **Tabela 25** e **Figura 26**. Observamos no grupo de idosos sem Alzheimer, uma redução de 25% (de forma significativa), na dosagem de TNF em leucócitos, na presença de RSV, quando comparado ao grupo sem estímulos e um aumento (53%) de TNF quando tais células foram expostas somente com H₂O₂, comparados ao grupo basal. Uma redução significativa de 40%, na concentração de TNF foi observada, quando houve estímulo com H₂O₂ e RSV, quando

os comparamos com o grupo estimulado somente com H₂O₂. O que nos sugere que o RSV exerceu sua ação anti-inflamatória nos leucócitos de doadores sem Alzheimer.

Quanto ao grupo dos idosos com Alzheimer, apresentados na **Tabela 25** foi observado um perfil semelhante, pois também ocorreu uma redução significativa de TNF (41%) em leucócitos, ao serem expostos ao RSV, comparado ao grupo sem estímulo. Quanto ao grupo de leucócitos que foi estimulado com H₂O₂ de forma isolada, notou-se um aumento significativo dos níveis desta citocina inflamatória (52%). Mas, quando houve interação da tríade (células, H₂O₂ e RSV), observou-se uma redução de 30% de tal concentração, comparado ao grupo estimulado com H₂O₂.

Assim, constata-se que neste estudo, os valores de TNF referentes ao grupo com a Doença de Alzheimer, se encontram praticamente 10 vezes mais elevadas quando comparadas ao grupo sem a doença, com destaque para o grupo com ausência de estímulos (basal), no qual sua relação se aproxima a 1000%. Além de perceber que o RSV teve seu poder anti-inflamatório reduzido no grupo com Alzheimer, já que houve uma redução de TNF menor neste grupo (41% vs 25%) de forma isolada, e 30% vs 40% quando estimulado com H₂O₂. Deste modo, observamos que na neuroinflamação a dosagem de citocinas pró-inflamatórias como TNF, pode se apresentar ainda mais elevada quando comparada com sua dosagem no grupo de idosos sem a doença estudada.

Ainda analisando o perfil inflamatório, porém, sob o aspecto da citocina anti-inflamatória, IL-10, de acordo com a **Figura 27** e **Tabela 26** quanto aos doadores de leucócitos do grupo dos idosos sem Alzheimer, a dosagem de IL-10, sofreu um aumento de 53% ao serem tratadas com RSV, em comparação ao grupo sem nenhum estímulo. Porém, quando foram expostas ao H₂O₂, houve uma redução significativa (41%) na dosagem de IL-10, quando comparada com o grupo basal. Após a exposição dos leucócitos com H₂O₂ e RSV, percebeu-se um aumento significativo de 153% na dosagem da citocina anti-inflamatória, quando comparada com o grupo estimulado apenas com H₂O₂, além do aumento de 153% quando houve o estímulo do polifenol em ambiente mimetizado, comparado ao grupo estimulado com H₂O₂ de forma isolada. Percebendo neste grupo sem a doença, que o RSV exerceu seu papel anti-inflamatório, já que foi capaz de aumentar as dosagens de IL-10 de forma basal e estimulada.

Um perfil semelhante foi percebido no grupo dos idosos com Alzheimer, pois quando as células foram estimuladas juntamente com o RSV, ocorreu um aumento de 77% da concentração de IL-10, comparativamente ao grupo basal; e um aumento de 52% no grupo estimulado com a tríade (célula, H₂O₂ e RSV), comparado ao grupo estimulado com H₂O₂. O RSV também pôde exercer sua ação anti-inflamatória neste caso em particular.

Inferimos que o RSV, de forma isolada, tem seu poder anti-inflamatório potencializado no grupo com Alzheimer (45%), devido à redução em que IL10 já apresenta nos dados basais, o que facilita a ação deste polifenol. Porém, o RSV teve seu poder reduzido em 76% quando este foi estimulado com H₂O₂, neste grupo com Alzheimer. De acordo com diversos autores, IL-10 pode estar reduzida em condições neurodegenerativas, devido a sua atuação anti-inflamatória, o que pode estar reduzida ou até silenciada em casos como a Doença de Alzheimer, justificando assim, tais resultados.

Portanto, os resultados estão de acordo com diversos autores, tanto no grupo de idosos sem a doença, como no grupo com Alzheimer, de acordo com os resultados de Almeida (2019) que constatou a redução de TNF em idoso na presença do RSV e nos estudos de Leite *et al.*, (2020), quando relaciona o aspecto imunológico com a neuroinflamação encontrada na Doença de Alzheimer, visto que as citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF se mostraram elevadas, e as citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 se mostraram em baixas concentrações, assim como os dados encontrados neste trabalho em particular. Tal fenômeno pode ser explicado pois o Sistema Imunológico (SI) é regulado por neurotransmissores, proteínas, citocinas e hormônios e se comunica de maneira constante e extensiva com o Sistema Nervoso Central (SNC); participando desta forma, da modulação do comportamento e de outras funções neurológicas críticas ao longo da vida. Os diversos estímulos captados pelo cérebro durante diferentes situações, podem agir de maneira benéfica ou prejudicial sobre o SI, desencadeando uma série de reações com consequências importantes (BAUER, 2005; ALVES, 2007).

Ou seja, quando analisamos o perfil inflamatório através das citocinas, percebe-se que os idosos com Alzheimer apresentam um quadro inflamatório mais acentuado comprovado pelo aumento significativo de IL-6 e TNF nos leucócitos, quando comparados com os leucócitos dos doadores sem Alzheimer. Além disso, observa-se

uma redução de IL-10 nos leucócitos dos doadores com Alzheimer quando comparados ao grupo sem a doença, corroborando os estudos de Cattaneo *et al.*, (2017), ao demonstrar um aumento significativo de TNF e IL-6 e uma redução significativa de IL10 no sangue periférico de idosos com Alzheimer.

Deste modo, neste estudo em particular, podemos constatar a ação do RSV como antioxidante e anti-inflamatório, em condições específicas no envelhecimento e na presença da DA, como ilustrados na **Tabela 27**.

Assim, o polifenol estudado foi capaz de reduzir ROS em ambos os grupos, aumentar a produção de NO e reduzir a produção de ONOO- no grupo sem a doença. Foi capaz de aumentar a atividade da GPx, reduzir os níveis de concentração de IL-6 /TNF e aumentar IL-10 (nos dois grupos).

Uma das consequências da inflamação crônica subclínica encontrada neste quadro neuroevolutivo foi o declínio funcional que se torna necessário averiguar, já que a capacidade funcional segundo Ferreira *et al.*, (2012), tem sido primordial para a avaliação da saúde do idoso, e, também, que tal avaliação investiga a habilidade e o desempenho para realizar determinadas atividades do cotidiano. Deste modo, procuramos analisar a influência da capacidade funcional nos grupos de idosos sem e com Alzheimer, cujos resultados estão ilustrados na **Tabela 28** e **Tabela 29**.

Assim, percebeu-se que no grupo com Alzheimer houve uma redução significativa da funcionalidade, observada através dos baixos valores apresentados no instrumento Índice de Katz, representando, neste caso, maior dependência (dependência moderada ou muito dependente) apresentadas pelos valores de 0 a 4, ou seja, tais idosos se mostraram mais comprometidos em suas AVDs, quando comparados ao grupo sem Alzheimer. Percebemos, assim, que quanto maior o comprometimento cognitivo observado no Alzheimer menor sua capacidade funcional, de acordo com o instrumento escolhido para este estudo em particular, em concordância com os achados de Ferreira *et al.*, (2012), demonstrando que idosos com Alzheimer (institucionalizados) apresentaram maior dependência quando comparados aos idosos sem a doença, utilizando o mesmo instrumento funcional. Com a intenção de comparar a funcionalidade com os parâmetros de EO (ROS- NO – ONOO-), percebemos que nos leucócitos dos doadores com Alzheimer, os valores basais se mantiveram mais elevados quando comparados ao grupo sem a doença, e

comparados a uma redução de sua funcionalidade. O mesmo foi constatado quanto aos parâmetros relacionados a ICS, quando identificamos que os valores das citocinas (IL6 e TNF) no grupo com a DA, se mantiveram mais elevadas quando, associados também a uma redução de sua funcionalidade.

Concluimos, assim, que tanto o estresse oxidativo, quanto a Inflamação crônica subclínica se mostraram mais elevadas nos grupos basais dos leucócitos de doadores com Alzheimer, concomitante com a redução de sua funcionalidade neste grupo.

Portanto, observamos uma redução na capacidade funcional nos idosos portadores da Doença de Alzheimer concomitante à diminuição das defesas antioxidantes, levando a um quadro de estresse oxidativo associado a uma inflamação crônica subclínica.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, constatamos que o RSV apresentou efeito antioxidante e anti-inflamatório nos leucócitos de ambos os doadores, entretanto sua ação foi menos eficaz em doadores com Alzheimer, grupo no qual a via AMPk se mostrou como a principal via antioxidante atuante. Além disso, idosos com a doença se apresentam menos funcionais. Em conjunto, nosso trabalho corrobora a hipótese de que o estresse oxidativo e a inflamação crônica subclínica, presentes na doença, predispõem ao aumento da perda da autonomia e da independência. Com isso, espera-se que esses resultados possam contribuir para estudos relacionados ao tratamento da Doença de Alzheimer, tanto em nível fisiológico quanto em nível funcional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, P *et al.* Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, n.2, 2010.

AHMED, S. M. U. *et al.* Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica**, v. 1863, p. 585-597, 2017.

ALBERTONI, G.; SHOR N. Resveratrol desempenha importante papel no mecanismo de proteção na doença renal- mini revisão. **J Bras Nefrol.**, v.37, n.1, p.106-114, 2015.

ALMEIDA, L. *et al.* Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n.1, p. S7-S15, 2009.

ANDO, T *et al.* Transduction with the antioxidant enzyme catalase protects human T cells against oxidative stress. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8382-8390, 2008.

ANDREE, G. *et al.* Hampton Quantifying mitochondrial respiration in human lymphocytes and monocytes challenged with hydrogen peroxide. **Free Radical Research**, v.54, n.4, p.271-279, 2020.

ANSARI, M.A.; SCHEFF, S.W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer

- disease in the frontal cortex. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v.69, p.155–167, 2020.
- AREZA-FEGYVERES, R. *et al.* Encefalopatia Traumática Crônica do Boxeador. **Rev. Psiq. Clín.**, v.32, n.1, p.17-26, 2005.
- ASSMANN, T.S. *et al.* Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus : A systematic review and meta-analysis. **Nitric Oxide**, v. 61, p. 1–9, 2016.
- AYTON S, L.P.; Bush, A.I. Metallostasis in Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v.62, p.76–89, 2013.
- BAE, Y. S. *et al.* Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. **Molecules and Cells**, v. 32, p. 491–509, 2011.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C.R D. Óxido Nítrico: Propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046–1054, 2005.
- BEHL, C.; MOOSMANN, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. **Free Radic Biol Med.**, v.15, n.33, p.182–191, 2002.
- BEN ANES, A. *et al.* Increased oxidative stress and altered levels of nitric oxide and peroxynitrite 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.
- BERMAN, A.Y. *et al.* The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **NPJ precision oncology**, v. 1, n. 1, p. 35-43, 2017.
- BHATTACHARYA, S. Reactive oxygen species and cellular defense system. In: **Free radicals in human health and disease**, v.1, p. 17-29, 2015.
- BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BOBERMIN, L. D. *et al.* Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52164- e52176, 2012.
- BRAM, J. M.F. Biomarcadores em líquido e em leucócitos no transtorno depressivo maior, comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Programa de Psiquiatria da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- BUDANOV, A.V. Stress-responsive sestrins link p53 with redox regulation and mammalian target of rapamycin signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1679-1690, 2011.
- BUŁDAK, Ł. *et al.* Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 3, p. 418-429, 2014.

- 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 2016. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.17, p. 431-469, 2016.
- CALDEIRA, C. A. Resveratrol: Mudança no Padrão de Sinalização da SIRT1 e AMPk, durante o processo de envelhecimento. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia-ICB da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- CALDEIRA, C.A. *et al.* Resveratrol: Change of SIRT 1 and AMPK signaling pattern during the aging process. **Experimental Gerontology**, v.146, p.1-10, 2021.
- CANDORE, G. *et al.* Inflammation, cytokines, immune response, apolipoprotein E, cholesterol, and oxidative stress in Alzheimer disease: therapeutic implications. **Rejuvenation Res**, v.13, p.301–313, 2010.
- CANTÓ, C *et al.* Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell metabolism**, v. 11, n. 3, p. 213-219, 2010.
- CARAMELLI, P. *et al.* Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil: Exames complementares. **Dement Neuropsychol**, n. 5 (Supple 1), p. 11-20, 2011.
- CATTANEO, D. *et al.* Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. **Neurobiology of aging**. v. 49, p. 60-68, 2017.
- CETRULO, S.; D'ADAMO, S.; TANTINI. mTOR, AMPK, and Sirt1: key players in metabolic stress management. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression.**, v.25, n.1, p.59-75, 2015.
- CHANDRASEKARAN, A.; SOSA, P.; MELENDEZ, J.A. Redox Biology Redox control of senescence and age-related disease. **Redox Biology**, v. 11, p. 91–102, 2017.
- CHANG, C. *et al.* Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity , differentiation , and lipolysis in 3T3-L1 cells. **Endocrine journal**, v. 63, n. 2, p. 169–178, 2016.
- CHAVES, M.M. *et al.* Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. **Mechanisms of ageing and development**, v. 104, n. 1, p. 103-109, 1998.
- CHAVES, M. M. *et al.* Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age. **Mech Ageing Dev**, v. 119, p. 1-8, 2000.

- CLEMENTE, C.E.T; PINTO, R.A.R. Revisão e atualização dos biomarcadores no líquido para doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, p. 1-17, 2017.
- CIOSAK, S. I *et al.* Senescência e senilidade: novo paradigma na atenção básica em saúde. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v. 45, p. 1763-1768, 2011.
- CORRADI, M. *et al.* Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 54, n. 7, p. 572-575, 1999.
- CORREIA-COSTA, L. *et al.* Oxidative stress and nitric oxide are increased in obese children and correlate with cardiometabolic risk and renal function. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 5, p. 805-815, 2016.
- COVARRUBIAS, L. *et al.* Function of reactive oxygen species during animal development : Passive or active ?. **Developmental biology**, v. 320, n. 1, p. 1–11, 2008.
- DAITOKU, H.; SAKAMAKI, J.I.; FUKAMIZU, A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 11, p. 1954–1960, 2011.
- DANYLOVYCH, G V; BOHACH, T V; DANYLOVYCH, Yu V . The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. **Ukrainian Biochemical Journal**, v. 90, n. 1, p. 3–24, 2018.
- DASGUPTA, B.; MILBRANDT, J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 17, p. 7217-7222, 2007.
- DE LA FUENTE, M.; MIQUEL, J. Um update the oxidation-inflammation theory of aging:the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging, **Current Pharmacological Disease**, v.15,3003-26, 2009.
- DE LA LASTRA, C.A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent : mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions** v. 35, p. 1156–1160, 2007.
- DIAS, S.D.; FULGA, T.A.; DUTTARROY, A.; FEANY, M.B. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila. **J Clin Invest.**, v.117, p.236–245, 2007.
- DIAZ-GEREVINI, G.T. *et al.* Beneficial action of resveratrol: how and why?. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 174-178, 2016.
- DICKINSON, B.C; CHANG, C.J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504–511, 2011.
- DUARTE, G.P. *et al.* Relationship of falls among the elderly and frailty components. **Rev Bras Epidemiol.**, v.2, 2019.

- DUMONT, M. *et al.* Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 8, p. 2459-2466, 2009.
- DUSSE, L.M. *et al.* Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- ELISIA, I.; LAM, V.; HOFSE, E.; LI, M.Y. KRYSTAL, G. Effect of age on chronic inflammation and responsiveness to bacterial and viral . **PLOS ONE**, 2017.
- EMAMGHOLIPOUR, S. *et al.* Can melatonin act as an antioxidant in hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in human peripheral blood mononuclear cells?. **Biochemistry research international**, v.16, p. 1-8, 2016.
- FARFEL, J M. 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.
- FENG, Y.S. *et al.* The involvement of NLRP3 inflammasome in the treatment of Alzheimer's disease. **Ageing Res Rev.**, 2020.
- FERREIRA, L. L. *et al.* Functional capacity of institutionalized elderly with or without Alzheimer's disease. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v.17, p.567-573, 2012.
- FERREIRA, O.G.L *et al.* Envelhecimento ativo e sua relação com a Independência Funcional. **Rev. Texto Contexto. Enferm**, v.21, p.513-8, 2012.
- FICHMAN, H.C. *et al.* Decline of cognitive capacity during aging. **Braz. J. Psychiatry**, v.1, 2005.
- FORMAN, H.J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 166, p. S4-S8, 2002.
- FUJIMOTO, H. *et al.* Age-Induced Reduction in Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Activity and Tolerance of Macrophages Against Apoptosis Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein. **Circulation Journal**, v. 74, n. 2, p. 353-360, 2010.
- GARCIA, D.; SHAW, R.J. AMPK : Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. **Molecular Cell**, v. 66, n. 6, p. 789–800, 2017.
- GERHART-HINES, Z. *et al.* The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD+. **Molecular cell**, v. 44, n. 6, p. 851-863, 2011.
- GIERGIEL, M. *et al.* Age-related Changes in Activity of Catalase in Selected Bovine Muscles. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1-7, 2015.
- GIORDANO, C.R. *et al.* Catalase therapy corrects oxidative stress-induced pathophysiology in incipient diabetic retinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 56, n. 5, p. 3095-3102, 2015.
- GLADYSHEV, V.N. The Free Radical Theory of Aging Is Dead . Long Live the

- Damage Theory !. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 4, p. 727-731, 2014.
- GOMES, A.P. *et al.* Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. **Cell**, v.155, p.1624–1638, 2013.
- GONZALEZ-VICENTE, A.; CABRAL, P.D.; GARVIN, J.L. Resveratrol increases nitric oxide production in the rat thick ascending limb via Ca²⁺/calmodulin. **PloS one**, v. 9, n. 10, p.11048-95, 2014.
- GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Molecular Diagnosis**, v. 8, n. 3, p. 141-149, 200
- GOTO, H. *et al.* Endothelial MnSOD overexpression prevents retinal VEGF expression in diabetic mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 366, n. 3, p. 814-820, 2008.
- GOWANS, G.J. *et al.* AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 556–566, 2013.
- GRANZOTTO, A.; ZATTA, P. Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. **Front Aging Neurosci.** v.14, p.6:95, 2014.
- GREENOUGH, M.A.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A.I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochem Int.**, v.62, p.540–555, 2013.
- GRIESS, J.P. On a new series of bodies in which nitrogen substituted for hydrogen. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** ,v. 154, p. 667-731, 1864.
- GRUBER, H. J. *et al.* Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 5, p. 826-831, 2008.
- GWINN, D. M. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Molecular cell**, v. 30, n. 2, p. 214-226, 2008.
- Habib, L. K. *et al.* Inhibitors of catalase amyloid interactions protect cells from β -amyloid induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.50, p. 38933–38943, 2010.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis ? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.
- HARDIE, D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 10, p. 774-786, 2007.
- HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. **Annual review of nutrition**, v. 34, p. 31-55, 2014.
- HARDIE, D.G. AMPK — Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 939–952, 2014.
- HARDIE, D.G. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein

- kinase. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, n. 138, p. 1-23, 2018.
- HARDIE, D.G.; LIN, S.C. AMP-activated protein kinase—not just an energy sensor. **F1000Research**, v. 6, p. 1-11, 2017.
- HERZIG, S.; SHAW, R.J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 2, p. 121-135, 2018.
- HOFFMANN, T. *et al.* Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discov Today**. v.20, n.1, p.122-8, 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.
- HOU, X. *et al.* SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, p. 20015-20026, 2008.
- HOUTKOOPEL, R. H. *et al.* Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 225-238, 2016.
- HOWITZ, K.T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, n. 6954, p. 191-196, 2003.
- IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018.
- INOKI, K. *et al.* TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, n. 5, p. 577-590, 2003.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: **Tests For In Vitro Cytotoxicity**. 2009.
- IVANOV, V.N. *et al.* Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. **Experimental cell research**, v. 314, n. 5, p. 1163-1176, 2008.
- JARDIM, F.R. *et al.* Resveratrol and Brain Mitochondria: a Review. **Mol Neurobiol.**, v.55, n.3, p.2085-2101, 2018.
- JEEVA, J. Sathiya *et al.* Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v.7, p. S331-S333, 2015.
- JĘŚKO, H.; STROSZNAJDER, R.P. Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly (ADP-ribose) polymerases. **Folia neuropathologica**, v. 54, n. 3, p. 212-233, 2016.
- JÚNIOR, P.P. *et al.* Leucócitos como marcadores de risco para doenças cardiovasculares na adolescência. **Revista Paulista de Pediatria**, v.34, n.1, p. 38-46,

2016.

KAVAS, G.O. *et al.* The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. **Adv Clin Exp Med**, v. 22, n. 2, p. 151-155, 2013.

KHAN, A. *et al.* Antioxidant Enzymes and Cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 22, n. 2, p. 87–92, 2010.

KIM, C. Y. *et al.* Therapeutic Effect of Resveratrol on Oxidative Stress in Graves' Orbitopathy Orbital Fibroblasts. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 56, n. 11, p. 6352-6361, 2015.

KIM, J. *et al.* AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 4, p. e224 - e236, 2016.

KIM, Y. J. *et al.* Recent studies on resveratrol and its biological and pharmacological activity. **EXCLI journal**, v. 16, p. 602-608, 2017.

KIMBROUGH, C.W. *et al.* Resveratrol decreases nitric oxide production by hepatocytes during inflammation. **Surgery**, v. 158, n. 4, p. 1095-1101, 2015.

KOZAKO, T. *et al.* High expression of the longevity gene product SIRT1 and apoptosis induction by sirtinol in adult T-cell leukemia cells. **International journal of cancer**, v. 131, n. 9, p. 2044-2055, 2012.

KUMAR, A. *et al.* Epigenetic potential of resveratrol and analogs in preclinical models of prostate cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 1–9, 2015.

LA PORTE, C. *et al.* Steady-state pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. **Clinical pharmacokinetics**, v. 49, n. 7, p. 449-454, 2010.

LAI, K.S.P. *et al.* Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.88, n°10, p.876-882, 2017.

LAN, F. *et al.* SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1 possible role in AMP-activated protein kinase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27628-27635, 2008.

LARA, R.C. *et al.* Oxidative Stress : In Vitro Comparative Evaluation of the Resveratrol Modulator Capacity in Neuro 2-A Lines and Human Leukocyte Cells. **Current Trends in Metabolomics**, v. 2018, n. 01, P. 1-8, 2018.

LARA, R. C. **Estresse oxidativo: Avaliação in vitro da capacidade moduladora do Resveratrol em Células da linhagem Neuro 2-A**. 2018. Tese (Doutorado em Neurociências) - Programa de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LARA, R. C. *et al.* Preventive use of Resveratrol increases its antioxidant capacity in neuro-2a cells. **International Journal of Development Research**, v.10, n.10, p.

41411-17, 2020.

LEE, J.H. *et al.* Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. **Cell metabolism**, v. 18, n. 6, p. 792-801, 2013.

LEBOVITZ, R.M. *et al.* Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 18, p. 9782-9787, 1996.

LEITE, M.S. *et al.* Diagnóstico do Paciente com Doença de Alzheimer: Uma revisão Sistemática de Literatura. **Braz. J. Surg. Clin. Res**, v.30, n.1, p. 47-50, 2020.

LI, L. *et al.* Acetic acid influences BRL-3A cell lipid metabolism via the AMPK signalling pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 2021-2030, 2018.

LI, X. N. *et al.* Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. **Diabetes**, v. 58, n. 10, p. 2246-2257, 2009.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v. 13, p. 757-772, 2018.

LIN, C. J. *et al.* Resveratrol protects astrocytes against traumatic brain injury through inhibiting apoptotic and autophagic cell death. **Cell death & disease**, v. 5, n. 3, p. e1147-e1158, 2014.

LIRA, V. A *et al.* Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 α in skeletal muscle cells. **J Physiol.**, v.588, n $^{\circ}$ 18, p.3551–3566, 2010.

LIU, F. *et al.* Anti-Inflammatory and Organ-Protective Effects of Resveratrol in Trauma-Hemorrhagic Injury. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 38–42, 2015.

LOBO, V. *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194-1217,, 2013.

LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* Metabolic control of longevity. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 802-821, 2016.

MA, C.H. *et al.* Homocysteine causes dysfunction of chondrocytes and oxidative stress through repression of SIRT1/AMPK pathway: A possible link between hyperhomocysteinemia and osteoarthritis. **Redox biology**, v. 15, p. 504-512, 2018.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2013.

MACHADO, A. P. R., CARVALHO, I. O.; ROCHA SOBRINHO, H. M. Neuroinflamação na Doença de Alzheimer. **Rev Bras. Militar de Ciências**, v.6, n $^{\circ}$ 14, 2020.

- MAPPETTI, M. et al. Neuroinflammation predicts disease progression in progressive supranuclear palsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.92, p.769–775, 2021.
- MARRA, T.A. et al. Atividades de vida diária de idoso com demência. **Rev. Bras. Fisiot.**, São Carlos, v. 11, n. 4, p. 267-273, 2007.
- MARTIN, J. E.; SHEAFF, M.T. The pathology of ageing : concepts and mechanisms.**The Journal of Pathology**, v. 211, p. 111–113, 2007.
- 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.
- MELENDEZ, G.V. et al. Prevalência e fatores associados com hipertensão arterial autorreferida em adultos brasileiros. **Rev Saude Publica**, v.17;51 Supl 1:11s, 2017.
- MENDES, J.L.V. et al. O aumento da população Idosa no Brasil e o Envelhecimento na última década: Uma Revisão da Literatura. **REMAS- Revista Educação, Meio Ambiente**. v. 8, n.1, p. 13-26, 2018.
- MIRANDA, G.M.D. et al. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v.19, n.3, p.507-519 2016.
- MOHAR, Di.S.; MALIK, S. The sirtuin system: the holy grail of resveratrol. **Journal of clinical & experimental cardiology**, v. 3, n. 11, p. 216-219, 2012.
- MOKNI, M. et al. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemical research**, v. 32, n. 6, p. 981-987, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MULLER, C.H.L. et al. Exercise Training for the Elderly: Infammaging and the Central Role for HSP70. **Journal of Science in Sport and Exercise**, v.1, p.97–115, 2019.
- NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **J Cell Sci**, v. 124, n. 6, p. 833-838, 2011.
- NANDI A, Y.L.; LANA, C.K.; DAS, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxid Med Cell Longev.**, v.11, 2019.
- NICOLAI, S.; ROSSI, A.; DI DANIELE, N.; MELINO, G. DNA repair and aging: the impact of the p53 family. **Aging** ,v.7, 1050-1065, 2015.
- NOGUEIRA-MACHADO, J. A. et al. Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic patients: na Akt/PKBdependent phenomenon. **Diabetes & Metabolism**, v. 32, 331-335, 2006.
- NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Rsc Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

- OLIVEIRA, B. F.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M. The role of oxidative stress in the aging process. **The Scientific World Journal**, v. 10, 1121-1128, 2010.
- PACHER, P.I.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.
- PARK, S.J. *et al.* Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 421–433, 2012.
- PASHA, M. *et al.* Sestrin2 as a Novel Biomarker and Therapeutic Target for Various Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.17, p. 1–10, 2017.
- 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.
- PEREIRA, A. *et al.* Envelhecimento, estresse e sociedade: uma visão psiconeuroendócrinológica. **Ciências e Cognição**. V.1, 34-53, 2004.
- PFLUGER, P.T. *et al.* Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 105, n. 28, p. 9793-9798, 2008.
- POTENTE, M.; DIMMELER, S. NO Targets SIRT1 A Novel Signaling Network in Endothelial Senescence. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.28, n. 9, p. 1577-1579, 2008.
- PRICE, N. L. *et al.* Article SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 675–690, 2012.
- RAJ, P.; ZIEROTH, S.; NETTICADAN, T. An overview of the efficacy of resveratrol in the management of ischemic heart disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 55-67, 2015.
- REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.
- RHEE, S. G.; BAE, S.H. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 205-211, 2015.
- RÓDENAS, J.; MITJAVILA, M.T.; CARBONELL, T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 274, n. 3, p. C827-C830, 1998.
- SABLINA, A.A. *et al.* The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Nature medicine**, v. 11, n. 12, p. 1306-1313, 2005.
- SALMINEN, A.; HYTTINEN, J.M.T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and

- lifespan. **Journal of molecular medicine**, v. 89, n. 7, p. 667-676, 2011.
- SALMINEN, L.E.; PAUL, R.H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 805-819, 2014.
- SANCAK, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496-1501, 2008.
- SANT, K. E. *et al.* The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. **Redox biology**, v. 13, p. 207-218, 2017.
- SANTOS, L; ESCANDE, C; DENICOLA, A. Potential modulation of sirtuins by oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 16, p. 1-13, 2016.
- SANTOS, M. A. **Envelhecimento: Avaliação da Capacidade Antioxidante e Anti-Inflamatória do Resveratrol, através do estudo das vias de sinalização celular, PKA, MAPK, AKT/PKB, em células mononucleares humanas in vitro.** 2019. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia-ICB da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
- SANTOS, M. A. *et al.* Antioxidant effect of Resveratrol: Change in MAPK cell signaling pathway during the aging process. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.92, p. 1-8, 2021.
- SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M.T.B. Healthy human aging: intrinsic and environmental factors. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 23-30, 2017.
- SHELTONS, P. *et al.* Alzheimer's disease. **Lancet**. v.24, n.397, p.1577-1590, 2021.
- SHETH, R. *et al.* Age and sex related serum changes in nitric oxide and its correlation with plasma lipid profile and lipid peroxidation in healthy ageing individuals. **International Journal of Advances in Medicine**, v. 4, n. 4, p. 1031–1035, 2017.
- SHIN, S. M. *et al.* Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly (ADP-ribose) polymerase-LKB1 pathway. **Molecular pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 884-895, 2009.
- SHIN, W. *et al.* Increased arginase II activity contributes to endothelial dysfunction through endothelial nitric oxide synthase uncoupling in aged mice. **Experimental & molecular medicine**, v. 44, n. 10, p. 594, 2012
- SIRIVARASAI, J. *et al.* Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: an analysis based on the EGAT study. **BioMed research international**, v.15, p. 1-9, 2015.
- SOUZA, J.C. *et al.* Resveratrol in Alzheimer's disease: a review. **Arq.**

Neuropsychiatr. v. 78, n°8, p.501-511, 2020.

SOYDINÇ, S. *et al.* The relationship between oxidative stress, nitric oxide, and coronary artery disease. **Eur J Gen Med**, v. 4, n. 2, p. 62-66, 2007.

SRIVASTAVA, S. The mitochondrial basis of aging and age-related disorders. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 398-421, 2017.

STANEVIČIENĖ, I. *et al.* Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. **Medicina**, v. 52, n. 3, p. 148-155, 2016.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.

SU, Q.; PU, H.; HU, C. Neuroprotection by combination of resveratrol and enriched environment against ischemic brain injury in rats. **Neurological research**, v. 38, n. 1, p. 60-68, 2016.

SZKUDELSKI, T.; SZKUDELSKA, K. Anti-diabetic effects of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 34-39, 2011.

SZKUDELSKI, T.; SZKUDELSKA, K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1145-1154, 2015.

TAKAHASHI, S.; UCHIYAMA, T.; TODA, K. Differential effect of resveratrol on nitric oxide production in endothelial f-2 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 11, p. 1840-1843, 2009

TAMAKI, N. *et al.* Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. 222-229, 2014.

TENNEN, R.I. *et al.* Finding a Target for Resveratrol. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 387-389, 2012.

TOSATO, G.; COHEN, J.I. Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines. **Curr Protoc Immunol.**, v.7, n.7, 2007.

TRUONG, V.; JUN, M.; JEONG, W. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. **Biofactors**, v. 44, n. 1, p. 36-49, 2018.

TURNER, R.S.; T. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. **Neurology**, v.85, n.16, 2015.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

VASILAKI, A. *et al.* Adaptive responses of mouse skeletal muscle to contractile activity: the effect of age. **Mechanisms of ageing and development**, v. 127, n. 11, p. 830-839, 2006.

VAUPEL, J.W. NIH Biodemography of human ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 536–542, 2010.

VENTURELLI, M. *et al.* Impact of Nitric Oxide Bioavailability on the Progressive Cerebral and Peripheral Circulatory Impairments During Aging and Alzheimer's Disease. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 169-178, 2018.

VENUGOPAL, R.; JAISWAL, A. K. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. **Oncogene**, v. 17, n. 24, p. 3145-3156, 1998.

VIEGAS, F. P.D. *et al.* Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamatório. **Rev. Virtual. Quim.** v. 3, n.4, p. 286-306, 2011.

VINGTDEUX, V. *et al.* AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid- β peptide metabolism. **J Biol Chem.**, 2010.

VOLONTE, D. *et al.* Oxidative stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6). **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 7, p. 4202-4214, 2015.

WANG, C. *et al.* The impact of population aging on medical expenses : A big data study based on the life table. **Bioscience trends**, v. 11, n. 6, p. 619-631, 2017.

WANG, R. *et al.* Resveratrol Protects Neurons and the Myocardium by Reducing Oxidative Stress and Ameliorating Mitochondria Damage in a Cerebral Ischemia Rat Model. **Cell Physiol Biochem**, v.34, p. 854-864, 2014.

WEISKIRCHEN, S.; WEISKIRCHEN, R. Resveratrol: Is It Really Good for Liver Health?. **Hepatitis Monthly**, v. 17, n. 8, p. 1-13, 2017.

WONG, R. H. X. *et al.* Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 11, p. 851-856, 2011.

XIA, N.; FÖRSTERMANN, U.; LI, H. Effects of resveratrol on eNOS in the endothelium and the perivascular adipose tissue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1403, n. 1, p. 132-141, 2017.

XIA, N.; FÖRSTERMANN, U; LI, H. Resveratrol and endothelial nitric oxide. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16102-16121, 2014.

XU, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. **Nature medicine**, v. 24, n. 8, p. 1246-1256, 2018.

XU, Z. *et al.* Rhizoma Coptidis and Berberine as a Natural Drug to Combat Aging and Aging-Related Diseases via Anti- Oxidation and AMPK Activation. **Aging and disease**, v. 8, n. 6, p. 760–777, 2017.

YAN, M.H.; Wang, X.; Zhu, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radic Biol Med.**, v.62, p.90–101, 2013.

YANG, L. *et al.* AMPK: Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. **Current Protein and Peptide Science**, v.21, p.66-77, 2020.

YE, X. *et al.* Sirtuins in glucose and lipid metabolism. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1845-1859, 2017.

YUN, H. *et al.* AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. **The FEBS journal**, v. 281, n. 19, p. 4421-4438, 2014.

ZAGHLOUL, N. *et al.* Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects against brain injury induced by chronic hypoxia. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 1-11, 2014.

ZÁMOCKÝ, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology*, v. 72, n. 1, p. 19-66, 1999.

ZHAO, Y.; Zhao, B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Oxid Med Cell Longev**, 2013.

ZHANG, J. *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 1-19, 2016.

ZHANG, J. *et al.* Pinolenic acid ameliorates oleic acid-induced lipogenesis and oxidative stress via AMPK/SIRT1 signaling pathway in HepG2 cell. **European Journal of Pharmacology**, v.861, 2019.

9. ANEXOS

Índice de KATZ

ÍNDICE DE KATZ – De Independência nas Atividades de Vida Diária

Tentar obter essas informações com o paciente caso seja possível.

1. Tomar banho (esponja, chuveiro ou banheira):

- (I) Não precisa de ajuda;
- (A) Precisa de ajuda apenas para lavar uma parte do corpo;
- (D) Precisa de ajuda para higiene completa (ou não toma banho).

2. Vestir-se:

- (I) Pega as roupas e veste-se sem nenhuma ajuda;
- (A) Pega as roupas e veste-se sem ajuda, com exceção de amarrar os sapatos;
- (D) Precisa de ajuda para pegar as roupas ou para se vestir, ou fica parcial ou completamente não vestido.

3. Ir ao banheiro:

- (I) Vai ao banheiro, faz a higiene, e se veste sem ajuda (mesmo usando um objeto para suporte como bengala, cadeira de rodas, e pode usar urinol à noite, esvaziando este de manhã);
- (A) Recebe ajuda para ir ao banheiro, ou para fazer higiene, ou para se vestir depois de usar o banheiro, ou para o uso do urinol à noite;
- (D) Não vai ao banheiro fazer suas necessidades.

4. Locomoção:

- (I) Entra e sai da cama, assim como da cadeira, sem ajuda (pode estar usando objeto para suporte, como bengala ou andador);
- (A) Entra e sai da cama ou da cadeira com ajuda;
- (D) Não sai da cama.

5. Continência:

- (I) Controla a urina e movimentos do intestino completamente, por si próprio;
- (A) Tem acidentes ocasionais;
- (D) Supervisão ajuda a manter o controle da urina e do intestino, cateter é usado ou é incontinente.

6. Alimentação:

- (I) Alimenta-se sem ajuda;
- (A) Alimenta-se com exceção no caso de cortar carne ou passar manteiga no pão;
- (D) Recebe ajuda para se alimentar ou é alimentado parcial ou completamente por meio de tubos ou fluido intravenosos.

Quando o paciente não souber informar, favor anotar que a informação não foi dada por ele.

Resultados:

- A. Independente em tomar banho, vestir-se, ir ao banheiro, locomoção, continência e alimentação;
- B. Independente para todas as funções anteriores, exceto uma;
- C. Independente para todas exceto tomar banho e outra função adicional;
- D. Independente para todas as funções exceto tomar banho, vestir-se e outra função adicional;
- E. Independente para todas as funções exceto tomar banho, vestir-se, ir ao banheiro e outra função adicional;
- F. Independente para todas as funções exceto tomar banho, vestir-se, ir ao banheiro, alimentação e outra função adicional;
- G. Dependente em todas as seis funções;
- H. Dependente em ao menos duas funções, mas não pode ser classificado como C, D, E e F.

KATZ, S. et al. Studies of Illness in the Aged – The Index of ADL: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function. JAMA. Sept 21, 1963.

Ass. Terapeuta Ocupacional _____ Data: ___/___/___

4 - Índice de Independência nas Atividades Básicas de Vida Diária (AVD) de Sidney Katz, modificado por The Hartford Institute for Geriatric Nursing, 1998.

| ATIVIDADES Pontos (1 ou 0) | INDEPENDÊNCIA (1 ponto) SEM supervisão, orientação ou assistência pessoal | DEPENDÊNCIA (0 pontos) COM supervisão, orientação ou assistência pessoal ou cuidado integral |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Banhar-se Pontos: ____ | (1 ponto) Banha-se completamente ou necessita de auxílio somente para lavar uma parte do corpo como as costas, genitais ou uma extremidade incapacitada | (0 pontos) Necessita de ajuda para banhar-se em mais de uma parte do corpo, entrar e sair do chuveiro ou banheira ou requer assistência total no banho |
| Vestir-se Pontos: ____ | (1 ponto) Pega as roupas do armário e veste as roupas íntimas, externas e cintos. Pode receber ajuda para amarrar os sapatos | (0 pontos) Necessita de ajuda para vestir-se ou necessita ser completamente vestido |
| Ir ao banheiro Pontos: ____ | (1 ponto) Dirigi-se ao banheiro, entra e sai do mesmo, arruma suas próprias roupas, limpa a área genital sem ajuda | (0 pontos) Necessita de ajuda para ir ao banheiro, limpar-se ou usa urinol ou comadre |
| Transferência Pontos: ____ | (1 ponto) Senta-se/delta-se e levanta-se da cama ou cadeira sem ajuda. Equipamentos mecânicos de ajuda são aceitáveis | (0 pontos) Necessita de ajuda para sentar-se/deitar-se e levantar-se da cama ou cadeira |
| Continência Pontos: ____ | (1 ponto) Tem completo controle sobre suas eliminações (urinar e evacuar) | (0 pontos) É parcial ou totalmente incontinente do intestino ou bexiga |
| Alimentação Pontos: ____ | (1 ponto) Leva a comida do prato a boca sem ajuda. Preparação da comida pode ser feita por outra pessoa | (0 pontos) Necessita de ajuda parcial ou total com a alimentação ou requer alimentação parenteral |

| | | | |
|---------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Total de Pontos = ____ | 6 = Independente | 4 = Dependência moderada | 2 ou menos = Muito dependente |
|---------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------------|

Fonte: The Hartford Institute for Geriatric Nursing, 1998⁽²⁰⁾

Anotações

Artigo publicado



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 10, Issue, 11, pp. 42374-42380, November, 2020

<https://doi.org/10.37118/ijdr.20451.11.2020>

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

ALZHEIMER'S ALTERS AMPK SIGNALING PATHWAY AND BIOMARKERS OF SUBCLINICAL INFLAMMATION IN LEUKOCYTES STIMULATED WITH RESVERATROL

*Luciana C. Cardoso, Filipe N. Franco, Glaucy R. de Araújo, Barbara N.M. Silva and Miriam M. Chaves

Biochemistry Laboratory of Aging and Correlated Diseases, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte/MG – Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 17th August, 2020
 Received in revised form
 28th September, 2020
 Accepted 04th October, 2020
 Published online 30th November, 2020

Key Words:

Aging; Alzheimer's; Resveratrol;
 Neuroprotective; AMPK.

*Corresponding author:

Luciana C. Cardoso,

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is considered the most prevalent form of dementia in the elderly and represents the fifth leading cause of death in this population. In addition, free radicals seem to play a fundamental role in brain aging, since several studies have found an association between cytotoxicity promoted by the accumulation of β A and oxidative stress. In this context, Resveratrol (RSV) is a polyphenol that has antioxidant and anti-inflammatory activity. However, its mechanism of action in elderly AD is still unclear. Therefore, the aim of this study was to analyze the possible modulating and/or neuroprotective effect of resveratrol from human leukocytes isolated from patients without and with AD. Our results showed that RSV has both antioxidant and anti-inflammatory activity. Among its possible mechanism of action, there is a correlation between the AMPK cell signaling pathway. However, it was possible to observe that its action occurs more accentuated in elderly people without AD, having shown a greater neuroprotective effect.

Copyright © 2020, Luciana C. Cardoso et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Luciana C. Cardoso, Filipe N. Franco, Glaucy R. de Araújo, Barbara N.M. Silva and Miriam M. Chaves. 2020. "Alzheimer's alters ampk signaling pathway and biomarkers of subclinical inflammation in leukocytes stimulated with resveratrol". *International Journal of Development Research*, 10, (11), 42374-42380.

INTRODUCTION

Aging can be associated with loss of functionality, resulting in a decrease in skills, such as learning, memory and intellectual activity, due to degeneration of the central nervous system. In this context, Alzheimer's disease (AD) is considered the most prevalent form of dementia in the elderly and represents the fifth leading cause of death in this population. It is considered a neurodegenerative disorder, affecting the cortex and hypothalamus, which can cause a progressive worsening of the individual's cognitive and motor function, resulting in speech impairment, recognition of words and objects, as well as the inability to perform voluntary movements (Souza *et al.* 2020). In addition, AD is characterized by the presence of senile plaques, which are formed by the deposition of β -amyloid peptides (β A) in the brain of individuals affected by the disease, in addition to presenting areas of chronic inflammation (Vingtdeux *et al.* 2010). Associated with this process, free radicals seem to play a fundamental role in brain aging, as several studies have found an association between cytotoxicity promoted by the accumulation of β A and

oxidative stress, resulting in an imbalance between the production and removal of reactive species oxygen (ROS). This increase in reactive species due to the reduction of antioxidant defenses is responsible for neurodegeneration mediated by oxidative stress (Viegas *et al.* 2011). In this context, there are antioxidants substances capable of retarding or inhibiting oxidation, defending the body from free radicals, maintaining homeostasis. Among them, the polyphenols family stands out, such as resveratrol (RSV), a stilbenoid compound found especially in plant sources such as peanuts, grapes and blackberries (Diaz-gerevini *et al.* 2016). Among the biological properties of RSV, is its ability to increase mitochondrial biogenesis (seen through its antioxidant effect), anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-cancer. Its best known cellular mechanisms are through its ability to activate the AMPk signaling pathway. These pathways mediate different responses to stress (in particular inflammation), observed as one of the causes of aging and its related diseases (Albertoni *et al.* 2015). Thus, the aim of our study was to verify whether Alzheimer's disease alters the signaling pattern of the AMPK pathway and the biomarkers of subclinical

chronic inflammation generated by Resveratrol in donors without Alzheimer's.

METODOLOGY

Donor selection: The project was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Minas Gerais - CAAE: 14846619.7.0000.5149. Men and women over 60 years old were selected and separated into two groups: without (control group) and with Alzheimer (AD). Those who were able to participate were invited to sign the Free and Informed Consent Form and their guardians, the Free and Informed Consent Term. Detailed medical history, physical examination and laboratory data for each subject were recorded. Inclusion and exclusion criteria followed Moraes *et al.* (2010). Ten individuals of both genders were selected as subjects for the research. AD patients were selected by Dr Rafael Pacheco Terra (CRM: 45302), with the following examinations: physiological evaluation; cognitive functions; mental health (Mini Mental). Patients had a diagnosis of probable AD according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria, and no major concomitant pathology (Oliveira *et al.* 2012). The demographic characteristics of the population are shown in Table 1.

Table 1. Demographic characteristics of the study population

| Parameters | Control | | Alzheimer | |
|--------------------------------------|--------------|----|---------------|--|
| | Mean ± SE | | Mean ± SE | |
| Age (years) | 76.3 ± 7 | ns | 78 ± 5.4 | |
| Body mass index (kg/m ²) | 23.4 ± 3 | ns | 25.5 ± 4.0 | |
| Serum Glucose (mg/dL) | 102.6 ± 11.3 | ns | 105.6 ± 10.6 | |
| Serum Triglycerides (mg/dL) | 164.3 ± 20 | ns | 153.5 ± 23 | |
| Serum creatine (mg/dL) | 0.741 ± 0.17 | ns | 0.994 ± 0.169 | |
| Vascular Complications | No | | No | |

ns = not significant by Mann-Whitney test. Body mass index range = 18.5–24.99 kg/m² (Martin McKee, 2000). Serum glucose: Normal value less than 99 mg/dL (Alexandria *et al.*, 2011). Triglycerides: Normal levels <150 mg/dL (American Heart Association, 2017). Serum Creatine: Normal levels 0.5–1.5 mg/dL for men and 0.6–1.2 mg/dL for women (Koch., 2000). n=10 Control group and n=10 Alzheimer group.

Obtaining leukocytes: Leukocytes were isolated according to the technique described in the literature, with adaptations (Wencel *et al.* 2017). In this way, 4 mL of heparinized blood was added in 3 mL of leucopaque gradient (density 1.12). After centrifugation (600g), two distinct phases were obtained and separated by two interphasic rings. The plasma formed corresponding to the first phase was discarded. The leukocytes were placed in another tube and resuspended with PBS (pH 7.3) through two washing sessions. Finally, the cells were suspended in 1 ml of PBS and the end the volume was adjusted to 1×10⁷ cells/ml.

Padronization of H₂O₂ and resveratrol concentration: The chosen H₂O₂ concentrations were previously chosen from the literature (Emamgholipour *et al.* 2016). First, the cells were stimulated with increasing concentrations of H₂O₂ for 1 h at 37°C: 50, 150 and 250 µM. Cell viability was performed using the trypan blue assay. In addition, the chemiluminescence test was performed in order to assess which concentrations were capable of generating an oxidizing environment. The resveratrol concentration was defined based on the Dose-Response-Curve. For this, 5×10³ cells/well were stimulated

with increasing concentrations of resveratrol: 0.63 µM; 1.25 µM; 2.5 µM; 5 µM; 10 µM and 20 µM for 24 hours at 37°C. After treatment, 100µL of resazurin (0.125 mg/L) was added to wells and the plate was incubated for 3 hours at 37°C. Absorbance was read at 570 nm in microplate reader (Thermo Plate). Results were expressed as absorbance vs concentration ± SE.

Cell viability assay: The MTT colorimetric assay was performed to verify cell viability against treatments with H₂O₂, RSV and H₂O₂ + RSV. For this, 5×10³ cells / well were seeded with their respective treatments for 1 h at 37°C. After that, 20 µL of MTT solution was added to the wells and the plate was incubated for 30 min at 37°C protected from light. Finally, 100 µL of DMSO was added to dissolve the generated formazan crystals and the absorbance was read at 570 nm in a microplate reader (Thermo Plate). The results were expressed as a percentage of viability ± SE.

Chemiluminescence Assay

Part I - Production of ROS

The quantitative determination of ROS was performed through the luminol-dependent chemiluminescence assay, according to Horta *et al.* (2005) with some adaptations. First, the leukocytes (1×10⁶ cell) were divided into four groups, with different treatments: (1) Negative control: leukocytes and luminol (10⁻⁴M) were added in a tube; (2) Positive Control: leukocytes, H₂O₂(150 µM) and luminol were added to the tube; (3) Treatment: leukocytes, H₂O₂ (150 µM) + RSV (5 µM) and luminol were added to the tube and (4) Treatment: leukocytes, RSV (5 µM) and luminol were added to the tube. The final volume of all tubes was completed to 700 µl with PBS. Each tube was immediately placed in a Luminometer (Lumat, LB 9501, EG&G) and the reading was performed in 10 minutes. The results were expressed in units of relative light (RLU) / minute.

Part II - Evaluation of AMPk signaling pathway

The mechanism of action of resveratrol in relation to AMPk was also evaluated in a luminol-dependent chemiluminescence assay. The same assay described above was performed, but in the presence or absence of the AMPk inhibitor (Compound C - 10 µM) (Zhang *et al.* 2011). Initially, leukocytes (1×10⁶ cells) were incubated with the inhibitor for 30 min at 37 °C. Then, these groups were centrifuged at 400 g for 10 min and the pellet was resuspended in PBS. The same treatments performed for groups 1, 2, 3 and 4, as described above, were added. The final volume of all tubes was completed at 700 µl with PBS and each tube was immediately placed in a luminometer for reading for 10 min. The results were expressed in units of relative light (RLU) / minute.

Dosage of cytokines IL-6, TNF and IL-10: After the leukocytes received the respective treatments for 24h at 37°C, the supernatant was collected and the procedures described in the specific kits used to measure the activity of IL-6 (Human IL-6 Uncoated ELISA- Thermo Fisher Scientific), TNF (Uncoated human TNF ELISA - Thermo Fisher Scientific) and IL-10 (Uncoated human IL-10 ELISA - Thermo Fisher Scientific) were performed. The absorbance was read at 450 nm and 570 nm in a microplate reader (Thermo Plate). The calculations were performed by analyzing the slope of the

curve and linear regression and the results were expressed as mean \pm SE.

Statistical analysis

All data were analyzed using the Kolmogorov - Smirnov normality test. Univariate analysis of variance (one-way ANOVA) was used, followed by the Dunnett or Bonferroni test when the samples had a normal distribution and the Dunns test when they did not follow the normal distribution. Differences were considered significant for $p < 0.05$. All analyzes were performed using the GraphPad Prism software version 6.0 (San Diego, California, USA).

RESULTS

Initially, it was defined which H_2O_2 concentration would be used in the study. The results obtained are shown in Figure 1. In general, it was demonstrated that the cell viability of the leukocytes remained above 85% in the three concentrations analyzed. The next step was to verify if these concentrations were able to generate the same amount of ROS by chemiluminescence assay. We observed that 150 μM and 250 μM were able to induce a necessary stimulus for the production of ROS, when compared to basal cell control. There was no difference between the two highest concentrations. Therefore, the concentration chosen for the following experiments was 150 μM . The resveratrol concentration was defined according to Dose-Response-Curve obtained in Figure 2.

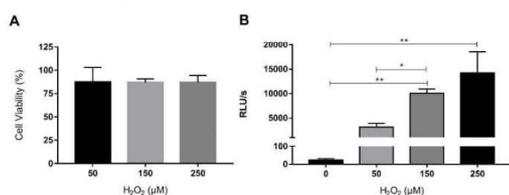


Figure 1. Padronization of H_2O_2 concentration used in the study. (A) Cells were stimulated by increasing concentrations of H_2O_2 for 1 hour (50 μM , 150 μM and 250 μM) and viability was tested by the Trypan Blue assay. (B) Evaluation of H_2O_2 -induced ROS production in the Chemiluminescence assay. ROS generation was expressed in RLU/min. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ significant result by ANOVA analysis followed by Dunn's test ($n = 6$)

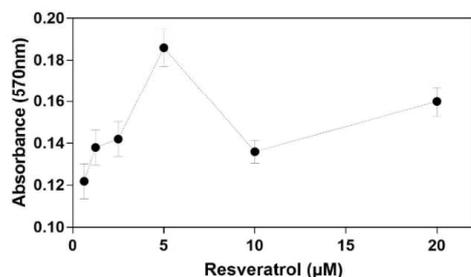


Figure 2. Dose-Response-Curve of resveratrol. Human leukocytes were stimulated by increasing concentrations of resveratrol (0.63 μM ; 1.25 μM ; 2.5 μM ; 5 μM ; 10 μM and 20 μM) and absorbance to verify stimulation in cells was measured at 570 nm. The concentration chosen was 5 μM which showed an absorbance peak and corresponds to physiological dosage. Assays were performed in triplicate for each concentration. ($n = 8$).

Among concentrations tested, 5 μM presented a higher resazurin metabolizing capacity with a cell viability $> 95\%$. After this, it was necessary to prove that the cells remained viable under the treatment conditions. The results of the MTT assay showed that all treatments allowed the cells to remain viable and not promote significant cytotoxicity in the group with or without AD, after defining the concentrations of H_2O_2 and resveratrol (Figure 3). Analyzing the production of ROS by the chemiluminescence assay (Table 2) it is possible to observe that baseline ROS of elderly people with AD was 160% higher compared to elderly people without AD. The RSV inhibited the baseline stress of the leukocytes of the elderly without AD 30% more than the leukocytes of the elderly with AD. H_2O_2 generated cell stress in both donors without AD and with AD. RSV inhibited the effect of H_2O_2 in both donors [without AD = 1640 ± 178 (88%) and with AD = 968 ± 42 (71%)], this effect being 20% less in the elderly with AD. The results when AMPk signaling was inhibited is shown in Figure 4.

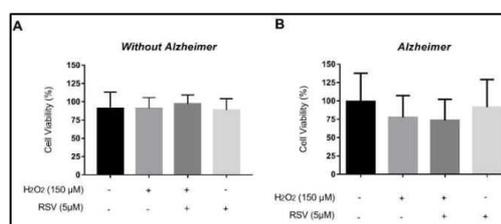


Figure 3. Evaluation of the viability of leukocytes isolated from elderly people without and with AD submitted to treatments (H_2O_2 - 150 μM and RSV - 5 μM). Viability was achieved through the MTT colorimetric assay and expressed in % of viable cells ($n = 6$)

Table 2. Evaluation of the antioxidant effect of resveratrol on leukocytes in the chemiluminescence assay

| Treatment | Without Alzheimer | Alzheimer |
|----------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | Mean \pm SE | Mean \pm SE |
| Basal | 437 \pm 56 | 1.137 \pm 114 |
| Resveratrol (5 μM) | 46.25 \pm 5.89 | 429 \pm 67.54 |
| H_2O_2 (150 μM) | 13.791 \pm 1245**** | 3.367 \pm 456**** |
| H_2O_2 (150 μM) + Resveratrol (5 μM) | 1.640 \pm 178#### | 968 \pm 42#### |

The generation of ROS was expressed in RLU/min. **** $p < 0.0001$ compared to Basal group and #### compared to H_2O_2 group significant by ANOVA-Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison post-test ($n = 8$ without Alzheimer and $n = 6$ with Alzheimer).

The addition of Compound C increased the effect of H_2O_2 by 40% and 116% in the elderly without (19345 ± 2196) and with AD (34219 ± 3789) respectively, this increase being 190% of the elderly with AD compared to the elderly without AD. RSV was able to reverse the effect of the AMPk pathway inhibitor in both donors [without AD = 1471 ± 189 (92%) and with AD = 10334 ± 1908 (70%)], with elderly people with DA were less efficient 24%. Finally, the anti-inflammatory action of RSV in individuals with and without AD was evaluated. The results obtained in the measurement of the pro-inflammatory cytokines TNF and IL-6 show the same profile (Figure 5). There was an increase when treated only with H_2O_2 and a decrease when treated only with RSV or in the combination $H_2O_2 + RSV$. In addition, our results show a difference in the levels of these cytokines in the two groups. Individuals with AD have a high inflammatory profile, because in all treatment

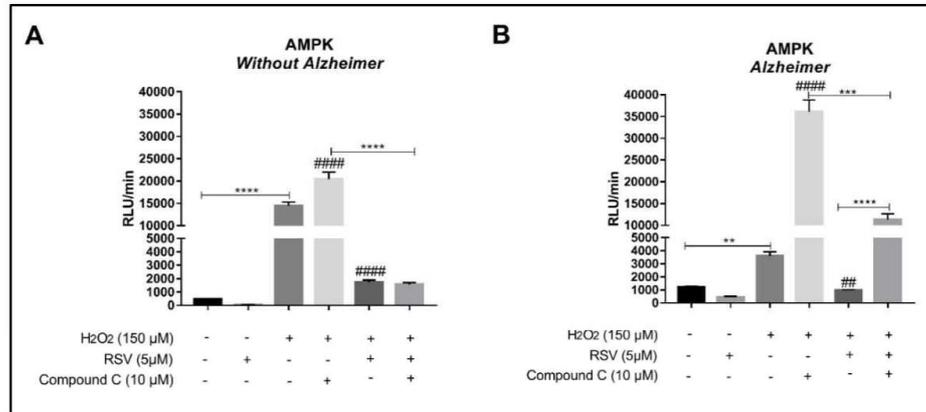


Figure 4. Evaluation of AMPk signaling pathway in leukocytes by chemiluminescence assay. Effect of resveratrol on ROS production induced by H₂O₂, being without (A) and with Alzheimer (B) in the AMPk pathway. The generation of ROS was expressed in RLU / min. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 and **** p <0.0001 significant by ANOVA-Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison post-test. #, ##, #### vs H₂O₂ group (n = 8 without AD and n = 6 with AD)

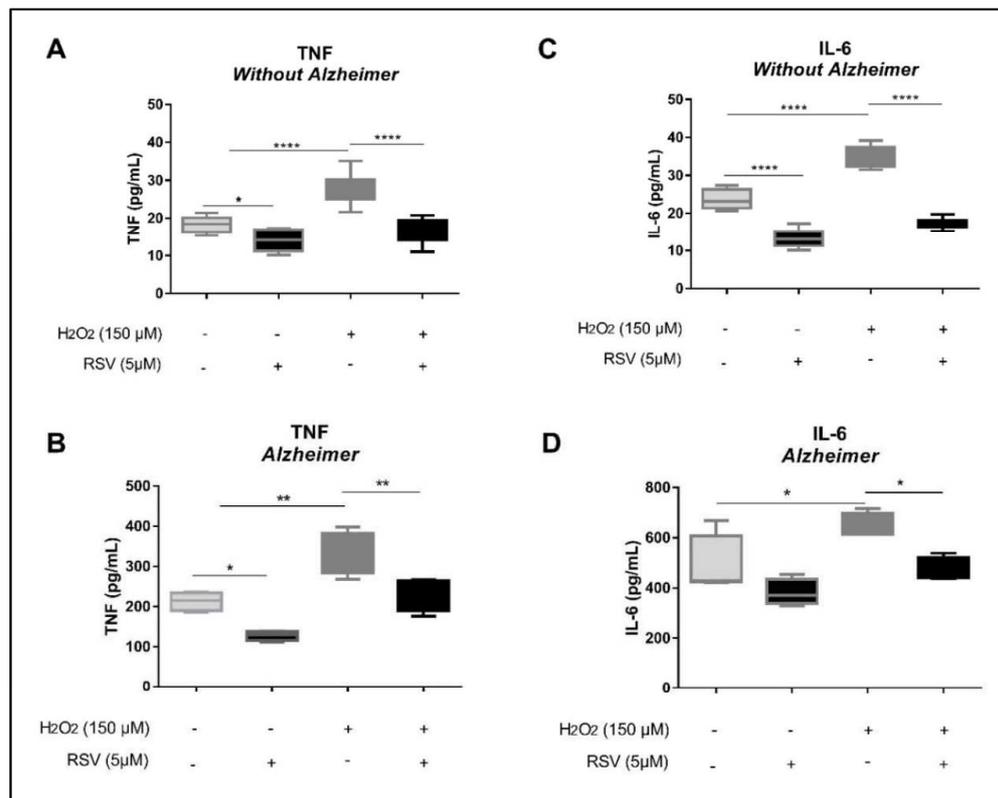


Figure 5. Effect of resveratrol on the pro-inflammatory activity of human leukocytes. TNF measurement, without (A) and with Alzheimer (B). IL-6 dosage, without (C) and with Alzheimer (D). Activity was measured in pg / mL (picograms / milliliters). * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 and **** p <0.0001 significant by the ANOVA test, post-test of the Multiple Comparison of Bonferroni (n = 7 without Alzheimer and n = 4 with Alzheimer)

conditions they have higher levels of these cytokines. The analysis of the anti-inflammatory cytokine IL-10 is shown in Figure 6. Lower levels of IL-10 are noted in all treatment conditions of individuals with AD. There was a decrease in the groups treated only with H₂O₂ and an increase in the group

treated only with RSV. However, in the H₂O₂ + RSV combination, only the group without AD was able to increase the levels of this cytokine when compared to the H₂O₂ group. That is, in an oxidizing environment, resveratrol has a better anti-inflammatory potential in elderly people without AD.

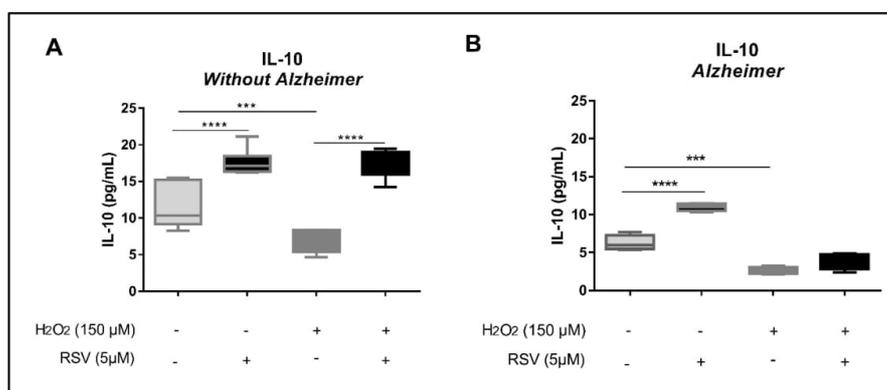


Figure 6. Effect of resveratrol on the anti-inflammatory activity of human leukocytes. IL-10 measurement, without (A) and with Alzheimer (B). Activity was measured in pg / mL (picograms / milliliters). * p < 0.05; ** p < 0.01; * p < 0.001 and **** p < 0.0001 significant by the ANOVA test, post-test of the Multiple Comparison of Bonferroni (n = 7 without Alzheimer and n = 4 with Alzheimer)**

DISCUSSION

Our study aimed to understand the mechanisms of antioxidant and anti-inflammatory action of resveratrol in elderly individuals with or without AD through possible regulation with the AMPk signaling pathway. The first step was to mimic an oxidizing environment, with the exogenous addition of H₂O₂ (150 μM) as a way to stimulate the production of reactive species (Figure 1). H₂O₂ is the main precursor of ROS, being widely used as an inducer of oxidative damage in *in vitro* studies to simulate stress conditions (Emamgholipour *et al.* 2016). In addition, the resveratrol concentration used (5 μM) was obtained on a Dose-Response Curve by our group (Figure 2) and are in agreement with several other studies in the literature (Lastra *et al.* 2007; Santos *et al.* 2021). Without significant changes in cell viability via the MTT assay (Figure 3), our chemiluminescence data showed higher baseline ROS levels in the AD group, compared to the group without AD (Table 2). When H₂O₂ was added, there was a significant induction of the oxidizing environment in both groups. ROS levels are known to be increased with aging, with significantly higher values compared to younger individuals (Luceri *et al.* 2017). In addition, mitochondrial dysfunction and increased apoptosis accompanied by a deficient antioxidant state are the mechanisms for the pathogenesis of AD. Extensive studies have pointed out the role of the superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide and nitric oxide in neurodegeneration mediated by oxidative stress in AD (Xie *et al.* 2002; Van, 1997). Resveratrol was able to decrease the generation of ROS in both groups. These data are in accordance with the literature. In HEK-AbPP cells that received additional treatment with resveratrol, a decrease in neurotoxicity and pro-apoptotic effects was observed. The authors also discussed the importance of associating different neuroprotective agents, such as antioxidants (RSV, for example) with specific drugs for AD. Neuroprotective effects were also observed with the injection of resveratrol in rats, which reduced the accumulation of amyloid, increased expression of the antioxidant enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) and suppression of lipid peroxidation in the hippocampus (Huang *et al.* 2011).

When we talk about oxidative stress, the evaluation of the mechanisms that modulate the activity of antioxidant compounds is important to be able to verify how this metabolic balance occurs. In this context, when studying resveratrol, one signaling pathway deserve our attention: AMPk (Figure 4). Our results showed a decrease in ROS independently of AMPk and AMPk in the group of elderly people without AD. However, the antioxidant action of resveratrol was dependent on the AMPk pathway in the AD group by inhibiting this pathway, its action was impaired. Several studies have shown that the activation of AMPk suppresses inflammation by inhibiting NF-κB, preventing oxidative stress. In this context, resveratrol has also been described as a potent activator of AMPk, implying as a pathway through which its neuroprotective effects can be exerted (Chiang *et al.* 2018). Studies have shown that resveratrol decreases the generation of ROS and increases the activity of the ERK1/2-RSK-nNOS pathway, activating AMPk to negatively regulate the NADPH oxidase induced during hypertension associated with oxidative stress. Several studies in cell and animal models have shown that resveratrol exhibits anti-inflammatory and antioxidant effects, inhibits the aggregation of beta-amyloid protein (Aβ) and modulates the intracellular effectors involved in the survival of neuronal cells. Vingdeux *et al.* showed that resveratrol activated AMPk, increasing intracellular calcium levels and that inhibition of AMPk neutralized the effect of resveratrol on Aβ levels. This effect was also achieved *in vivo*, in which the peripheral administration of resveratrol activated AMPk and reduced brain levels of Aβ and accumulation in the mouse cerebral cortex (Lin *et al.* 2018).

Finally, our was to check the anti-inflammatory profile of resveratrol in the elderly without and with AD (Figure 5-6). Neuroinflammation is another important feature in AD, which manifests itself through the proliferation and activation of microglia. Microglia are macrophages residing in the brain and forming dense clusters around β-amyloid plaques. These cells function as damage trackers to the central nervous system and detect lesions in the brain parenchyma. After detecting damage or immune stimulation in the brain, such as that caused by Aβ peptides, the microglia cells are activated and produce pro-inflammatory mediators, such as, for example,

tumor necrosis factor (TNF). The accumulation of these mediators contributes to the progression of the disease (Yao *et al.* 2015). In general, our results are divided into two parts: AD group had a much more pronounced inflammatory profile than elderly without AD group. In addition, resveratrol was able to decrease the levels of the pro-inflammatory cytokines TNF and IL-6 and increase the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in both groups, the results being more expressive in the elderly without Alzheimer's. Our data are in accordance with the literature (Luigi *et al.* 2001). Capiralla *et al.* (2012), demonstrate that the administration of resveratrol in BV-2 and RAW 264.7 cells inhibited A β -mediated action through the activation of microglia and lipopolysaccharide (LPS). Such activation was stimulated by NF- κ B, and was able to reduce the expression of its target genes, such as TNF and IL-6. When investigating the beneficial effect of resveratrol on microglia, Song *et al.* (2014) also observed the same anti-inflammatory profile as resveratrol. There was an increase in the levels of IL-10 mRNA under hypoxia conditions. In addition, resveratrol acted through the NF- κ B gene, which is upstream in controlling inflammatory reactions in the microglia.

Conclusion

We concluded that resveratrol showed antioxidant and anti-inflammatory activity in both experimental groups. However, there was greater action in the group without AD, suggesting a potential preventive effect. Analyzing the cellular signaling pathway AMPk, it was possible to observe that the antioxidant capacity of resveratrol in individuals with AD decreases when this pathway is inhibited, showing the importance of this pathway in the antioxidant capacity of resveratrol during AD.

Support

This research was supported by the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFGM) and *In Vitro* Cells Toxicological Research Laboratory (IVC).

Conflict of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Albertoni, G. *et al.* (2015) Resveratrol and kidney disease. *J Bras Nefrol.* 37(1), pp. 106-114.
- Alexandria, V. A. *et al.* (2011). American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 34(Suppl 1), S11–S61.
- Aronow, W. S. *et al.* (2017). American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics. *Circulation*, 135(10), e146–e603.
- Capiralla, H., Vingtdoux, V., Zhao, H. *et al.* (2012) Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *J Neurochem.* 120(3), pp. 461-72.
- Chiang, M.C., Nicol, C.J., Cheng, Y.C. (2018) Resveratrol activation of AMPk dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid- β -induced inflammation and oxidative stress. *Neurochem Int.* 115, pp. 1-10.
- Diaz-Gerevini, Tomas, G. *et al.* (2016) Beneficial action of resveratrol: how and why?. *Nutrition.* 32(2), pp. 174-178.
- Emamgholipour, S., Hossein-Nezhad, A., Ansari, M. (2016) Can Melatonin Act as an Antioxidant in Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress Model in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells? *Biochem Res Int.* 16, pp.585-598.
- Horta, B.C., Perilo, C.S., Costa, D.C. (2005). Aging: Functional Metabolic Balance among cAMP, cGMP and Reactive Oxygen Intermediate Generation by Human Granulocytes. *Gerontology.* pp.363-368.
- Huang, T.C., Lu, K.T., Wo, Y.Y.P., Wu, Y.J., Yang, Y.L. (2011). Resveratrol Protects Rats from A β -induced Neurotoxicity by the Reduction of iNOS Expression and Lipid Peroxidation. Musaro A, organizador. *PLoS One.* 6, pp.291-302.
- Koch, W. (2000). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved guideline C28-A2. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory. *Pennsylvania: NCCLS.*
- Lastra, C. A., Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transaction.* 35(5), pp. 1156–1160.
- Lin, Y.T., Wu, Y.C., Sun, G.C. *et al.* (2018) Efeito do resveratrol no comprometimento cognitivo induzido por espécies reativas de oxigênio em ratos com doença de Alzheimer precoce induzida por angiotensina II[†]. *J Clin Med.* 7, pp. 329.
- Luceri, C., Bigagli, E., Femia, A.P., Caderni, G., Giovannelli, L., Lodovici, M. (2017) Mudanças relacionadas ao envelhecimento em espécies reativas de oxigênio circulante (ROS) e carbonilas de proteína são indicativas de lesão oxidativa do fígado. *Toxicol Rep.* 5, pp. 141-145.
- Luigi, A.D., Fragiaco, C., Lucca, U. *et al.* (2001) Inflammatory markers in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Mechanisms of Ageing and Development.* 122, 6, pp. 1985-1995.
- Martin McKee. World Health Organization. The world health report 2000: health systems: improving performance. Geneva: WHO; 2000.
- Moraes, E.N., Moraes, F.L. (2010) Coleção guia de bolso em geriatria e gerontologia Incapacidade cognitiva: Abordagens diagnósticas e terapêuticas das demências no idoso. *Folium Editorial.* 117, pp. 117–32.
- Oliveira, B.F., Veloso, C.A., Nogueira-Machado, J.A. *et al.* (2012) Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene reduce oxidative stress and proinflammatory cytokines in mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. *Nutr Neurosci.* 15(6), pp. 244-51.
- Santos, M.A., Franco, F.N., Caldeira, C.A., de Araújo, G.R., Vieira, A., Chaves, M.M., Lara, R.C. (2021) Antioxidant effect of Resveratrol: Change in MAPK cell signaling pathway during the aging process. *Archives of Gerontology and Geriatrics.* 92, pp. 1-8.
- Song, J., Cheon, S.Y., Jung, W., Lee, W.T., Lee, J.E. (2014) O resveratrol induz a expressão de interleucina-10 e fator neurotrófico derivado do cérebro na microglia BV2 sob hipóxia. *Int J Mol Sci.* 15, pp. 15512-15529.
- Sousa, J.C. *et al.* (2020) Resveratrol in Alzheimer's disease: a review. *Arq Neuropsiquiatr.* 78(8), pp. 501-511.

- Van Dyke, K. (1997) O possível papel do peroxinitrito na doença de Alzheimer: uma hipótese simples que poderia ser testada mais profundamente. *Hipóteses médicas*. 48(5), pp.375–380.
- Viegas, F. *et al.* (2011) Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamatório. *Rev. Virtual Quim.* 3(4), pp. 286-306.
- Vingtdeux, V., Giliberto, L., Zhao, H., *et al.* (2010) A ativação da sinalização da proteína quinase ativada por AMP pelo resveratrol modula o metabolismo do peptídeo beta-amilóide. *J. Biol. Chem.* 285, pp. 9100–9113.
- Wencel, P.L., Lukiw, W.J., Strosznajder, J.B., Strosznajder, R.P. (2018) Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Enhances Gene Expression of Selected Sirtuins and APP Cleaving Enzymes in Amyloid Beta Cytotoxicity. *Mol Neurobiol.* 55(6), pp. 4612-4623.
- Xie, Z., Wei, M., Morgan, TE, *et al.* (2002) O peroxinitrito medeia a neurotoxicidade do beta-peptídeo amilóide 1-42-e da microglia ativada por lipopolissacarídeo. *The Journal of Neuroscience.* 22(9), pp. 3484–3492.
- Yao, Y., Li, J., Niu, Y., Yu, J.Q., Yan, L., Miao, Z.H., *et al.* (2015) Resveratrol inhibits oligomeric A β -induced microglial activation via NADPH oxidase. *Mol Med Rep.* 12(4), pp. 6133-9.
- Yeh, T.C., Shin, C.S, Chen, H.H., Lai, C.C., Sun, G.C., Tseng, C.J., Cheng, P.W. (2018) O resveratrol regula a pressão sanguínea aumentando a sinalização da AMPk para diminuir a regulação de uma NADPH oxidase derivada de Rac1 no sistema nervoso central. *J. Appl. Physiol.* 125, pp. 40–48.
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J. *et al.* (2011) Akt, Foxo and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 1813(11), pp. 1978-1986.

17/12/2021 13:29

SEI/UFMG - 1113090 - Folha de Aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Doença de Alzheimer: modificação na funcionalidade e na capacidade antioxidante do resveratrol pela alteração nas vias de sinalização celular SIRT1 e AMPK.

LUCIANA DE CÁSSIA CARDOSO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 02 de dezembro de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Gabriela Silveira Nunes Abreu

UFJF

Prof(a). Thais Santos Contencas

UFJF

Prof(a). Glaucy Rodrigues de Araujo

UFMG

Prof(a). Paola Caroline Lacerda Leocadio

UFMG

Prof(a). Aline Silva de Miranda

UFMG

Prof(a). Miriam Chaves Schultz - Orientadora

UFMG

17/12/2021 13:29

SEI/UFMG - 1113090 - Folha de Aprovação

Belo Horizonte, 02 de dezembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Thaís Santos Contenças, Usuário Externo**, em 02/12/2021, às 19:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Silveira Nunes Abreu, Usuário Externo**, em 03/12/2021, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 03/12/2021, às 19:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paola Caroline Lacerda Leocádio, Usuária Externa**, em 03/12/2021, às 22:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Chaves Schultz, Chefe**, em 06/12/2021, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glauy Rodrigues de Araújo, Usuário Externo**, em 16/12/2021, às 18:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1113090** e o código CRC **26CA9710**.

Referência: Processo nº 23072.261472/2021-21

SEI nº 1113090