

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia**

Filipe Nogueira Franco

**ENVELHECIMENTO: PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO NRF2 SOBRE OS  
MECANISMOS ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS MEDIADOS PELO  
RESVERATROL**

Belo Horizonte

2023

Filipe Nogueira Franco

**ENVELHECIMENTO: PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO NRF2 SOBRE OS  
MECANISMOS ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS MEDIADOS PELO  
RESVERATROL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Chaves Schultz

Co-Orientadora: Profa. Dra. Glaucy Rodrigues de Araújo

Belo Horizonte

2023

043

Franco, Filipe Nogueira.

Envelhecimento: papel da via de sinalização NRF2 sobre os mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios mediados pelo resveratrol [manuscrito] / Filipe Nogueira Franco. – 2023.

178 f. : il. ; 29,5 cm.

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

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Envelhecimento. 3. Estresse Oxidativo. 4. Inflamação. 5. Resveratrol. 6. Fator 2 Relacionado a NF-E2. I. Schultz, Miriam Chaves. II. Araújo, Glaucy Rodrigues de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



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



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE FILIPE NOGUEIRA FRANCO. Ao um dia do mês de dezembro de 2023 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Envelhecimento: Papel da via de sinalização Nrf2 sobre os mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios mediados pelo resveratrol", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Miriam Chaves Schultz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Breno de Mello Silva (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovado; Dra. Daniela Caldeira Costa (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovado; Dr. Rafael Pinto Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Glaucoy Rodrigues de Araújo - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

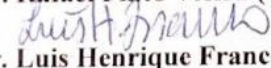
- APROVADO  
 REPROVADO

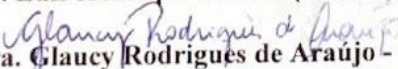
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2023.

  
 Dr. Breno de Mello Silva (UFOP)

  
 Dra. Daniela Caldeira Costa (UFOP)

  
 Dr. Rafael Pinto Vieira (UFMG)

  
 Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

  
 Dra. Glaucoy Rodrigues de Araújo - Coorientadora (UFMG)

  
 Dra. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (UFMG)

A minha mãe, o meu maior exemplo e minha grande incentivadora:

“Nunca se esqueça nem um segundo  
Que eu tenho o amor maior do mundo  
Como é grande o meu amor por você”

## AGRADECIMENTOS

Aqui estamos nós, entre graduação, mestrado e doutorado foram 10 anos de muito estudo, dedicação e amor pela ciência. Inúmeras pessoas se fizeram presente (seja fisicamente, em espírito ou pela torcida) e aqui vão os meus agradecimentos a algumas delas.

A Deus, por ser um ponto de apoio nos momentos mais difíceis. Juntamente a ele, a memória de minha avó Sãozinha, a quem sempre me deu tanto apoio e sempre me admirava pela minha dedicação nos estudos. Rezo sempre por você, vó! Foram incontáveis os dias em que eu olhava para o seu retrato no apartamento de BH e te pedia ajuda em tantas coisas, não somente aquelas atreladas ao doutorado. Você presenciou a minha entrada na Universidade e tenho certeza que do céu também está acompanhando a minha saída... e Doutor!!

Aos meus amigos de Itaúna, meus doces “morangos”, pela amizade desde o ensino fundamental e que sobrevive ao tempo. Não só sobrevive como se fortalece, pois mesmo na distância e na correria diária, nós nos fazemos presentes na vida uns dos outros. Seja nos momentos bons ou ruins. Vocês me ensinaram que a amizade é o amor que nunca morre, que amigo é coisa pra se guardar debaixo de sete chaves e mais quantas frases clichês forem necessárias para demonstrar o meu amor e minha gratidão por terem vocês há tantos anos na minha vida.

Aos amigos do laboratório e do doutorado: Bárbara, Luciana, Alessandra, Brenda, Nathália, Carol e principalmente... Gabi! Essa última não é uma amizade apenas do doutorado, mas que a graduação em Bioquímica me apresentou e na qual eu nunca mais vivi sem. Agradeço pelos almoços, pelos cafés, pela companhia constante em todos esses anos.

Ao Willian, por ter sido um grande apoiador na minha vida, sobretudo na jornada acadêmica. Por ter segurado a barra junto comigo mesmo nos momentos em que as coisas não saíam como planejado, por ter aprendido sobre bioquímica durante tanto tempo. Você fez e sempre fará parte do que me tornei.

A meu pai pelas diversas ligações, por ser um pai tão carinhoso e presente. Por ser o único que me entendia na época em que eu falava tudo errado.... por ter me incentivado a ler as revistas pra você na hora do almoço, a desenhar, a me colocar na cama. Todo o amor que tenho pelos estudos devo grande parte a você!

A minha irmã Thais, também pela enorme torcida, pelas cervejas, pelas risadas que começam, mas nunca tiveram hora para terminar. Ter uma irmã é ter uma amiga para a vida toda. Conte sempre comigo! Menos para pedir dinheiro emprestado, por hora não tenho um centavo.

Aos meus irmãos Aclimarcos e Fabrício, pela torcida e carinho. A minha cunhada Priscilla pelas conversas bioquímicas e intelectuais, por sempre ter papo sobre qualquer assunto. Fabrício, de onde estiver, esteja em paz e saiba que aqui ficou um pedacinho de você em cada gesto de ternura e afeto.

A Miriam, minha orientadora, pôr na verdade ter sido muito mais do que isso. Ainda hoje me lembro do meu primeiro contato com você, sempre tão gentil e receptiva. Recebendo um aluno para passar os próximos quatro anos com você sem nunca ter visto na vida. Serei eternamente

grato pela oportunidade de fazer parte do laboratório, de ter feito um doutorado incrível, melhor do que eu sempre imaginei. Pela confiança nas escritas de artigos, da época da IVC, de me liberar pra UEMG... enfim, por sempre me dar carta branca e apoio total nas minhas escolhas.

Por falar em IVC, é impossível não citar aqui o Cleiber e a Sandra. Vocês fizeram desses quatro anos um mix de boas risadas, desespero para conseguir amostra para os meus experimentos. Agradeço ao Cleiber independente do seu mau humor e a Sandra da grosseria hahahahah Brincadeira meus amigos, vocês serão umas das minhas maiores saudades de BH!

Ao Carlos, por ter me apresentado o amor na sua forma mais pura. Um amor maduro e respeitoso. Que me faz querer viver todos os dias da minha vida ao seu lado: “O amor é paciente e tudo crê... é compassivo, não tem rancor. Não se alegra com a injustiça e com o mal. Tudo suporta. É o dom total. Ainda que eu tenha o vigor de profeta e o dom da ciência, firmeza na fé. Ainda que eu possa transpor as montanhas. Se eu não tenho amor, de nada adianta.” E eu tenho... ao seu lado.

Por fim, eu gostaria de agradecer a duas pessoas, de forma ainda mais especial.

A minha mãe, por seu amor incondicional, por viver os meus sonhos como se fossem os dela. Por sofrer comigo em cada coisa que dava errado, ao mesmo tempo por respirar aliviada e feliz em cada conquista. Tudo o que sou eu devo a você. Eu te amo tanto, mãe! Não seria metade do homem (e muito menos Doutor) sem os seus conselhos, sua amizade, seu zelo. Saber que sou um pedaço de você me enche de orgulho, e eu busco levar a sua bondade em cada lugar ou situação em que vivo.

E a você Glaucy, por ter sido muito mais que uma co-orientadora. Você foi uma irmã, uma titia (não vou falar mãe porque você não tem idade para isso, né?). Eu costumo dizer que Deus coloca anjos da guarda ao longo da nossa vida, para nos guiar e nos tranquilizar nos momentos difíceis. Você foi um desses anjos que apareceu para mim. Deus foi tão maravilhoso que te trouxe de volta para minha rotina na reta final do doutorado. Um anjo não necessariamente tem asas, mas eles têm um sorriso fácil, um abraço apertado, uma pausa para um café, para ouvir um áudio de quando a gente se perde um pouco no meio no caminho ou quer desabafar. Você foi um ponto de equilíbrio na minha vida, uma âncora que me dava o suporte mesmo no alto mar do doutorado. Obrigado por me ouvir e por me aconselhar. De todas as pessoas em quem eu me inspiro, você é a maior delas. Porque em você eu vejo que por mais que o caminho não seja fácil (e às vezes demorado) o sucesso é possível, desde que se tenha esforço e dedicação. Eu amo você. Te desejo todo o sucesso do mundo, em todos os âmbitos da sua vida.

Meu muito obrigado a todos! Amo vocês!!

Enfim, DOUTOR!!!!!!!!!!

"Tenho em mim todos os sonhos do mundo"

*Fernando Pessoa*



## **APOIO FINANCEIRO E PARCERIAS**

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas da Universidade Federal de Minas Gerais** com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pró Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq) e Laboratório In vitro Cells (IVC).

Além disso, agradeço ao Prof. Dr. Breno de Mello Silva, da Universidade Federal de Ouro Preto e ao Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem da UFMG, pela parceria em alguns dos experimentos contidos nesse projeto.

Ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

A Coordenação do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, sobretudo as coordenadoras da gestão anterior: Profa. Dra. Maria de Fátima Martins Horta e Profa. Dra. Leda Quercia Vieira, pela organização, gestão e por incentivarem os alunos do programa a sempre alcançarem grandes voos.

## RESUMO

Uma das teorias sobre o envelhecimento provém do acúmulo da geração de radicais livres, além de um quadro inflamatório de baixo grau. Dentre essas moléculas, destacam-se as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Nitrogênio (RNS); além de citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-6 (IL-6). Nosso organismo conta com um sistema de defesa para combater essas moléculas reativas, como as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). A ativação de diversas vias de transdução de sinais são as responsáveis pela eficiência desses sistemas. O resveratrol é um composto que tem demonstrado atuar como um potente antioxidante e anti-inflamatório. Assim, o objetivo foi verificar se o perfil antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol (5  $\mu$ M) permanece o mesmo em leucócitos de doadores de diferentes faixas etárias. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE: 33842420.4.0000.5149). Os indivíduos foram divididos em três grupos: 20-39, 40-59 e 60-80 anos. Após a separação dos leucócitos, foram realizados ensaios para quantificar ROS e RNS. O peróxido de hidrogênio (150  $\mu$ M) foi usado como controle positivo. SOD, CAT, GPx, TNF, IL-6 e IL-10 foram quantificadas por kits comerciais. A análise das vias antioxidantes PKA, AKT/PKB, AMPK, MAPK, SIRT1 e Nrf2 foi feita através do uso de inibidores específicos. O ensaio com o gene repórter da luciferase e ELISA foram realizados para avaliar a ativação e expressão de p-Nrf2, respectivamente. A análise entre idade e tratamento foi realizada através da correlação de Pearson (\* $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que houve redução de ROS e RNS em leucócitos tratados com resveratrol em todas as idades, com menor efeito no envelhecimento. Houve aumento de CAT nos leucócitos de 20-39 anos tratados com resveratrol e aumento de SOD e GPx entre 40-80 anos. Houve correlação positiva entre a ação antioxidante do resveratrol sobre a atividade e o envelhecimento das três enzimas. Foi observado um comportamento antioxidante das vias PKA, AKT/PKB, SIRT1 e AMPK nos leucócitos de 20-59 anos. Nos leucócitos de doadores acima de 60 anos essas vias estavam silenciadas. As vias MAPK e Nrf2 foram vias ativas em todas as idades, e o resveratrol teve efeito antioxidante em ambas. Nrf2 se mostrou ativado nos leucócitos tratados com resveratrol dos doadores de todas as idades, além do aumento da proteína fosforilada. O resveratrol se mostrou eficaz em diminuir TNF e IL-6 concomitante ao aumento de IL-10, com menor efeito no envelhecimento. A dosagem com o inibidor de Nrf2 comprovou que essa via também é importante no contexto anti-inflamatório. Portanto, a via Nrf2 é um importante mecanismo bioquímico responsável pelo efeito antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol. Esse efeito diminui no envelhecimento, mas ainda é observado. A hipótese é de que o Nrf2 atua (via fosforilação pela MAPK) na transcrição dos genes das enzimas antioxidantes e citocinas anti-inflamatórias, diminuindo os processos de estresse oxidativo e a inflamação crônica observados no envelhecimento.

**Palavras-chaves:** Envelhecimento; estresse oxidativo; inflamação; resveratrol; nrf2.

## ABSTRACT

One of the theories about aging comes from the accumulation of the generation of free radicals, in addition to a low-grade inflammatory condition. Among these molecules, Reactive Oxygen Species (ROS) and Nitrogen (RNS) stand out; in addition to pro-inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor (TNF) and Interleukin-6 (IL-6). Our body has a defense system to combat these reactive molecules, such as the enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx). The activation of several signal transduction pathways is responsible for the efficiency of these systems. Resveratrol is a compound that has been shown to act as a potent antioxidant and anti-inflammatory. Thus, the objective was to verify whether the antioxidant and anti-inflammatory profile of resveratrol (5  $\mu$ M) remains the same in leukocytes from donors of different age groups. The project was approved by the Ethics Committee (CAAE: 33842420.4.0000.5149). The individuals were divided into three groups: 20-39, 40-59 and 60-80 years old. After separation of leukocytes, assays were performed to quantify ROS and RNS. Hydrogen peroxide (150  $\mu$ M) was used as a positive control. SOD, CAT, GPx, TNF, IL-6 and IL-10 were measured in commercial kits. The analysis of the antioxidant pathways PKA, AKT/PKB, AMPK, MAPK, SIRT1 and Nrf2 was carried out using specific inhibitors. Luciferase reporter gene assay and ELISA were performed to evaluate p-Nrf2 activation and expression, respectively. The analysis between age and treatment was performed using Pearson correlation (\* $p < 0.05$ ). The results showed that there was a reduction in ROS and RNS in leukocytes treated with resveratrol at all ages, with less effect in aging. There was an increase in CAT in leukocytes from 20-39 years old treated with resveratrol and an increase in SOD and GPx between 40-80 years old. There was a positive correlation between the antioxidant action of resveratrol on the activity and aging of the three enzymes. An antioxidant behavior of the PKA, AKT/PKB, SIRT1 and AMPK pathways was observed in leukocytes aged 20-59 years. In leukocytes from donors over 60 years of age, these pathways were silenced. The MAPK and Nrf2 pathways were active pathways at all ages, and resveratrol had an antioxidant effect on both. Nrf2 was activated in leukocytes treated with resveratrol from donors of all ages, in addition to an increase in phosphorylated protein. Resveratrol was effective in reducing TNF and IL-6 concomitantly with an increase in IL-10, with a lesser effect on aging. Dosing with the Nrf2 inhibitor proved that this pathway is also important in the anti-inflammatory context. Therefore, the Nrf2 pathway is an important biochemical mechanism responsible for the antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol. This effect diminishes with aging but is still observed. The hypothesis is that Nrf2 acts (via phosphorylation by MAPK) in the transcription of genes for antioxidant enzymes and anti-inflammatory cytokines, reducing the processes of oxidative stress and chronic inflammation observed in aging.

**Keywords:** Aging; oxidative stress; inflammation; resveratrol; nrf2.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dados epidemiológicos do envelhecimento a nível mundial .....	20
<b>Figura 2.</b> Panorama nacional do envelhecimento .....	21
<b>Figura 3.</b> Dados demográficos do envelhecimento dos brasileiros de acordo com o sexo .....	22
<b>Figura 4.</b> Os sete marcadores fisiológicos, celulares e moleculares presentes ao longo do envelhecimento .....	23
<b>Figura 5.</b> Mitocôndria e respiração celular .....	24
<b>Figura 6.</b> Principais danos intracelulares causados pelos radicais livres .....	25
<b>Figura 7.</b> Produção das principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e mecanismos de defesa enzimáticos .....	26
<b>Figura 8.</b> Principais alterações imunológicas observadas durante o envelhecimento .....	27
<b>Figura 9.</b> Relação entre estresse oxidativo e inflamação .....	28
<b>Figura 10.</b> Tipos de leucócitos .....	29
<b>Figura 11.</b> Estrutura do <i>trans</i> -resveratrol .....	30
<b>Figura 12.</b> Número de publicações sobre o resveratrol .....	31
<b>Figura 13.</b> Via de sinalização da SIRT1 .....	32
<b>Figura 14.</b> Atuação da AMPK mediada por ROS dos processos de dinâmica mitocondrial ...	34
<b>Figura 15.</b> Vias de sinalização PKA e AKT/PKB .....	35
<b>Figura 16.</b> Representação esquemática da regulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) da via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) .....	37
<b>Figura 17.</b> Via de sinalização da Nrf2 .....	38
<b>Figura 18.</b> Os mecanismos moleculares antioxidantes do resveratrol .....	40
<b>Figura 19.</b> Processo de obtenção dos leucócitos a partir do sangue venoso .....	49
<b>Figura 20.</b> Reação de redução do MTT .....	51
<b>Figura 21.</b> Princípio do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol .....	53
<b>Figura 22.</b> A reação de Griess originalmente relatada por Griess em 1879 .....	54
<b>Figura 23.</b> Etapas da quimioluminescência para avaliação das vias de sinalização .....	58
<b>Figura 24.</b> Plasmídeos constitutivo pRL-TK (A) e da luciferase pGL4.37 (B) .....	60
<b>Figura 25.</b> Padronização da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	68
<b>Figura 26.</b> Curva Dose-Concentração de resveratrol em leucócitos humanos .....	69
<b>Figura 27.</b> Viabilidade dos leucócitos isolados de diferentes faixas etárias através do ensaio de MTT .....	70

<b>Figura 28.</b> Representação qualitativa da produção de ROS em leucócitos humanos da faixa etária dos 20-39 anos .....	73
<b>Figura 29.</b> Representação qualitativa da produção de ROS em leucócitos humanos da faixa etária dos 40-59 anos .....	74
<b>Figura 30.</b> Representação qualitativa da produção de ROS em leucócitos humanos da faixa etária dos 60-80 anos .....	75
<b>Figura 31.</b> Avaliação do efeito do antioxidante do resveratrol em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias por análise fluorescente .....	76
<b>Figura 32.</b> Avaliação do efeito do resveratrol na produção de ROS em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	79
<b>Figura 33.</b> Avaliação do efeito do resveratrol na concentração de NO e ONOO <sup>-</sup> em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	82
<b>Figura 34.</b> Avaliação do resveratrol na atividade das enzimas antioxidantes SOD, Catalase e GPx em leucócitos de diferentes faixas etárias .....	85
<b>Figura 35.</b> Avaliação do efeito do resveratrol sobre a via de PKA (A-C) e AKT/PKB (D-F) na produção de ROS em leucócitos humano de diferentes faixas etários induzidos por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	90
<b>Figura 36.</b> Avaliação do efeito do resveratrol sobre a via de SIRT1 (A-C) e AMPK (D-F) na produção de ROS em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzidos por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	93
<b>Figura 37.</b> Avaliação do efeito do resveratrol sobre a via de MAPK (A-C) e Nrf2 (D-F) na produção de ROS em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzidos por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	96
<b>Figura 38.</b> Avaliação preliminar sobre a influência do tempo de transfecção do plasmídeo contendo o gene da luciferase nos leucócitos humanos .....	100
<b>Figura 39.</b> Efeito da ativação do gene Nrf2 induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e resveratrol via ensaio de luciferase .....	101
<b>Figura 40.</b> Quantificação das proteínas Nrf2 e p-Nrf2 em leucócitos humanos através do ensaio de ELISA .....	103
<b>Figura 41.</b> Quantificação da isoforma p-Nrf2 em leucócitos humanos submetidos a diferentes tratamentos através do ensaio de ELISA .....	104
<b>Figura 42.</b> Avaliação da via Nrf2 na produção de TNF (A-C) e IL-6 (D-F) em leucócitos tratados com resveratrol em diferentes faixas etárias .....	113
<b>Figura 43.</b> Avaliação da via Nrf2 na produção de IL-10 em leucócitos tratados com resveratrol em diferentes faixas etárias .....	115
<b>Figura 44.</b> Análise do perfil anti-inflamatório do resveratrol na ausência e presença do inibidor da via Nrf2 .....	117
<b>Figura 45.</b> Proposta de interação entre as principais vias de transdução de sinais responsáveis pelo efeito antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol ao longo do envelhecimento .....	132

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Característica demográfica da população de estudo .....	48
<b>Tabela 2.</b> Grupos experimentais para avaliação da viabilidade celular frente aos tratamentos .....	52
<b>Tabela 3.</b> Disposição dos grupos experimentais para avaliação das vias de sinalização .....	58
<b>Tabela 4.</b> Disposição dos grupos experimentais para avaliação das vias de sinalização da via Nrf2 sobre as citocinas TNF, IL-6 e IL-10 .....	64
<b>Tabela 5.</b> Médias e correlação de Pearson (r) entre tratamentos e idade por meio da análise de ROS via sonda iT <sup>TM</sup> LIVE Green .....	77
<b>Tabela 6.</b> Controles sem células e com células no Ensaio de quimioluminescência .....	78
<b>Tabela 7.</b> Correlação de Pearson (r) entre tratamentos e idade por meio do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol .....	80
<b>Tabela 8.</b> Avaliação da produção de NO e ONOO <sup>-</sup> em leucócitos de diferentes faixas-etárias submetidos ao tratamento com resveratrol .....	81
<b>Tabela 9.</b> Correlação de Pearson (r) da concentração de Óxido Nítrico e Peroxinitrito dos diferentes tratamentos com a idade .....	83
<b>Tabela 10.</b> Avaliação do resveratrol sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD, Catalase e GPx nas diferentes faixas etárias .....	84
<b>Tabela 11.</b> Correlação de Pearson (r) das enzimas SOD, Catalase e GPx dos diferentes tratamentos com a idade .....	86
<b>Tabela 12.</b> Controles sem e com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via PKA e AKT/PKB .....	89
<b>Tabela 13.</b> Controles sem e com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via SIRT1 e AMPK .....	92
<b>Tabela 14.</b> Controles sem e com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via MAPK e Nrf2 .....	95
<b>Tabela 15.</b> Correlação de Pearson (r) das vias de sinalização PKA, AKT/PKB, SIRT1, AMPK, MAPK e Nrf2 dos diferentes tratamentos com a idade .....	98
<b>Tabela 16.</b> Correlação de Pearson (r) da ativação de Nrf2 dos diferentes tratamentos com a idade .....	102
<b>Tabela 17.</b> Correlação de Pearson (r) de p-Nrf2 dos diferentes tratamentos com a idade .....	105
<b>Tabela 18.</b> Avaliação do efeito anti-inflamatório do resveratrol .....	108
<b>Tabela 19.</b> Avaliação do efeito anti-inflamatório do resveratrol na presença do inibidor ML385 .....	111
<b>Tabela 20.</b> Correlação de Pearson dos tratamentos sem e com inibidor da via Nrf2 .....	118

**Tabela 21.** Avaliação comparativa do efeito do resveratrol ao longo do envelhecimento ..... 131

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AkT/PKB = proteína cinase B

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

AMPK = Proteína quinase ativada por Monofosfato de Adenosina

Ca<sup>2+</sup> = íon cálcio

CamKKβ = proteína quinase β dependente de cálcio / calmodulina

CAT = catalase

c-NOS = óxido sintase constitutiva

COX = ciclooxigenase

COX-2 = ciclooxigenase 2

cPLA2 = fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica

CREB = proteína de ligação responsiva ao AMPc

DMSO = dimetil sulfóxido

ERK = quinase regulada pela sinalização extracelular

ER = Espécies Reativas

ERN/RNS = espécies reativas de nitrogênio

ERO/ROS = espécies reativas de oxigênio

GPx = glutathione peroxidase

GSH = glutathione

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

H89 = inibidor de via de sinalização PKA

IKK = Complexo de proteínas inibitórias

IL-10 = interleucina 10

IL-1β = interleucina 1-beta

IL-2 = interleucina 2

IL-6 = interleucina 6

IL-8 = interleucina 8

IκB = inibidor de kappa beta

JNK = quinase regulada pela sinalização extracelular

LDL = lipoproteína de baixa densidade

Lp(a) = lipoproteína A

LPS = lipopolissacarídeo



MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno  
mRNA = RNA mensageiro  
MTT = brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólico  
N2-A = células de neuroblastoma murinho  
NAD<sup>+</sup> = forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NF-κB = fator de transcrição nuclear kappa B  
NO = óxido nítrico  
NOS = óxido nítrico sintase  
Nrf2 = fator nuclear derivado do eritróide 2-like 2  
p-Nrf2 = fator nuclear derivado do eritróide 2-like 2 fosforilado  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> = ânion superóxido  
OH<sup>•</sup> = radical hidroxila  
ONOO<sup>-</sup> = peroxinitrito  
ip38 MAPKinase Inhibitor = inibidor de p38 MAPKinase  
p38MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno p38  
pNrf2 = Proteína Nrf2 fosforilada  
PBMC = células mononucleares do sangue periférico  
PBS = solução salina tamponada  
PCR = proteína C reativa  
PI3K/AKT = fosfatidilinositol-3-quinase/ serina-treonina quinase  
PKA = proteína cinase A  
PLA<sub>2</sub> = fosfolipase A<sub>2</sub>  
Resv. = resveratrol  
SIRT's = sirtuínas  
SIRT1 = sirtuína 1  
SOD = superóxido dismutase  
TNF = fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>46</b>
4.1 SELEÇÃO DE DOADORES .....	47
4.2 OBTENÇÃO E CULTURA DOS LEUCÓCITOS HUMANOS .....	49
4.3 PADRONIZAÇÕES .....	50
4.3.1 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	50
4.3.2 Concentração de Resveratrol .....	50
4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	50
4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DE ROS .....	52
4.5.1 Quantificação por microscopia de fluorescência .....	52
4.5.2 Quantificação por quimioluminescência dependente de luminol .....	53
4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO .....	54
4.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PEROXINITRITO .....	55
4.8 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	55
4.8.1 Atividade de SOD .....	55
4.8.2 Atividade de CAT .....	56
4.8.3 Atividade de GPx .....	56
4.9 SINALIZAÇÃO CELULAR .....	57

4.10 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE NRF2 .....	59
4.10.1 Preparo de bactérias competentes .....	59
4.10.2 Transformação bacteriana por choque térmico .....	59
4.10.3 Purificação plasmidial .....	60
4.10.4 Transfecção dos leucócitos e tratamentos .....	61
4.10.5 Ensaio de Dual-Luciferase .....	61
4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NRF2 .....	62
4.12 ANÁLISE DE CITOCINAS .....	63
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	64
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
5.1 Padronizações .....	67
5.2 O resveratrol tem seu efeito antioxidante diminuído no envelhecimento .....	71
5.3 Nrf2 é a principal via de sinalização responsável pelo efeito antioxidante do resveratrol no envelhecimento .....	87
5.4 O resveratrol também apresenta diminuição do seu efeito anti-inflamatório no envelhecimento .....	106
5.5 Nrf2 também é a principal via de sinalização responsável pelo efeito anti-inflamatório do resveratrol no envelhecimento .....	109
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>134</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>148</b>

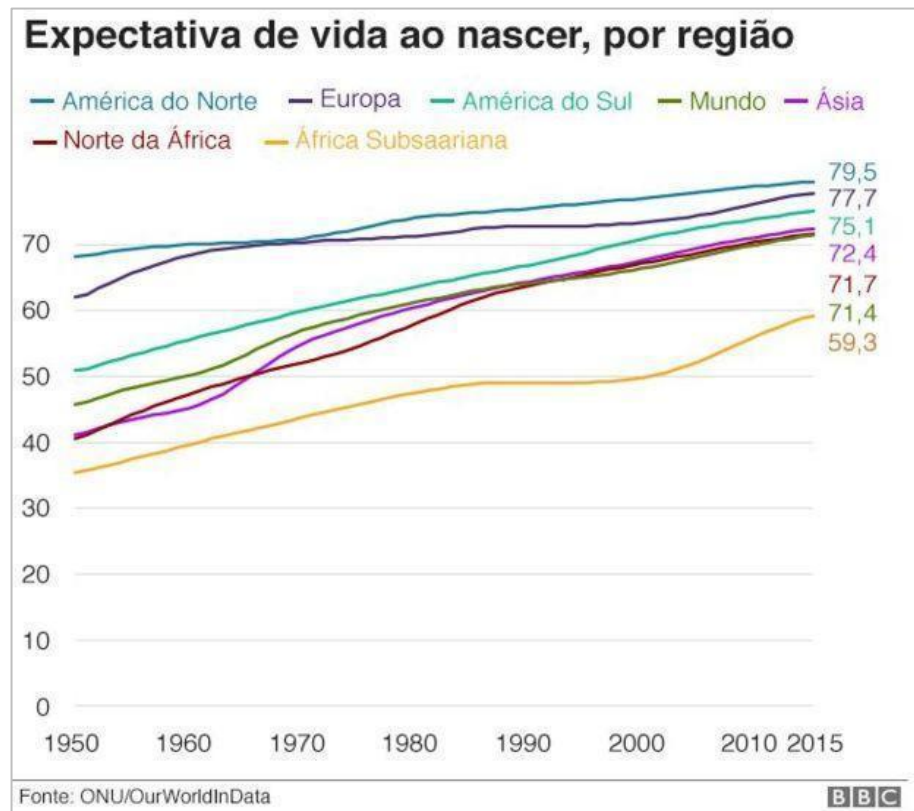
## INTRODUÇÃO

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

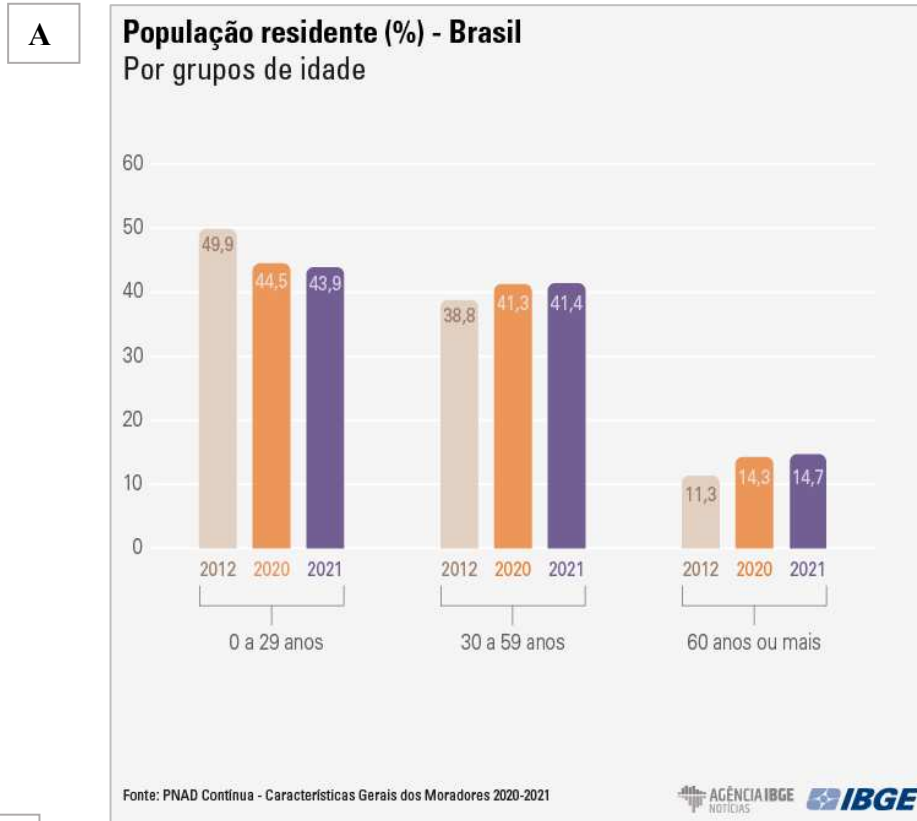
Atualmente, em todo o mundo, o envelhecimento da população tem aumentado rapidamente. Esse fenômeno se deve à diminuição nas taxas de nascimento simultaneamente ao declínio na taxa de mortalidade. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as pessoas em todo o mundo estão vivendo mais (**Figura 1**) (WHO, 2021). Hoje, pela primeira vez na história, as pessoas podem esperar por uma expectativa de vida acima dos 60 anos. Em 2050, a população mundial com 60 anos ou mais deve totalizar 2 bilhões, contra 900 milhões que existiam em 2015. Dados de 2013 mostravam que 125 milhões de pessoas tinham 80 anos ou mais. A estimativa para 2050 é de que 434 milhões de pessoas em todo o mundo estarão nessa faixa etária e 80% de todas as pessoas mais velhas viverão em países de baixa e média renda (LOPES-ÓTIN *et al.*, 2013).



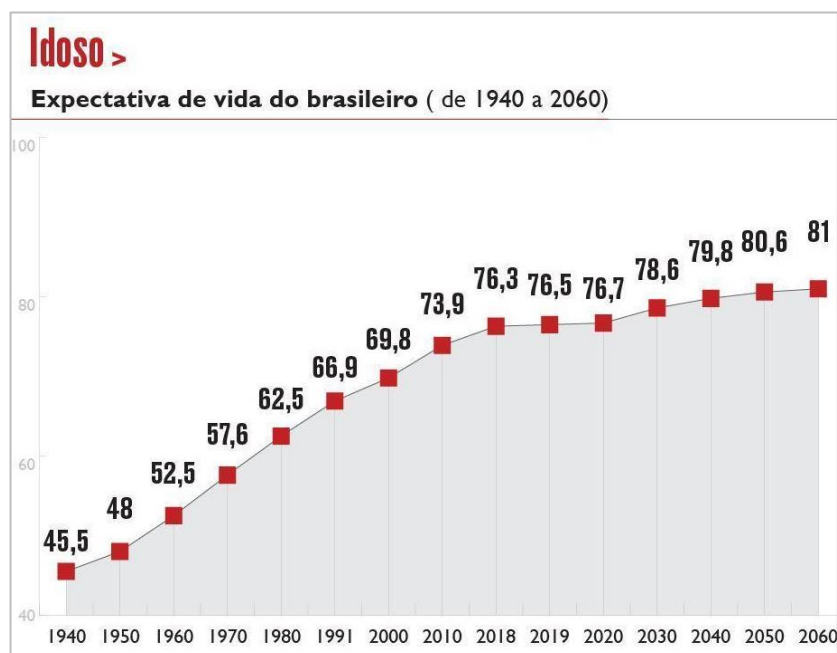
**Figura 1.** Dados epidemiológicos do envelhecimento a nível mundial. Fonte: ONU/OurWorldInData

No Brasil não é diferente, a população idosa tende a crescer nas próximas décadas, como apontam estudos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), atualizada em 2021 (**Figura 2A e 2B**). Segundo os dados, em 2043, 25% da população deverá ter mais de 60 anos, enquanto a proporção de jovens até 14 anos será de apenas 16,3%. Ainda segundo o mesmo levantamento, a partir de 2047 a população deverá parar de crescer, contribuindo para o

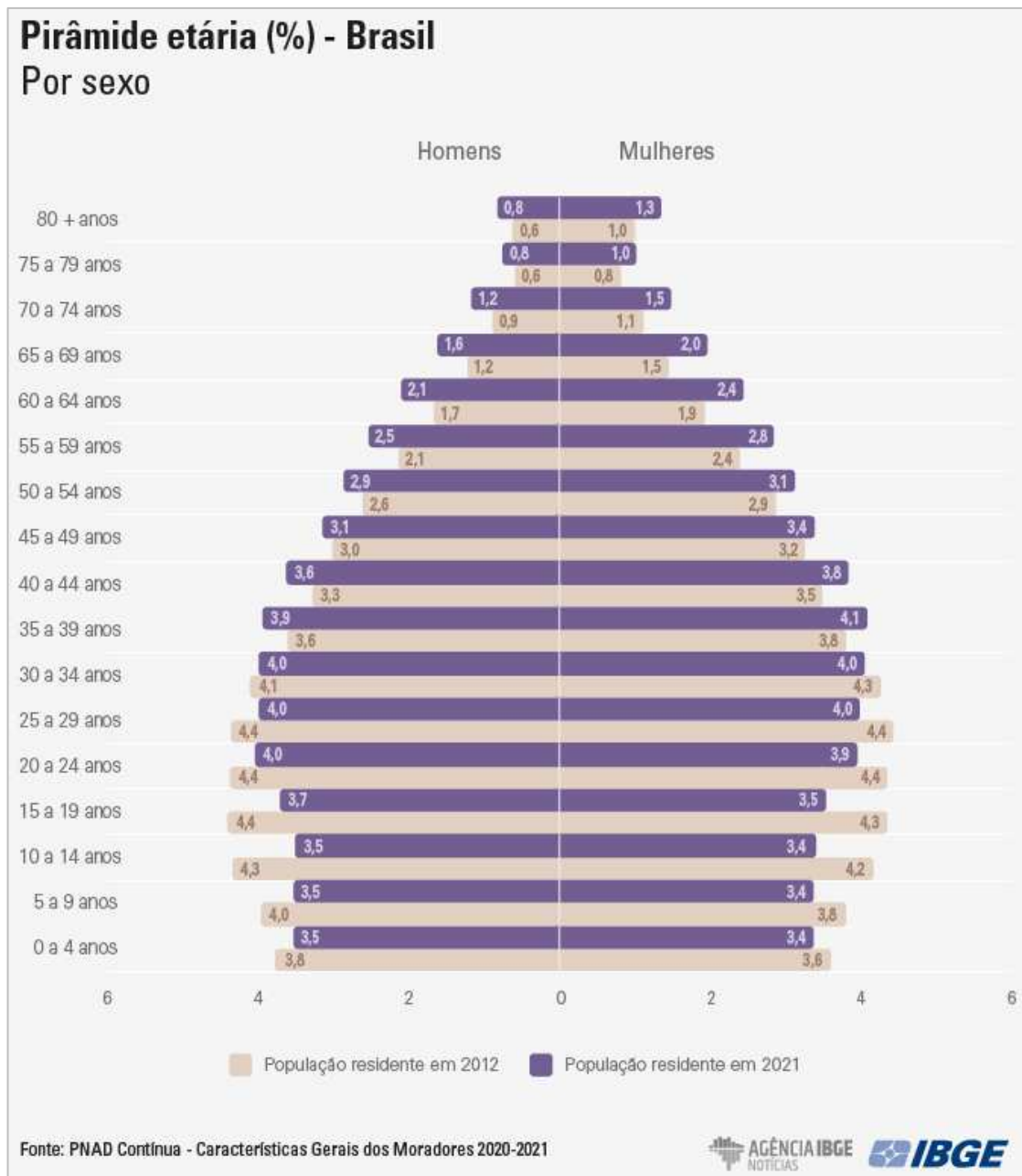
processo de envelhecimento populacional. Um outro dado apontado no senso de 2021 é a prevalência de mulheres em relação aos homens, quando levamos em conta a população acima dos 60 anos (**Figura 3**).



**B**



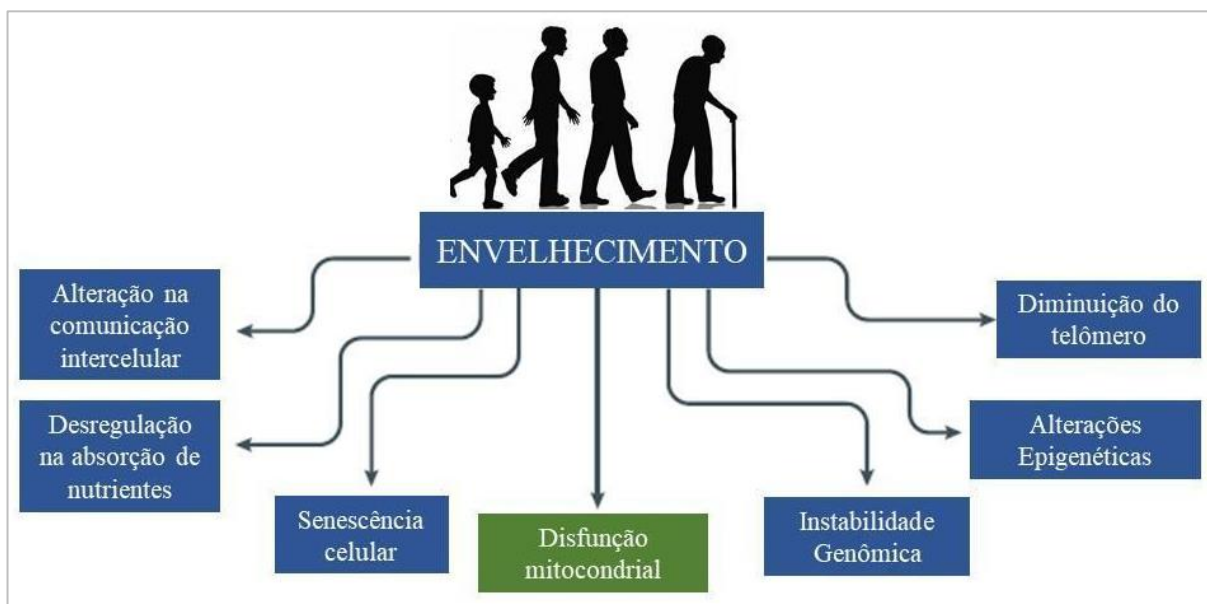
**Figura 2.** Panorama nacional do envelhecimento. (A) Dados comparativos entre os três últimos levantamentos. (B) Expectativa de vida da população brasileira até 2060. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).



**Figura 3.** Dados demográficos do envelhecimento dos brasileiros de acordo com o sexo. Observa-se a prevalência de mais mulheres acima dos 60 anos comparado aos homens. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Por definição, o envelhecimento é caracterizado por uma perda progressiva da integridade fisiológica, causando comprometimento de diversas funções no organismo, conforme mostrado na **Figura 4**. Um denominador comum do processo de envelhecer é o acúmulo de danos genéticos ao longo da vida, incluindo erros de replicação de DNA, reações hidrolíticas espontâneas e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERN/ROS) e nitrogênio (ERN/RNS), sendo essas espécies estando fortemente relacionadas a um aumento na disfunção

mitocondrial, importante organela celular. O estresse oxidativo e o envelhecimento estão diretamente ligados à fisiopatologia de diversas desordens inflamatórias e doenças degenerativas crônicas, desencadeadas pelo recrutamento de células imunológicas e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, causadas pelo acúmulo de ROS/RNS ao longo da vida. Dentre essas doenças destacam-se as Doenças de Alzheimer e Parkinson, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e outras (HOEIJMAKERS, 2009; HE *et al.*, 2015).

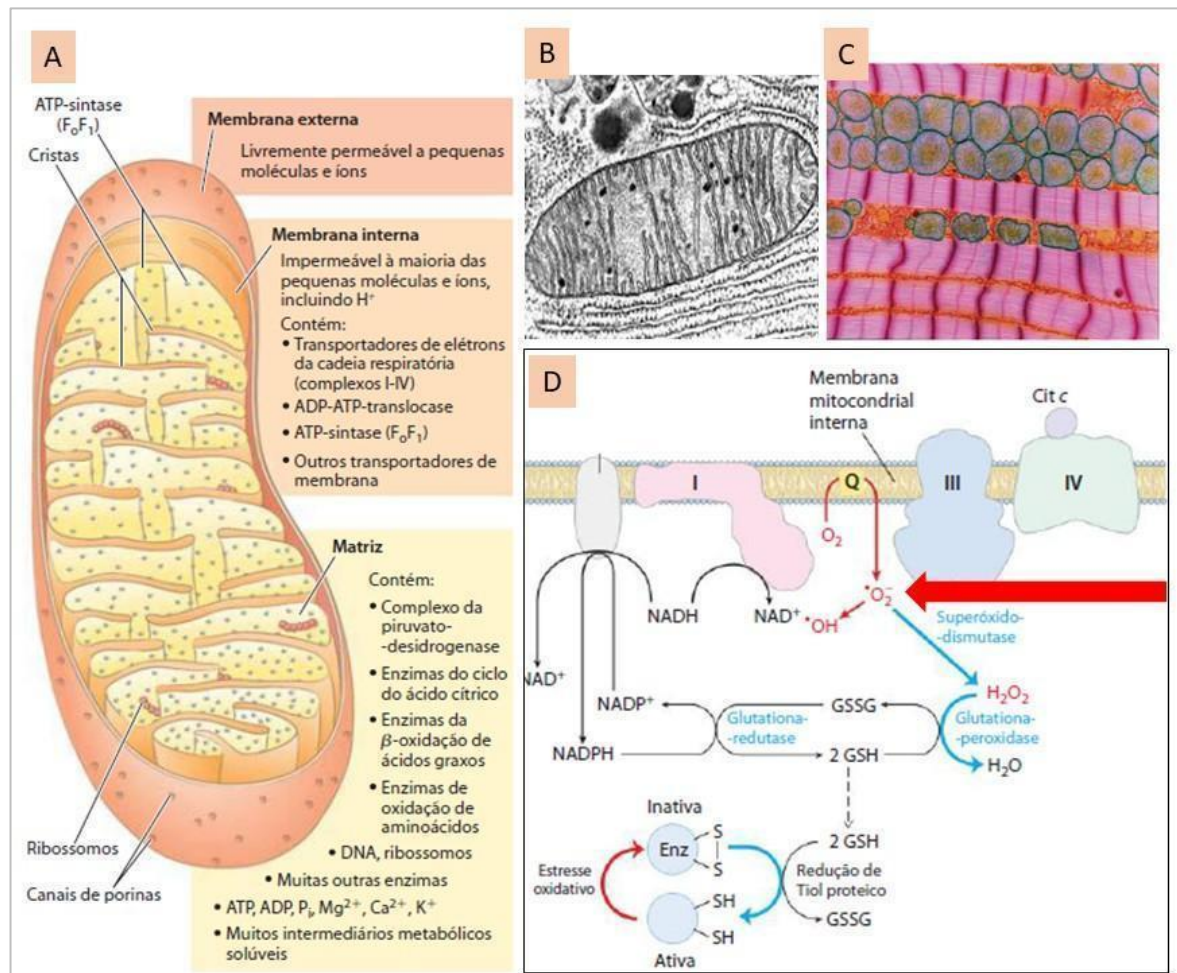


**Figura 4.** Os sete marcadores fisiológicos, celulares e moleculares presentes ao longo do envelhecimento (Adaptado de KHOSLA *et al.*, 2020).

Nesse contexto, existe a “Teoria dos Radicais Livres do Envelhecimento” e a “Teoria Mitocondrial do Envelhecimento”, ambas propostas pelo médico americano Denham Harman em 1956 e 1972, respectivamente. Harman foi pioneiro nos estudos sobre o envelhecimento celular e nomeado seis vezes para o Prêmio Nobel. Essas teorias postulam que o processo comum no envelhecimento é a iniciação de reações que levam ao aumento na produção de radicais livres (RL), produzidas em grande parte pelas mitocôndrias no processo de respiração celular (**Figura 5**). Cabe destacar que RL é um átomo, molécula ou substância com um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada mais externa, conferindo a eles alta reatividade. Essas reações, quando iniciadas, podem ser responsáveis pela deterioração progressiva dos sistemas biológicos ao longo do tempo por sua capacidade inata de produzir mudanças aleatórias devido a essa alta reatividade química, principalmente em proteínas, lipídeos de membrana e até mesmo no DNA (BARBOSA *et al.*, 2006) (**Figura 6**). A teoria foi confirmada ao longo dos



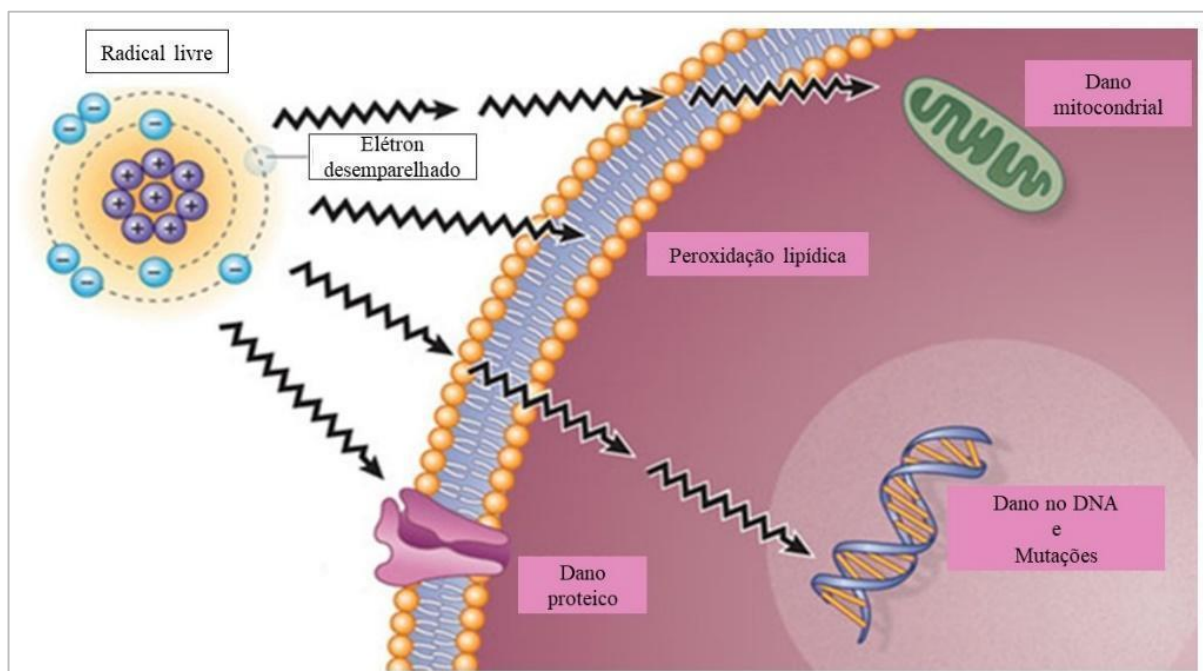
anos com sugestões de que a maioria desses RL são produzidos nas mitocôndrias em uma taxa crescente com a idade (HARMAN, 2003). Atualmente, sabe-se que a geração de um ambiente oxidante é uma das principais causas do envelhecimento, mas não a única (GLADYSHEV, 2014).



**Figura 5.** Mitocôndria e respiração celular. (A) Esquema da estrutura da mitocôndria, com destaque para as membranas externa e interna, cristas e matriz mitocondrial. (B) Imagem de microscopia eletrônica da organela. (C) As mitocôndrias do músculo cardíaco, mostrando a membrana interna e as estruturas dos complexos da cadeia transportadora e elétrons. (D) Formação de ROS nas mitocôndrias e defesas mitocondriais. Quando a taxa de entrada e transferência de elétrons ao longo da cadeia não são coordenadas, a produção do radical superóxido ( $\cdot O_2$ ) aumenta nos complexos I e III. Os mecanismos enzimáticos para neutralizar essas moléculas serão descritos a seguir. Fonte: LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

Conforme mencionado inicialmente, as Espécies Reativas (ER) se dividem em duas principais classes: as espécies reativas radiculares e não-radiculares. Além disso, elas podem ser espécies reativas em oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS). Dentre os exemplos de ROS

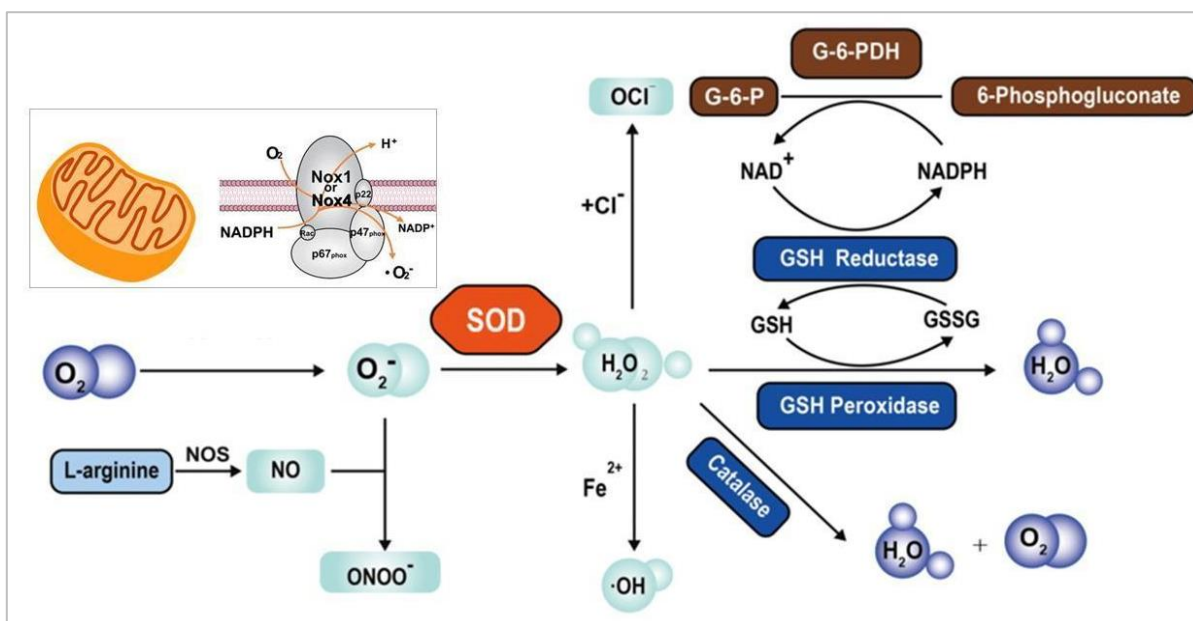
destacam-se os radicais ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), radical hidroperoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ), mas também algumas moléculas não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); enquanto que os principais exemplos de RNS radicalares são o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\bullet}$ ) e a principal espécie não-radicalar é o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (DANYLOVYCH *et al.*, 2016). Vale ressaltar que em baixas concentrações, essas espécies são consideradas essenciais para a regulação de diversos processos fisiológicos, como a progressão do ciclo celular e proliferação, diferenciação, migração e morte celular. O grande desafio (e o que tem sido relatado no envelhecimento) é o aumento na geração dessas espécies e seu efeito em danificar importantes componentes relacionados à homeostase do organismo (COVARRUBIAS *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Principais danos intracelulares causados pelos radicais livres. Fonte: Adaptado de The Biology of Aging, 2019.

Na célula, a formação de ER é evitada por um amplo sistema antioxidante. Essas defesas incluem antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona peroxidase (GPx), peroxirredoxinas e sestrinas, como também antioxidantes não enzimáticos, como vitamina C e E, glutiona (GSH), ácido lipóico, carotenoides e polifenóis (BLOKHINA *et al.*, 2003). As principais enzimas antioxidantes, bem como as reações por elas catalisadas são apresentadas na **Figura 7**. Podemos destacar três enzimas. A primeira é a SOD, localizada no citosol e na mitocôndria, é responsável por converter o  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  na

presença dos íons metálicos, cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) ou manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ). A segunda enzima é a CAT, presente no peroxissomo, que converte  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . A terceira enzima é a GPx, localizada tanto no citoplasma quanto no meio extracelular em quase todos os tecidos. Essa última enzima também é responsável pela conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , porém forma apenas  $\text{H}_2\text{O}$  como produto da reação. O papel dos RL no envelhecimento tem sido reforçado por vários estudos demonstrando que o quadro de estresse oxidativo aumenta com a idade cronológica concomitante com a redução dos níveis e da atividade dessas enzimas antioxidantes (SRIVASTAVA, 2017).

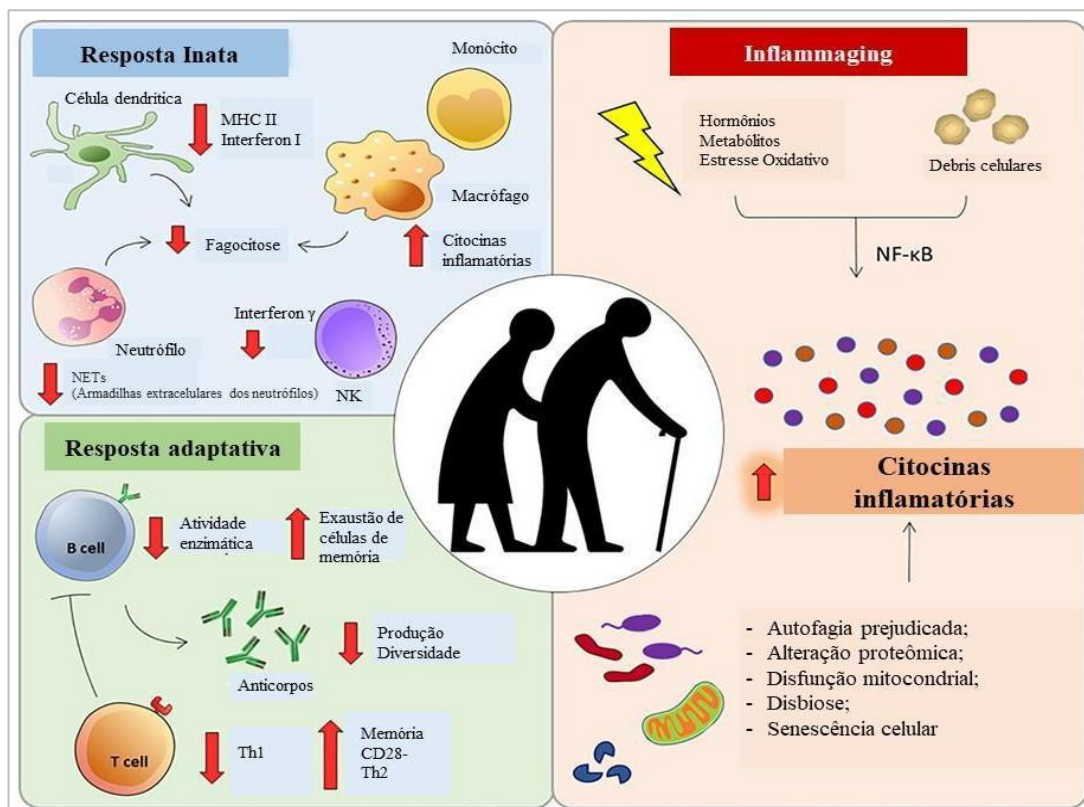


**Figura 7. Produção das principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e mecanismos de defesa enzimáticos.** ROS/RNS endógenos são produzidos principalmente pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e pela enzima NADPH oxidase. O ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) é o primeiro radical livre a ser produzido. Juntamente com o Óxido Nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) podem facilmente reagir com outras substâncias para formar outros ROS e RNS. Por exemplo,  $\text{O}_2^-$  pode ser dismutado pela SOD para formar  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou reagir com NO para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Além disso,  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage rapidamente com  $\text{Cl}^-$  para formar  $\text{OCl}^-$  ou pode ser decomposto e formar radicais hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). Sendo: NOS óxido nítrico sintase, G-6-P glicose-6-fosfato, G-6-PDH glicose-6-fosfato desidrogenase (Adaptado de HE *et al.*, 2020).

Durante o envelhecimento, além do aumento do estresse oxidativo, também ocorre o aumento do processo inflamatório. A relação entre esses dois processos tem sido documentada por muitos autores. Evidências indicam que a oxidação desempenha um papel patogênico em doenças inflamatórias crônicas, pois danos provenientes de estresse oxidativo, como proteínas

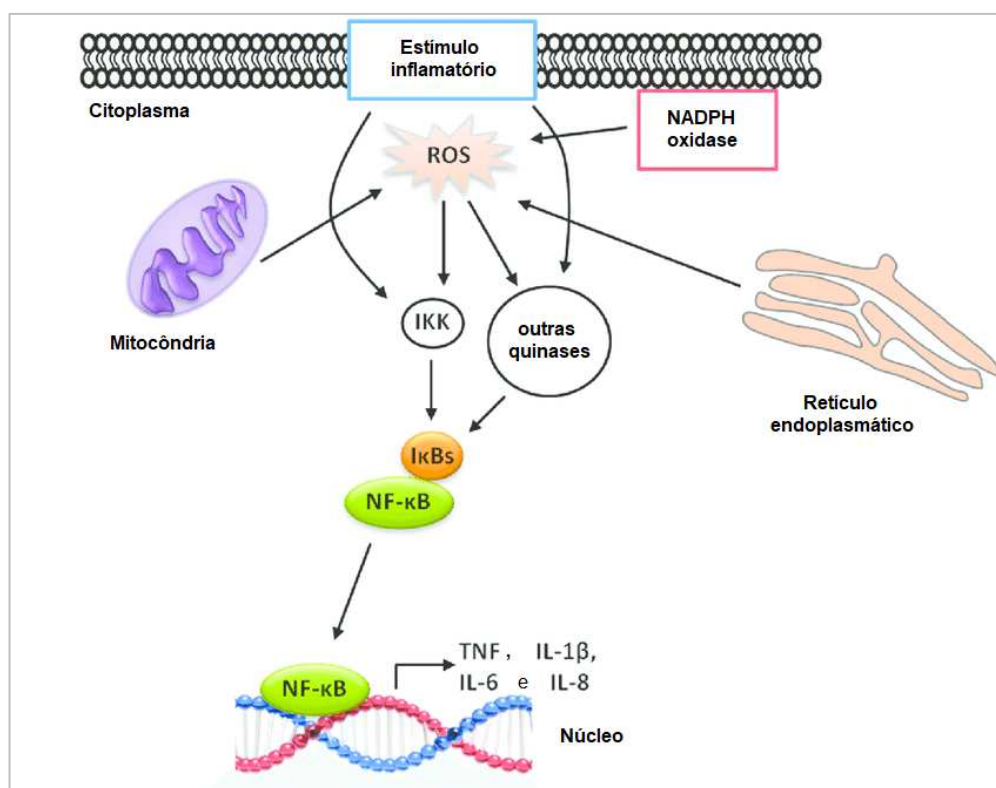
oxidadas, produtos glicosados e peroxidação lipídica, resultam em alterações na dinâmica e função celular.

Sabe-se que existem dois tipos de inflamação: a aguda (que se inicia rapidamente, com ação curta, tendo como principais características o edema e a migração de neutrófilos) e a crônica (maior duração, presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos, fibrose e necrose). No caso específico do envelhecimento, a literatura vem mostrando que se desenvolve uma inflamação crônica e de baixo grau – denominada “*inflammaging*” – que contribui para a etiologia de doenças relacionadas ao envelhecimento. Essa inflamação é caracterizada principalmente pela ativação de vias inflamatórias (como a do Fator Nuclear Kappa B – NFκB) e pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-6 (IL-6), concomitantemente com a diminuição de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10). Este quadro inflamatório pode levar a uma mudança em relação à senescência celular (**Figura 8**). Este fenômeno é preocupante, uma vez que a inflamação é um fator de risco altamente significativo para a morbidade e mortalidade nos idosos, uma vez que a maioria das doenças relacionadas ao envelhecimento partilham uma patogênese inflamatória (PILKINGTON *et al.*, 2021; FRANCESCHI *et al.*, 2014).



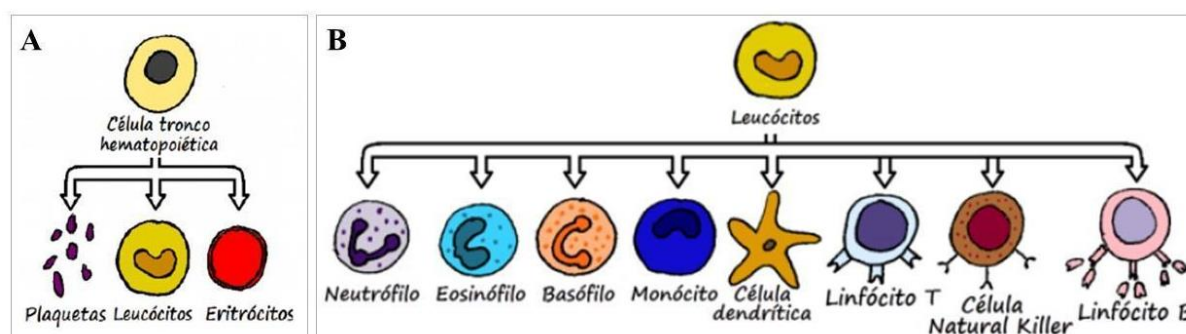
**Figura 8.** Principais alterações imunológicas observadas durante o envelhecimento. O envelhecimento interfere em vários aspectos das células imunes inatas e adaptativas que podem prejudicar ou comprometer sua função e resposta. Além disso, diversos fatores podem desregular a homeostase intracelular durante o envelhecimento, intensificando a secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias – processo conhecido por *inflammaging* (Adaptado de PIETROBON *et al.*, 2020).

É importante destacar a relação entre o estresse oxidativo e a inflamação como um ciclo vicioso. Uma vez que fatores-chave são ativados por meio do aumento da produção dessas espécies reativas, o processo culmina na liberação de mediadores inflamatórios, capazes de ativar algumas células do sistema imune (como macrófagos e neutrófilos) e inibir outras (como linfócitos do tipo Th1). Esses mediadores também desempenham papel crucial na produção de mais moléculas reativas, acarretando a ativação de vários outros fatores-chave no processo inflamatório. Esse processo acontecendo de forma crônica, ou seja, por um tempo maior, pode levar à instalação de diversas doenças, sejam elas inflamatórias ou não, devido ao descontrole constante do nosso organismo. Em suma, estudos vêm demonstrando que o estresse oxidativo aumenta o nível de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação de NF- $\kappa$ B, conforme mostrado na **Figura 9** (CHEN *et al.*, 2017).



**Figura 9.** Relação entre estresse oxidativo e inflamação. O aumento no estresse oxidativo leva a danos intracelulares, capazes de ativar proteínas cinases como IKK e finalmente a ativação de NF- $\kappa$ B, causando um processo inflamatório (Adaptado de MINATEL *et al.*, 2016).

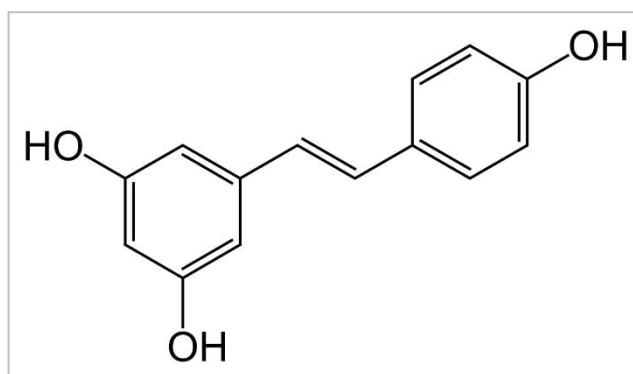
Atualmente, diversas formas de promover o envelhecimento saudável são estudadas, sobretudo visando a diminuição do estresse oxidativo e da inflamação crônica de baixo grau que se acumula ao longo dos anos. Dentre elas, podemos destacar os estudos *in vitro* com moléculas com potencial ação antioxidante e anti-inflamatória, sobretudo a partir de cultura de células obtidas do sangue periférico. O sangue total consiste em dois tipos de células: as hemácias (também chamadas de eritrócitos) e os leucócitos (também chamados de glóbulos brancos). A principal função dos leucócitos é atuar na defesa do organismo, além de serem conhecidos por sua importância no controle da homeostasia. A classificação dos leucócitos é mostrada na **Figura 10**. Visto sua importância, atualmente são muitos os trabalhos encontrados na literatura que visam o estudo de compostos com algum potencial terapêutico (não apenas antioxidantes) e que são investigados a partir de cultura de leucócitos (APOSTOLOVA *et al.*, 2020; FATHIMA *et al.*, 2017; COUTINHO *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Tipos de leucócitos. (A) Principais células presentes no sangue, originadas a partir de uma célula tronco hematopoética. (B) Tipos de leucócitos, que podem ou não apresentar grânulos (PANZARDI, 2018).

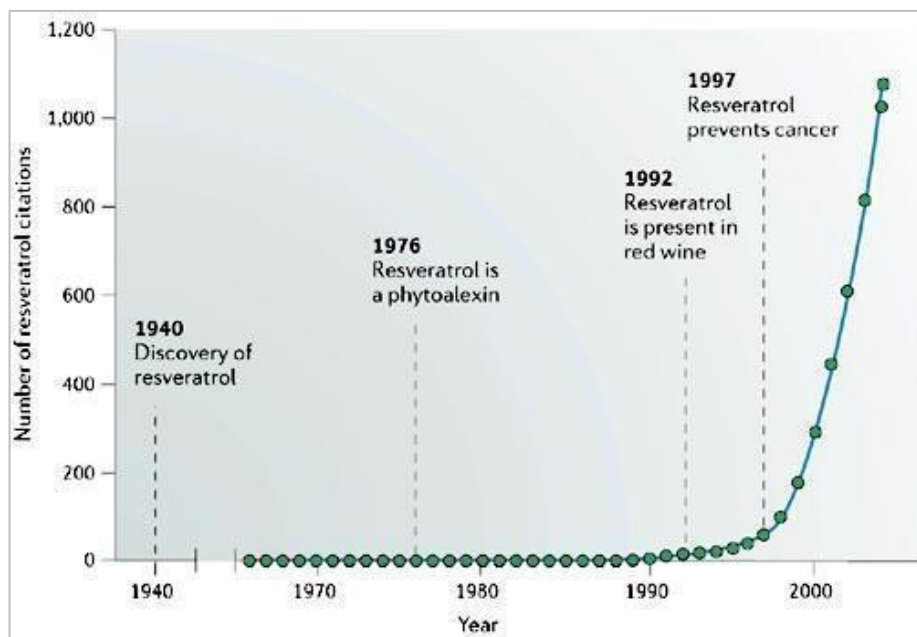
Nesse contexto de utilizar-se a suplementação com diversos antioxidantes não enzimáticos a fim de diminuir o acúmulo de RL, tem-se o resveratrol. O resveratrol é uma fitoalexina natural produzida por várias plantas em resposta a lesões, exercendo múltiplas atividades biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, anti proliferativos e antioxidantes. Estruturalmente, este composto é um estilbenoide que foi isolado pela primeira vez em 1939 das raízes do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum*) e provavelmente recebeu esse nome pelo fato de ser um derivado do benzeno-1,3-diol resorcinol. Posteriormente, o resveratrol foi isolado de várias outras plantas, frutas e derivados, como uvas, vinhos, maçãs, framboesas, mirtilos, pistache, ameixa, amendoim e uma infinidade de espécies de plantas medicinais e comestíveis que sofrem resposta a condições de estresse. Estudos experimentais e pré-clínicos

atribuíram vários efeitos de promoção da saúde a este composto, incluindo efeitos cardioprotetores, atividade quimiopreventiva em diversos tipos de câncer e uma capacidade de prolongar a vida de organismos inferiores. Em geral, trata-se de um polifenol estilbenoide, que possui dois anéis fenólicos ligados entre si por uma ponte de etileno. A estrutura química do resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxistilbeno) é identificada em duas formas isoméricas, *cis*- e *trans*- resveratrol, sendo que a forma *trans* (**Figura 11**) é dominante em termos de prevalência e nas diferentes atividades biológicas a que esse composto é atribuído (SALEHI *et al.*, 2018; PORRO *et al.*, 2015; Howitz *et al.*, 2003).



**Figura 11.** Estrutura do *trans*-resveratrol (MALAGUTI *et al.*, 2013).

RENAUD E DE LORGERIL (1992) foram os primeiros a relacionar os polifenóis do vinho, como o resveratrol, aos potenciais benefícios à saúde atribuídos ao consumo regular e moderado de vinho. Desde então, o resveratrol tem recebido uma atenção científica crescente, levando a investigações sobre sua atividade biológica e às numerosas publicações (**Figura 12**). Altas concentrações estão presentes nas uvas, possivelmente devido à resposta da *Vitis vinifera* à infecção fúngica. Nas plantas, o resveratrol atua como uma fitoalexina que é sintetizada em resposta a lesões mecânicas, irradiação UV e ataques de fungos. Já para fins industriais, o resveratrol é geralmente obtido por síntese química ou biotecnológica a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Atualmente, ele é comercializado como um suplemento nutricional com uma ampla gama de efeitos farmacológicos, principalmente por sua ação celular no combate ao estresse oxidativo (KEYLOR *et al.*, 2015; NAWAZ *et al.*, 2017).



**Figura 12.** Número de publicações sobre o resveratrol. O resveratrol é um composto com um crescente número de estudos publicados desde a sua descoberta em 1942, passando pela sua descoberta no vinho por Renaud e Lorigeril em 1992 até efeitos biológicos de importância clínica, como na prevenção do câncer em 1997 (BAUR *et al.*, 2006).

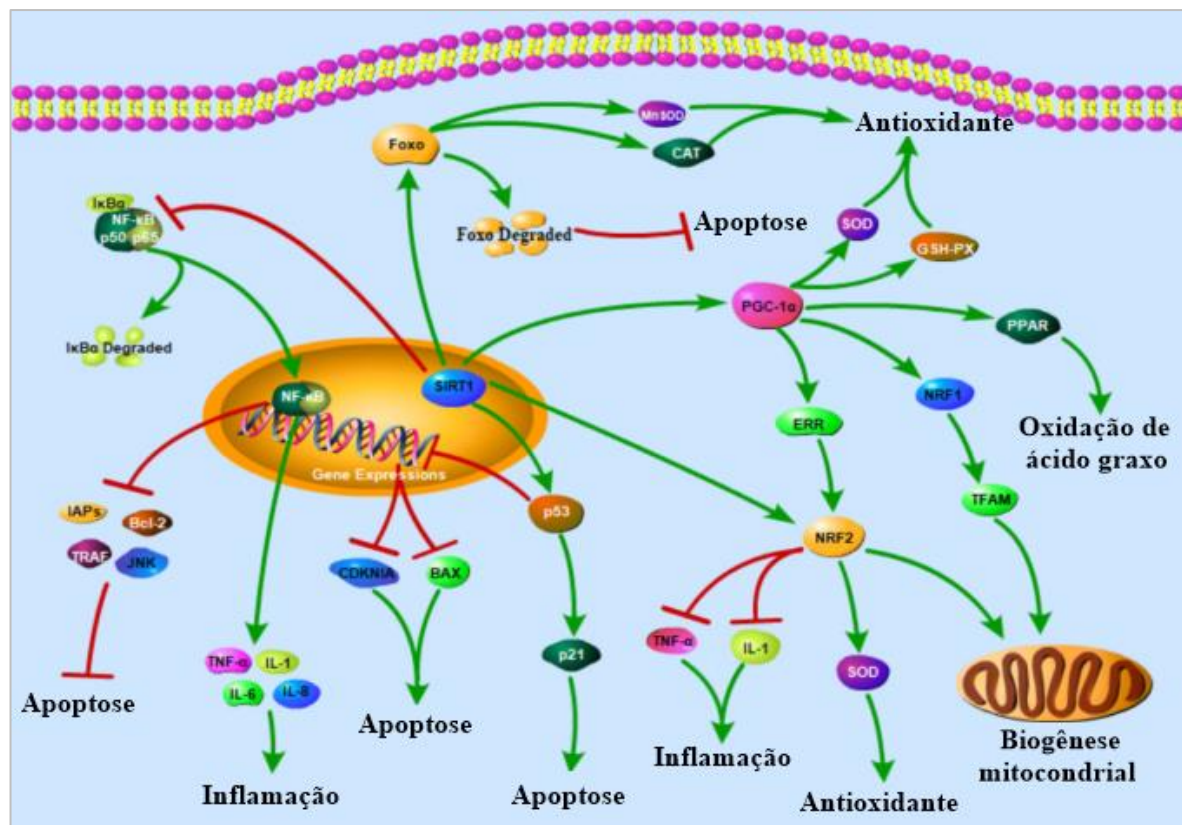
Os mecanismos moleculares de ação antioxidante e anti-inflamatória do resveratrol indicam a ativação de diversas vias bioquímicas de sinalização, tais como das proteínas sirtuínas (SIRT1) e proteínas quinases, como PKA, AKT/PKB, AMPK e MAPK. O resveratrol também atua por meio da ativação de um importante fator de transcrição, o fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* - Nrf2) (PANGENI *et al.*, 2014, CETRULO *et al.*, 2015), vias das quais serão descritas a seguir.

A Sirtuína 1 (SIRT1) é uma histona desacetilase de dinucleotídeo nicotinamida adenina (NAD<sup>+</sup>), que existe principalmente no núcleo e é membro de uma família de sirtuínas de mamíferos bem estudadas (SIRT1-SIRT7). A SIRT1 interage com substratos de proteínas em uma variedade de vias de sinalização (como Wnt e Notch), participa na regulação da maioria das funções fisiológicas do corpo e desempenha um papel regulador central na proliferação celular, diferenciação, senescência, apoptose e controle do metabolismo (CHANG *et al.*, 2014, CHEN *et al.*, 2013).

Estamos constantemente expostos a várias fontes de danos químicos e físicos na forma de drogas, poluentes ambientais, radiação ultravioleta e ionizante. Em níveis elevados, essas substâncias podem causar danos por meio de uma variedade de mecanismos (incluindo o já



citado estresse oxidativo) além de estimulação inflamatória e inibição do metabolismo energético. Estudos demonstraram que a SIRT1 é ativada a partir desses danos ao interagir com substratos de proteínas, como a família do fator de transcrição Forkhead-box (FOXO), o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), o fator de ativação assistida-1 (PGC-1) e com o supressor de tumor p53 em algumas vias de sinalização, como por exemplo a via do Nrf2 (detalhada a seguir). Uma outra via importante é a da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), a qual pode ativar SIRT1 por meio da regulação da razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  enquanto que SIRT1 ativa AMPK por desacetilação da serina treonina hepática cinase B1 (LKB1). Um resumo do mecanismo de atuação dessa via, bem como as principais respostas por ela gerada são ilustradas na **Figura 13**. De forma simplificada, a SIRT1 pode catalisar a desacetilação de acetil lisina de um substrato de histona e alguns outros substratos para regular a expressão gênica (SUZUKI *et al.*, 2015, REN *et al.*, 2019).

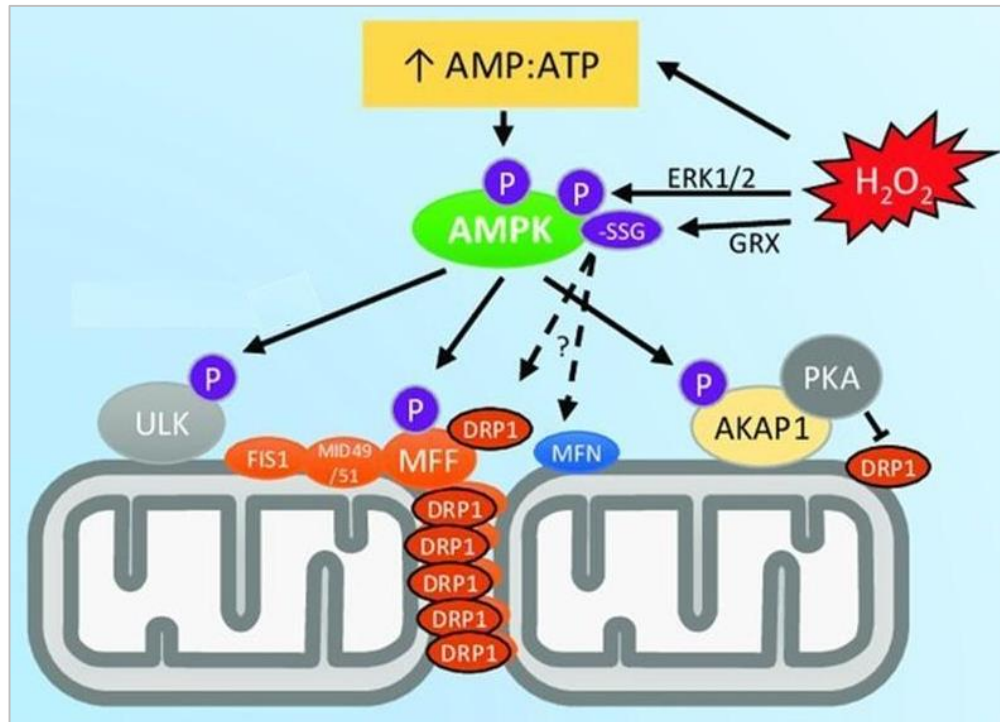


**Figura 13.** Via de sinalização da SIRT1. Os principais substratos da SIRT1 incluem Foxo, PPAR- $\gamma$  coativador-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), Nrf2, p53 e NF- $\kappa$ B (levando a sua inibição). Através da regulação desses sinais celulares, SIRT1 pode aumentar a resistência ao estresse oxidativo, diminuir processos inflamatórios e mediar o metabolismo celular (Adaptado de REN *et al.*, 2019).

---

Dentre as proteínas quinases, uma das que mais se destacam é a AMPK – Proteína Quinases Ativada por AMP, por seu papel central na regulação do metabolismo energético. A AMPK é uma serina/treonina quinase presente em todos os tecidos e órgãos eucarióticos, podendo ser ativada por vários estímulos que afetam o metabolismo celular, incluindo hipoxemia, deficiência alimentar, exercício físico e hormônios. A ativação da AMPK requer a ligação de AMP e ADP à subunidade  $\gamma$  para promover a fosforilação em Thr172. Além disso,  $\text{Ca}^{2+}$ /proteína quinase  $\beta$  dependente de calmodulina (CaMKK $\beta$ ) e serina/treonina quinase 1 (LKB1) também podem promover a fosforilação em Thr172 para ativar a AMPK. A ativação da AMPK também inibe as vias anabólicas. As suas funções biológicas incluem principalmente: estimular a oxidação de ácidos graxos do fígado e do músculo esquelético, promover a captação de glicose muscular, inibir a produção de triglicérides, colesterol, inibir a lipólise dos adipócitos e regular a secreção de insulina pancreática. No geral, a AMPK é um balanceador chave da oferta e demanda de energia e um integrador chave de vias importantes, como o sistema redox, produção inflamatória e autofagia nas células (SANDERS *et al.*, 2007; STEINBERG *et al.*, 2009; CANTÓ *et al.*, 2009).

A AMPK pode, portanto, ser ativada por estresse oxidativo, geralmente desencadeado experimentalmente pela adição de espécies reativas, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou NO ao meio celular (**Figura 14**). A adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa aumento na razão AMP:ATP celular, sugerindo que sua ativação ocorre por meio da via clássica mediada pelo AMP. Esse fenômeno foi comprovado por estudos que mostram que linhagens celulares HEK-293 expressando estavelmente AMPK de tipo selvagem (células WT) tem a via ativada por adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em um mecanismo dependente de AMP/ADP envolvendo a inibição da cadeia respiratória mitocondrial (AUCIELLO *et al.*, 2014).

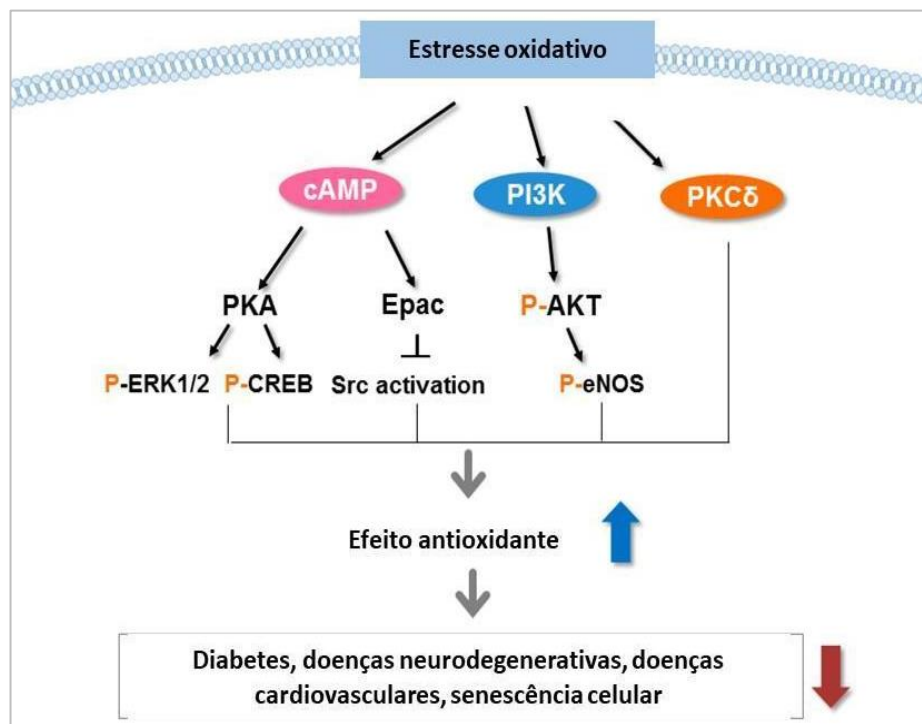


**Figura 14.** Atuação da AMPK mediada por ROS dos processos de dinâmica mitocondrial. Sob condições energeticamente estressantes, os níveis crescentes de AMP em relação ao ATP são detectados pela AMPK, o que leva à fosforilação de alvos a jusante, incluindo: MFF para promover a ligação de DRP1, unc-51 como quinase ativadora de autofagia (ULK) para induzir mitofagia e ancoragem da proteína quinase mitocondrial A (AKAP1) para se ligar à proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA), levando à fosforilação inibitória de DRP1 Ser637. Além disso, ROS pode modular a AMPK através dos níveis de AMP:ATP, fosforilação mediada pela quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e, adicionalmente, através da S-glutationilação mediada pela glutaredoxina – GRX (Adaptado de TREWIN *et al.*, 2018).

Outras duas vias de sinalização envolvendo proteínas quinases são a da proteína quinase A (PKA) e proteína quinase B (AKT/PKB). A PKA é uma serina / treonina quinase ativada por cAMP que também controla inúmeras funções do metabolismo. Evidências indicam que a PKA é uma quinase regulada por meio do balanço redox, na qual pode ser ativada de maneira independente do AMPc por meio da oxidação da cisteína na posição 17 da região N-terminal de uma das suas subunidades. A oxidação dessa cisteína induz à formação de uma ligação dissulfeto entre as subunidades da PKA, o que favorece uma conformação de dímero que exibe uma afinidade aumentada por proteínas de ancoragem da quinase A (AKAPs). Esta família de proteínas prendem a PKA e outras enzimas de transdução de sinais em microdomínios subcelulares, onde podem coordenar as respostas celulares que regulam o estresse oxidativo (**Figura 15**). Descobertas recentes indicam que a ativação da PKA por oxidação promove

respostas adaptativas que protegem diversos tipos celulares contra o estresse oxidativo (DIVIANI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2017).

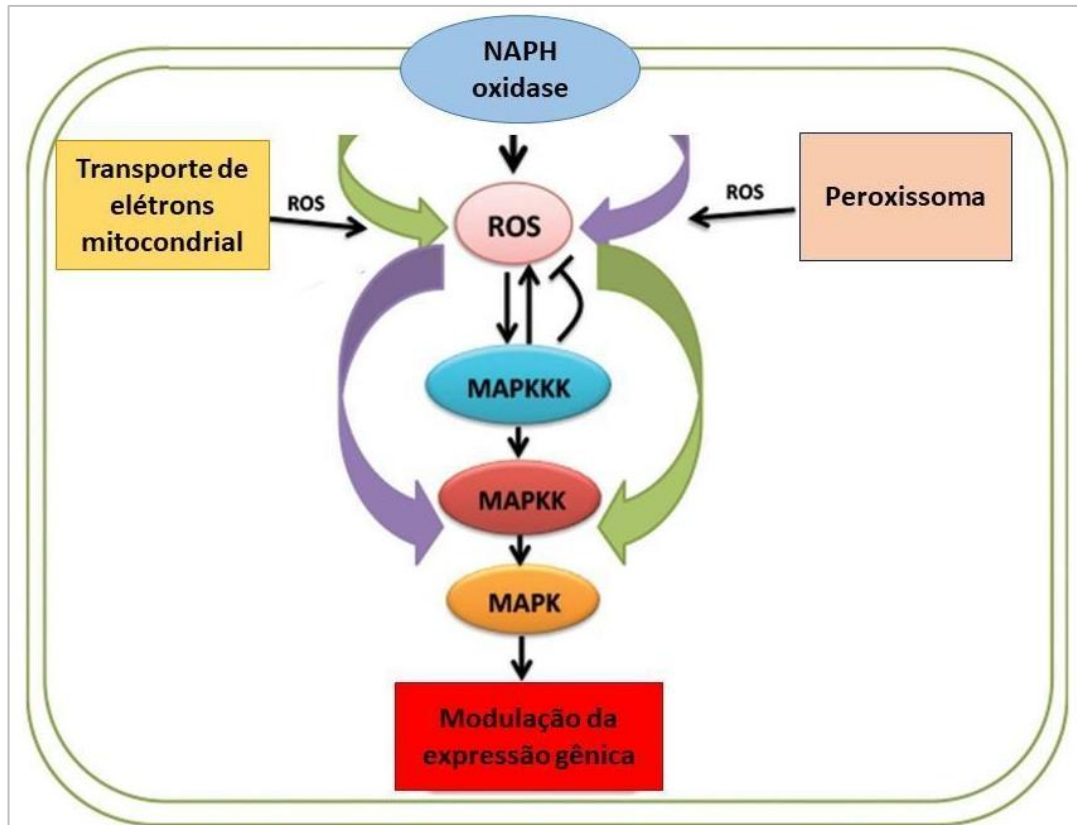
A proteína quinase B (PKB), também chamada de AKT também é uma serina / treonina quinase de 60 kDa que foi clonada em virtude de sua homologia com a PKA e PKC. É uma proteína ativada rapidamente em resposta à estimulação de receptores de tirosina quinase, como aqueles para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), insulina, fator básico de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento epidérmico. É descrito que PKB inibe a apoptose através de uma variedade de mecanismos moleculares, incluindo fosforilação direta e inibição do membro pró-apoptótico da família Bcl-2, glicogênio sintase quinase-3 e caspase-9. Mais recentemente, também foi demonstrado que a PKB fosforila e inibe diretamente membros da subfamília Foxo, resultando na sua retenção citoplasmática. Sabe-se que os fatores de transcrição da família FOXO regulam uma variedade de genes que influenciam a proliferação celular, sobrevivência, metabolismo e respostas ao estresse oxidativo, sendo esse último através da ativação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Portanto, a regulação da atividade de PKB é um meio crítico através do qual essa via modula a homeostase celular (VAN GORP *et al.*, 2006).



**Figura 15.** Vias de sinalização PKA e AKT/PKB. Com o aumento de cAMP, fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K) e a proteína quinase C (PKC), ocorre subsequentemente uma série de ativação de vias, incluindo proteína quinase A (PKA), proteína quinase de troca ativada por cAMP2 (Epac2) e proteína quinase B

(AKT). Essas vias aumentam a capacidade antioxidante em vários tecidos e reduzem o diabetes, as doenças neurológicas, as doenças cardíacas e a senescência. p-fosforilação, ERK - quinase regulada por sinal extracelular, CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP, Src – sarcoma, eNOS - óxido nítrico sintase endotelial (Adaptado de OH *et al.*, 2017).

Já a MAPKs (proteína quinase ativada por mitógenos) são proteínas quinases pertencentes a uma das principais vias associadas ao mecanismo de transdução de sinal intracelular. Assim como AMPK, PKA e PKB também é uma proteína da subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose. Existem pelo menos três tipos de sinalização MAPK distintos que medeiam sinais extracelulares no núcleo para ativar os genes responsivos em células de mamíferos. Estes incluem ERK, JNK e p38 quinase. A p38 MAP Kinase (p38MAPK) participa de uma cascata de sinalização que controla as respostas celulares às citocinas inflamatórias e ao estresse. A p38 MAP quinase é ativada por uma variedade de estresses celulares, incluindo choque osmótico, citocinas inflamatórias, lipopolissacarídeos (LPS), fatores de crescimento e estresse oxidativo (**Figura 16**). A via p38 MAPK é um regulador chave da biossíntese de citocinas pró-inflamatórias nos níveis transcricional e translacional, o que torna diferentes componentes desta via alvos potenciais para o tratamento de diversas doenças (ANERILLAS *et al.*, 2020; FRANÇA *et al.*, 2018; TUDOR *et al.*, 2009).

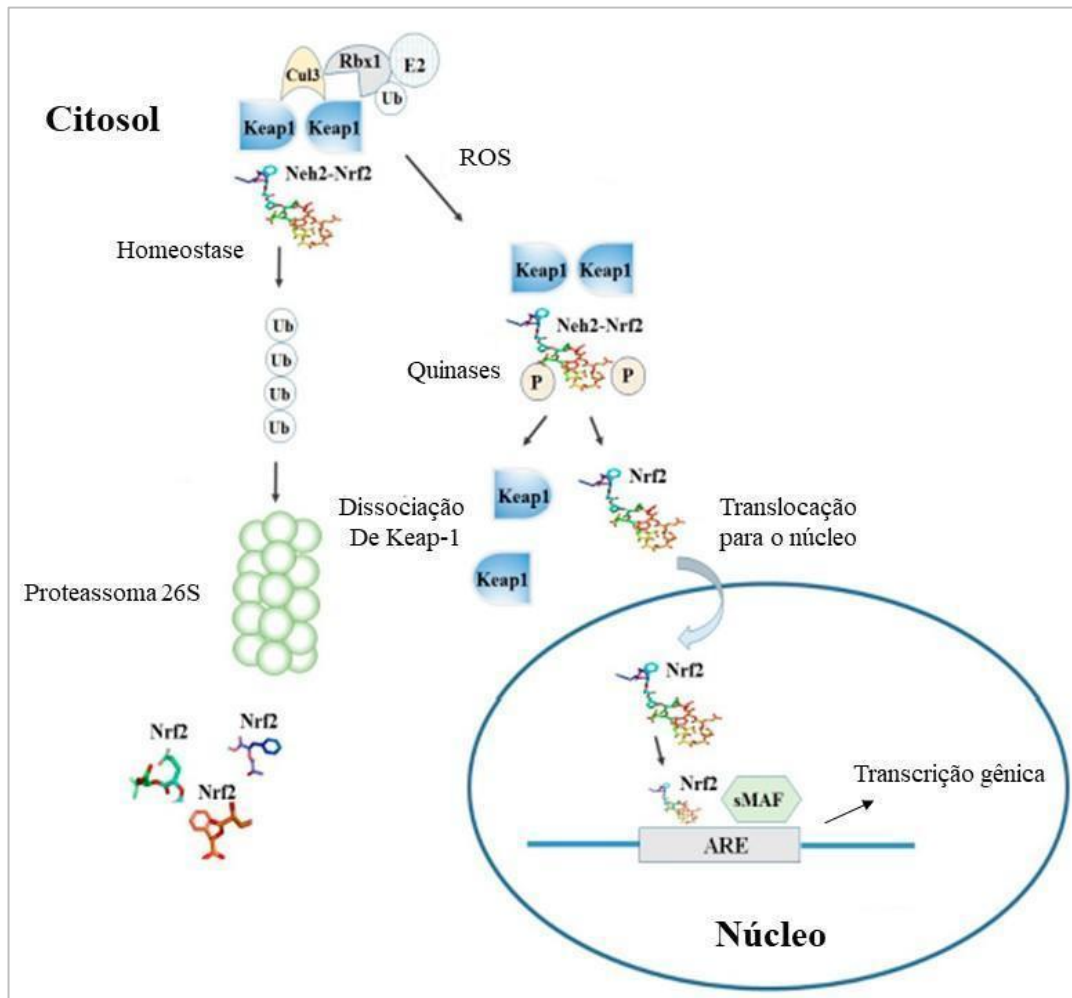


**Figura 16.** Representação esquemática da regulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) da via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). ROS é um mensageiro comum produzido em resposta a diversas situações fisiológicas, como no envelhecimento, agindo a montante ou a jusante da cascata MAPK (Adaptado de JALMI *et al.*, 2015).

Outra via de sinalização importante que foi estudada é a do Nrf2. Nrf2 é um membro da família de fatores de transcrição do tipo *Cap'n'collar*, que consiste em 605 resíduos de aminoácidos divididos em sete domínios funcionais altamente conservados, conhecidos como Neh1-Neh7 (SAHA *et al.*, 2020). Em um ambiente de estresse oxidativo, o Nrf2 é fosforilado por cinases, processo no qual é responsável por se desprender do seu inibidor negativo Keap-1. O Nrf2 fosforilado se transloca para o núcleo, heterodimeriza com pequenas proteínas Maf (sMaf) e se liga a Elementos de Resposta Antioxidante (AREs), encontrada na região promotora de vários genes quimioprotetores e de enzimas antioxidantes que estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (**Figura 17**) (AHMED *et al.*, 2017; SALDANHA *et al.*, 2013).

A ativação do Nrf2 é, portanto, mediada principalmente por vias envolvendo proteínas cinases, como AMPK e MAPK. Embora a fosforilação do Nrf2 já tenha sido demonstrada, nenhuma delas foram conclusivamente ligadas à sua estabilização. Devido as vias envolvendo proteínas cinases controlarem numerosos processos de sinalização na célula, são necessários

estudos adicionais para explorar se tais mecanismos são intimamente envolvidos na regulação da estabilidade da proteína Nrf2 em resposta ao estresse oxidativo. Em adição, outros estudos têm demonstrado um *crossstalk* entre essas vias bioquímicas ativadas pelo resveratrol, de modo a potencializar os efeitos que culminam na ativação de Nrf2. Entretanto, algumas dessas vias de proteínas cinases parecem estar inibidas no envelhecimento (ZHU *et al.*, 2017).



**Figura 17.** Via de sinalização da Nrf2. Em condições normais, Nrf2 é constantemente ubiquitinado através de Keap1 e degradado via proteossoma. Após a exposição ao estresse oxidativo, Keap1 é inativado e Nrf2 torna-se fosforilado. O Nrf2 fosforilado (p-Nrf2) se acumula no núcleo e se liga aos locais do elemento de resposta antioxidante (ARE), ativando inúmeros genes, incluindo os de enzimas antioxidantes e moléculas de transporte (Adaptado de SAHA *et al.*, 2020).

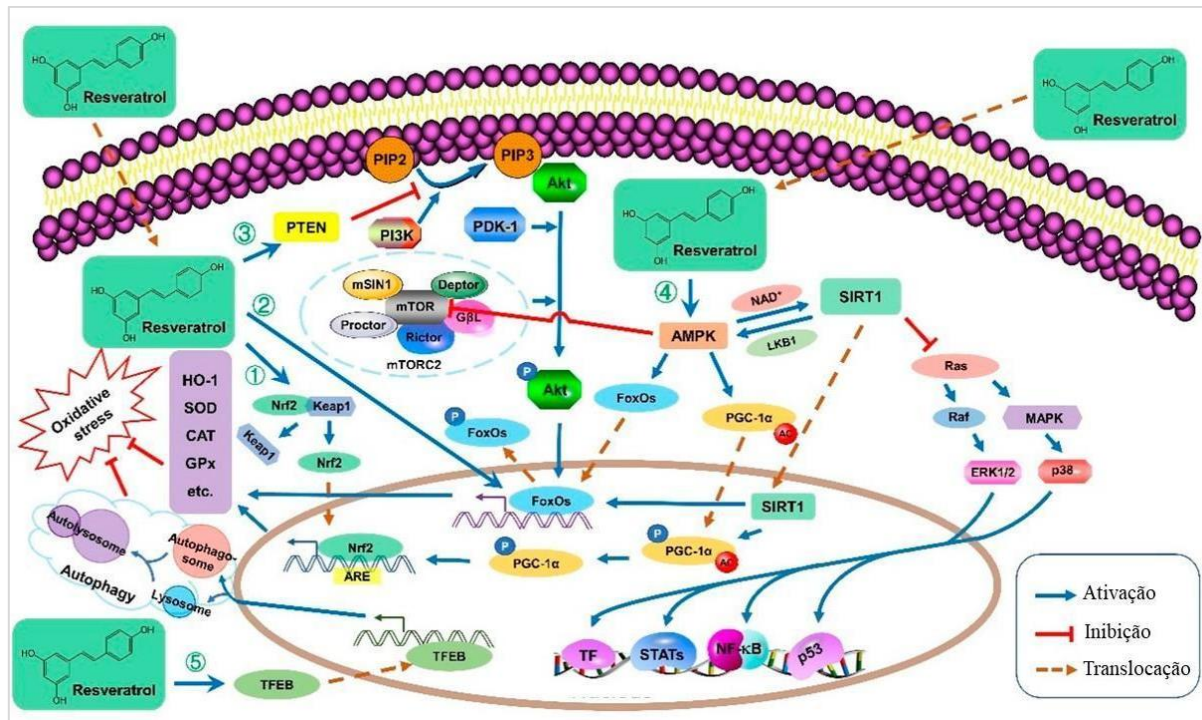
NGUYEN (2009) demonstrou que células que expressavam Nrf2 apresentavam maior proteção contra a morte celular em um ambiente de estresse oxidativo induzido por  $H_2O_2$ , além dessa proteína ser capaz de inibir a expressão de moléculas de adesão e citocinas, sugerindo potenciais propriedades anti-inflamatórias. Além disso, dados da literatura supõem que o Nrf2

parece estar envolvido no controle da integridade mitocondrial durante a inflamação e estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2022; RYOO *et al.*, 2018). Foi demonstrado que a ativação do Nrf2 é capaz de proteger as mitocôndrias da abertura de poros de transição da permeabilidade mitocondrial em resposta ao tratamento com terc-butil-hidroperóxido. Ao que parece, essa resistência é acompanhada por um aumento na produção de enzimas antioxidantes, como a GPx. Durante o estresse oxidativo, o Nrf2 também pode contribuir para a regulação da mitofagia, processo pelo qual as mitocôndrias danificadas são removidas, via regulação de degradação autofagossômica (VOMUND, 2017).

Importante destacar que existe um *crossstalk* entre todas essas vias de transdução de sinais, por exemplo mostrado entre as vias SIRT1 e Nrf2 na **Figura 13**. HUANG e colaboradores (2015) demonstraram que SIRT1 pode ativar a transcrição de Nrf2 e aumentar sua expressão gênica juntamente com a de outros genes, como aqueles que codificam SOD e GSH. Além disso, a redução da expressão de SIRT1 também reduziu a expressão da proteína Nrf2 (REN *et al.*, 2019). Outros estudos demonstraram que a alta expressão de SIRT1 pode desacetilar Nrf2, o qual pode ser regulado por acetilação. SIRT1 foi capaz de aumentar a estabilidade de Nrf2 e promover seu transporte para o núcleo, aumentando a resistência ao dano oxidativo e desempenhando um papel protetor em células epiteliais alveolares. Pode-se observar, portanto, que a via SIRT1-Nrf2 pode antagonizar o dano oxidativo e diversos efeitos tóxicos ao aumentar a capacidade antioxidante do organismo (DING, 2016). A ativação de Nrf2 também pode ser feita por fosforilação, sendo, portanto, um processo dependente da ativação das vias quinases descritas anteriormente (ZHU *et al.*, 2017).

Por fim, muitos estudos têm demonstrado as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do resveratrol (CALDEIRA *et al.*, 2021; CARDOSO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021; MALAGUTI *et al.*, 2013). Tal composto protege contra o estresse oxidativo e inflamação, visto ao longo do texto como um dos principais contribuintes para muitas doenças (principalmente aquelas atreladas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, osteoporose, etc), por meio de várias vias moleculares associadas ao sistema redox (MENG *et al.*, 2020). As principais vias estimuladas pelo resveratrol são mostradas na **Figura 18**. Entretanto, pouco se sabe sobre esse padrão de sinalização e as respostas celulares geradas ao longo do envelhecimento, sendo o principal objetivo do presente trabalho.





**Figura 18.** Os mecanismos moleculares antioxidantes do resveratrol. (1) O resveratrol desfaz a ligação do Nrf2 com seu inibidor Keap1 no citoplasma, interrompendo sua ubiquitinação e degradação. O Nrf2 acumulado se desloca para o núcleo, liga-se ao ARE e inicia a transcrição de muitos genes antioxidantes, como SOD e CAT para reduzir o estresse oxidativo. (2) O resveratrol promove as funções de transcrição de FoxOs no núcleo para facilitar a transcrição de muitos genes antioxidantes como o HO-1, contribuindo para a redução do estresse oxidativo. (3) O resveratrol regula positivamente o gene PTEN, um dos principais antagonistas da PI3K, bloqueando a ativação da AKT. Consequentemente, a Akt inibida leva à diminuição da fosforilação de FoxOs. Portanto, menos p-FoxOs se translocam do núcleo para o citoplasma e mais FoxOs permanecem no núcleo para atuar como fatores de transcrição. (4) O resveratrol ativa a AMPK para manter a estabilidade estrutural de FoxOs, facilitando sua translocação e cumprindo sua função transcricional. Além disso, a AMPK ativada fosforila PGC-1 $\alpha$ , que pode translocar-se para o núcleo e ser desacetilada por SIRT1. PGC-1 $\alpha$  promove a ativação de Nrf2, levando ao aumento de sua expressão. O resveratrol ativa a AMPK, levando à ativação da SIRT1, que inibe as vias de sinalização da MAPK e resulta em autofagia. (5) O resveratrol induz a autofagia ao ativar o TFEB (Fator de transcrição de lisossomos), que promove a formação de autofagossomo e lisossomo, bem como sua fusão em um autolisossomo, levando à redução do estresse oxidativo. (Adaptado de MENG *et al.*, 2020).

## JUSTIFICATIVA

---

---

## 2. JUSTIFICATIVA

A demografia populacional da maioria dos países ocidentais está mudando rapidamente. A proporção de indivíduos mais velhos está aumentando devido a diminuição das taxas de nascimento e o declínio da taxa de mortalidade, a qual tem diminuído consideravelmente a partir de avanços contínuos de melhoria da saúde da população. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o número de pessoas com idade superior a 60 anos chegará a 2 bilhões até 2050, o que representará um quinto da população mundial. Enquanto isso, dados do Ministério da Saúde em 2016, mostraram que o Brasil tinha a quinta maior população idosa do mundo e que em 2030, o número ultrapassará o total de crianças entre 0-14 anos (VAUPEL *et al.*, 2010).

Com isso, o envelhecimento sem doenças associadas torna-se um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea, pois essas doenças são responsáveis pela maior parte dos gastos na área da saúde em países industrializados. Essas doenças permanecem mal caracterizadas, mal diagnosticadas e com tratamento inadequado (BULLONE *et al.*, 2017).

Conforme mencionado anteriormente, um denominador comum que leva ao envelhecimento é o acúmulo de radicais livres. Segundo Denham Harman (1956), a Teoria do Estresse Oxidativo do Envelhecimento aponta que os organismos envelhecem porque eles acumulam dano oxidativo. Esse dano é proveniente de ROS/RNS, que são metabólitos parcialmente reduzidos do oxigênio ou do nitrogênio molecular gerados como produtos de reações metabólicas ou como subprodutos de vários processos celulares. Um processo conhecido por gerar ROS, por exemplo, é a respiração celular. Baseado nesse conceito, a formação fisiológica de ROS durante o metabolismo celular produz dano oxidativo para a própria célula e que com o tempo resulta em um declínio bioquímico e fisiológico. Uma ampla gama de estudos tem mostrado que o desequilíbrio entre a produção de ROS, por um lado, e as defesas antioxidantes, por outro, contribuem consideravelmente para o desenvolvimento de patologias relacionadas ao envelhecimento (BULLONE *et al.*, 2017; GLADYSHEV *et al.*, 2014).

Além disso, o envelhecimento e as doenças relacionadas com a idade partilham alguns mecanismos básicos que convergem em grande parte para a inflamação. Durante o envelhecimento, desenvolve-se uma inflamação crônica e de baixo grau – chamada *inflammaging* – que contribui para a patogênese de doenças relacionadas com a idade. O novo campo da gerociência (área de estudo do envelhecimento) oferece uma nova perspectiva para

---

abordar a crescente incidência de doenças crônicas relacionadas com a idade, incluindo distúrbios metabólicos como a síndrome metabólica, obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (sendo essa a principal causa de morte em todo o mundo). A crescente incidência destas patologias é reflexo do crescente envelhecimento populacional. De acordo com a gerociência, a inflamação é um dos sete pilares do envelhecimento evolutivamente conservados que são partilhados nessas doenças relacionadas à idade (FRANCESCHI *et al.*, 2018). Em contrapartida, a utilização de compostos naturais (como cúrcuma, alecrim, azeite de oliva, etc) associados a uma alimentação saudável vem se mostrando de suma importância para a prevenção dessas inúmeras doenças que surgem no envelhecimento (LIN *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Dentre os compostos naturais estudados atualmente, o resveratrol tem ganhado destaque, sobretudo pela sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Estudos demonstram que este polifenol tem atuado como um potente agente no envelhecimento saudável através da ativação de vias de transdução de sinais específicas (como a via Nrf2), que são capazes de estimular a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx concomitantemente a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e ativação de citocinas anti-inflamatórias (GU *et al.*, 2021; LOPEZ-OTIN *et al.*, 2013). Importante destacar que o resveratrol têm apresentado um bom potencial terapêutico e uma boa tolerância nos ensaios clínicos aos quais vem sendo submetido, porém as respostas celulares por ele ativadas ao longo do processo de envelhecimento ainda não são totalmente compreendidas (SINGH *et al.*, 2019; SARUBBO *et al.*, 2020).

Visto isso, torna-se de extrema importância o estudo dessas vias para entender o mecanismo pelo qual o resveratrol pode promover a diminuição do estresse oxidativo e inflamação, sendo capaz de retardar o envelhecimento celular e promover uma longevidade saudável em uma população cada vez mais idosa. A hipótese deste estudo é de que, apesar do envelhecimento levar ao aumento de marcadores oxidativos e inflamatórios, o resveratrol consegue ativar vias de transdução de sinais específicas capazes de promover uma resposta antioxidante e anti-inflamatória eficaz.

## **OBJETIVOS**

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol e investigar as vias de transdução de sinais em leucócitos humanos de doadores em três faixas etárias (20-39, 40-59 e 60-80 anos).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar as concentrações de resveratrol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (para indução de um ambiente oxidante) e avaliar a viabilidade dos leucócitos obtidos dos indivíduos frente às condições de tratamentos;
- Analisar o perfil oxidativo dos leucócitos humanos na ausência e presença de resveratrol através da quantificação da produção de ROS nas três faixas etárias;
- Quantificar a produção de RNS na ausência e presença de resveratrol através da dosagem de peroxinitrito e óxido nítrico nas três faixas etárias;
- Estudar a atividade do complexo antioxidante na ausência e presença de resveratrol nas três faixas etárias por meio da dosagem das enzimas SOD, CAT e GPx;
- Avaliar a influência das vias PKA, AKT/PKB, AMPK, SIRT1, MAPK e Nrf2 sobre o efeito antioxidante do resveratrol nos leucócitos das diferentes faixas-etárias através do uso de inibidores específicos;
- Identificar a ativação do gene da proteína Nrf2 e a concentração da proteína total e fosforilada (forma ativa);
- Analisar o perfil anti-inflamatório do resveratrol em leucócitos das diferentes faixas-etárias através da quantificação de citocinas pró (TNF e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10);
- Avaliar a importância da via de sinalização Nrf2 sobre os mecanismos anti-inflamatórios do resveratrol nos leucócitos das diferentes faixas-etárias, quantificando as mesmas citocinas quando os leucócitos foram previamente incubados com o inibidor específico da via;
- Correlacionar a idade dos doadores nos quais foram obtidos os leucócitos com os níveis basais de estresse oxidativo e inflamação, bem como a atividade das enzimas e atuação das vias PKA, AKT/PKB, AMPK, SIRT1, MAPK e Nrf2;
- Correlacionar a influência do tratamento com resveratrol nos parâmetros acima, nos leucócitos das três faixas etárias.

## **METODOLOGIA**

---

---

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 SELEÇÃO DE DOADORES

Primeiramente, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 33842420.4.0000.5149), cujo termo encontra-se nos anexos. Foram selecionados 60 indivíduos, divididos em três faixas-etárias: Grupo 1 (20-39 anos), Grupo 2 (40-59 anos) e Grupo 3 (60-80 anos), pertencentes a ambos os sexos, nos quais as amostras foram cedidas através de parceria com o laboratório IVC: *In Vitro* Cells Pesquisa Toxicológica LTDA, sediada na Avenida José Cândido da Silveira, nº 2100, Bairro Horto Florestal, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os critérios de exclusão foram: portadores de Síndrome Metabólica, fumantes, portadores de infecção, inflamação, insuficiência cardíaca e uso de medicamentos que influenciavam diretamente na função imunológica.

Aqueles que puderam participar, foram submetidos à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A **Tabela 1** descreve as características da população estudada.



**Tabela 1.** Característica demográfica da população de estudo.

<b>Parâmetros por faixa etária</b>	<b>Homens</b>		<b>Mulheres</b>	
	<b>Média ± DP</b>		<b>Média ± DP</b>	
<b>Faixas Etárias (anos)</b>				
20-39	32,3 ± 6	ns	29,8 ± 5	
40-59	52,1 ± 4	ns	50,2 ± 5	
60-80	76,3 ± 7	ns	66,9 ± 6	
Total:	53,57 ± 12	ns	48,97 ± 11	
<b>Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>)</b>				
20-39	22,4 ± 2	ns	21,8 ± 3	
40-59	18,8 ± 2	ns	17,5 ± 3	
60-80	23,4 ± 3	ns	24,5 ± 4	
Total:	21,5 ± 1	ns	21,3 ± 2	
<b>Glicose sanguínea (mg/dL)</b>				
20-39	89,4 ± 7,0	ns	83,7 ± 5,6	
40-59	83,4 ± 8,6	ns	85,5 ± 9,1	
60-80	102,6 ± 11,3	ns	105,6 ± 10,6	
Total:	91,8 ± 5,7	ns	91,6 ± 7,1	
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>				
20-39	102,4 ± 38	ns	101,8 ± 29	
40-59	130,0 ± 57	ns	127,7 ± 43	
60-80	164,3 ± 20	ns	153,5 ± 23	
Total:	132,2 ± 18	ns	127,7 ± 15	
<b>Creatina sérica(mg/dL)</b>				
20-39	0,979 ± 0,16	ns	0,821 ± 0,16	
40-59	0,630 ± 0,02	ns	0,680 ± 0,12	
60-80	0,741 ± 0,17	ns	0,793 ± 0,17	
Total:	0,783 ± 0,10	ns	0,763 ± 0,04	
<b>Complicações Vasculares</b>				
20-39	Não		Não	
40-59	Não		Não	
60-80	Não		Não	

ns= não significativo pelo teste de Mann-Whitney.

Faixa de índice de massa corporal = 18,5 – 24,99kg/m<sup>2</sup> (World Health Organization, 2000).

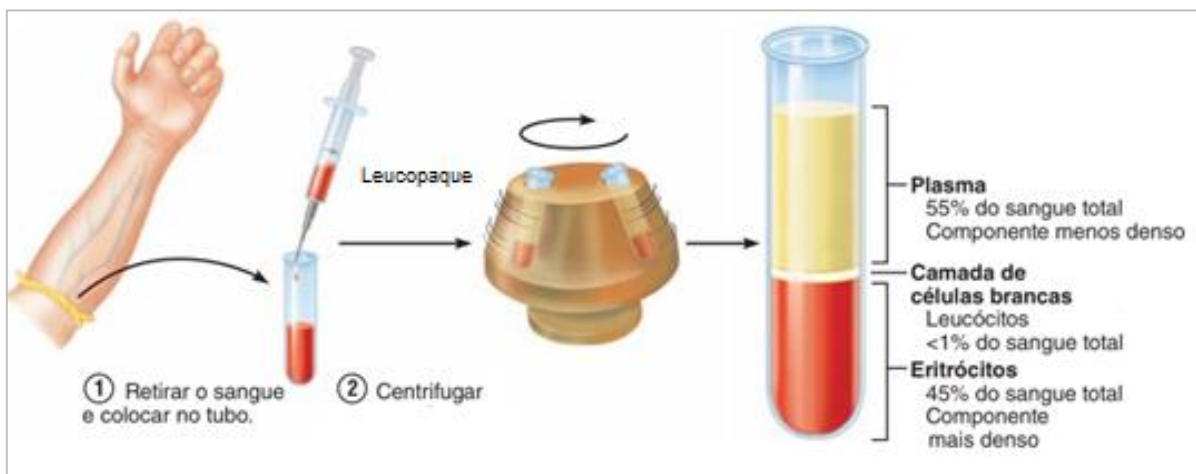
Glicose sanguínea: Valor normal inferior a 99mg/dL (American Diabetes Association, 2011).

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

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

## 4.2 OBTENÇÃO E CULTURA DOS LEUCÓCITOS HUMANOS

Os leucócitos humanos foram isolados a partir de um gradiente de separação, seguindo a metodologia de CARDOSO e colaboradores (2020). Em suma, 4ml de sangue heparinizado foram adicionados sobre 3 ml de gradiente Leucopaque (Guerbet | densidade = 1,13) em tubos de vidro. Após centrifugação a 2.200 rpm por 15 minutos, foram obtidas duas fases distintas separadas por dois anéis interfásicos. O plasma, correspondente à primeira fase formada após centrifugação, foi descartado (**Figura 19**). Os leucócitos foram acondicionados em um tubo siliconizado, que teve seu volume completado com PBS (pH 7,3) para duas sessões de lavagem a 1.500 rpm por 10 minutos cada. Após as duas lavagens as células foram suspensas em 1,0 mL de RPMI. Para utilização, as mesmas foram diluídas 100 vezes em PBS e contadas na Câmara de Neubauer. O volume final foi ajustado para  $1 \times 10^7$  células/mL.



**Figura 19.** Processo de obtenção dos leucócitos a partir do sangue venoso (MARIEB *et al.*, 2014).

As culturas dos leucócitos foram mantidas em banho-maria a 37°C até a realização dos experimentos. O tempo máximo de incubação, a depender do experimento, foi de 24 horas, sendo que para a condução desses experimentos as células foram suplementadas com meio de cultura RPMI.

### 4.3 PADRONIZAÇÕES

#### 4.3.1 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Labsynth) foram escolhidas com base no trabalho de EMAMGHOLIPOUR e colaboradores (2016). 5x10<sup>3</sup> de leucócitos foram adicionados em placas de 96 poços e estimulados com concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 μM, por 1h a 37°C em banho maria (triplicata por poço). O ensaio colorimétrico MTT foi utilizado para conferir a viabilidade (descrito a seguir). Além disso, foi realizado teste de Quimioluminescência dependente de luminol (também descrito a seguir) para as concentrações que apresentaram viabilidade celular dentro dos parâmetros aceitáveis (>70%, conforme normativa ISO 10993-5) a fim de verificar se tais concentrações eram capazes de gerar estresse oxidativo significativo.

#### 4.3.2 Concentração de Resveratrol

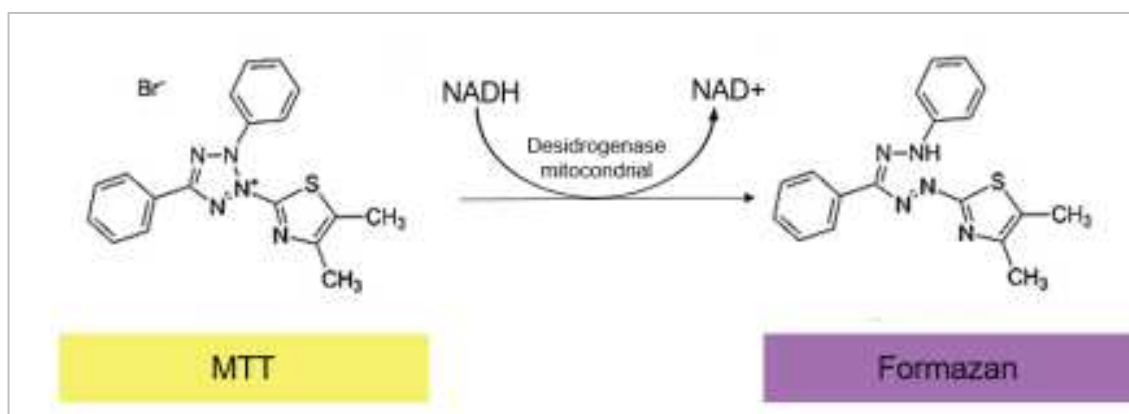
Para o preparo da solução estoque de resveratrol (Sigma Aldrich), o conteúdo do frasco (100mg) foi diluído em 10 mL de DMSO. Essa solução (43.810 μM) foi estocada refrigerada. Para uso, fez-se uma solução com volume de 10 mL, sendo 18μL da solução estoque e 9,982 mL de PBS. Esta solução (80 μM) é filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns, colocada em recipiente estéril e mantida a 4°C.

Os leucócitos (5x10<sup>3</sup>) foram adicionados em placas de 96 poços e estimulados com concentrações crescentes de *trans*-resveratrol (forma mais estável e atualmente disponível no mercado), previamente escolhidas por estudos de JUAN e colaboradores (2005) e POSADINO e colaboradores (2019). As concentrações foram: 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μM (triplicata por poço) e 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 através do ensaio MTT. A concentração escolhida foi a que apresentou um pico de absorbância.

### 4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular frente aos tratamentos foi monitorada pelo ensaio colorimétrico MTT. Esse ensaio consiste em um modelo para avaliar a viabilidade com base em uma reação colorimétrica. A mitocôndria é uma organela de extrema importância neste estudo, pois é a maior fonte de origem de ROS, através da cadeia transportadora de elétrons e pela possível participação de flavoenzimas na liberação de ROS. O MTT, quando incubado com células vivas é metabolizado por enzimas mitocondriais denominadas succinato-desidrogenases,

transformando o composto amarelo em um composto violeta – formazan (**Figura 20**). 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 a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).



**Figura 20.** Reação de redução do MTT (Magalhães *et al.*, 2018).

Para isso, os leucócitos foram adicionados em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço. Foram divididos em quatro grupos, de acordo com os tratamentos descritos na **Tabela 2** (triplicata por poço). O volume final foi ajustado para 200  $\mu\text{L}$  por poço com a adição de meio de cultura RPMI (Sigma Aldrich). Após isso, as células foram incubadas em estufa umidificada a  $37^\circ\text{C}$  por 1 e 24 horas, a fim de verificar se o tempo de tratamento afetava a viabilidade. Transcorrido os tempos, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (Sigma Aldrich) em cada poço e a placa foi novamente incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos, protegida da luz. Por fim, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, homogeneizando para dissolução dos cristais de formazan gerados. A absorbância foi lida a 570 nm no leitor de microplacas e os valores foram expressos em porcentagem de células viáveis, considerando a média do grupo controle como 100%.

**Tabela 2.** Grupos experimentais para avaliação da viabilidade celular frente aos tratamentos.

Grupo	Tratamento
1	Células + RPMI
2	Células + RPMI + Resveratrol (5 $\mu$ M)
3	Células + RPMI + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (150 $\mu$ M)
4	Células + RPMI + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (150 $\mu$ M) + Resveratrol (5 $\mu$ M)

## 4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DE ROS

### 4.5.1 Quantificação por microscopia de fluorescência

Para avaliação da produção de ROS nos leucócitos humanos foi utilizado o Kit Image-iT™LIVE Green (Invitrogen® | I36007), no qual permite a detecção de ROS intracelular por microscopia de fluorescência. A técnica utiliza um marcador fluorogênico não fluorescente (5-ou-6)-carboxi-2',7',diclorodihidro-fluoresceína-diacetato (carboxi H<sub>2</sub>DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas gera a molécula carboxy-DCFH, capaz de reagir com ROS, tornando-se fluorescente.

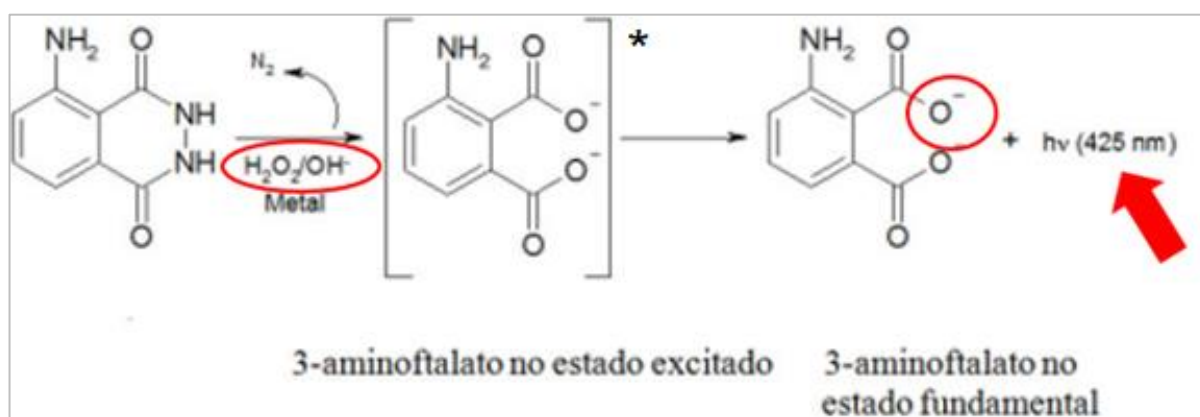
O ensaio seguiu os protocolos do fabricante, com algumas adaptações. Em resumo, 1x10<sup>6</sup> células foram incubadas de acordo com os tratamentos descritos na **Tabela 2** por 1 hora a 37°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 2.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se esse processo. Ao final as células foram ressuspendidas com 500 $\mu$ l do marcador carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA (10 $\mu$ M) e incubadas a 37°C por 30 minutos sob o abrigo de luz. Após esse período, as células foram centrifugadas a 2.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em PBS. Foi realizada uma nova centrifugação e o pellet resultante foi ressuspendido em 100 $\mu$ l de solução fixadora contendo metanol: ácido acético glacial (3:1). As lâminas utilizadas para disposição das células estavam limpas, geladas e com um filme de água em sua superfície. Este protocolo de fixação foi feito de acordo com OLIVEIRA e colaboradores (2021).

Após secas, as lâminas foram coradas com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorato – 2,86  $\mu$ M), um marcador intercalante do DNA e fluorescente, que permite a coloração diferencial do núcleo em relação ao citoplasma. As aquisições das imagens de fluorescência foram realizadas no CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – ICB, UFMG) no

microscópio Apotome.2 Zeiss. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para carboxiH<sub>2</sub>DCFDA e DAPI foram 495<sub>Ex</sub>/529<sub>Em</sub> e 350<sub>Ex</sub>/461<sub>Em</sub> nm, respectivamente. Foram tiradas 20 fotos aleatórias em cada aumento (4x, 40x, 100x e 1000x). A análise quantitativa de ROS a partir das imagens foi realizada de acordo com estudos de LIYANAGE e colaboradores (2020). Para isso, foi utilizado o software ImageJ e a porcentagem da intensidade de fluorescência foi calculada em comparação ao grupo controle. Os resultados foram expressos em porcentagem de fluorescência ± desvio padrão.

#### 4.5.2 Quantificação por quimioluminescência dependente de luminol

Para avaliação quantitativa de ROS, foi utilizado o ensaio de Quimioluminescência dependente de luminol de acordo com SANTOS e colaboradores (2021). Esta técnica baseia-se na reação entre o luminol e as espécies reativas geradas na ausência ou presença das diferentes concentrações das substâncias, individualmente (**Figura 21**). As células produzem uma luminosidade natural definida como quimioluminescência nativa ou natural. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada usando-se reagentes químicos, como por exemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, ao reagirem com as espécies reativas de oxigênio produzidas, passam a emitir a luminescência amplificada.



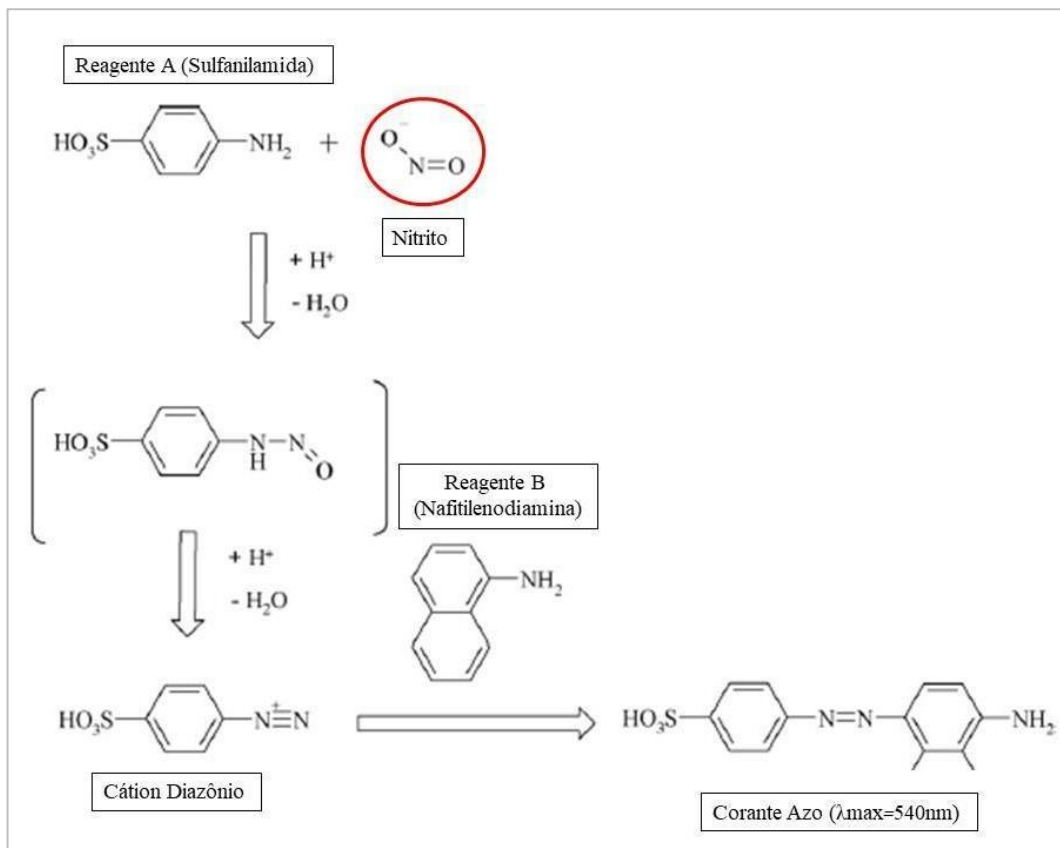
**Figura 21.** Princípio do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol (VASCONCELLOS, 2017).

Para isso, os leucócitos ( $1 \times 10^6$ ) foram previamente incubados com os diferentes tratamentos descritos na **Tabela 2**. Em tubos específicos, foram adicionados 500 $\mu$ L de luminol (Sigma Aldrich |  $10^{-4}$ M) e a leitura foi realizada em corridas de 10 minutos. Importante destacar que foram realizados dois controles sem células (um contendo apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outro contendo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol) com o intuito de conferir se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o resveratrol precisam da maquinaria celular para atuar ou podem reagir inespecificamente entre si e/ou com o Luminol. Os resultados foram expressos em valores de Unidades Relativas de Luz/minuto (RLU/min).

#### 4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A quantificação de produção de NO foi avaliada através da produção de nitrito, segundo reação de GRIESS, 1897 (**Figura 22**) com algumas adaptações. Para isso, os grupos descritos na **Tabela 2** foram incubados em banho-maria a 37°C por 24 horas. Transcorrido esse tempo, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 100µl do sobrenadante foram dispostos em placas de 96 poços e adicionados 100µl de solução de Griess. Essa solução é formada de dois reagentes, na proporção 1:1, a saber: Reagente A (sulfanilamina 1% em 2,5% de ácido fosfórico) e Reagente B (naftilenodiamina 0,1% em 2,5% de ácido fosfórico). O conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear, utilizando uma curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1 mM em meio de cultura RPMI.



**Figura 22.** A reação de Griess originalmente foi relatada por Griess em 1879. Sob condições ácidas, o nitrito reage com o grupo amino do ácido sulfanílico para formar o cátion diazônio, que se acopla à naftilamina para formar o corante azo, lido a 540nm (Adaptado de TSIKAS, 2007).

#### 4.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PEROXINITRITO

O radical peroxinitrito é formado a partir da reação entre peróxido de hidrogênio e o nitrito:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{H}_2\text{O}$ . Sua quantificação foi avaliada de acordo com a técnica de HUGHES & NICKLIN (1968) e seguida com base na metodologia de LARA e colaboradores (2020), a qual mede a absorbância das amostras a partir do comprimento de onda de 302nm, capaz de detectar a presença dessa molécula. Para isso, os grupos descritos na **Tabela 2** foram incubados em banho-maria a 37°C por 24 horas. Transcorrido esse tempo, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ foram adicionados aos pellets das células e agitados em vórtex por 1 minuto. Tal conteúdo foi medido e quantificado em um espectrômetro de placa a 302 nm.

#### 4.8 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

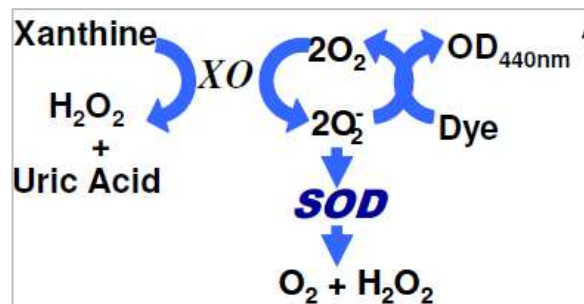
As enzimas SOD, CAT e GPx foram dosadas através de kits específicos. Para isso, os leucócitos ( $1 \times 10^6$ ) foram previamente incubados por 1 hora de acordo com os tratamentos descritos na **Tabela 2**. Após esse período, as células foram centrifugadas a 4.200 rpm por 2 min, o sobrenadante foi 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 1.500 rpm. O sobrenadante foi coletado e deu-se início aos procedimentos descritos nos kits específicos usados para a dosagem das enzimas.

##### 4.8.1 Atividade de SOD

O ensaio SOD da BioAssay Systems (ESOD-100) fornece um meio colorimétrico conveniente para a determinação quantitativa da atividade da enzima SOD em amostras biológicas. No ensaio, o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) é fornecido através de uma reação catalisada pela enzima xantina oxidase (XO). Após isso, o  $\text{O}_2^-$  reage com o corante WST-1 para formar um produto colorido. A SOD sequestra o  $\text{O}_2^-$ , assim menos  $\text{O}_2^-$  fica disponível para a reação cromogênica. A intensidade da cor lida a 440 nm é utilizada para determinar a atividade de SOD na amostra. Foram transferidos 20 µL da amostra em poços de placa de 96 poços. Posteriormente, foi adicionado 160 µL de Reagente de Trabalho (tampão + xantina + corante WST-1) e 20 µL da



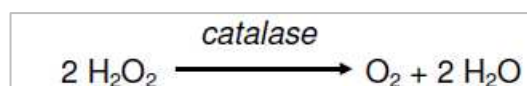
enzima XO diluída (1:20 em diluente) em cada poço. Imediatamente, o conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 440 nm. A placa foi incubada no escuro por 60 min em temperatura ambiente. Após isso, o conteúdo da placa foi novamente analisado no leitor de microplacas. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva de regressão linear.



#### 4.8.2 Atividade de CAT

O ensaio CAT da Bioassay (ECAT-100) melhora as medidas diretas do ensaio da degradação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela CAT, usando um corante redox. A mudança na intensidade da cor a 570 nm é diretamente proporcional à atividade da CAT na amostra.

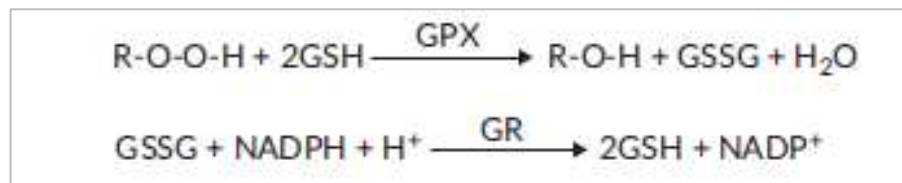
Foram transferidos 10  $\mu\text{L}$  da amostra ou do padrão (controle positivo, contendo CAT) em poços separados da placa de 96 poços. Adicionalmente, para cada corrida do ensaio foi preparado um poço de branco que continha 10  $\mu\text{L}$  do tampão de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  do substrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$  a 50  $\mu\text{M}$ ) em cada um dos poços. A placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de Reagente de detecção (Reagente Corante) por poço das amostras e do controle positivo. A placa foi novamente incubada por 10 min e seu conteúdo foi analisado por leitor de microplacas. Os cálculos também foram realizados através da análise do *slope* da curva de regressão linear.



#### 4.8.3 Atividade de GPx

O ensaio GPx da Cayman (EGPX-100) mede a atividade da enzima de forma indireta por uma reação acoplada com a Glutathiona Redutase (GR). A Glutathiona 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<sup>+</sup> é acompanhada por um aumento na absorbância a 340 nm:



Foram transferidos 20 µL da amostra + 50 µL do tampão de ensaio + 50 µL de Co-substrato + 50 µL de NADPH em cada poço. Foram 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. Após isso, 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 de regressão linear.

#### 4.9 SINALIZAÇÃO CELULAR

As vias de sinalização PKA, AKT/PKB, AMPK, MAPK, SIRT1 e Nrf2 foram analisadas através do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol. A escolha dos inibidores específicos de cada via são:

- PKA: Inibidor H89 (Calbiochem | 1µM) definido por ZHANG e colaboradores (2011);
- PKB/AKT: Akt Inhibitor (Calbiochem | 1µM) definido por URAK e colaboradores (2017);
- AMPK: Inibidor Compound C (Calbiochem | 10 µM) definido por BULDAK e colaboradores (2014);
- MAPK: ip38MAPKinase Inhibitor III (Calbiochem | 10µM) definido por SWEPSON e colaboradores (2016);
- SIRT1: Inibidor Sirtinol (Tocris Bioscience | 10 µM) definido por KOZAKO e colaboradores (2012);
- Nrf2: Inibidor ML385 (Sigma-Aldrich | 10 µM) definido por HITZEL e colaboradores (2018).

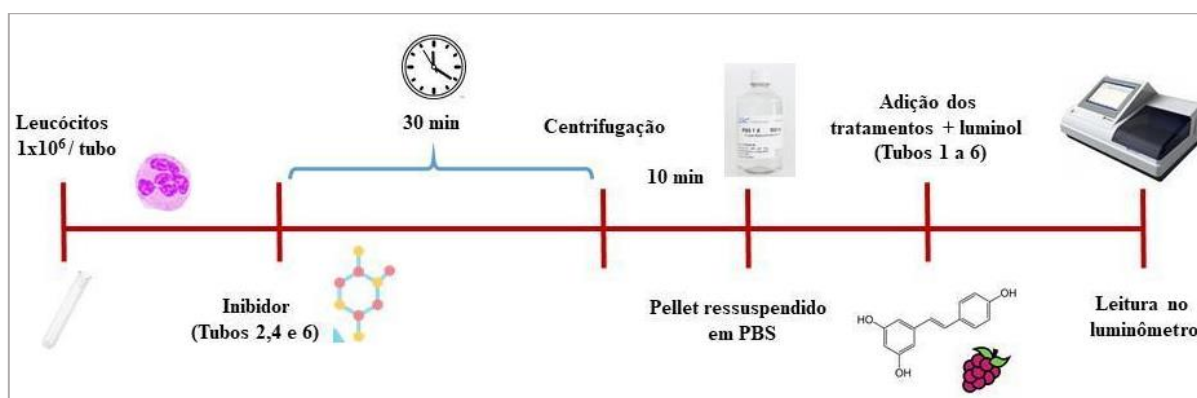
Primeiramente, para avaliar a especificidade dos inibidores em atuar sobre a produção de ROS nas células, foram realizados experimentos de quimioluminescência na ausência dos leucócitos (contendo apenas o respectivo inibidor + 100 µL de PBS e 500µL de luminol 10<sup>-4</sup> M (sempre

considerando o volume final dos tubos = 700 $\mu$ L) a fim de comparar os grupos sem e com os leucócitos.

Após isso, os leucócitos ( $1 \times 10^6$ ) foram previamente incubados por 30 minutos na ausência (grupo controle) e presença dos inibidores, de acordo com a metodologia de CADEIRA e colaboradores (2020). Transcorrido o tempo, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de PBS. Por fim, foram adicionados os tratamentos de acordo com a **Tabela 3**. A leitura foi realizada em corridas de 10 minutos e os resultados foram expressos em valores de Unidades Relativas de Luz/minuto (RLU/min), conforme resumido na **Figura 23**.

**Tabela 3.** Disposição dos grupos experimentais para avaliação das vias de sinalização.

Grupo	Tratamento
1	Células + PBS
2	Células + PBS previamente incubados com inibidor
3	Células + PBS + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
4	Células + PBS + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> previamente incubados com inibidor
5	Células + PBS + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resveratrol
6	Células + PBS + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resveratrol previamente incubados com inibidor



**Figura 23.** Etapas da quimioluminescência para avaliação das vias de sinalização. Elaborada pelo autor.

#### 4.10 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE NRF2

Nesse ensaio é empregado o sistema de gene repórter, que codifica proteínas que são facilmente detectadas, quantificadas e diferenciadas das proteínas endógenas. Para tal, emprega-se um plasmídeo que contém o gene para luciferase e a sequência promotora para o fator de transcrição de interesse, no caso o Nrf2. Dessa forma, a quantidade de enzima expressa, assim como sua atividade, mostra o quão ativo está o promotor. A detecção da expressão enzimática é possível devido à enzima repórter, que catalisa a reação de transferência de energia do ATP para o substrato luciferina, formando oxiluciferina com liberação de ATP, CO<sub>2</sub> e luz. A reação é detectada em luminômetro a 580 nm e a atividade enzimática é medida pela quantidade de luz emitida em RLU (unidade relativa de luz). Portanto, quanto maior a produção de enzimas repórter (maior RLU), maior será a atividade do fator de transcrição (SMALE, 2010).

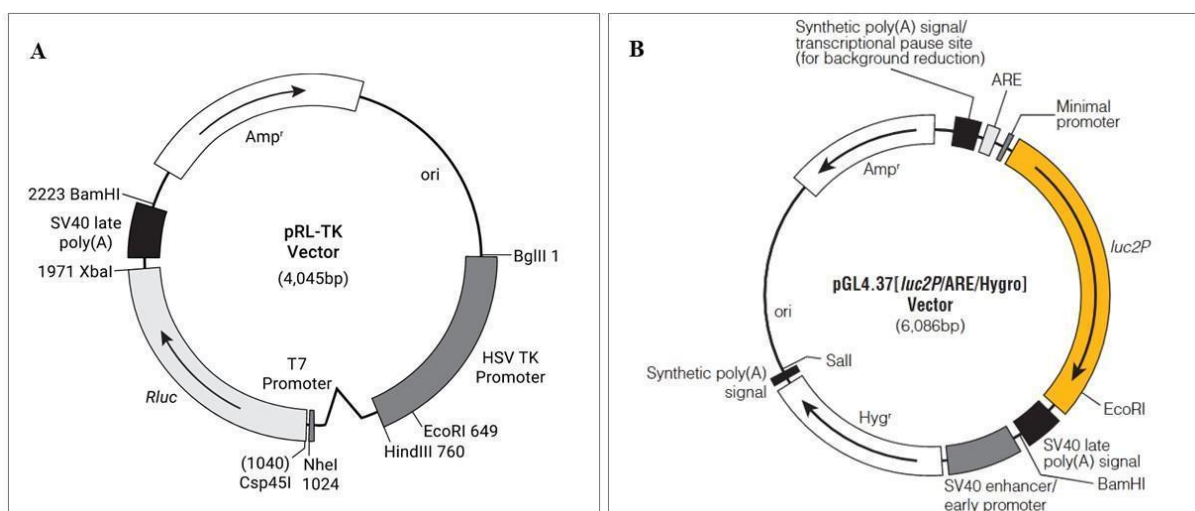
##### 4.10.1 Preparo de bactérias competentes

Bactérias *E. coli* ultracompetentes XL10 gold (*Stratagene*) foram inoculadas em 50 mL de caldo Luria Bertani (LB) *overnight* a 37° C sob agitação de 180 rpm. Após a incubação, 0,5 mL da cultura bacteriana foi adicionado à 50 mL de meio A [caldo LB (10g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura) suplementado com 10 mM de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,2% de glicose] e incubadas sob as mesmas condições até atingirem a fase logarítmica ( $A_{600}=0,4$ ). As células foram mantidas por 10 minutos no gelo e, em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm a 4°C. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 0,5 mL de meio A gelado e acrescentou-se 2,5 mL de meio B [caldo LB suplementado com 36% glicerina, 12% PEG, 12 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (esterilizado por filtração)]. As células foram aliquotadas e armazenadas a -80°C (NISHIMURA *et al.*, 1990).

##### 4.10.2 Transformação bacteriana por choque térmico

Uma alíquota contendo 100 µL de bactéria competente foi descongelada e foram adicionados 500 ng de 2 plasmídeos. Suas estruturas são mostradas na **Figura 24**. O plasmídeo pRL-TK consiste em um plasmídeo constitutivo (também chamado de normalizador), pois não se liga a nenhum fator de transcrição. O segundo plasmídeo, pGL4.37, consiste no plasmídeo de ligação ao fator de transcrição escolhido, sendo expresso apenas quando o Nrf2 é ativado.

O microtubo foi incubado por 10 minutos no gelo e, imediatamente, foi colocado a 42°C por 45 segundos e novamente no gelo por 2 minutos. A diferença de temperatura induz a formação de poros na membrana plasmática da bactéria permitindo a entrada do plasmídeo na célula. A seguir, foram adicionados 900 µL de meio LB e incubou-se a 37°C sob agitação de 180 rpm por 60 minutos. Após este período, 100 µL da suspensão bacteriana foram semeadas em uma placa de petri contendo meio LB ágar com adição de 100 µg/mL de ampicilina para seleção das bactérias transformadas (CALVETE *et al.*, 2015).



**Figura 24.** Plasmídeos constitutivo pRL-TK (A) e da luciferase pGL4.37 (B). Disponível em: <https://www.promega.com.br/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?catNum=E2231>. Acesso em 21 de setembro de 2023.

#### 4.10.3 Purificação plasmidial

Para purificação plasmidial, foi selecionada uma colônia de bactéria da placa de petri contendo o meio com antibiótico. A colônia foi inoculada em 50 mL de meio caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina *overnight*.

A extração foi realizada utilizando o kit *PureYield Plasmid DNA Purification System* (Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit permite a purificação plasmidial com remoção de endotoxinas, sendo ideal para o uso em transfecções celulares. Para isso, a cultura bacteriana foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm, o pellet foi ressuspenso em 3 mL da solução de ressuspenso celular. Logo após, foram adicionados 3 mL de solução de lise celular, invertendo suavemente por 5 vezes o tubo, seguido de incubação por 3 minutos. Sobre o lisado celular foi acrescido 3 mL de solução de neutralização. A solução foi filtrada

com a *Clearing Column* acoplada a um tubo de 50 mL, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 3.000 rpm. Logo após, o filtrado foi colocado na *Binding Column* acoplada a um tubo de 50 mL e novamente centrifugado. Foram adicionados 5 mL de solução de lavagem para remoção de endotoxinas e novamente centrifugado. Adicionou-se 20 mL de solução de lavagem na coluna e novamente a coluna foi centrifugada. Para eluição do DNA plasmidial a coluna foi acoplada a um novo tubo e adicionou-se 600 µL de água livre de nucleases. As alíquotas foram armazenadas a -80°C.

#### 4.10.4 Transfecção dos leucócitos e tratamentos

A transfecção celular foi realizada utilizando o kit de Lipofectamine 3.000 (Invitrogen®) seguindo o protocolo do fabricante. Esse kit proporciona uma eficiência de 70% através do uso de nanopartículas lipídicas para a entrega do DNA plasmidial. Foi preparada uma placa de 24 poços ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) contendo os leucócitos em meio OptiMEM (Gibco). Para cada reação foi diluído 0,75 µL do reagente Lipofectamine 3.000 em 25 µL de meio OptiMEM. Em outro microtubo foi adicionado 1 µL de reagente P300, 500 ng de DNA e 25 µL de meio OptiMEM. O conteúdo do primeiro tubo foi acrescentado ao segundo e incubou-se a mistura por 15 minutos. O conteúdo de cada reação foi adicionado aos poços contendo as células e incubado por 24 horas. Após esse tempo, o meio contendo os reagentes de transfecção foi descartado e foram acrescentados os tratamentos de acordo com a **Tabela 2**. Inicialmente, foi realizado um ensaio piloto para determinar se o tempo de tratamento afetaria a expressão de Nrf2. Os tempos escolhidos foram 30 min, 90 min e 12h. Como não houve diferença entre os tempos (dados mostrados na seção resultados) os demais experimentos foram realizados com um tempo de tratamento de 90 minutos.

#### 4.10.5 Ensaio de Dual-Luciferase

O ensaio de luciferase foi realizado utilizando o kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega®) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit permite a dosagem de duas enzimas, luciferase do vagalume e de *Renilla sp.* a partir de uma única amostra. Neste ensaio foi avaliada a atividade do fator de transcrição Nrf-2.

O meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS. Foram adicionados a cada poço 100 µL de solução de lise e a placa permaneceu sob agitação por 15 minutos. O luminômetro

(*Sirius – Titertek Berthold*) foi programado para um atraso de leitura de 2 segundos, seguido de duas leituras de 10 segundos. A cada tubo foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de lisado celular e 100  $\mu\text{L}$  da solução LARII, que fornece o substrato para a enzima luciferase do vagalume (luciferina), após a primeira leitura adicionou-se o reagente *StopGlo*, que inativa a enzima da luciferase do vagalume e fornece o substrato da enzima luciferase de *Renilla sp.* Para normalização dos resultados, os valores obtidos na primeira leitura foram divididos pelo resultado da segunda leitura. Os resultados foram expressos em Unidades relativas de Luciferase (URL).

#### 4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NRF2

Para a avaliação qualitativa da proteína Nrf2 foi realizado o ensaio de ELISA. O ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica de imunensaio usada para detectar e quantificar a presença de um antígeno ou anticorpo em uma amostra biológica. Basicamente, essa técnica utiliza um anticorpo específico (no caso Nrf2 Polyclonal Antibody e Phospho-Nrf2) para o antígeno de interesse (Nrf2 e p-Nrf2) que é fixado em uma superfície sólida. Em seguida, um segundo anticorpo, conhecido como anticorpo secundário que é conjugado a uma enzima é adicionado (Goat anti-Rabbit IgG). Esse anticorpo reconhece e se liga ao antígeno ou anticorpo presente na amostra e, como a enzima está ligada ao anticorpo secundário, a detecção utilizada para quantificar a quantidade de antígeno ou anticorpo presente na amostra é feita por identificação do produto enzimático na espectrofotometria (Sakamoto *et al.*, 2018).

Inicialmente  $1 \times 10^6$  de leucócitos foram incubados com os respectivos tratamentos da **Tabela 2** em banho-maria por 24h à 37°C. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 2.200 rpm por 10 min à 4°C, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de tampão de lise gelado (Tris HCl 1M pH 7,6; EDTA 5 M; Nonidet P-40; DTT 100 mM; Coquetel inibidor de protease (Sigma); inibidor de fosfatase (Sigma) NaCl 0,9%, SDS 10% e água Milli-Q). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas e sonicadas por 5 ciclos de 30 segundos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min à 4°C. O sobrenadante foi usado para dosagem de proteínas através do espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Após preparadas todas as amostras, procedeu-se o experimento.

No primeiro dia, a placa de 96 poços foi sensibilizada com a adição de 5  $\mu\text{g}$  de solução proteica usando *Coating Buffer* (100 $\mu\text{L}$ /poço – pH 9,6 formado por solução de 2,65g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 400 mL e 4,2g de  $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 800 mL) *overnight* a 4°C. No dia seguinte, lavou-

se os poços 3x com *Wash buffer* (PBS + Tween 0,01%), adicionou-se o tampão de bloqueio (leite em pó – Molico ® 3%) e deixou por 1 hora em estufa a 37°C. Após repetir as lavagens com PBS, foram colocados os anticorpos diluídos em tampão de incubação (formado por 1mL de tampão de bloqueio + 29mL PBS + 14,5 µL de Tween 20) e deixou-se por 1h em estufa a 37°C. A concentração dos anticorpos foram:

- Anti-β-Actin Antibody, clone 6L12, ZooMAb® Rabbit Monoclonal (Sigma Aldrich) 1:1.000 como anticorpo primário constitutivo;
- Nrf2 Polyclonal Antibody (Thermo Fisher) 1:500 como anticorpo primário para marcação de Nrf2 total;
- Phospho-Nrf2 (Ser40) Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (Thermo Fisher) 1:1.000 como anticorpo primário para marcação da proteína fosforilada;
- Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher) 1:10.000 como anticorpo secundário.

Trancorrido esse tempo, procedeu-se novamente a lavagem 3x com PBS e adicionou-se 100µL/poço da solução OPD (formada por 10mL de tampão citrato + 2mg de OPD + 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, solução preparada no escuro). Após 30 min, foram adicionados 25µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para parar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

#### 4.12 ANÁLISE DE CITOCINAS

Os leucócitos foram inicialmente incubados em banho-maria a 37°C por 24 horas na concentração de  $1 \times 10^6$ , seguindo os respectivos tratamentos. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante coletado para a análise das citocinas, que também foram dosadas por ELISA, desta vez utilizando kits comerciais. Os procedimentos foram seguidos de acordo com as orientações dos fabricantes. As amostras foram lidas a 450nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

Os kits utilizados foram:

- Human TNF Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences | ADI 901-099 (citocina pró-inflamatória);



- Human IL-6 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences | ADI 900-033 (citocina pró-inflamatória);
- Human IL-10 Uncoated ELISA- ENZO Life Sciences | ADI 900-036 (citocina anti-inflamatória).

Além dos quatro tratamentos convencionais neste estudo (Controle, resveratrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+resveratrol), também foi avaliada a influência do inibidor da via Nrf2 (ML385 - 10 µM) sobre a produção dessas três citocinas dos leucócitos dos três grupos etários. Portanto, o total de amostras para a dosagem das citocinas são descritos na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Disposição dos grupos experimentais para avaliação das vias de sinalização da via Nrf2 sobre as citocinas TNF, IL-6 e IL-10.

Grupo	Tratamento
1	Células + RPMI
2	Células + RPMI + <b>ML385</b>
3	Células + RPMI + resveratrol
4	Células + RPMI + resveratrol + <b>ML385</b>
5	Células + RPMI + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
6	Células + RPMI + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + <b>ML385</b>
7	Células + RPMI + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + resveratrol
8	Células + RPMI + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + resveratrol + <b>ML385</b>

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados pelo *software GraphPad Prism 8.0*. Foram realizados o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e a análise de variância univariada (ANOVA one-way) seguida pelo teste de Dunnett ou Bonferroni, quando as amostras apresentavam distribuição normal, e o teste de Dunns quando não seguiam a distribuição normal. Diferenças foram consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$ .

Para a análise de correlação entre a idade e os parâmetros bioquímicos estudados procedeu-se a correlação de Pearson. Este tipo de correlação é uma das mais aplicadas nesse tipo de estudo

e foi escolhida com base no trabalho de UCHIDA e colaboradores (2020). O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. É um índice adimensional com valores situados entre -1,0 e 1,0 inclusive, que reflete a intensidade de uma relação linear entre dois conjuntos de dados. Sendo:

- $r = 1$  Significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis;
- $r = 0$  Significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra;
- $r = -1$  Significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis - Isto é, se uma aumenta, a outra sempre diminui.

## RESULTADOS

---

---

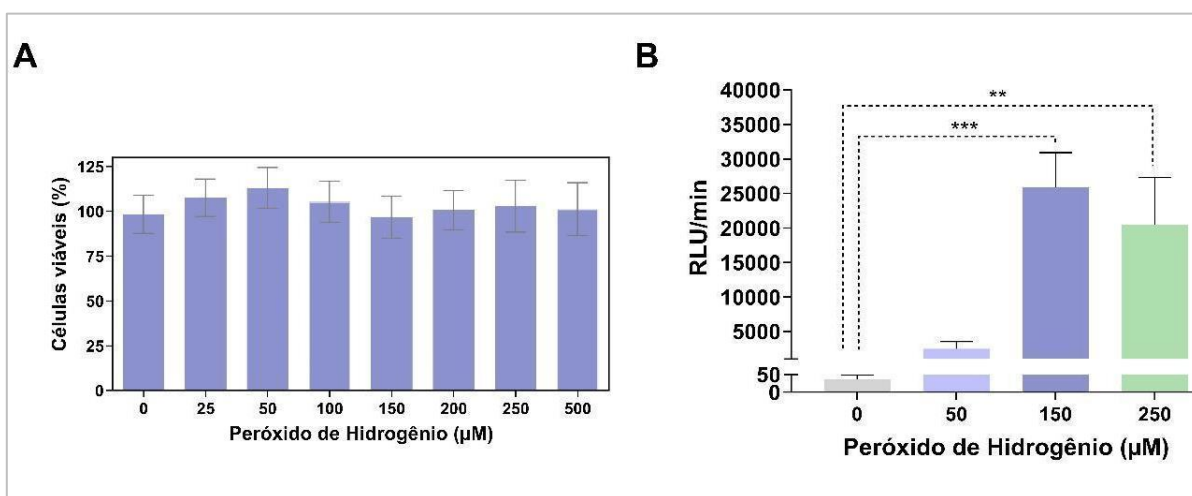
*Parte I: Padronizações*

---

## 5. RESULTADOS

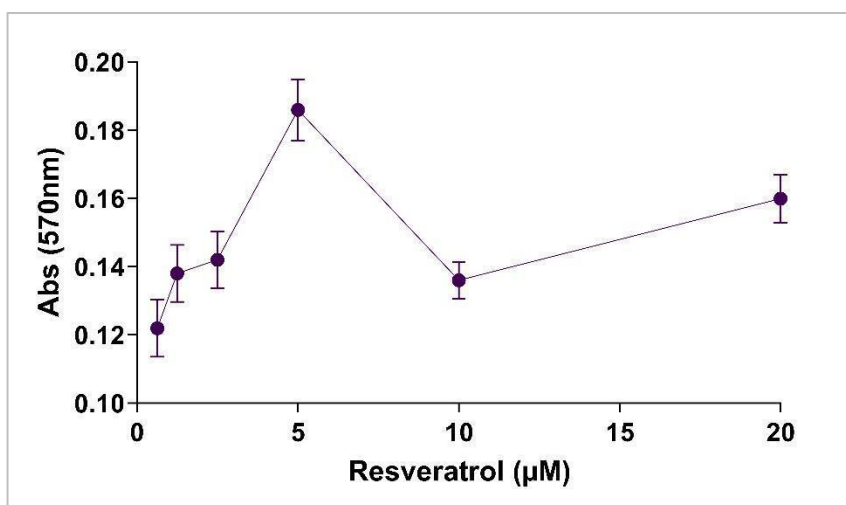
A primeira etapa do estudo foi estabelecer se as concentrações de  $H_2O_2$  e resveratrol eram capazes de promover a indução de um ambiente oxidativo e o máximo de seu potencial efeito antioxidante, respectivamente.

Em relação à concentração de  $H_2O_2$ , observa-se na **Figura 25A** que os leucócitos permaneceram viáveis em todas as concentrações utilizadas (0-500  $\mu M$ ). Após isso, avaliamos se havia diferença na produção de ROS em diferentes concentrações pelo ensaio de quimioluminescência. Como nenhuma concentração afetou a viabilidade celular, as concentrações de 50  $\mu M$ , 150  $\mu M$  e 250  $\mu M$  foram escolhidas para o ensaio. É possível observar na **Figura 25B** que as concentrações de 150  $\mu M$  e 250  $\mu M$  induziram um aumento na produção de ROS de forma significativa em relação ao controle (0uM). Como não foram observados diferenças significativas entre as concentrações de 150  $\mu M$  vs 250  $\mu M$ , optamos pela concentração de 150uM para a realização de todos os demais ensaios deste estudo.



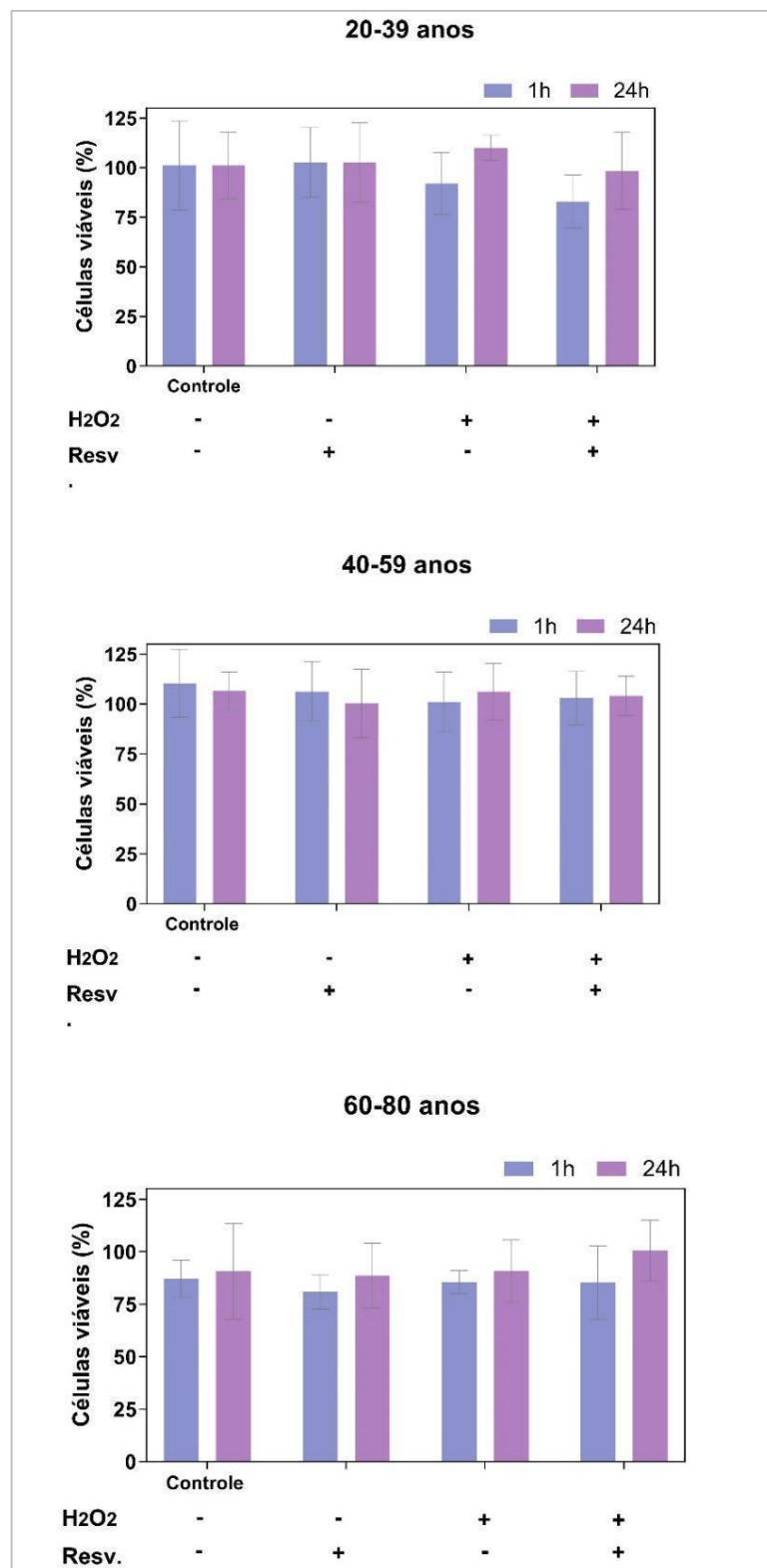
**Figura 25.** Padronização da concentração de  $H_2O_2$ . (A) Viabilidade celular de leucócitos humanos estimulados com diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Os leucócitos foram estimulados com concentrações crescentes de  $H_2O_2$  por 1 hora (0  $\mu M$ , 25  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 150  $\mu M$ , 200  $\mu M$ , 250  $\mu M$  e 500  $\mu M$ ) e a viabilidade dos mesmos foi realizada através do ensaio colorimétrico de MTT. De acordo com a ISO 10993-5, 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  $H_2O_2$  através do ensaio de quimioluminescência. A geração de ROS foi expressa em RLU/min na média de 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).

Já a concentração de resveratrol foi definida de acordo com a Curva de Dose-Concentração obtida na **Figura 26**. Entre as concentrações testadas, 5 $\mu$ M apresentou maior capacidade de metabolização do MTT, com pico de absorbância. 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 todos os demais ensaios deste estudo.



**Figura 26.** Curva Dose-Concentração de resveratrol em leucócitos humanos. Os leucócitos foram estimulados por concentrações crescentes de resveratrol (0,63  $\mu$ M; 1,25  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M) e a absorbância 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  $\mu$ M, a qual apresentou um pico de absorbância e corresponde a dosagem fisiológica. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração (n = 8).

O ensaio de MTT também foi usado para avaliar a viabilidade dos leucócitos frente aos diferentes tratamentos. Vale ressaltar que o ensaio foi realizado com os tempos de 1h e 24h, pois são estes os tempos de tratamento dos diferentes experimentos do nosso estudo. Em geral, a **Figura 27** mostra que nenhum tratamento afetou a viabilidade celular. Os leucócitos permaneceram com valores de viabilidade acima de 75% para todos os grupos avaliados. 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. Portanto, as condições de tratamento estão de acordo com os padrões internacionais para estudo (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).



**Figura 27.** Viabilidade dos leucócitos isolados de diferentes faixas etárias através do ensaio de MTT. Os leucócitos ( $5 \times 10^3$ /poço) foram adicionados em placas de 96 poços e incubados por 1h ou 24h com resveratrol ( $5 \mu\text{M}$ ) e/ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $150 \mu\text{M}$ ). 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.

*Parte II: O resveratrol tem seu efeito antioxidante diminuído no envelhecimento*

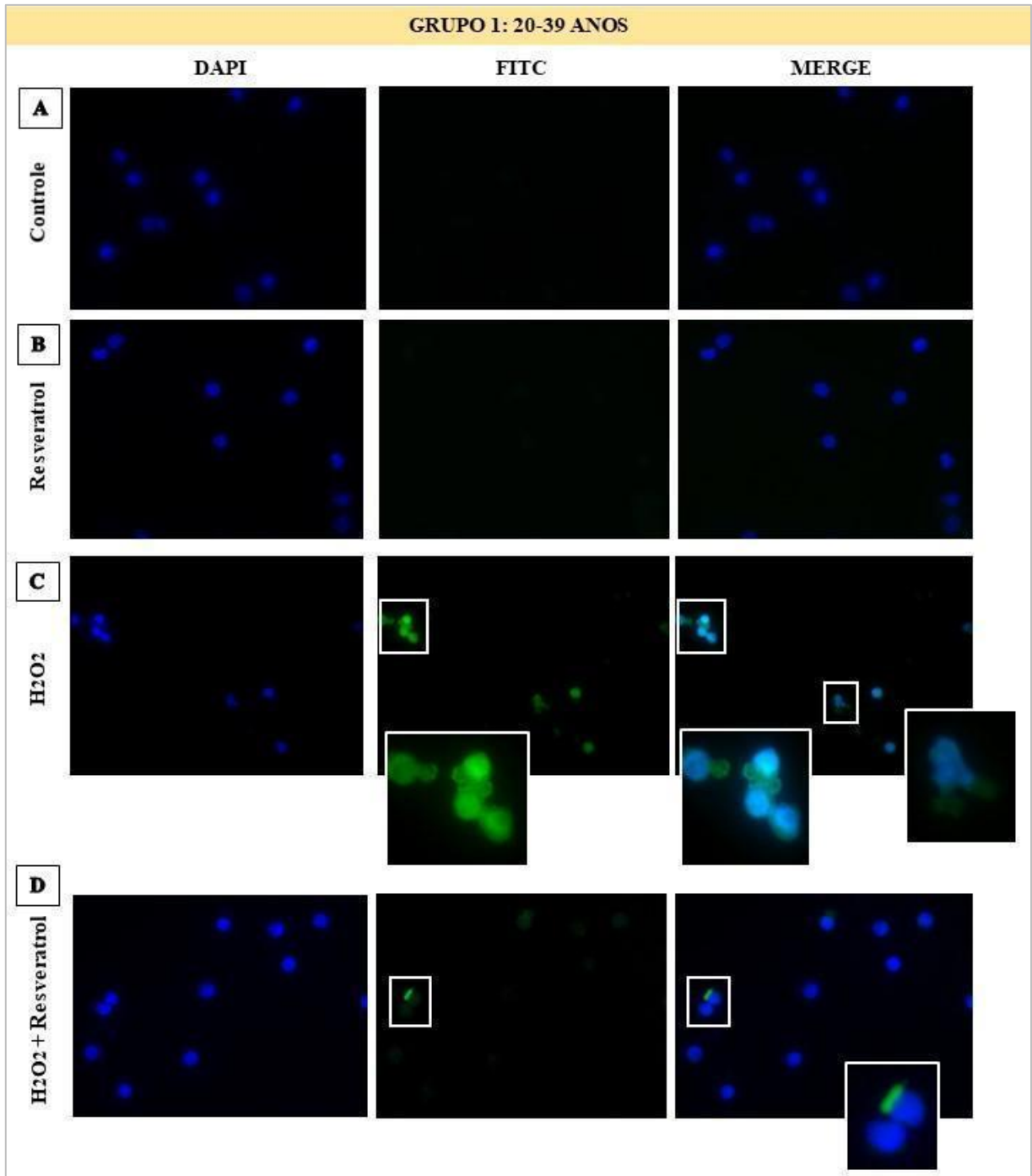
---



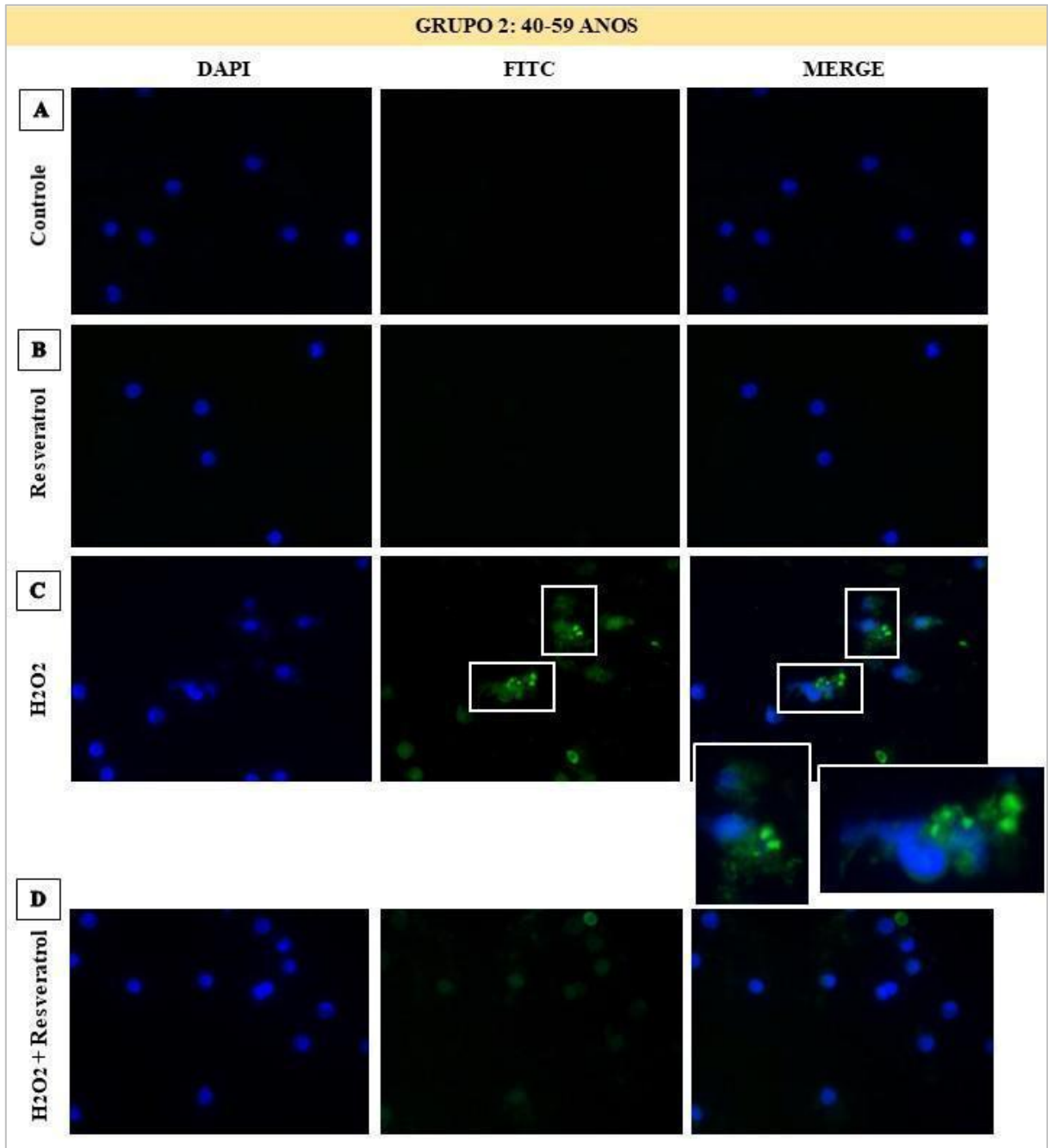
Após a definição das concentrações de  $H_2O_2$  e de resveratrol e comprovada a viabilidade celular, foi realizado ensaio de fluorescência com a sonda Carboxi- H2DCFDA em leucócitos de indivíduos das três faixas etárias para quantificar e visualizar a produção de ROS de acordo com os tratamentos. Analisando as **Figuras 28, 29 e 30** é possível observar os núcleos marcados em azul e as espécies reativas em verde. Nota-se que no grupo controle da faixa etária acima dos 60 anos é possível observar marcações de ROS, um indicativo que o próprio processo de envelhecimento leva ao aumento na produção dessas espécies. De forma geral, observa-se nas três figuras esquemáticas que o estímulo com  $H_2O_2$  aumenta a presença de marcação para ROS (**painéis C**) enquanto que os leucócitos estimulados com  $H_2O_2$ , mas tratados com resveratrol tem uma diminuição na marcação pela sonda (**painéis D**) quando comparados ao estímulo com  $H_2O_2$ .

A quantificação das imagens, mostrada nos gráficos da **Figura 31**, comprova o observado nas imagens representativas. Em todos os três grupos etários observa-se um aumento significativo de ROS nos leucócitos estimulados com  $H_2O_2$  vs Controle e uma diminuição de ROS nos leucócitos  $H_2O_2$  + Resveratrol vs  $H_2O_2$ .

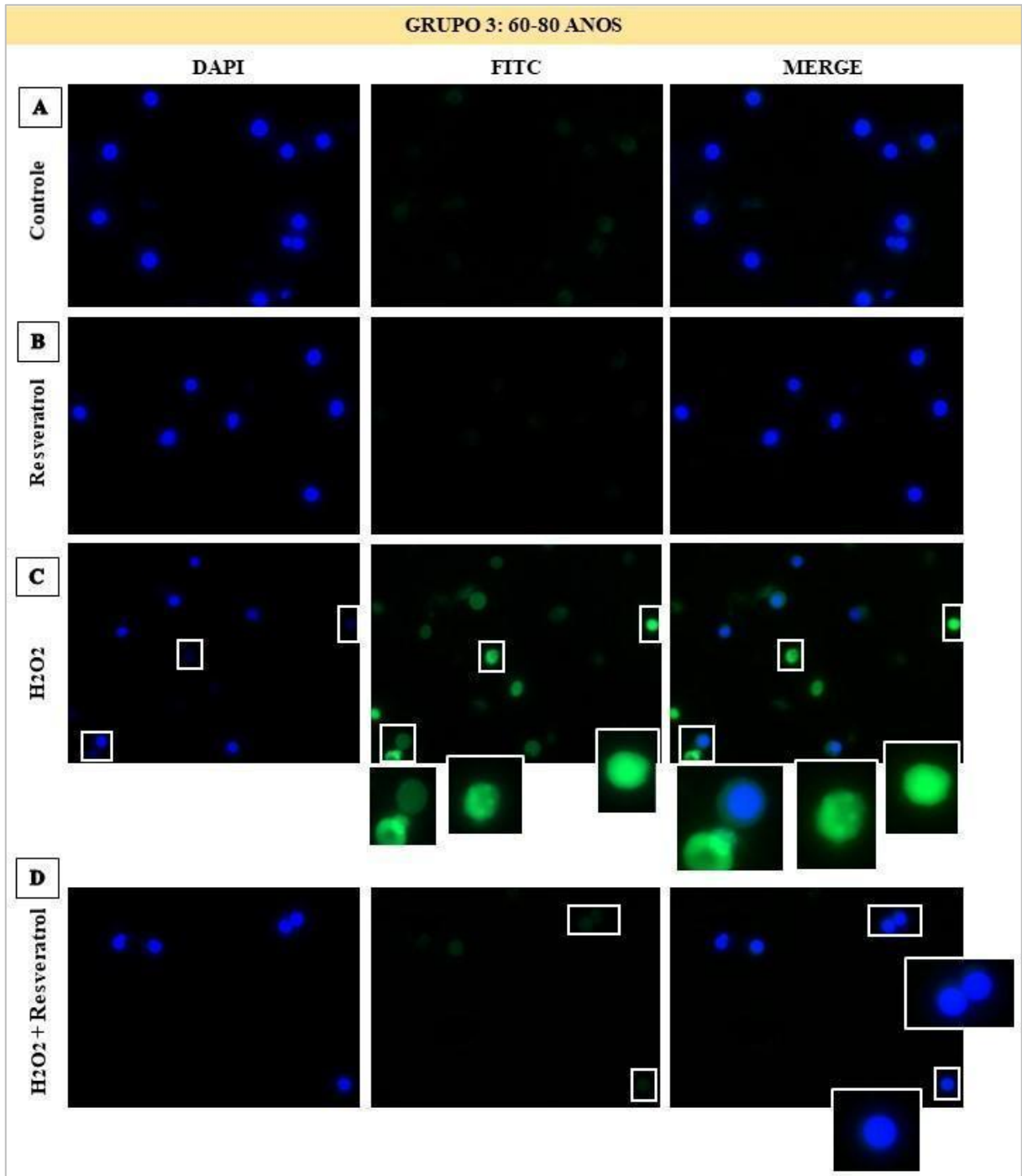
A correlação de Pearson apresentada na **Tabela 5** comprova que o envelhecimento aumenta a produção de ROS já a nível basal, bem como o  $H_2O_2$  aumenta a capacidade oxidativa das células de doadores com o passar da idade. Já o tratamento com resveratrol em leucócitos estimulados com  $H_2O_2$  se mostra menos eficaz com o passar da idade dos doadores. Conclusões essas obtidas a partir dos valores de r positivos e de um  $p < 0,05$ . Ou seja, quanto maior a idade do doador, maior foi a marcação para ROS pela técnica de fluorescência.



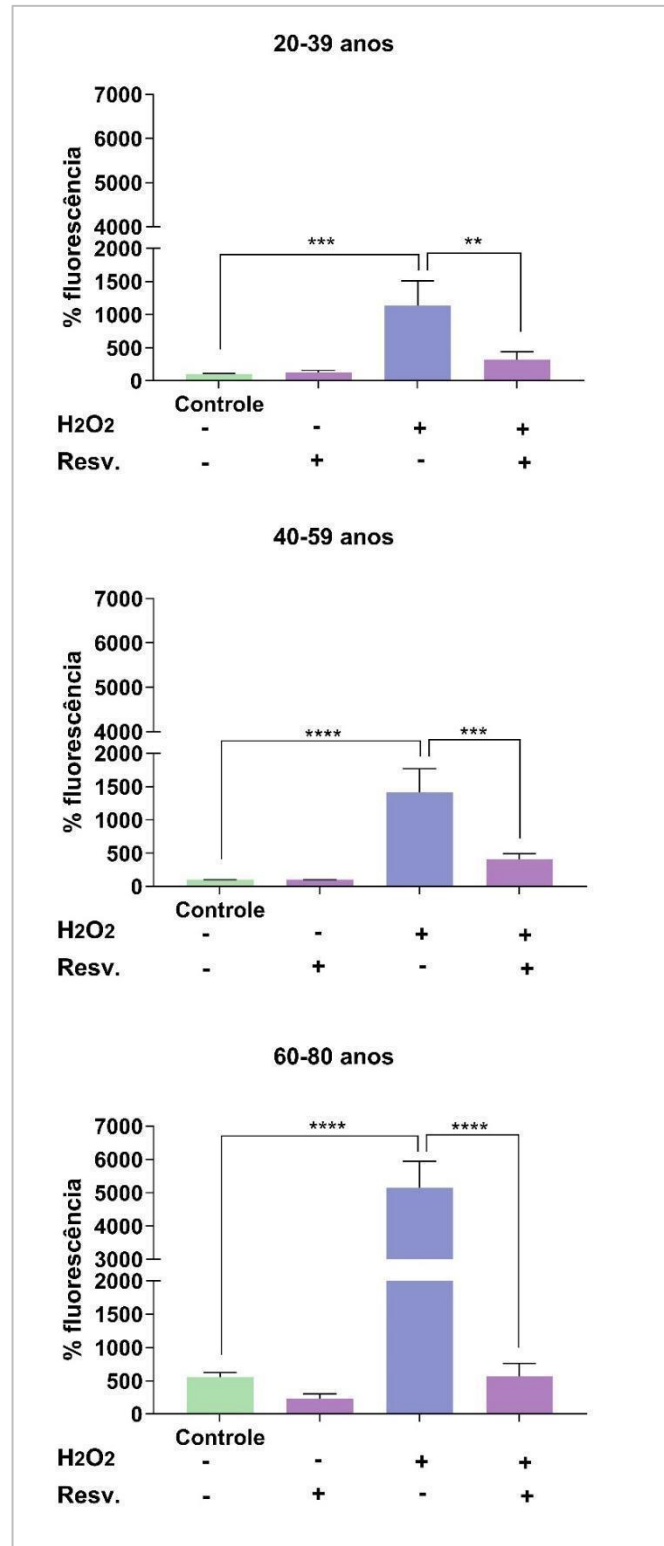
**Figura 28.** Representação qualitativa da produção de ROS em leucócitos humanos da faixa etária dos 20-39 anos. Sendo (A) Controle, (B) Resveratrol, (C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e (D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. As amostras foram marcadas com a sonda Carboxi- H<sub>2</sub>DCFDA e visualizadas através de Microscopia de Fluorescência (n=5).



**Figura 29.** Representação qualitativa da produção de ROS em leucócitos humanos da faixa etária dos 40-59 anos. Sendo (A) Controle, (B) Resveratrol, (C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e (D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. As amostras foram marcadas com a sonda Carboxi- H<sub>2</sub>DCFDA e visualizadas através de Microscopia de Fluorescência (n=5).



**Figura 30.** Representação qualitativa da produção de ROS em leucócitos humanos da faixa etária dos 60-80 anos. Sendo (A) Controle, (B) Resveratrol, (C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e (D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. As amostras foram marcadas com a sonda Carboxi- H<sub>2</sub>DCFDA e visualizadas através de Microscopia de Fluorescência (n=5).



**Figura 31.** Avaliação do efeito do antioxidante do resveratrol em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias por análise fluorescente. A geração de ROS foi expressa em porcentagem de fluorescência utilizando a sonda iT<sup>TM</sup>LIVE Green. Sendo \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ). Os resultados foram significativos através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett ( $n=5$ /grupo).

**Tabela 5.** Médias e correlação de Pearson (r) entre tratamentos e idade por meio da análise de ROS via sonda iT<sup>TM</sup>LIVE Green.

Tratamento	Média ± DP			Valor de r	Valor de p
	20-39 anos	40-59 anos	60-80 anos		
Controle	103,3 ± 3,33	101,02 ± 1,93	557,3 ± 37,9	0,6813	*0,043
Resv.	123,3 ± 18,56	101,3 ± 1,33	232,8 ± 38,75	0,5434	0,131
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.134 ± 218,9	1.419 ± 201,7	5.144 ± 465,06	0,6781	*0,045
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	322,2 ± 68,69	411,4 ± 48,04	566,6 ± 114,05	0,7457	*0,021

A correlação de Pearson (r) foi realizada a partir da comparação entre a idade do paciente em que foram obtidos os leucócitos (expressa em anos) e o valor quantificado da espécie reativa de oxigênio (em porcentagem, assumindo o controle sem células como 100%) em determinado tratamento. Sendo \*p<0,05 e n=15/tratamento.

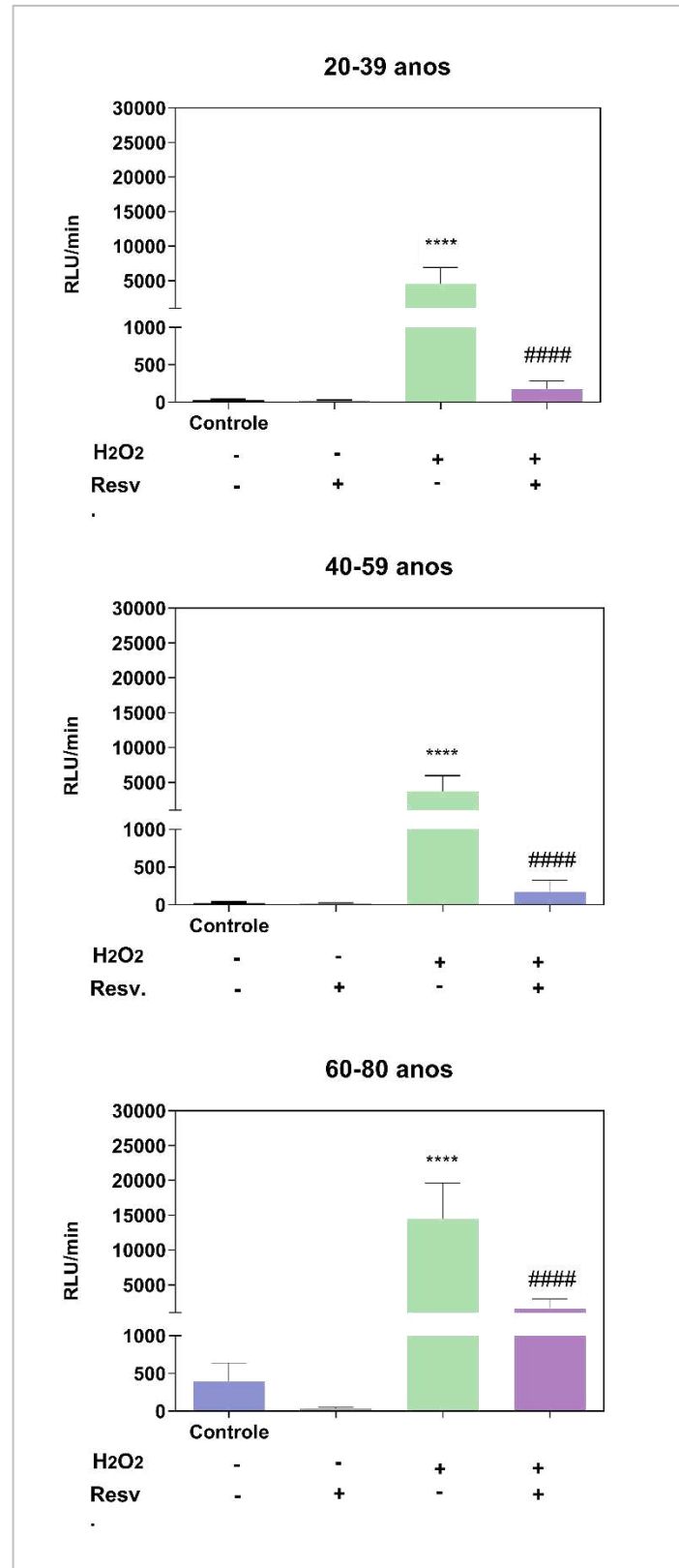
Uma outra técnica para comprovar a capacidade antioxidante do resveratrol foi realizada através do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol. O primeiro passo foi avaliar se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o resveratrol necessitam da célula para reagir ou se essa reação ocorre de forma inespecífica. Os resultados obtidos na **Tabela 6** mostram que houve diferença estatística na produção de ROS comparando os controles sem e com células tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e resveratrol. Ou seja, mecanismos celulares são necessários para promover sua atividade, uma vez que os valores obtidos na quimioluminescência estão abaixo dos valores obtidos quando se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e resveratrol em leucócitos.

Analisando a produção de ROS nos leucócitos pela **Figura 32**, observa-se que em ambos os grupos houve um aumento significativo na produção de ROS nas células expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação ao grupo controle, mas eles apresentaram perfis diferentes quanto à produção dessas espécies reativas. A produção de ROS aumentou com o passar da idade dos grupos (dados confirmados a seguir pela correlação de Pearson). Outro aspecto observado refere-se à capacidade do resveratrol de reduzir significativamente a produção de ROS em ambas as faixas etárias, sobretudo na de 20-39 e 40-59 anos.

**Tabela 6.** Controles sem células e com células no Ensaio de quimioluminescência.

Tratamento	RLU/min (média ±DP)			
	Sem célula	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	58,54 ± 5,78			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	14,34 ± 2,21			
Controle		24,7 ± 4,01	24,5 ± 2,09	392,1 ± 78,71
Resv		21,7 ± 2,33	22,5 ± 1,22	35,4 ± 4,69
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		4572 ± 739,71****	3719 ± 709,9****	14508 ± 1628****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv		177,4 ± 34,86####	169,9 ± 49,01####	1640 ± 422,5####

Sendo \*\*\*\* diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150µM) sem célula e #### diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150µM) + Resv (5µM) sem célula através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA two-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo). Os controles sem células foram realizados em quintuplicata.



**Figura 32.** Avaliação do efeito do resveratrol na produção de ROS em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A geração de ROS foi expressa em RLU/min em leitura média de 10 minutos. Sendo \*\*\*\*(p < 0,0001) comparado ao grupo controle e ####(p < 0,0001) comparado ao grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150µM). Os resultados foram significativos através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo).



Para confirmar se o envelhecimento altera a capacidade antioxidante do resveratrol, foi realizada a análise de correlação de Pearson entre a idade e os níveis de ROS apresentados no ensaio de quimioluminescência submetido aos diferentes tratamentos. A **Tabela 7** mostra que uma correlação positiva e estatisticamente significativa foi observada entre a idade e todas as condições de tratamento. Ou seja, quanto maior a idade do doador, maiores foram os resultados de RLU/min (maior produção de ROS). Houve aumento dos níveis basais de ROS e também na indução de um ambiente oxidativo com o aumento da idade. Além disso, a ação antioxidante do resveratrol foi mais pronunciada em indivíduos mais jovens.

**Tabela 7.** Correlação de Pearson (r) entre tratamentos e idade por meio do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol.

Tratamento	Valor de r	Valor de p
Controle	0,6089	***<0,001
Resv.	0,4537	*0,012
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5869	***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	0,5987	***<0,001

A correlação de Pearson (r) foi realizada a partir da comparação entre a idade do paciente em que foram obtidos os leucócitos (expressa em anos) e o valor quantificado da espécie reativa de oxigênio em determinado tratamento. Sendo \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001.

Com o objetivo de avaliar também a produção das espécies reativas de nitrogênio foram quantificadas as moléculas de NO e ONOO-, importantes componentes do estresse oxidativo e consequentemente marcadores do envelhecimento juntamente com as espécies reativas de oxigênio. Os resultados obtidos na **Tabela 8** e na **Figura 33** mostram um perfil similar entre as duas moléculas. Houve um aumento significativo na produção de NO nos leucócitos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol quando comparado ao grupo tratado apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas três faixas-etárias. Simultaneamente, houve um aumento significativo na produção de ONOO- em todas as três faixas etárias dos leucócitos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs Controle. Nossa hipótese é de que como os valores basais aumentam com a idade (dados confirmados a seguir pela correlação de Pearson), a capacidade de indução de um aumento de estresse oxidativo não ocorre de forma tão eficiente. Já o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol foi capaz de diminuir os níveis desse radical livre em todas as faixas etárias quando comparado ao grupo tratado apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

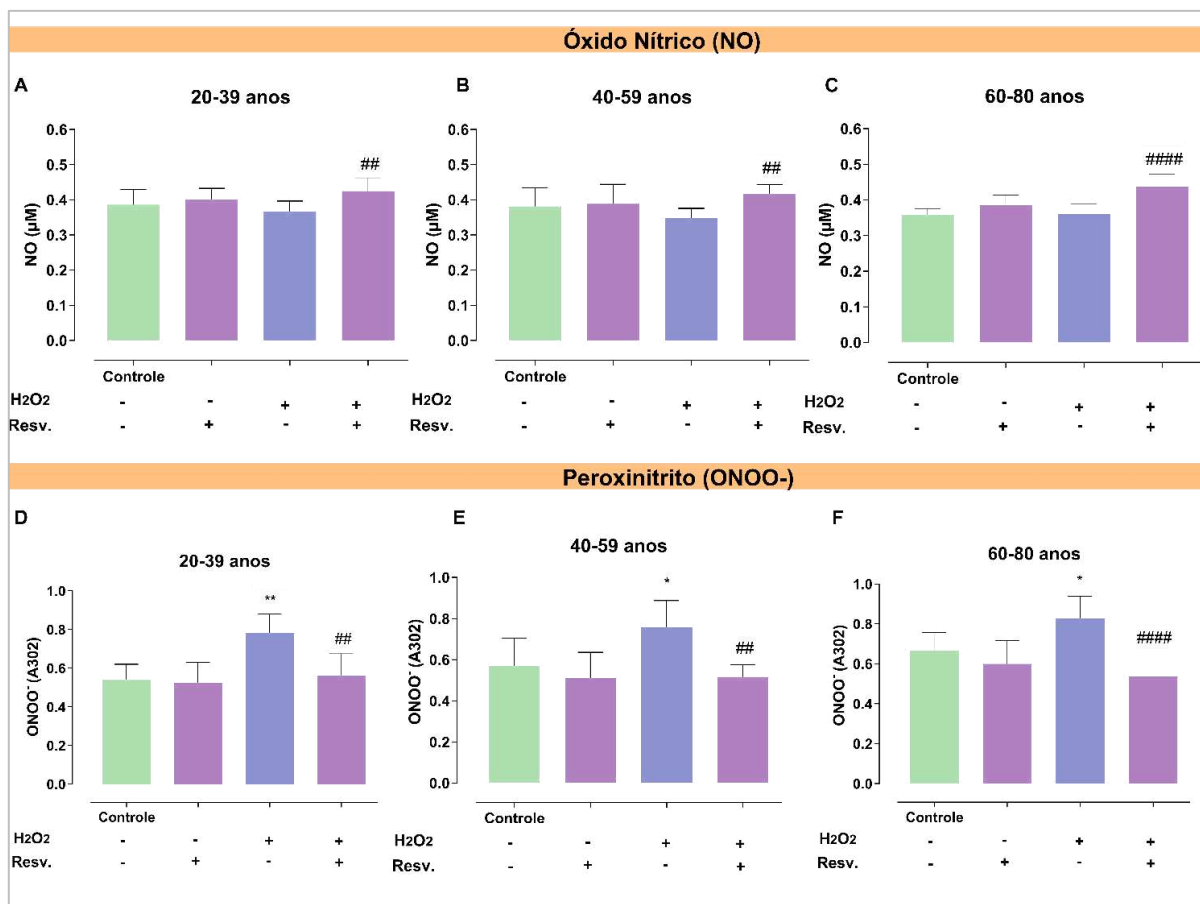
**Tabela 8.** Avaliação da produção de NO e ONOO<sup>-</sup> em leucócitos de diferentes faixas-etárias submetidos ao tratamento com resveratrol.

Tratamento	NO $\mu\text{M}$ (média $\pm$ DP)		
	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
Controle	0,386 $\pm$ 0,0136	0,3815 $\pm$ 0,0167	0,3579 $\pm$ 0,0052
Resv	0,4009 $\pm$ 0,01	0,3887 $\pm$ 0,0175	0,3847 $\pm$ 0,009
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,3672 $\pm$ 0,0092	0,3472 $\pm$ 0,009	0,3601 $\pm$ 0,0093
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	0,4246 $\pm$ 0,0119 <sup>##</sup>	0,4176 $\pm$ 0,0081 <sup>##</sup>	0,437 $\pm$ 0,0111 <sup>####</sup>

Tratamento	ONOO <sup>-</sup> (DO 302nm) (média $\pm$ DP)		
	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
Controle	0,5415 $\pm$ 0,0321	0,5683 $\pm$ 0,0556	0,6681 $\pm$ 0,0337
Resv	0,5235 $\pm$ 0,0436	0,5097 $\pm$ 0,0513	0,5998 $\pm$ 0,0416
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,7822 $\pm$ 0,0406 <sup>**</sup>	0,757 $\pm$ 0,0531 <sup>*</sup>	0,8273 $\pm$ 0,0352 <sup>*</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	0,56 $\pm$ 0,0403 <sup>##</sup>	0,5158 $\pm$ 0,0244 <sup>##</sup>	0,537 $\pm$ 0,0356 <sup>####</sup>

Sendo \* diferença estatística ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo Controle, <sup>##</sup> diferença estatística ( $p < 0,01$ ) e <sup>####</sup> ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 $\mu\text{M}$ ) através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett ( $n=10/\text{grupo}$ ).



**Figura 33.** Avaliação do efeito do resveratrol na concentração de NO e ONOO<sup>-</sup> em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A concentração de NO foi expressa em μM e a de ONOO<sup>-</sup> foi expressa em D.O. medida em 302nm. Sendo \*(p< 0,05) e \*\*(p< 0,01) comparado ao grupo controle; ##(p<0,01) e ####(p<0,0001) comparado ao grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150μM). Os resultados foram significativos através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo).

Existem diversos trabalhos que descrevem o NO como uma molécula potencialmente citotóxica na célula. Entretanto, é provável que a maior parte deste efeito seja mediado por seus produtos oxidados, como o ONOO<sup>-</sup>, produzido pela reação entre o NO e outro radical livre, o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. O peroxinitrito é capaz de interagir de forma direta ou indireta com diversas macromoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA desencadeando respostas celulares que podem culminar em necrose ou apoptose (PACHER *et al.*, 2007).

A análise de correlação de Pearson também foi realizada para avaliar se a idade exerce influência sobre as condições de tratamento. A **Tabela 9** mostra que houve uma correlação estatisticamente significativa apenas entre a idade e os valores basais de NO e ONOO<sup>-</sup>, sendo uma correlação negativa nos valores de NO e positiva nos valores de ONOO<sup>-</sup>. Ou seja, ao longo

do processo do envelhecimento ocorre uma diminuição na biodisponibilidade de NO simultaneamente a um aumento na produção de ONOO<sup>-</sup>.

**Tabela 9.** Correlação de Pearson (r) da concentração de Óxido Nítrico e Peroxinitrito dos diferentes tratamentos com a idade.

NO	Valor de r	Valor de p
Controle	-0,363	*0,049
Resv.	-0,0729	0,702
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,1765	0,351
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	0,2238	0,234

ONOO <sup>-</sup>	Valor de r	Valor de p
Controle	0,5543	***<0,001
Resv.	0,3342	0,071
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0841	0,659
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,0217	0,909

A tabela mostra o nível de correlação e a diferença estatística entre a espécie reativa de nitrogênio e a idade em cada tratamento. Sendo \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 considerado significativo (n=30/tratamento).

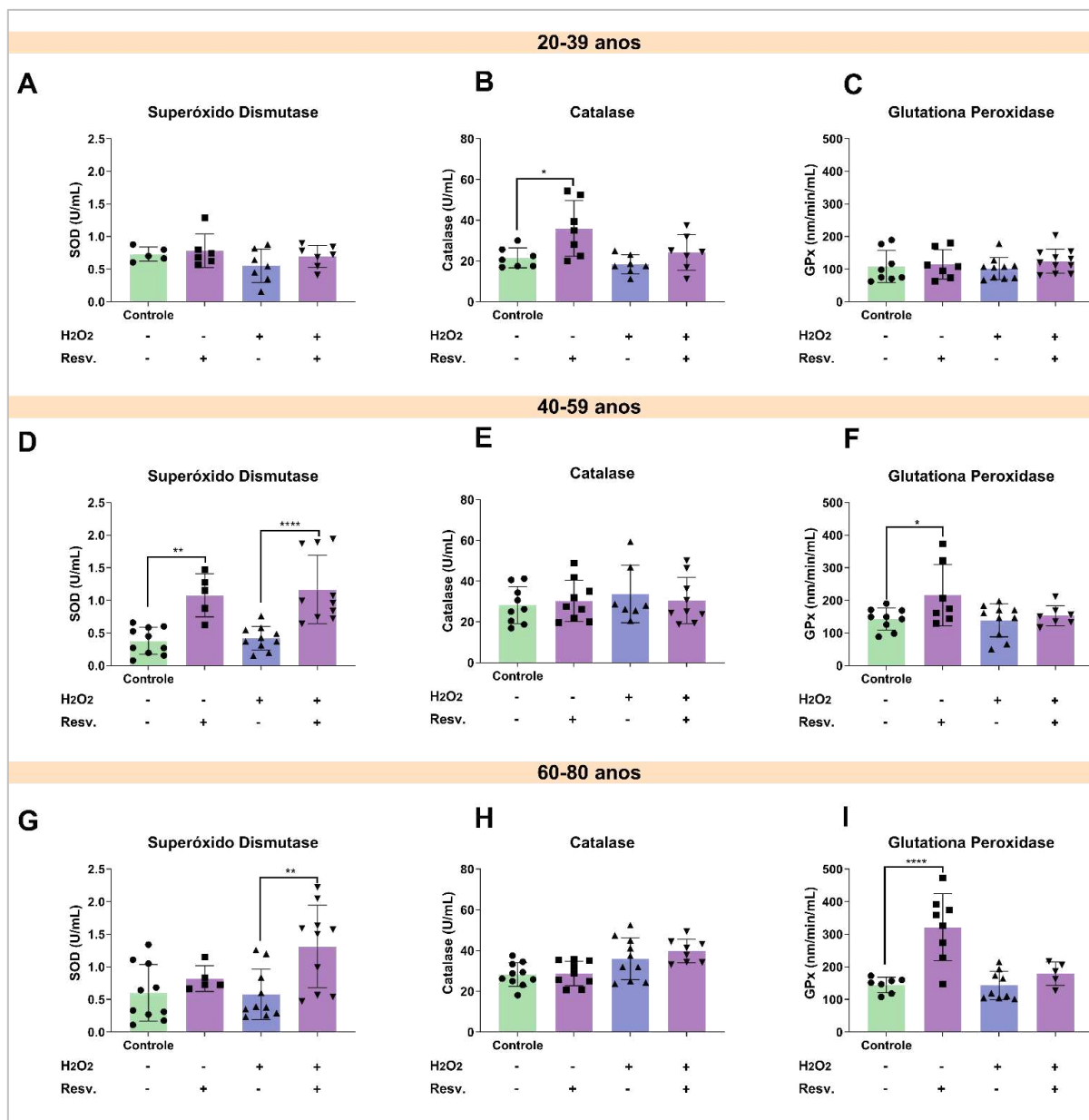
A próxima etapa do nosso estudo foi avaliar a interferência do resveratrol na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. Os resultados são mostrados na **Tabela 10**.

Analisando a atividade de SOD, observa-se um aumento dessa enzima na faixa etária de 40-59 anos. Houve um aumento no grupo Resveratrol vs Controle e no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na faixa etária de 60-80 anos, houve um aumento da atividade dessa enzima no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os níveis de CAT apresentaram alteração apenas na faixa etária de 20-39 anos, havendo um aumento no grupo Resveratrol vs Controle. Houve uma mudança nos níveis de GPx na faixa etária de 40-59 anos, com aumento nos grupos tratados com Resveratrol vs Controle. A **Figura 34** mostra a comparação da atividade dessas três enzimas por faixa etária: em 20-39 anos houve aumento apenas da CAT (quando os leucócitos foram tratados com Resveratrol) enquanto que em 40-59 e 60-80 anos houve aumento das enzimas SOD e GPx (também submetidas a tratamentos com resveratrol e/ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol).

**Tabela 10.** Avaliação do resveratrol sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD, Catalase e GPx nas diferentes faixas etárias.

Tratamento	Idade		
	20-39 anos	40-59 anos	60-80 anos
<b>Superóxido Dismutase (U/ml)</b>			
Controle	0,729 ± 0,05	0,379 ± 0,06	0,603 ± 0,13
Resv.	0,783 ± 0,11	1,079 ± 0,15**	0,819 ± 0,08
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,549 ± 0,09	0,419 ± 0,06	0,579 ± 0,12
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv.	0,696 ± 0,06	1,166 ± 0,16####	1,312 ± 0,20##
<b>Catalase (U/ml)</b>			
Controle	21,52 ± 1,85	28,24 ± 3,03	28,18 ± 1,83
Resv.	35,98 ± 5,17*	30,3 ± 3,36	28,78 ± 2,02
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	18,3 ± 1,76	33,66 ± 5,30	36,06 ± 3,26
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv.	24,2 ± 3,31	30,49 ± 3,79	39,71 ± 2,05
<b>Glutationa Peroxidase (nm/min/mL)</b>			
Controle	107,9 ± 17,52	142,7 ± 11,2	144,5 ± 8,85
Resv,	114,8 ± 17,1	215,9 ± 35,69*	321,7 ± 36,15****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	102,3 ± 10,71	138,9 ± 16,09	143,1 ± 14,54
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv.	124,4 ± 11,04	153 ± 11,7	179,6 ± 16,08

Resv (Resveratrol). Sendo \* diferença estatística ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo Controle, ## diferença estatística ( $p < 0,01$ ) e #### ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 $\mu$ M) por meio do teste de normalidade de Kolmogorov - Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n = 8-10 / grupo). teste de normalidade de Kolmogorov - Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n = 8-10 / grupo).



**Figura 34.** Avaliação do resveratrol na atividade das enzimas antioxidantes SOD, Catalase e GPx em leucócitos de diferentes faixas etárias. A atividade de SOD e Catalase foram medidas em U/mL (unidade de massa atômica/mililitro), enquanto a de GPx foi medida em nm/min/ml (nanomolar/minuto/mililitro). Sendo \*diferença estatística ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) por meio do teste de normalidade de Kolmogorov - Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett ( $n = 8-10$  / grupo).

Os dados de correlação entre a idade e a atividade das enzimas submetidas aos diferentes tratamentos são apresentados na **Tabela 11**. A enzima SOD apresentou correlação positiva estatisticamente significativa apenas no grupo  $H_2O_2$ +Resveratrol, em que a atividade desta enzima na faixa dos 60-80 anos foi maior do que em leucócitos de indivíduos de 20-39 anos. Os resultados da CAT mostraram correlação positiva e significativa nos grupos  $H_2O_2$  e  $H_2O_2$ +Resveratrol. No grupo  $H_2O_2$ , os níveis dessa enzima foram maiores em 60-80 anos em

comparação com 20-39 anos. No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol, os níveis foram maiores na última faixa etária em relação à primeira. É importante ressaltarmos que apesar de haver uma correlação positiva, não houve alteração na atividade dessa enzima a partir de 40 anos quando comparados os tratamentos. Ou seja, ocorre um aumento, mas ele não foi suficiente para promover uma atuação significativa do resveratrol sobre esta enzima dentro da mesma faixa-etária.

Os resultados da GPx mostraram correlações positivas e significativas nos grupos tratados com Resveratrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. Analisando o grupo tratado apenas com Resveratrol, as atividades foram maiores em 60-80 anos em comparação com 20-39 anos. Os grupos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol mostraram um aumento em 60-80 anos em comparação com 20-39 anos. Analisando os dados em conjunto, foi possível observar um aumento na atividade dessas enzimas em diversos tratamentos. No entanto, o tratamento com resveratrol mostrou-se mais eficaz sobre a atividade de SOD e GPx durante o envelhecimento.

**Tabela 11.** Correlação de Pearson (r) das enzimas SOD, Catalase e GPx dos diferentes tratamentos com a idade.

<b>Catalase</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,3632	0,068
Resv.	-0,2701	0,192
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4379	*0,039
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	0,5449	**0,006

<b>SOD</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	-0,01224	0,954
Resv.	0,03364	0,902
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,02141	0,916
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	0,4123	*0,033

<b>GPx</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,291	0,168
Resv.	0,7162	***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4614	*0,012
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	0,4999	*0,018

A tabela mostra o nível de correlação e a diferença estatística entre a enzima e a idade em cada tratamento. Sendo \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 considerado significativo (n=24-30/ tratamento).

*Parte III: Nrf2 é a principal via de sinalização responsável pelo efeito antioxidante do resveratrol no envelhecimento*

---



Uma vez demonstrado que o resveratrol tem seu efeito antioxidante diminuído no envelhecimento, a próxima etapa do nosso estudo foi avaliar as principais vias de sinalização que parecem modular a ação antioxidante deste polifenol, bem como elas se comportam ao longo do processo de envelhecimento. As vias analisadas foram: PKA, AKT/PKB, AMPK, MAPK, SIRT1 e Nrf2. Conforme citado na metodologia, o comportamento dessas vias foi analisado através do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol com a ausência e presença de seus respectivos inibidores.

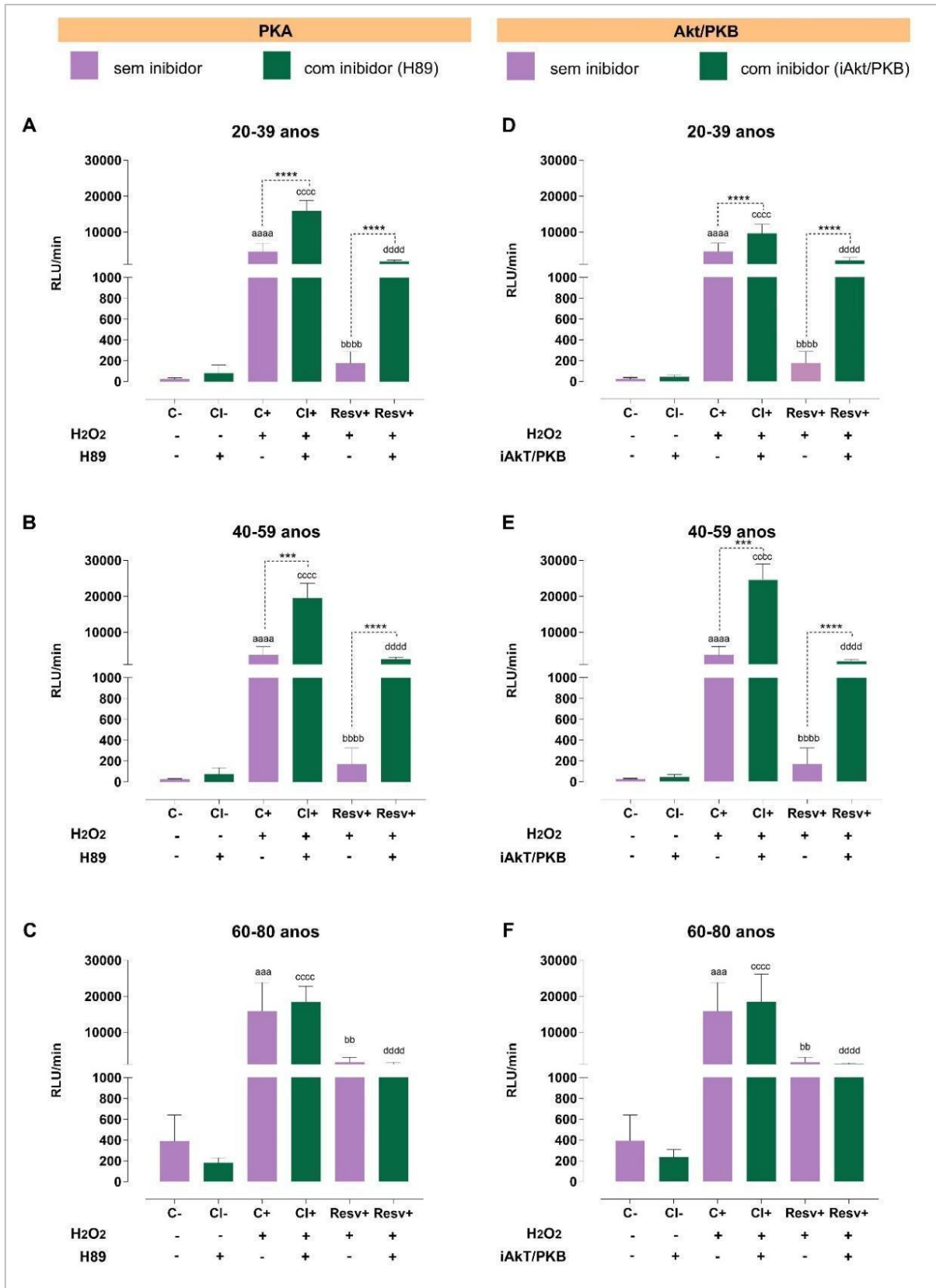
Os resultados da via PKA e AKT/PKB são mostrados a seguir. Para verificarmos se os inibidores necessitam da maquinaria celular ou se reagem inespecificamente com o  $H_2O_2$  e com o resveratrol, também foram realizados experimentos na ausência e presença dos leucócitos. Os resultados presentes na **Tabela 12** mostram que houve um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio em todos os grupos com célula tratados com  $H_2O_2$  e/ou resveratrol vs o grupo sem célula, confirmando que o inibidor da H89 e iAKT/PKB precisam da maquinaria celular para atuarem.

Ao analisarmos as vias PKA e AKT/PKB e compararmos entre os tratamentos com  $H_2O_2$  e resveratrol, é possível observarmos o mesmo perfil de sinalização para as duas vias (**Figura 35**). Ao adicionamos os inibidores e  $H_2O_2$ , houve aumento na produção de ROS quando comparamos apenas os leucócitos estimulados com  $H_2O_2$ . Isso demonstra que existe um papel antioxidante para essas vias. Ao adicionar os inibidores+  $H_2O_2$ +Resv, observa-se que os valores de ROS foram maiores que nas células nas quais as vias não foram inibidas ( $H_2O_2$ +RSV). Isto demonstra que o efeito antioxidante do resveratrol depende da ativação destas vias de sinalização celular. Contudo, esse perfil é observado nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos. O próprio envelhecimento inibe essas vias, pois não observamos diferença nos grupos de 60-80 anos quando foram adicionados inibidores e  $H_2O_2$  ou resveratrol (quatro últimas colunas dos gráficos).

**Tabela 12.** Controles sem e com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via PKA e AKT/PKB.

Tratamento	PKA - RLU/min (média ±DP)			
	Sem célula	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
H89 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	81,33 ± 9,81	-	-	-
H89 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	61,63 ± 0,24	-	-	-
Controle	-	24,7 ± 4,01	24,5 ± 2,09	392,1 ± 78,71
Controle + H89	-	44,01 ± 8,54	46,12 ± 32,23	183,74 ± 46,49
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4.572 ± 739,71	3.719 ± 709,9	14.508 ± 1628
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + H89	-	15.900 ± 3.004****	19.464 ± 4.277****	18.354 ± 4.498****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	-	177,4 ± 34,86	169,9 ± 49,01	1.640 ± 422,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv +H89	-	1.789 ± 411,57####	2.494 ± 538,69####	1.036 ± 579,14####
Tratamento	AKT/PKB - RLU/min (média ±DP)			
	Sem célula	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
iAKT/PKB + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	131 ± 32,37	-	-	-
H89 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	129,2 ± 35,54	-	-	-
Controle	-	24,7 ± 4,01	24,5 ± 2,09	392,1 ± 78,71
Controle + iAKT/PKB	-	43,10 ± 18,77	44,2 ± 17,76	238,4 ± 77,71
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4572 ± 739,71	3.719 ± 709,9	14.508 ± 1628
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + iAKT/PKB	-	9.581 ± 2.688****	24.655 ± 4.526****	18.416 ± 8.171****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	-	177,4 ± 34,86	169,9 ± 49,01	1.640 ± 422,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv +iAKT/PKB	-	2.059 ± 833,84####	1.826 ± 642,82####	1.089 ± 318,51####

Diferenças observadas através do teste de Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo). Os controles sem células foram realizados em triplicata. Sendo \*\*\*\*(p<0,0001) vs H89 ou iAKT/PKB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sem célula) e ####(p<0,0001) vs H89 ou iAKT/PKB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv (sem célula).



**Figura 35.** Avaliação do efeito do resveratrol sobre a via de PKA (A-C) e Akt/PKB (D-F) na produção de ROS em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A geração de ROS foi expressa em RLU/min em média de leitura de 10 minutos. Sendo C- (controle negativo), CI- (controle negativo com inibidor), C+ (controle positivo), CI+ (controle positivo com inibidor) e Resv+

(Resveratrol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As diferenças estatísticas foram observadas através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo): <sup>aaaa</sup>(p<0,0001) e <sup>aaa</sup>(p<0,001) vs C-; <sup>bbbb</sup>(p<0,0001) e <sup>bb</sup> (p<0,01) vs C+; <sup>cccc</sup>(p<0,0001) vs C+; <sup>dddd</sup>(p<0,0001) vs CI+; <sup>\*\*\*\*</sup>(p<0,0001), <sup>\*\*\*</sup>(p<0,001) e <sup>\*\*</sup> (p<0,01).

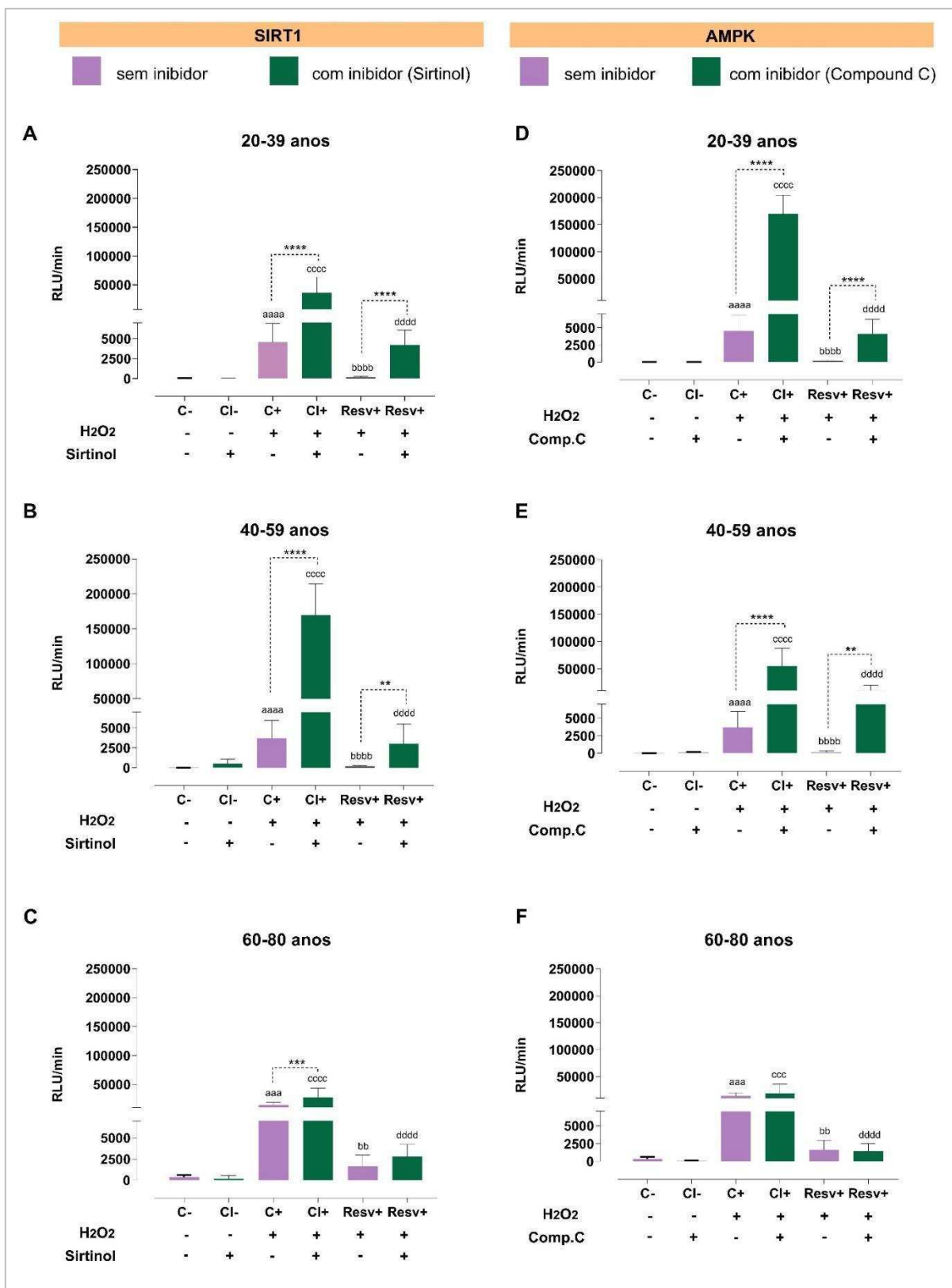
Seguindo para duas outras vias antioxidantes, os resultados de AMPK e SIRT1 são mostrados a seguir. Também verificamos se os inibidores necessitam da maquinaria celular ou se reagem inespecificamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com o resveratrol, Os resultados presentes na **Tabela 13** mostram que houve um aumento em todos os grupos com célula tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou resveratrol vs o grupo sem célula, confirmando que o inibidor compound c e sirtinol também precisam da maquinaria celular para atuarem.

Ao analisarmos essas duas vias e compararmos entre os tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e resveratrol, é possível observarmos o mesmo perfil de sinalização do observado nas vias PKA e AKT/PKB (**Figura 36**). Ao adicionamos os inibidores e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve aumento na produção de ROS quando comparamos apenas os leucócitos estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isso mostra que existe um papel antioxidante para essas vias. Ao adicionar os inibidores+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv, observa-se que os valores de ROS foram maiores que as células nas quais as vias não foram inibidas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+RSV). Isto demonstra que o efeito antioxidante do resveratrol depende da ativação destas vias de sinalização celular. Contudo, esse perfil é observado nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos. O próprio envelhecimento inibe essas vias, pois não observamos diferença nos grupos de 60-80 anos quando foram adicionados inibidores e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou resveratrol (quatro últimas colunas dos gráficos).

**Tabela 13.** Controles sem e com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via SIRT1 e AMPK.

Tratamento	SIRT1- RLU/min (média ±DP)			
	Sem célula	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	81,33 ± 9,81	-	-	-
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	61,63 ± 0,24	-	-	-
Controle	-	24,7 ± 4,01	24,5 ± 2,09	392,1 ± 78,71
Controle + Sirtinol	-	30,5 ± 7,89	529 ± 276,4	183,8 ± 151,6
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4572 ± 739,71	3719 ± 709,9	14508 ± 1628
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Sirtinol	-	35905 ± 8718****	169525 ± 14201****	27610 ± 4923****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	-	177,4 ± 34,86	169,9 ± 49,01	1640 ± 422,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv +Sirtinol	-	4241 ± 581,7####	3054 ± 776,8####	2772 ± 466,8####
Tratamento	AMPK - RLU/min (média ±DP)			
	Sem célula	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
Comp. C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	142,30 ± 17,11	-	-	-
Comp. C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	120,93 ± 2,61	-	-	-
Controle	-	24,7 ± 4,01	24,5 ± 2,09	392,1 ± 78,71
Controle + Comp. C	-	22,03 ± 4,76	71,66 ± 54,50	23,04 ± 8,32
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4.572 ± 739,71	3719 ± 709,9	14508 ± 1628
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Comp. C	-	170.181± 34.247****	54.956 ± 20.840****	19.345 ± 5.022****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	-	177,4 ± 34,86	169,9 ± 49,01	1640 ± 422,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv +Comp. C	-	4.141 ± 2.090####	10.064 ± 3.927####	1.471 ± 571,19####

Diferenças estatísticas observadas através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo). Os controles sem células foram realizados em triplicata. Sendo \*\*\*\*\*(p<0,0001) vs Sirtinol/Comp. C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sem célula) e ####(p<0,0001) vs Sirtinol/Comp.C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Resv (sem célula).



**Figura 36.** Avaliação do efeito do resveratrol sobre a via de SIRT1 (A-C) e AMPK (D-F) na produção de ROS em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A geração de ROS foi expressa em RLU/min em média de leitura de 10 minutos. Sendo C- (controle negativo), CI- (controle negativo com inibidor), C+ (controle positivo), CI+ (controle positivo com inibidor) e Resv+ (Resveratrol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As diferenças estatísticas foram observadas através do teste de normalidade

Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo): <sup>aaaa</sup>(p<0,0001) e <sup>aaa</sup>(p<0,001) vs C-; <sup>bbbb</sup>(p<0,0001) e <sup>bb</sup> (p<0,01) vs C+; <sup>cccc</sup>(p<0,0001) vs C+; <sup>dddd</sup>(p<0,0001) vs CI+; <sup>\*\*\*\*</sup>(p<0,0001), <sup>\*\*\*</sup>(p<0,001) e <sup>\*\*</sup> (p<0,01).

As duas últimas vias de sinalização estudadas são a da MAPK e do Nrf2. Da mesma forma que as demais vias, foi verificado que seus respectivos inibidores (ip38MAPKinase Inhibitor III e ML385) necessitam da maquinaria celular para atuar, pois houve um aumento significativo nos grupos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ inibidor com células comparado ao grupo sem células, ocorrendo o mesmo nos grupos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv+inibidor. Os dados são mostrados na **Tabela 14**.

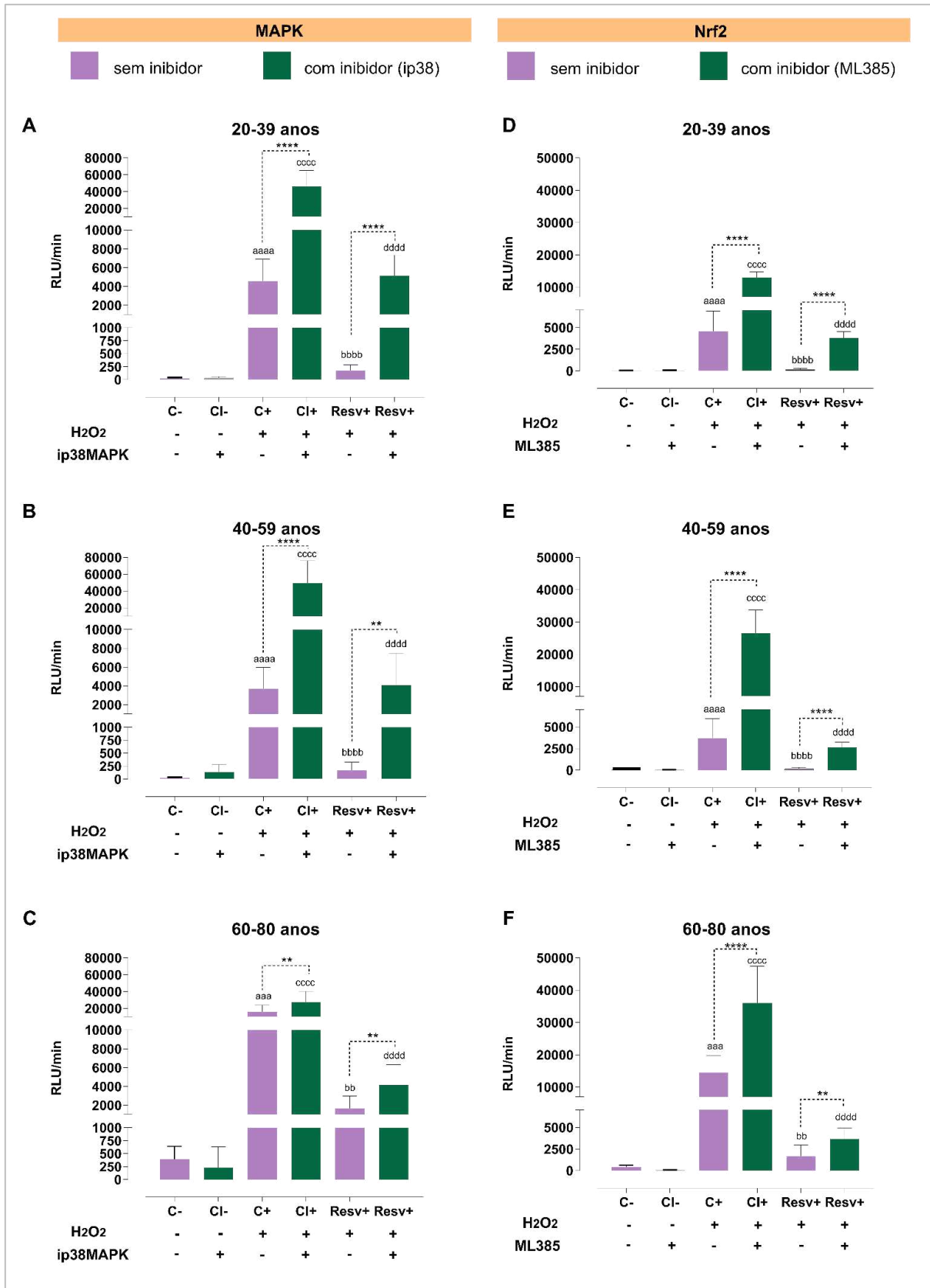
Comparando as diferentes faixas-etárias e tratamentos a partir da **Figura 37**, verificamos o mesmo padrão de sinalização dessas duas vias ao longo do envelhecimento e diferente do que foi observado com as vias PKA, AKT/PKB, AMPK e SIRT1. Os resultados mostram que as vias antioxidantes da proteína quinase MAPK e da proteína Nrf2 permanecem ativadas em todas as faixas etárias: houve aumento de ROS no grupo inibidor+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também no grupo inibidor+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. Ou seja, o efeito antioxidante do resveratrol ainda observado no envelhecimento se deve em grande parte à ativação dessas duas vias de sinalização celular.

**Tabela 14.** Controles sem e com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via MAPK e Nrf2.

Tratamento	MAPk- RLU/min (média ±DP)			
	Sem célula	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
ip38 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	26,94 ± 3,98	-	-	-
Ip38 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	46,30 ± 6,82	-	-	-
Controle	-	24,7 ± 4,01	24,5 ± 2,09	392,1 ± 78,71
Controle + ip38	-	33,5 ± 23,78	131,5 ± 43,44	25,02 ± 4,35
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4.572 ± 739,71	3.719 ± 709,9	14508 ± 1628
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ip38	-	45.889 ± 19.215****	49.443 ± 24.461****	27.237 ± 12.922 ****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	-	177,4 ± 34,86	169,9 ± 49,01	1640 ± 422,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv +ip38	-	5.166 ± 2.300####	4.058 ± 3.421####	4.169 ± 2.131####
Tratamento	Nrf2 - RLU/min (média ±DP)			
	Sem célula	20-39 anos	40-50 anos	60-80 anos
ML385 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	131 ± 32,37	-	-	-
ML385 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	129,2 ± 35,54	-	-	-
Controle	-	24,7 ± 4,01	24,5 ± 2,09	392,1 ± 78,71
Controle + ML385	-	23,53 ± 1,85	33,36 ± 10,11	21,47 ± 1,35
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4572 ± 739,71	3719 ± 709,9	14.508 ± 1.628
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + ML385	-	13.005 ± 543****	26.555 ± 2274****	36.024 ± 3.575****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv	-	177,4 ± 34,86	169,9 ± 49,01	1640 ± 422,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Resv + ML385	-	3.778 ± 240####	2.634 ± 186,6####	3.667 ± 388,9####

Diferenças observadas através do teste Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo). Os controles sem células foram realizados em triplicata. Sendo \*\*\*\*(p<0,0001) vs ip38MAPK/ML385+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sem célula) e ####(p<0,0001) vs ip38MAPk/ML385+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv (sem célula).





**Figura 37.** Avaliação do efeito do resveratrol sobre a via de MAPK (A-C) e Nrf2 (D-F) na produção de ROS em leucócitos humanos de diferentes faixas etárias induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A geração de ROS foi expressa em RLU/min em média de leitura de 10 minutos. Sendo C- (controle negativo), CI- (controle

negativo com inibidor), C+ (controle positivo), CI+ (controle positivo com inibidor) e Resv+ (Resveratrol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As diferenças estatísticas foram observadas através do teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov, ANOVA one-way e pós-teste de Dunnett (n=10/grupo): <sup>aaaa</sup>(p<0,0001) e <sup>aaa</sup>(p<0,001) vs C-; <sup>bbbb</sup>(p<0,0001) e <sup>bb</sup> (p<0,01) vs C+; <sup>cccc</sup>(p<0,0001) vs C+; <sup>dddd</sup>(p<0,0001) vs CI+; <sup>\*\*\*\*</sup>(p<0,0001), <sup>\*\*\*</sup>(p<0,001) e <sup>\*\*</sup> (p<0,01).

A análise de Pearson das vias é mostrada na **Tabela 15**. Foi possível observar correlação significativa na AKT/PKB em todos os tratamentos. Houve uma correlação positiva nos grupos Controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e correlação negativa no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. Ou seja, a AKT/PKB é uma via antioxidante que é silenciada durante o envelhecimento, tanto nos níveis basais quanto no estresse oxidativo (através da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Além disso, foi demonstrado que o resveratrol não é capaz de ativar esta via no envelhecimento.

Analisando a via SIRT1 foi observada uma correlação estatisticamente significativa apenas no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. Tal correlação é negativa, indicando que, quanto maior a idade, menores são os valores de ROS ao inibirmos a via, ou seja, o resveratrol deixa de agir pela via SIRT1 ao longo do envelhecimento.

A via AMPK se confirmou como uma via antioxidante silenciada no envelhecimento, uma vez que foi encontrada uma correlação negativa e significativa no grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ou seja, quanto maior a idade, menor o papel dessa via em combater o estresse oxidativo, demonstrado pelo aumento de ROS no ensaio de quimioluminescência.

Por fim, nos dados da via Nrf2 foi observada uma correlação estatisticamente significativa apenas no grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tal correlação é positiva, indicando que, quanto maior a idade, maior são os valores de ROS ao inibirmos a via, ou seja, a via do Nrf2 é uma via antioxidante ativada ao longo do envelhecimento (ao contrário, por exemplo, da AMPK que teve correlação negativa). É possível observar, portanto, que a via do Nrf2 é mais atuante em indivíduos mais velhos, pois os valores de ROS produzidos a partir de sua inibição são maiores ao passar dos anos.

**Tabela 15.** Correlação de Pearson (r) das vias de sinalização PKA, AKT/PKB, SIRT1, AMPK, MAPK e Nrf2 dos diferentes tratamentos com a idade.

<b>PKA</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,4002	0,197
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,3191	0,086
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,3181	0,087

<b>AKT/PKB</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,7008	**0,004
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4168	*0,022
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,571	***<0,001

<b>SIRT1</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,0865	0,759
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0229	0,904
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,3972	*0,03

<b>AMPK</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,1069	0,707
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,8211	***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,2053	0,277

<b>MAPK</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,2767	0,318
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,2799	0,134
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,1148	0,546

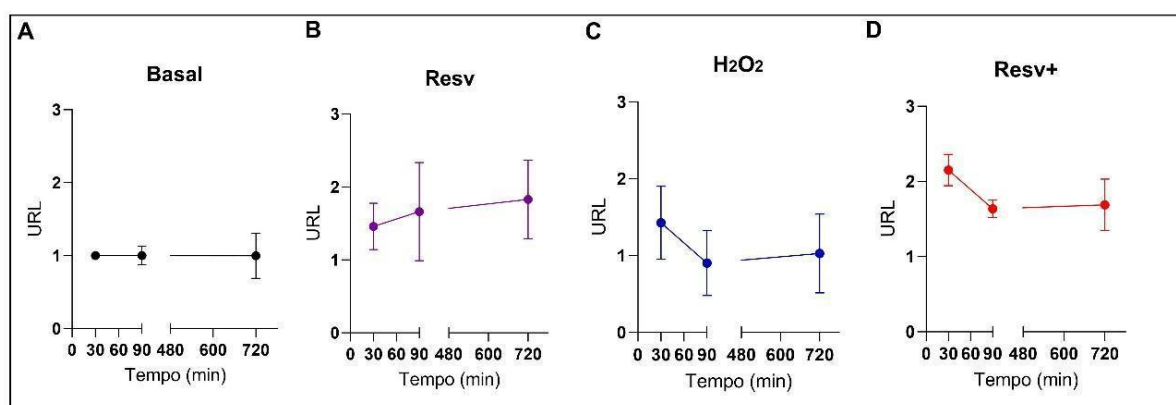
  

<b>Nrf2</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	-0,0917	0,745
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,6759	***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,0687	0,714

A tabela mostra o nível de correlação e a diferença estatística entre o tratamento utilizando o inibidor da respectiva via e a idade em cada tratamento. Sendo \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 considerado significativo (n=30/ tratamento).

Cabe aqui ressaltarmos que conforme mostrado na **Figura 17**, durante a descrição do mecanismo de ativação da via Nrf2 na secção “Introdução”, a mesma é ativada por fosforilação. Ao final desse conjunto de dados, a nossa hipótese adiante foi de que a MAPK promove a fosforilação e ativação do Nrf2, por ser a única quinase estudada que não foi silenciada nos leucócitos dos doadores acima de 60 anos. Conforme também citado na introdução, o Nrf2 atua como fator de transcrição, se ligando em uma sequência chamada de “Elementos de resposta antioxidante” (ARE), levando a resposta celular. Partimos dessa hipótese para avaliarmos como está a ativação do gene que codifica a proteína Nrf2 e também a quantificação dessa proteína fosforilada (forma ativa) no citoplasma dos leucócitos de todos os grupos etários.

O primeiro passo para analisarmos a ativação de Nrf2 por meio do ensaio da luciferase foi padronizar o tempo de tratamento, para verificarmos se 30 min seriam suficientes para mostrar a ativação do fator de transcrição, se seriam necessários tempos maiores ou até mesmo se o tempo afetaria a taxa de ativação. Como os ensaios de viabilidade foram realizados com até 24h de tratamento e mantendo as células em cultura, foi realizado um ensaio piloto (n=3) seguindo as etapas: 30 min (igual o protocolo de quimioluminescência com os inibidores das vias de sinalização), 90 min (um pouco maior do que o utilizado na análise das enzimas antioxidantes) e 12h. Logo após os tratamentos foi seguida a leitura das amostras no luminômetro. Os resultados mostrados na **Figura 38** mostram que não houve diferença na ativação do gene Nrf2, através dos valores de Unidades Relativas de Luciferase (URL) dentre os três tempos de tratamento. Por isso, ficou definido o tempo de 90 minutos para os ensaios posteriores. Cabe ressaltar que já nesse ensaio podemos observar maiores valores de URL nos grupos tratados com resveratrol (**Painel B e D**), ainda que não se tenha feito uma estatística entre os tratamentos nesse primeiro momento.



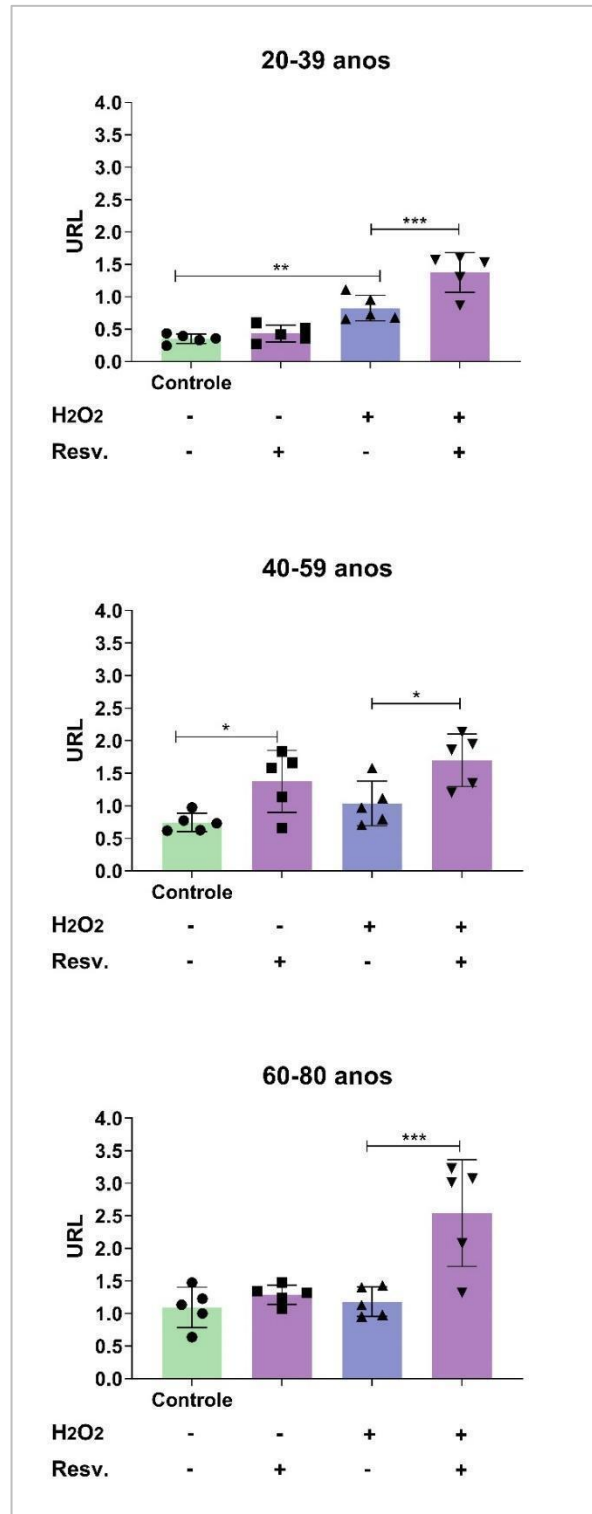
**Figura 38.** Avaliação preliminar sobre a influência do tempo de tratamento sobre a expressão de luciferase nos leucócitos humanos. Foi realizado um teste piloto com três diferentes tempos: 30 minutos, 90 minutos e 12 horas (720 minutos) de tratamento. Não foram observadas diferenças significativas nas Unidades Relativas de Luz (URL) de luciferase nos diferentes tempos.

Ao analisarmos a ativação do gene Nrf2 nos leucócitos das diferentes faixas-etárias e tratamentos, observamos que o resveratrol foi capaz de ativar sim esse fator de transcrição em algumas situações. A **Figura 39** mostra que na faixa-etária dos 20-39 anos houve um aumento de URL nas células estimuladas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs Controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isso indica que, nessa faixa-etária, a própria indução do estresse oxidativo já é capaz de promover a ativação da via.

A faixa-etária dos 40-59 anos mostra que houve um aumento de URL nos leucócitos tratados apenas com Resv. vs Controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ou seja, a presença de resveratrol nos leucócitos promove a ativação de Nrf2 independente das demais condições de tratamento.

Analisando a última faixa-etária, dos 60-80 anos, observa-se um aumento de URL em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isso indica que, mesmo no envelhecimento, o fator de transcrição é capaz de ser ativado pelo resveratrol, reduzindo o estresse oxidativo (conforme já mostrado nos dados de quimioluminescência acima).

A correlação de Pearson da **Tabela 16** mostra que houve uma correlação positiva e significava em todos os tratamentos. Ou seja, quanto maior a idade dos doadores, maior foram as Unidades Relativas de Luciferase encontradas, logo, maior a ativação de Nrf2.



**Figura 39.** Efeito da ativação do gene Nrf2 induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e resveratrol via ensaio de luciferase. Os leucócitos humanos de diferentes faixas etárias foram tratados com os respectivos tratamentos por 24h, em seguida foram realizados os protocolos de acordo com o kit de transfecção, com um tempo de 90 min. Sendo \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 (n=5/grupo).

**Tabela 16.** Correlação de Pearson (r) da ativação de Nrf2 dos diferentes tratamentos com a idade.

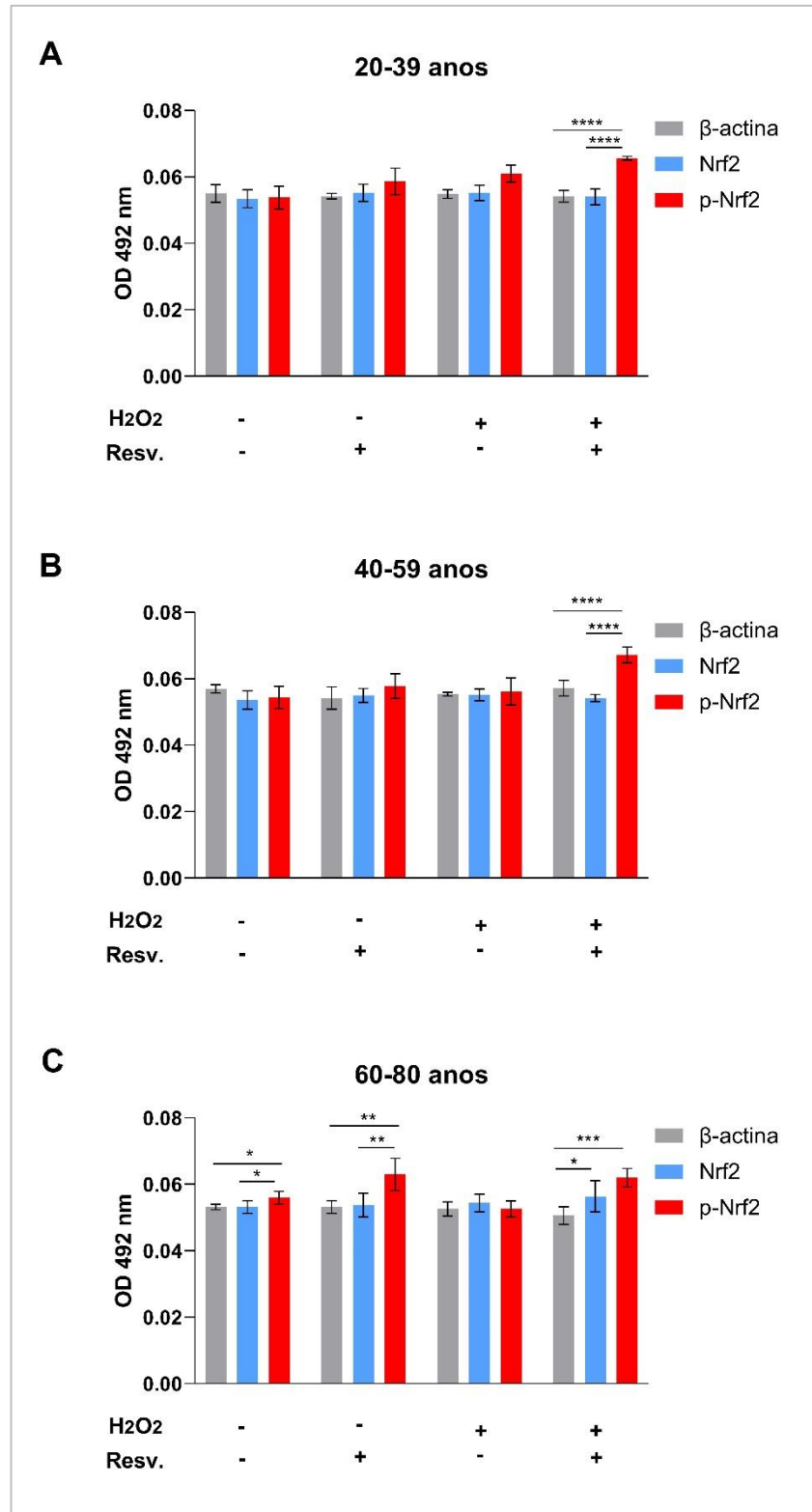
URL	Valor de r	Valor de p
Controle	0,8348	***<0,001
Resv.	0,7660	***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,6235	*0,013
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	0,7253	**0,002

A tabela mostra o nível de correlação e a diferença estatística entre a ativação do fator de transcrição Nrf2 e a idade em cada tratamento. Sendo \*p<0,05, \*\*p<0,001 \*\*\*p<0,001 considerado significativo (n=15/tratamento).

A quantificação das proteínas Nrf2 e p-Nrf2 (proteína fosforilada) foi realizada através da técnica de ELISA. Os resultados são mostrados em duas partes.

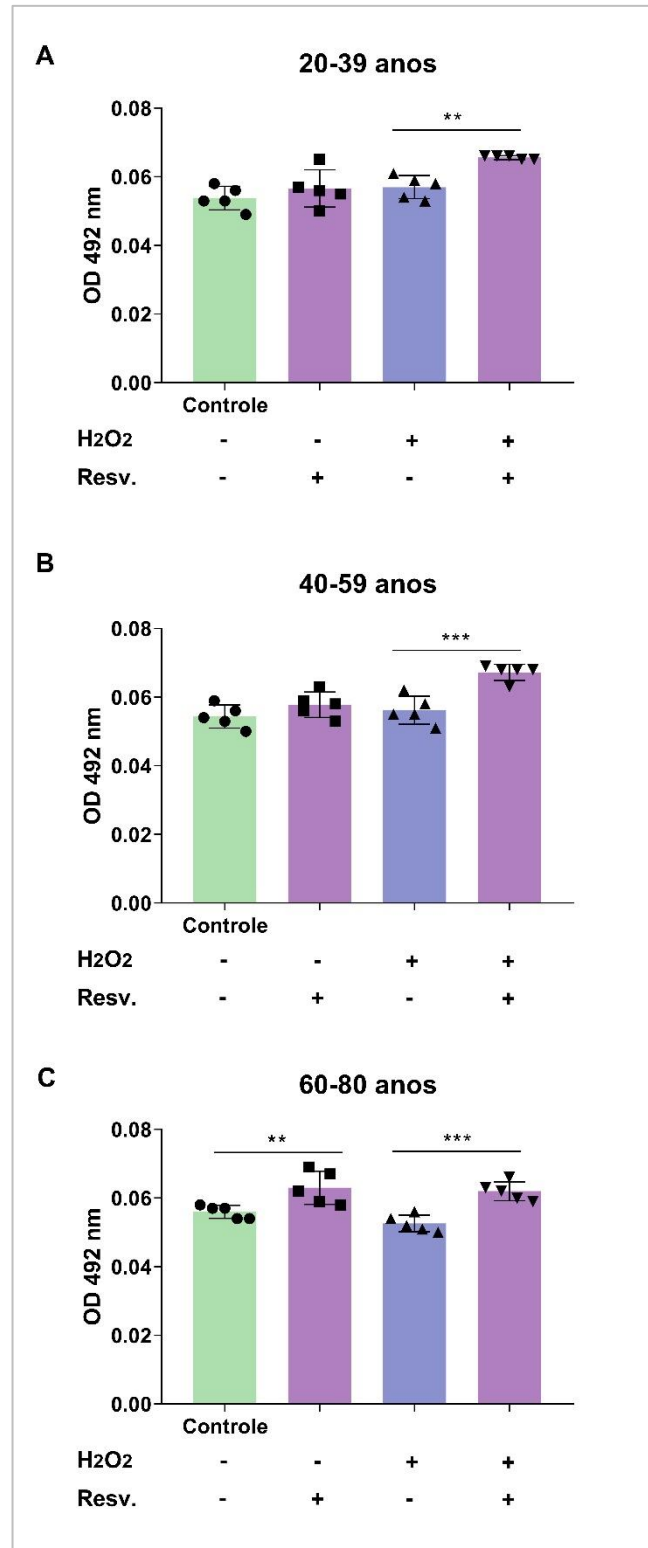
Analisamos inicialmente os valores dessas duas isoformas comparando com o controle constitutivo, neste caso utilizando a  $\beta$ -actina. Os resultados são mostrados na **Figura 40**. Nas **Figuras 40A-B** observa-se um aumento em p-Nrf2 vs  $\beta$ -actina p-Nrf2 vs Nrf2 nos leucócitos estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tratados com resveratrol nas faixas etárias de 20-39 e 40-59 anos. Dados interessantes foram observados na **Figura 40C** - células dos doadores entre 60-80 anos: a nível basal e nas células apenas estimuladas com resveratrol houve um aumento da proteína p-Nrf2 vs  $\beta$ -actina p-Nrf2 vs Nrf2. Já nos leucócitos estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tratados com resveratrol houve um aumento de Nrf2 vs  $\beta$ -actina e p-Nrf2 vs  $\beta$ -actina. Ou seja, observamos que no envelhecimento houve um aumento de Nrf2, mas sobretudo da forma fosforilada (ativa) da proteína, já com o tratamento apenas com o polifenol.

A partir disso, foi avaliado os níveis da isoforma p-Nrf2 por faixa-etária comparando os respectivos tratamentos. Os resultados são mostrados na **Figura 41**. Nos leucócitos dos doadores de 20-39 e 40-59 anos observa-se um aumento de p-Nrf2 nas células H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na última faixa-etária foi possível observar um aumento da forma fosforilada em ambas as células tratadas com o resveratrol: Resv. vs Controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 40.** Quantificação das proteínas Nrf2 e p-Nrf2 em leucócitos humanos através do ensaio de ELISA. Sendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparando no respectivo tratamento as diferenças entre  $\beta$ -actina (constitutivo), Nrf2 e p-Nrf2. Os resultados foram significativos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ANOVA unidirecional e pós-teste de Dunnett ( $n=5$ /grupo)





**Figura 41.** Quantificação da isoforma p-Nrf2 em leucócitos humanos submetidos a diferentes tratamentos através do ensaio de ELISA. Sendo  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ . Os resultados foram significativos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ANOVA unidirecional e pós-teste de Dunnett ( $n=5$ /grupo).

Ao avaliarmos a influência da idade na fosforilação de Nrf2 pela correlação de Pearson através da **Tabela 17** observamos que houve uma correlação negativa e estatisticamente significativa quando os leucócitos são estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tratados com resveratrol. Ou seja, por mais que observamos a importância da fosforilação da proteína (e que ela ocorre em ambas as faixas etárias), o envelhecimento influencia negativamente nessa fosforilação.

**Tabela 17.** Correlação de Pearson (r) de p-Nrf2 dos diferentes tratamentos com a idade.

<b>OD 492 nm</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
Controle	0,3469	0,205
Resv.	0,3899	0,151
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,3335	0,224
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv.	-0,5303	*0,042

A tabela mostra o nível de correlação e a diferença estatística entre p-Nrf2 e a idade em cada tratamento. Sendo \*p<0,05 considerado significativo (n=15/tratamento).

*Parte IV: O resveratrol também apresenta diminuição do seu efeito anti-inflamatório no envelhecimento*

---

Uma vez demonstrado o efeito antioxidante do resveratrol no envelhecimento e visto na literatura o seu potencial alvo como anti-inflamatório, bem como a relação entre estresse oxidativo e inflamação, o último objetivo do estudo foi avaliar a ação anti-inflamatória do polifenol.

Para isso, primeiramente foram avaliados os níveis das citocinas TNF, IL-6 e IL-10 (**Tabela 18**). Pode-se destacar que um perfil semelhante foi observado nas dosagens de TNF e IL-6, independentemente da faixa etária dos indivíduos dos quais foram obtidos os leucócitos.

É possível observar na faixa etária de 20-39 anos, diminuição dos níveis de TNF no tratamento com Resv *vs* Controle, aumento quando os leucócitos foram estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle e diminuição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na faixa etária de 40-59 anos, observa-se um aumento dos níveis de TNF nos leucócitos estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle e diminuição em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na faixa etária de 60-80 anos foi observado aumento dessa citocina com o estímulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle e diminuição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os níveis de IL-6 mostram as mesmas diferenças que TNF nos respectivos tratamentos em todas as faixas etárias. Houve diminuição dessas citocinas nos leucócitos tratados apenas com Resv *vs* Controle, um aumento quando os leucócitos foram estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle e diminuição em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória se mostraram com um perfil oposto a TNF e IL-6. Analisando os valores na faixa etária de 20-39 anos, é possível observar um aumento quando o Resv. foi adicionado sem nenhum estímulo quando comparado ao Controle, uma diminuição quando os leucócitos foram estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle e um aumento em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na faixa etária de 40-59 anos, houve aumento de IL-10 quando adicionado Resv. sem nenhum estímulo quando comparado ao controle, diminuição quando os leucócitos foram estimulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle e aumento em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na faixa etária de 60-80 anos, foi observada apenas uma diminuição da IL-10 em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle. O resveratrol, contudo, foi capaz de aumentar essa citocina quando comparado aos leucócitos dessa faixa etária estimulados apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Tabela 18.** Avaliação do efeito anti-inflamatório do resveratrol.

TNF	Média ± DP		
	20-39 anos	40-59 anos	60-80 anos
Controle	2,779 ± 0,12	3,857 ± 0,08	13,872 ± 0,28
Resv	1,597 ± 0,17****	3,831 ± 0,22	13,771 ± 1,09
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,841 ± 0,09****	14,700 ± 0,13****	19,051 ± 0,22****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv	3,294 ± 0,13^^^^	3,831 ± 0,22^^^^	13,770 ± 1,09^^^^

IL-6			
Controle	1,773 ± 0,17	3,363 ± 0,18	16,543 ± 0,33
Resv	0,934 ± 0,04**	1,967 ± 0,16****	13,304 ± 0,92****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,302 ± 0,21****	10,380 ± 0,16****	35,500 ± 1,06****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv	2,014 ± 0,06^^^^	2,703 ± 0,15^^^^	17,492 ± 0,53^^^^

IL-10			
Controle	11,471 ± 1,07	3,184 ± 0,16	1,112 ± 0,04
Resv	17,580 ± 0,3****	10,155 ± 0,13****	0,932 ± 0,02
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,770 ± 0,33***	2,280 ± 0,19**	0,724 ± 0,02**
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv	17,110 ± 0,74^^^^	9,804 ± 0,13^^^^	0,502 ± 0,03

Sendo \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001 vs Controle e ^p<0,01, ^^^p<0,0001 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram significativos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ANOVA e pós-teste de Dunnett (n=6/grupo).

*Parte V: Nrf2 também é a principal via de sinalização responsável pelo efeito anti-inflamatório do resveratrol no envelhecimento*

---

As mesmas citocinas foram analisadas com os tratamentos Controle, Resv., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv., porém simultaneamente a incubação com 10µM de ML385, para verificarmos o efeito da inibição de Nrf2 também no perfil anti-inflamatório do resveratrol.

A **Tabela 19** mostra um perfil semelhante ao ensaio sem a inibição da via. Nota-se apenas as seguintes diferenças da tabela anterior:

Analisando TNF, na faixa etária de 40-59 anos, observa-se uma diminuição no tratamento apenas com Resv. *vs* Controle. Nos níveis de IL-10, na faixa-etária dos 60-80 anos, foi observada uma diminuição de IL-10 em Resv. *vs* Controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *vs* Controle. Porém, o Resv. foi capaz de aumentar essa citocina quando comparado aos leucócitos dessa faixa etária estimulados apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. *vs* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ou seja, os valores de IL-10 na presença de ML385 eram menores do que na ausência do inibidor, demonstrando o efeito da via Nrf2 na resposta anti-inflamatória do resveratrol (dados confirmados a seguir).

**Tabela 19.** Avaliação do efeito anti-inflamatório do resveratrol **na presença do inibidor ML385.**

TNF	Média ± DP		
	20-39 anos	40-59 anos	60-80 anos
<b>Controle</b>	4,296 ± 0,16	5,223 ± 0,14	18,321 ± 0,82
<b>Resv</b>	2,774 ± 0,09****	4,693 ± 0,15**	18,183 ± 0,19
<b>H2O2</b>	12,201 ± 0,13****	20,721 ± 0,73****	28,054 ± 1,62****
<b>H2O2+Resv</b>	5,931 ± 0,04^^^^	4,693 ± 0,15^^^^	18,180 ± 0,19^^^^

IL-6			
<b>Controle</b>	2,021 ± 0,02	5,189 ± 0,14	23,632 ± 0,94
<b>Resv</b>	1,891 ± 0,07****	2,479 ± 0,21****	19,211 ± 0,16****
<b>H2O2</b>	10,351 ± 0,13****	13,111 ± 0,39****	44,873 ± 0,30****
<b>H2O2+Resv</b>	5,039 ± 0,02^^^^	9,041 ± 0,32^^^^	28,902 ± 0,21^^^^

IL-10			
<b>Controle</b>	6,955 ± 0,26	2,193 ± 0,12	1,116 ± 0,09
<b>Resv</b>	17,593 ± 0,66****	4,033 ± 0,09**	0,567 ± 0,03**
<b>H2O2</b>	6,776 ± 0,53	0,872 ± 0,02***	0,342 ± 0,08***
<b>H2O2+Resv</b>	16,521 ± 0,38^^^^	5,873 ± 0,09^^^^	0,518 ± 0,04^^

Sendo \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001 vs Controle e ^^p<0,01, ^^^p<0,0001 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram significativos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ANOVA e pós-teste de Dunnett (n=6/grupo).

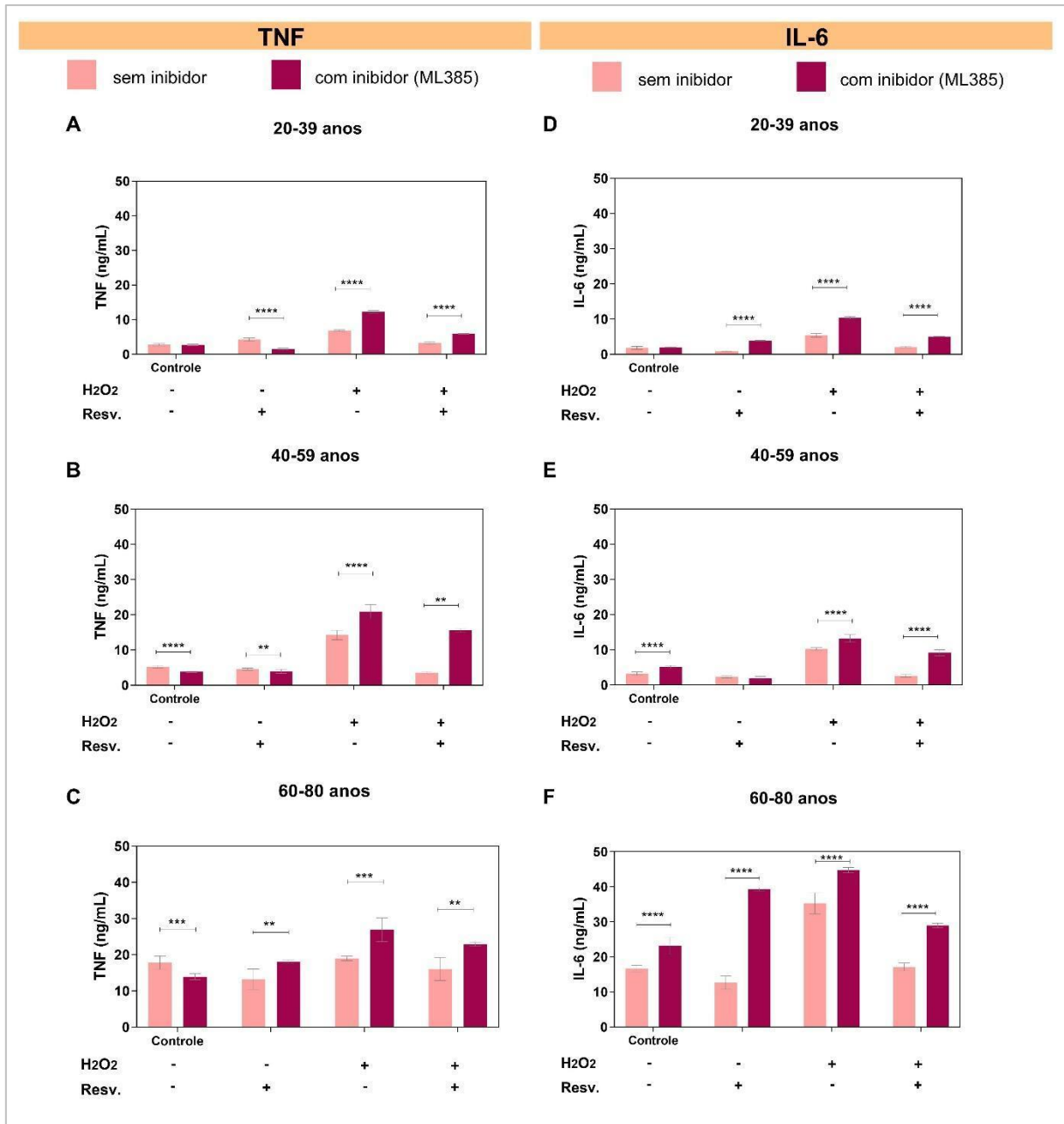


O próximo passo foi comparar estatisticamente os tratamentos para as mesmas faixas etárias na ausência e presença do inibidor da via Nrf2. Nesse sentido, a **Figura 42** mostra os valores de TNF e IL-6, as duas citocinas pró-inflamatórias.

Na faixa etária de 20-39 anos foi observado aumento de TNF (**Figura 42A**) e IL-6 (**Figura 42D**) nos grupos Resv, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. com adição de ML385 em comparação aos respectivos grupos sem o inibidor.

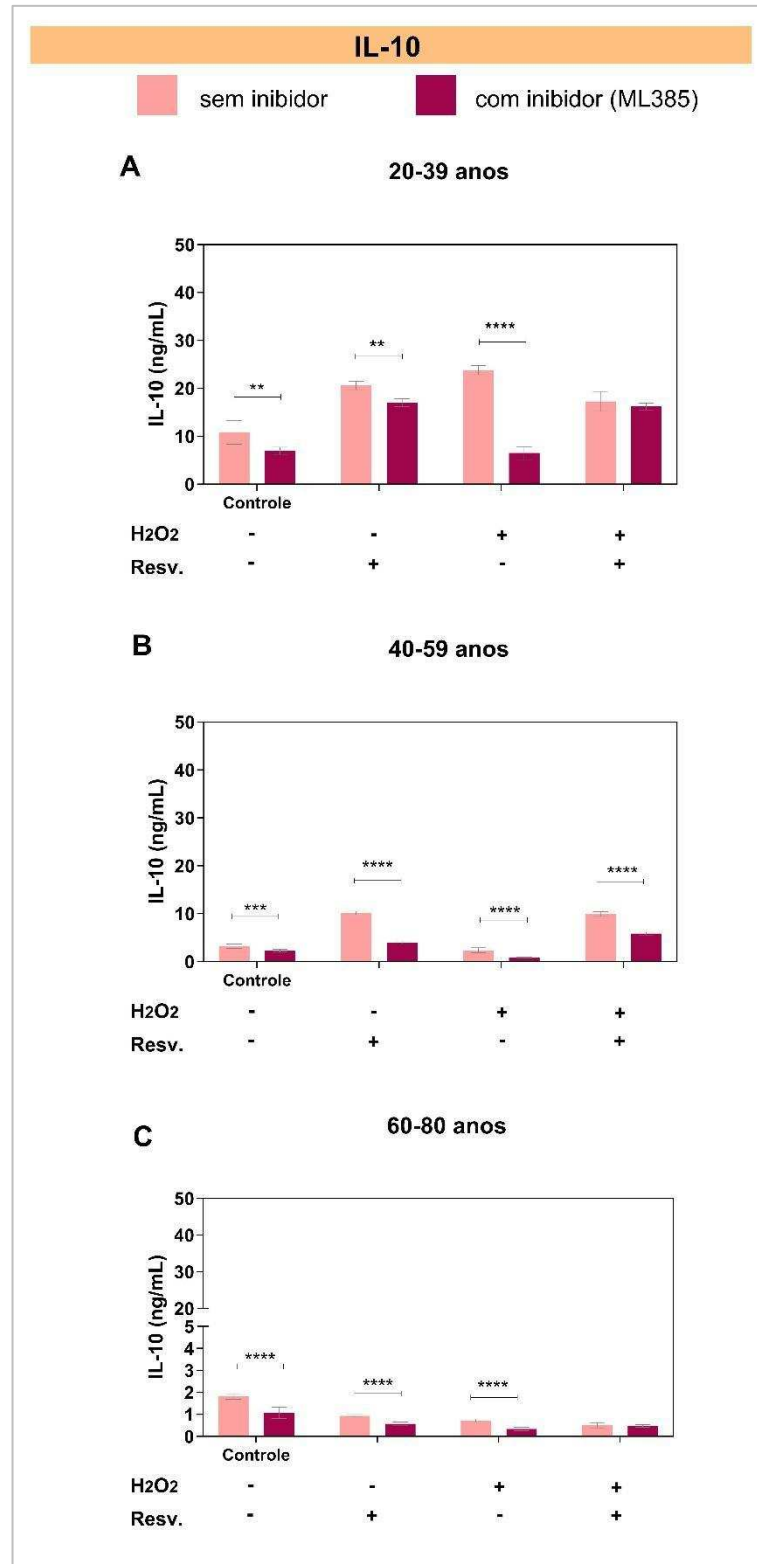
Na faixa etária de 40-59 anos houve diminuição do grupo Controle e Resv.; e aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. em comparação aos respectivos grupos sem inibidor nos níveis de TNF (**Figura 42B**). Em relação à IL-6 nesta mesma faixa etária, houve aumento em Controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv em comparação aos respectivos grupos sem o inibidor (**Figura 42E**).

A última faixa etária apresentou aumento nas quatro condições de tratamento em comparação aos respectivos tratamentos sem o inibidor, tanto nos níveis de TNF quanto de IL-6 (**Figura 42C** e **Figura 42F**). Cabe destacarmos que em todas as condições em que as células foram incubadas com o inibidor, houve uma exacerbação dos valores das citocinas TNF e IL-6.



**Figura 42.** Avaliação da via Nrf2 na produção de TNF (A-C) e IL-6 (D-F) em leucócitos tratados com resveratrol em diferentes faixas etárias. Sendo \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparando o tratamento na ausência vs presença do inibidor. Os resultados foram significativos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ANOVA unidirecional e pós-teste de Dunnett ( $n=6$ /grupo).

Quanto à influência da inibição da via nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, foi observada uma diminuição em todos os tratamentos nas duas primeiras faixas etárias (**Figura 43A** e **Figura 43B**) em comparação aos respectivos tratamentos sem inibidor. Na última faixa etária (**Figura 43C**), foi possível observar uma diminuição apenas no Controle, Resv. e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação aos respectivos tratamentos sem o inibidor.



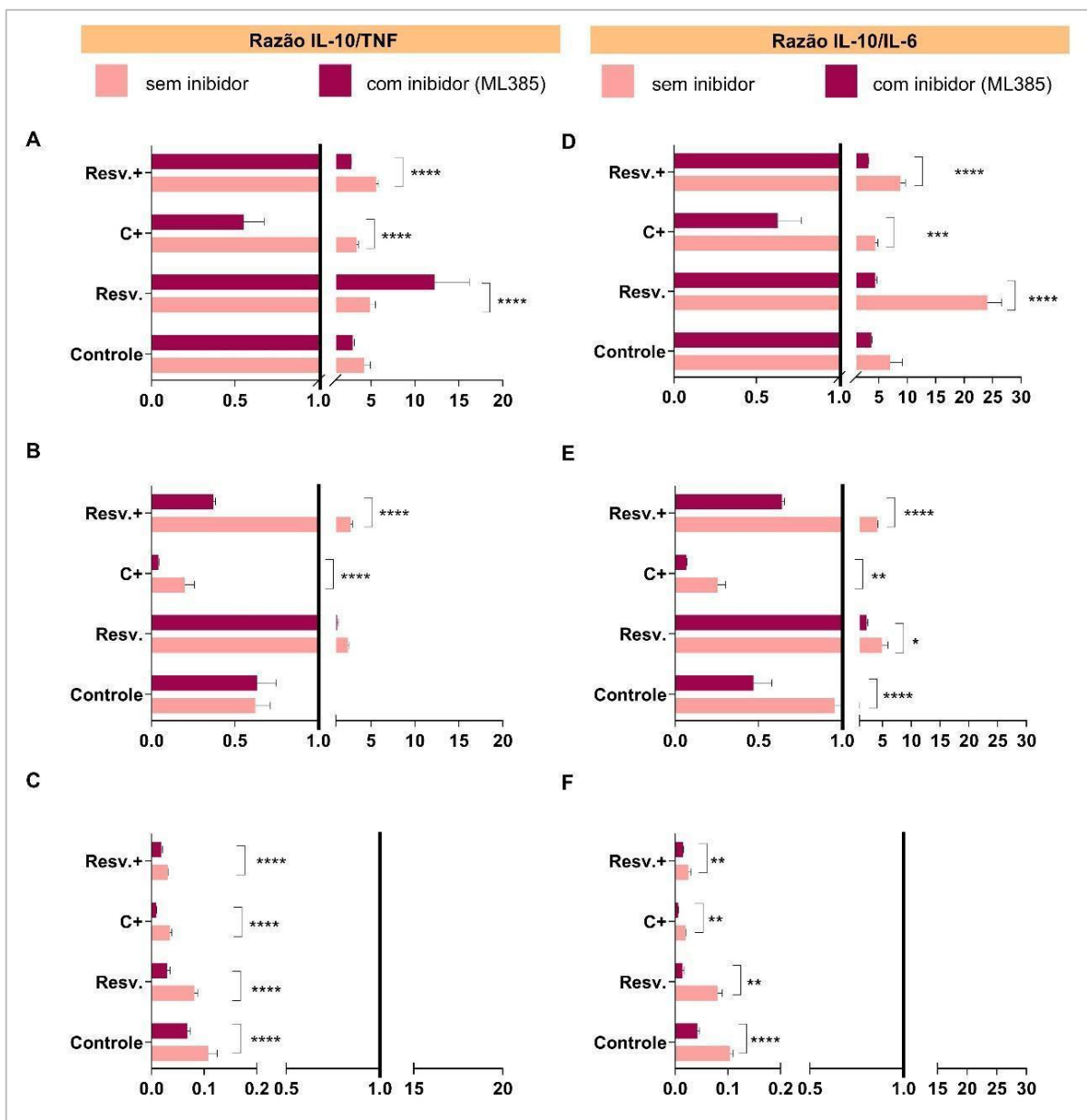
**Figura 43.** Avaliação da via Nrf2 na produção de IL-10 em leucócitos tratados com resveratrol em diferentes faixas etárias. (A) 20 a 39 anos, (B) 40 a 59 anos e (C) 60 a 80 anos. Sendo  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  e  $****p < 0,0001$  comparando o tratamento na ausência vs presença do inibidor. Os resultados foram significativos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ANOVA unidirecional e pós-teste de Dunnett ( $n=6$ /grupo).

A análise do perfil inflamatório dos leucócitos nas diferentes condições de tratamento foi medida pela razão entre as citocinas IL-10/TNF e IL-10/IL-6, respectivamente (**Figura 44**). Cabe destacar que valores maiores que 1 indicam perfil anti-inflamatório, pois há maior concentração de IL-10. Por outro lado, uma relação inferior a 1 indica um perfil mais pró-inflamatório, pois há maior concentração das citocinas TNF ou IL-6.

Analisando essas proporções nos leucócitos de doadores entre 20-39 anos, foi observado um perfil anti-inflamatório em todos os tratamentos ( $>1$ ). No tratamento apenas com Resv. foi observado perfil anti-inflamatório na presença de ML385 em comparação ao grupo sem inibidor, enquanto houve diminuição do perfil anti-inflamatório no grupo C+ (com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e Resv+ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Resv) quando comparado ao mesmo grupo com adição do inibidor (**Figura 44A** e **Figura 44D**).

Na faixa etária de 40-59 anos, foi observado perfil anti-inflamatório no tratamento apenas com Resv. O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C+) levou a um perfil pró-inflamatório que foi restaurado com a adição de Resv., mas quando a via Nrf2 não foi inibida pelo ML385 (**Figura 44B** e **Figura 44E**).

Na faixa etária de 60-80 anos foi observado um perfil mais pró-inflamatório em todos os tratamentos, característico do envelhecimento. No entanto, os tratamentos nos quais o inibidor foi incluído apresentaram proporções IL-10/TNF ainda mais baixas do que os tratamentos sem adição do inibidor (**Figura 44C** e **Figura 44F**). Isso demonstra que, mesmo com o processo inflamatório no envelhecimento, a via de sinalização celular Nrf2 ainda é importante no contexto anti-inflamatório. Isso ocorre tanto nos níveis basais quanto com o tratamento dos leucócitos com o resveratrol.



**Figura 44.** Análise do perfil anti-inflamatório do resveratrol na ausência e presença do inibidor da via Nrf2. Razão IL-10/TNF (A) 20-39, (B) 40-59 e (C) 60-80 anos; Razão IL-10/IL-6 (A) 20-39, (B) 40-59 e (C) 60-80 anos. O perfil inflamatório foi avaliado como a razão entre os níveis de IL-10 (citocinas anti-inflamatórias) divididos por TNF e IL-6 (citocinas pró-inflamatórias), respectivamente. C (controle), RSV (resveratrol), C+ (grupo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e Resv+ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+resveratrol). Sendo \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 pelo teste pós-ANOVA de Tukey (n=6/grupo).

Por fim, para avaliar a influência do envelhecimento nos níveis das citocinas, foram realizadas as correlações de Pearson (r). Na **Tabela 20** é possível observar uma correlação positiva e significativa nos valores de TNF e IL-6 em todos os tratamentos: Controle, Resv.,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resv. Isto ocorreu tanto nos tratamentos sem inibidor quanto com adição de ML385. Ou seja, o envelhecimento aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias ( $r>0$ ) e o resveratrol, apesar de reduzir os níveis dessas citocinas em diversas situações, não foi capaz de restaurar os valores observados nos leucócitos dos indivíduos mais jovens. Quanto à IL-10, foram observadas correlações negativas e significativas em todos os tratamentos, com e sem o inibidor. Assim, com o envelhecimento, houve diminuição da secreção dessa importante citocina anti-inflamatória. Como visto nos resultados anteriores, o resveratrol atua aumentando os níveis de IL-10, mas a correlação mostra que os valores são menores nos leucócitos de indivíduos mais velhos quando comparados aos leucócitos de indivíduos mais jovens.

**Tabela 20.** Correlação de Pearson dos tratamentos sem e com inibidor da via Nrf2.

TNF	Valor de r   p valor	
	Sem inibidor	ML385 inibidor
Controle	0,8443   ***<0,001	0,8327   ***<0,001
Resv	0,8823   ***<0,001	0,7604   ***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,8691   ***<0,001	0,7101   ***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv	0,786   ***<0,001	0,9442   ***<0,001

IL-6	Valor de r   p valor	
	Sem inibidor	ML385 inibidor
Controle	0,8291   ***<0,001	0,8410   ***<0,001
Resv	0,8309   ***<0,001	0,7599   ***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,8445   ***<0,001	0,8135   ***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv	0,8062   ***<0,001	0,8612   ***<0,001

IL-10	Valor de r   p valor	
	Sem inibidor	ML385 inibidor
Controle	-0,8453   ***<0,001	-0,8958   ***<0,001
Resv	-0,9418   ***<0,001	-0,9216   ***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,8763   ***<0,001	-0,8622   ***<0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Resv	-0,9299   ***<0,001	-0,9397   ***<0,001

A correlação de Pearson (r) foi realizada a partir da comparação entre a idade do paciente em que foram obtidos os leucócitos (expressa em anos) e o valor quantificado da respectiva citocina (ng/mL) em determinado tratamento, seja quando a via Nrf2 é ativada ou quando é inibida pela adição de ML385.

## DISCUSSÃO

---

---



## 6. DISCUSSÃO

O objetivo do nosso estudo foi verificar se a ação antioxidante e anti-inflamatória do resveratrol permanece a mesma em leucócitos isolados de indivíduos de diferentes idades. Avaliando a capacidade antioxidante do resveratrol, observamos que o composto apresentou atividade antioxidante e anti-inflamatória em todas as faixas etárias. Porém, o composto agiu de forma menos eficiente ao longo do processo de envelhecimento. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre dois fatores: o aumento na produção de ROS/RNS concomitantemente à diminuição das defesas antioxidantes. Esse processo está envolvido na “Teoria dos Radicais Livres do Envelhecimento”, e também no processo conhecido por “*Oxi-inflamm-aging*” (MARTÍNEZ *et al.*, 2021). Além disso, o estresse oxidativo também está relacionado a diversas doenças crônicas e, juntamente com a inflamação crônica, contribuiu para a sarcopenia e para a fragilidade na população idosa (LIGUORI *et al.*, 2018).

LUNA e colaboradores (2009) observaram que o resveratrol diminuiu a produção de ROS nas células da malha trabecular quando expostas a um ambiente oxidativo. Embora a literatura disponível sobre este composto seja muito abundante, os ensaios, especialmente aqueles relacionados com idosos e envelhecimento, ainda são escassos (KURSVIETIENE *et al.*, 2016). Porém, alguns estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa já demonstraram que há perda da capacidade antioxidante do resveratrol ao longo do processo de envelhecimento (assim como os dados observados na **Tabela 7**), quando PBMCs (células mononucleares do sangue periférico humano) de indivíduos com idade entre 40-80 anos foram tratados com resveratrol e submetidos ao ensaio de quimioluminescência dependente de luminol (CADEIRA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021).

Dentre as RNS, NO e ONOO<sup>-</sup> merecem destaque. O NO atua no relaxamento do endotélio, uma molécula sinalizadora fundamental que regula inúmeras funções celulares críticas, bem como um potente mediador de danos celulares em uma ampla gama de condições. Porém, na presença de espécies reativas (principalmente o radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o NO pode ser convertido em ONOO<sup>-</sup>, um dos RNS mais nocivos às células, podendo danificar a membrana plasmática, organelas e aumentar a taxa de morte celular. No caso do envelhecimento, observa-se uma disfunção endotelial, com diminuição de NO, o que contribui para o aumento de ONOO<sup>-</sup> (PACHER *et al.*, 2007; VAN DER LOO *et al.*, 2000).

Cabe ressaltarmos que o efeito do resveratrol sobre essas duas moléculas se mostrou menos eficaz quando comparado aos dados de ROS pelo ensaio com a sonda fluorescente e

pelo ensaio de quimioluminescência (**Figura 33**). Além disso, a adição de  $H_2O_2$  não afetou os níveis de NO. Esses resultados têm sido observados pelo nosso laboratório, em estudos por meio de diferentes modelos. É importante destacarmos que a principal enzima que sintetiza NO em leucócitos é a i-NOS (Óxido Nítrico Sintase induzível), ou seja, ela não é expressa em condições normais (DUSSE *et al.*, 2003). Nossa hipótese é de que a resposta das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são diferentes em uma mesma condição de tratamento: alterações nos níveis de ROS são muito mais rápidas do que de RNS, além de responderem melhor ao estímulo com  $H_2O_2$  (MEO *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2003). Existem estudos demonstrando que outros compostos são utilizados para estimular ou inibir a produção de NO (como lipopolissacarídeos e  $IFN-\gamma$ ). Além disso, OLAS e colaboradores (2018) citam que análogos do resveratrol foram mais eficazes em reduzir a produção de  $ONOO^-$  do que o próprio resveratrol. De toda forma, nossos dados mostraram que o resveratrol atuou aumentando a biodisponibilidade do NO quando estimulados com  $H_2O_2$  e parece prevenir a sua inativação e consequente formação de  $ONOO^-$  mediada por  $O_2^-$ .

HOLTHOFF e colaboradores (2010) mostraram que o resveratrol serve como substrato para a oxidação do  $ONOO^-$ , auxiliando na sua eliminação. Os produtos e dímeros de nitração do resveratrol foram detectados por cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem por *electrospray*. Os dados dos autores também mostraram que o resveratrol foi capaz de fornecer proteção funcional às células tubulares renais, eliminando diretamente o peroxinitrito.

Também analisamos a influência deste polifenol na atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx (**Figura 34**). Está descrito na literatura que um dos mecanismos de ação do resveratrol é a sua capacidade de promover a atividade de muitas dessas enzimas (LASTRA *et al.*, 2007). Nossos resultados confirmaram estas descobertas. Porém, a ação do resveratrol foi diferente ao longo do processo de envelhecimento. Segundo IGHODARO e colaboradores (2018), as células respondem ao desafio oxidativo com indução seletiva de enzimas antioxidantes. Os autores afirmam ainda que não há consenso na literatura sobre o padrão das enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo. Provavelmente está relacionado ao modelo celular, ao tipo e concentração do agente oxidante e ao tempo de incubação utilizado (que no nosso caso foi de uma hora). Observamos que o resveratrol aumentou a atividade da catalase nas células dos doadores de 20-39 anos, enquanto que nos grupos acima de 40 anos as principais enzimas estimuladas pelo polifenol foram a superóxido dismutase e glutatona peroxidase.

Existem estudos relacionando a atividade dessas enzimas com o envelhecimento. GIERGIEL e colaboradores (2015) observaram aumento da catalase durante o envelhecimento no coração e diafragma bovino. Em contraste, FUJIMOTO e colaboradores (2010) observaram uma redução na atividade mitocondrial de MnSOD em leucócitos humanos com a idade. Em relação ao tratamento com o resveratrol, TRUONG e colaboradores (2018) observaram que houve aumento na expressão de catalase e GPx em segmentos aórticos de ratos concomitante ao aumento na capacidade antioxidante hepática por SOD, catalase e GPx. KAVAS e colaboradores (2013) também observaram aumento na atividade de SOD e catalase em eritrócitos do grupo de ratos wistar em que foi administrado o polifenol. Por fim, CALDEIRA e colaboradores (2021) observaram que o resveratrol aumenta os níveis de SOD (mas não de catalase) em PBMCs de indivíduos com idade entre 60-80 anos em comparação com aqueles com idade entre 40-59 anos, dados que também foram observados em nosso estudo.

Uma importante regulação dessas enzimas ocorre através de algumas vias, que têm a capacidade de culminar na transcrição gênica e na ativação enzimática. Uma hipótese para essa alteração no perfil enzimático observado no envelhecimento poderia ser a alteração na sinalização de algumas dessas vias. Dentre elas, destacam-se as proteínas quinases. Conforme já mencionado, de forma geral as proteínas quinases são enzimas que modificam o substrato através da fosforilação, resultando em alterações na proteína alvo que podem interferir na sua atividade, localização ou associação com outras proteínas. Além disso, elas participam de eventos chaves do metabolismo celular, transcrição gênica, replicação e apoptose. A fosforilação pelas proteínas quinases é conhecida por ser um dos principais mecanismos pelos quais a atividade celular é controlada. Entre as vias mais estudadas que regulam o metabolismo estão PKA, AKT/PKB, AMPK e p38-MAPK (HANKS, 2003).

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa mostrou que o aumento do estresse oxidativo durante o envelhecimento é acompanhado por alterações em algumas dessas vias metabólicas (CHAVES *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013). A PKA, por exemplo, tornou-se de grande interesse para o estudo do envelhecimento. Sabe-se que mutações que afetam a sinalização de PKA também afetam a incidência e a gravidade de doenças relacionadas à idade, levando ao emagrecimento e envelhecimento precoce em estudo com camundongos (HSIEH *et al.*, 2004). Em adição, ENNS e colaboradores (2010) observaram que a fosforilação e ativação da AKT/PKB está diminuída em camundongos Snell, estando relacionada à sua longevidade. Esse fato também foi observado em nossos resultados, com silenciamento dessa via nos leucócitos de doadores a partir de 60 anos (**Figura 35**). Estudos descrevem um mecanismo que

liga as espécies reativas de oxigênio geradas nas mitocôndrias à ativação de fenótipos de envelhecimento induzido por estresse que regulam a atividade da via p38-MAPK e seus alvos a jusante de senescência e envelhecimento, como p16, p19, TNF, JNK. Estes estudos sugerem que o desenvolvimento de certas doenças de cunho oxidativo está ligado à via p38-MAPK e a senescência é regulada pela p38-MAPK em células endoteliais humanas. Os resultados mostram que a maioria de ROS gerados com a progressão da idade se originam da disfunção mitocondrial e que as vias p38-MAPK e JNK são ativadas durante esse processo (PAPACONSTANTINO, 2019). Importante destacarmos que das vias das proteínas quinases estudadas, a única que permaneceu ativa durante todas as faixas etárias foi justamente a via da p38MAPK (**Figura 37**).

NOGUEIRA-MACHADO e colaboradores (2006) demonstraram o efeito antioxidante das vias PKA, AKT/PKB e MAPK em granulócitos de indivíduos com diabetes tipo 1 e 2. Os resultados mostraram que a elevação intracelular de AMPc induziu a inibição da produção de ROS dependente de PKA e independente de AKT/PKB em granulócitos de indivíduos saudáveis, mas houve produção significativa de ROS em células de pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2. A geração das espécies reativas em células de pacientes diabéticos mostrou ser dependente de AKT/PKB e independente de PKA. CHAVES e colaboradores (2007) avaliaram possíveis alterações na via de sinalização de PKA e p38-MAPK na geração de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos durante o processo de envelhecimento. Os resultados demonstraram um aumento de ROS em granulócitos de indivíduos acima dos 50 anos com o silenciamento de PKA e nos neutrófilos quando a sinalização p38-MAPK foi inibida.

Cabe ressaltarmos que o resveratrol tem a capacidade de ativar diversas dessas vias que culminam em seu efeito antioxidante (REN *et al.*, 2019). A via SIRT1 é uma das mais descritas como responsável pelos efeitos do resveratrol. Conforme mencionado na introdução, SIRT1 é uma histona desacetilase capaz de regular vários fatores-chave capazes de promover a transcrição de vários genes, incluindo o das enzimas antioxidantes (CHANG *et al.*, 2014, CHEN *et al.*, 2013). Observamos que essa via está ativa nas duas primeiras faixas etárias estudadas, sendo uma das responsáveis pelo efeito antioxidante do resveratrol. Entretanto, se mostrou silenciada a partir dos 60 anos (**Figura 36**). BORRA e colaboradores (2005) observaram aumento na expressão de SIRT1 em células tratadas com resveratrol, enquanto LI e colaboradores (2004) demonstraram que a ativação de SIRT1 é capaz de promover aumento na atividade do complexo antioxidante enzimático. Além disso, já foi demonstrado que o resveratrol aumenta a expectativa de vida em modelos de organismos através de uma via

dependente das sirtuínas (BORRA *et al.*, 2005). Isso destaca a importância dessa via sobre os mecanismos antioxidantes do resveratrol, com destaque para as que observamos nas faixas etárias iniciais.

A análise por Western blot revela que o resveratrol aumenta a fosforilação de AKT/PKB e, em menor grau, da proteína quinase regulada por sinal extracelular ativada por mitógeno (ERK), um tipo de MAPK. Este efeito foi relacionado de maneira dose-dependente (HAIDER *et al.*, 2002). SANTOS e colaboradores (2021) observaram que ao inibir as vias de sinalização PKA, AKT/PKB e p38-MAPK, o resveratrol apresentou atuação alterada no processo de envelhecimento, alterando o padrão de sinalização dessas vias. Houve um silenciamento das vias PKA e AKT/PKB, enquanto a via p38-MAPK se comportou como antioxidante na meia-idade e pró-oxidante no grupo de idosos.

Outra via quinase estudada foi a da AMPK. Sabe-se que a AMPK estimula a produção de energia a partir de glicose e ácidos graxos durante o estresse e inibe o consumo de energia para síntese de proteínas, colesterol e glicogênio. Porém, existem inúmeros estudos indicando que a função da AMPK não se restringe à manutenção do metabolismo energético, mas pode coordenar vários outros mecanismos, como por exemplo, autofagocitose de estruturas danificadas e redução do estresse oxidativo (MIHAYLOVA *et al.*, 2011). A ativação da AMPK reduz esse estresse ao regular positivamente a expressão da tioredoxina (LI *et al.*, 2009). Além disso, a atividade da AMPK pode reduzir o estresse do retículo endoplasmático (DONG *et al.*, 2010) e distúrbios inflamatórios (SALMINEN *et al.*, 2011). Curiosamente, estas são as características que são afetadas pelo envelhecimento, conforme já mencionado. Os nossos resultados mostraram que essa via é silenciada nos leucócitos de doadores acima de 60 anos (**Figura 36**). Estas observações e os dados disponíveis na literatura implicam que a capacidade de ativação da AMPK diminui com a idade. Estudos recentes confirmaram que a capacidade de resposta da AMPK a diferentes estímulos é claramente silenciada com o passar dos anos. Como a AMPK coordena uma grande rede de sinalização de fatores de transcrição, ela se torna uma via chave de estudo em compostos que possam promover um envelhecimento saudável (SALMINEN *et al.*, 2011).

HAN e colaboradores (2016) observaram que a AMPK é silenciada em células senescentes. No entanto, a ativação farmacológica da AMPK por metformina e berberina preveniu significativamente o desenvolvimento da senescência e, conseqüentemente, a via permaneceu ativada. O estudo ainda mostra que a ativação da AMPK evitou o

comprometimento do fluxo autofágico induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células senescentes, evidenciado pela diminuição da degradação da p62 e atividade das hidrolases lisossômicas. Descobriu-se também que a ativação da AMPK restaura os níveis de NAD (+) nas células senescentes. Além disso, foram avaliadas a relação do mecanismo do fluxo autofágico e da síntese de NAD (+) e o envolvimento das atividades das vias mTOR e SIRT1. Em resumo, os resultados mostraram que, quando a AMPK é ativada, previne-se a senescência induzida pelo estresse oxidativo, melhorando o fluxo autofágico e a homeostase do NAD (+), mecanismos chaves do envelhecimento.

Estudos sobre como o resveratrol ativa a AMPK leva a conclusões diferentes e muitas vezes conflitantes. HAWLEY e colaboradores (2010) relataram que em alta concentração (100–300 µM), o resveratrol diminui os níveis de ATP em uma linhagem celular que expressava uma subunidade  $\gamma$  mutada da AMPK. Isto sugeriu que o resveratrol, em altas concentrações, ativa a AMPK diminuindo a energia das células e aumentando as razões AMP/ATP ou ADP/ATP. No entanto, a literatura também mostra que o resveratrol pode ativar a AMPK em uma concentração inferior a 10 µM (DASGUPTA *et al.*, 2007; FEIGE *et al.*, 2008), concentração utilizada em nosso estudo. Em baixas concentrações ( $\leq 50$  µM), o resveratrol parece ativar a AMPK sem diminuir a energia das células. Como o nível plasmático após a administração oral de resveratrol é baixo, o mecanismo pelo qual o resveratrol ativa a AMPK em concentrações fisiologicamente relevantes provavelmente não envolve a diminuição de energia (PARK *et al.*, 2012).

Já em relação ao envelhecimento, nosso estudo observou um silenciamento da via, com consequente perda da capacidade do resveratrol em ativá-la. Entretanto, HUANG e colaboradores (2019) observaram que o resveratrol evitou a perda de massa muscular e inibiu o acúmulo excessivo de gordura durante o envelhecimento. *In vitro*, o resveratrol inibiu as reduções no conteúdo da cadeia pesada da miosina nas células musculares. Além disso, o resveratrol melhorou a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo, levando a uma melhora no metabolismo proteico e contribuindo para a prevenção da atrofia muscular. Além disso, os efeitos protetores do resveratrol na função mitocondrial, estresse oxidativo e atrofia muscular foram silenciados pela transfecção *in vitro* de siRNA da PKA, siRNA da LKB1 e siRNA da AMPK nessas células.

Porém, nossos resultados mostraram um silenciamento das quinases PKA, AKT/PKB e AMPK e da SIRT1 no envelhecimento, quando os leucócitos são tratados com resveratrol.

Mesmo com o silenciamento, algumas outras vias de proteínas quinases são responsáveis por promover a atividade dessas enzimas. GAITANAKI e colaboradores (2006) demonstraram um aumento na SOD e catalase concomitante com a ativação do p38MAPK. Entretanto, o resveratrol também foi capaz de fosforilar e ativar AMPK e AKT/PKB em estudos *in vitro* e *in vivo* (PRICE *et al.*, 2012). Além disso, o resveratrol também ativa a PKA, uma via relacionada ao aumento dos níveis de AMPc (TENNEN *et al.*, 2012). Cabe ressaltarmos que em nosso estudo a ativação dessas três vias de proteínas quinases ocorreu apenas nos leucócitos de doadores de 20-59 anos, sendo a MAPK prevalecendo em todas as faixas-etárias dos leucócitos estudados.

Cabe destacarmos que em nosso estudo a principal via que orquestrou os efeitos antioxidantes do resveratrol no envelhecimento foi a via Nrf2, dados mostrados pelo aumento de ROS com inibição da via no ensaio de quimioluminescência, aumento da ativação gênica (via luciferase) e aumento da expressão proteica de Nrf2 fosforilada pela técnica de ELISA (**Figuras 37-41**).

Muitos estudos apontaram para a importância da via Nrf2 no contexto antioxidante. Conforme mencionado anteriormente, o Nrf2 é uma proteína que se liga a uma sequência específica de DNA chamada Elemento de Resposta Antioxidante (ARE), encontrada na região promotora de vários genes que estão envolvidos na transcrição de enzimas antioxidantes como SOD e GPx (KIM *et al.*, 2018). Nossa hipótese é que o resveratrol, via ativação de Nrf2, possa melhorar as condições relacionadas ao envelhecimento, como o aumento do estresse oxidativo relacionado à idade e disfunção mitocondrial.

Nesse contexto, KIM e colaboradores (2010) relataram que resveratrol tem um impacto protetor contra danos renais em camundongos C57BL/6 idosos. O polifenol melhorou a função renal, as alterações histopatológicas e a inflamação em camundongos idosos por meio da ativação da sinalização de Nrf2/HO-1. A heme oxigenase-1 (HO-1) degrada o grupo heme em monóxido de carbono, ferro livre e biliverdina, sendo esta última posteriormente degradada em bilirrubina, que possui propriedades antioxidantes. A atividade de HO-1 é induzida em resposta a estresse oxidativo, por exemplo através de Nrf-2 (HAM *et al.*, 2012).

FISCHER e colaboradores (2017) indicaram que os análogos sintéticos do resveratrol aumentaram a longevidade de *Caenorhabditis elegans* através da diminuição na produção e acúmulo de ROS na presença de SIRT2. Além disso, o tratamento de células musculares lisas vasculares envelhecidas (VSMCs) com resveratrol (1µM) inibiu a via do NF-κB induzida pelo

envelhecimento e diminuiu a geração de ROS mitocondrial através da ativação de Nrf2 nessa linhagem celular. O impacto inibitório do resveratrol nos mediadores oxidativos indicou seu efeito antioxidante via Nrf2 em modelos animais de envelhecimento.

De forma geral, a via Nrf2 possui uma função crítica na modulação de respostas inflamatórias e estresse oxidativo, bem como na síntese, metabolismo e degradação de proteínas, lipídeos e carboidratos. A regulação de Nrf2 é essencial para manter a homeostase da função celular e inibir a progressão de diversas condições patológicas. A ativação dessa via exerce atividades neuroprotetoras, cardioprotetoras, renoprotetoras, hepatoprotetoras, anti-diabéticas, anti-obesidade, antitumorais e sobretudo, anti-envelhecimento. O resveratrol também tem um efeito protetor nas doenças respiratórias, infecções e doenças do sistema imunológico, justamente pela sua capacidade em ativar a atividade transcricional de Nrf2. O ensaio da luciferase comprovou que o resveratrol exerce um efeito positivo na ativação da via (**Figura 39**). Esse polifenol potencializa a expressão desse importante fator de transcrição através da dissociação da ligação Nrf2-Keap1, aumentando a translocação de Nrf2-p para o núcleo. O resveratrol dissocia as ligações entre Nrf2-Keap1 via estimulação de p38-MAPK e da sinalização SIRT1/FOXO1. Ou seja, o resveratrol aumenta a expressão de Nrf2-p através da supressão sua sinalização inibitória Nrf2-Keap1 (FARKHONDEH *et al.*, 2020).

Com o aumento da expectativa de vida e a porcentagem crescente de indivíduos idosos na população em geral, compreender porque o envelhecimento resulta numa suscetibilidade maior à morbidade crônica, incapacidade e fragilidade tornou-se uma prioridade de saúde pública. Isso decorre da observação de que organismos mais velhos tendem a desenvolver um estado pró-inflamatório, caracterizado por altos níveis de marcadores pró-inflamatórios em células e tecidos, uma condição frequentemente denominada *inflammaging*, termo cunhado pela primeira vez nos anos 2000 por Claudio Franceschi. O estado pró-inflamatório é caracterizado por altos níveis circulantes de marcadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1, proteína antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RN), IL-6, IL-8, IL-13, IL-18, Proteína C reativa (PCR), IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF $\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e seus receptores solúveis (membros da superfamília do receptor de TNF 1A e 1B) e proteína soro amiloide (FERRUCCI *et al.*, 2018).

Nosso estudo demonstrou que o resveratrol teve efeito anti-inflamatório quando estudado em leucócitos de doadores entre 20-80 anos (**Tabela 18**). Esse efeito foi observado pela diminuição de TNF e IL-6 concomitante ao aumento dos níveis de IL-10. Ressalta-se que



os dados de correlação, porém, mostram um declínio da ação anti-inflamatória deste composto durante o envelhecimento. Como já mencionado, são inúmeros os estudos que já estabeleceram que uma das características do envelhecimento é a instalação de um processo inflamatório crônico, de baixo grau (PILKINGTON *et al.*, 2021; FRANCESCHI *et al.*, 2014).

OLESEN e colaboradores (2013) investigaram o papel do treinamento físico e da suplementação de resveratrol na prevenção da inflamação de baixo grau associada à idade. Tanto o treinamento físico quanto o uso de resveratrol preveniram um aumento da inflamação associada à idade, conforme observado pela diminuição dos níveis sistêmicos de IL-6 e da adiposidade em camundongos Wistar mais velhos. GINÉS e colaboradores (2017) analisaram os efeitos da inflamação, estresse oxidativo e apoptose no pâncreas de dois diferentes tipos de camundongos com senescência acelerada tratados com o polifenol (5mg/kg/dia). O resveratrol foi capaz de modular o estado inflamatório, oxidativo e apoptótico relacionado ao envelhecimento, exercendo assim um efeito protetor sobre os danos induzidos pela idade no pâncreas, bem como diminuindo a expressão de genes pró-inflamatórios e reduzindo a liberação de citocinas inflamatórias associadas à idade. Nesse estudo, foi observada uma diminuição de TNF e IL-1 $\beta$ , concomitante ao aumento de IL-10.

BELLAVER e colaboradores (2014) também observaram uma diminuição das defesas antioxidantes e aumento da resposta inflamatória em astrócitos do hipocampo de ratos adultos e idosos em comparação com culturas clássicas de astrócitos de ratos recém-nascidos. Porém, o resveratrol preveniu esses efeitos, diminuindo principalmente os níveis de TNF e IL-1 $\beta$ .

Múltiplas linhas de pesquisa, tanto *in vivo* como *in vitro*, mostram que as propriedades anti-inflamatórias do resveratrol podem ser explicadas através da inibição da produção de fatores pró-inflamatórios (PILKINGTON *et al.*, 2021; FRANCESCHI *et al.*, 2014). Nosso estudo mostrou isso através da diminuição de TNF e IL-6 e aumento de IL-10 nos leucócitos de todas as faixas etárias. Um estudo de MENG e colaboradores (2021) mostrou que resveratrol suprimiu a proliferação de células do baço induzida pela concanavalina A (ConA), IL-2 ou alo-antígenos, além de prevenir de forma mais eficaz a produção de IL-2 e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) pelos linfócitos e macrófagos. Descobriu-se ainda que o resveratrol induz uma supressão dependente da dose na produção de IL-1, IL-6 e TNF e regula negativamente a expressão de mRNA e a secreção de IL-17 *in vitro*.

Diversas outras vias de sinalização celular também são responsáveis pelo processo inflamatório. XU e colaboradores (2018) mostram que o resveratrol inibe a via de sinalização

do NF- $\kappa$ B, via chave responsável pelo aumento da inflamação. Essa inibição ocorre através da ativação de linfócitos, macrófagos e outras células do sistema imunológico. No entanto, o efeito do resveratrol na inibição desta via também foi descrito como prejudicado no envelhecimento (LI *et al.*, 2021).

Uma via que demonstrou ativar tanto a resposta antioxidante (já discutido anteriormente) e anti-inflamatória do resveratrol é a via Nrf2. Vários estudos demonstraram que o Nrf2 contribui para o processo anti-inflamatório, orquestrando o recrutamento de células do sistema imune (**Figura 42 e 43**). A via de sinalização Keap1/Nrf2/ARE regula principalmente a expressão gênica anti-inflamatória e inibe a progressão da inflamação no envelhecimento (SCHMIDLIN *et al.*, 2019; MATSUMARU *et al.*, 2021). Esse achado da literatura é reforçado com os nossos resultados, uma vez que o efeito anti-inflamatório do resveratrol diminui quando é adicionado um inibidor específico desta via de sinalização celular (grupos ML385+).

Foi relatado que a ativação de Nrf2 previne a regulação positiva transcricional de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS, incluindo IL-6 e IL-1 $\beta$ . A produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 também foi aumentada em camundongos Nrf2  $-/-$  com colite induzida por sulfato de dextrana. Em adição, Nrf2 inibe a produção de IL-17 a jusante e outros fatores inflamatórios das subpopulações de linfócitos Th1 e Th17 e suprime o processo da doença em um modelo experimental de esclerose múltipla. Os genes antioxidantes dependentes de Nrf2, como o já mencionado HO-1 e outros, como NQO-1, Gclc e Gclm bloqueiam TNF, IL-6, proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP1), proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP2) e outros mediadores inflamatórios. Além disso, a expressão de HO-1 dependente de Nrf2 também diminuiu a ativação de NF- $\kappa$ B e a secreção de MCP-1 estimulada por TNF em células endoteliais da veia umbilical humana. Essas descobertas sugerem que, em resposta a estímulos inflamatórios, a regulação positiva da sinalização Nrf2 inibe a superprodução de citocinas pró-inflamatórias (AHMED *et al.*, 2017).

KIM e colaboradores (2018) examinaram se o resveratrol poderia potencialmente melhorar o estresse oxidativo celular e a disfunção mitocondrial causada pelo envelhecimento. Observou-se que o polifenol melhora a função renal, proteinúria, alterações histológicas e inflamação em camundongos idosos. Além disso, a ativação de Nrf2 foi aumentada no grupo tratado com resveratrol. WANG e colaboradores (2020) observaram que a administração de resveratrol aumentou as porcentagens dos subgrupos CD3 + CD4 $+/$ CD3 + CD8 $+$  e a produção

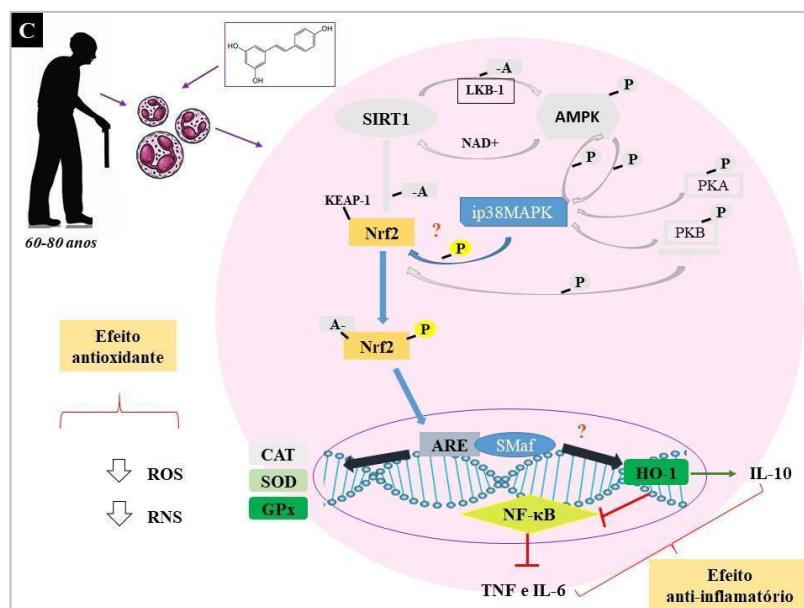
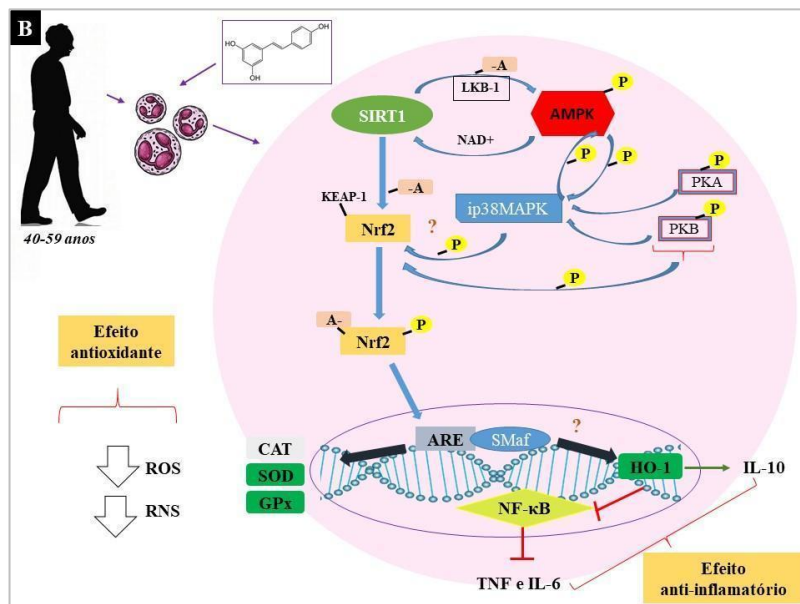
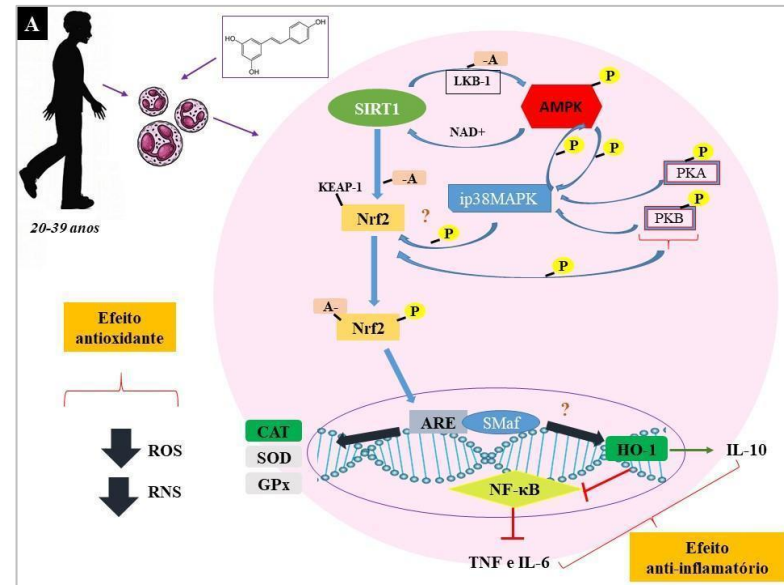
de células T reguladoras (Tregs) após 13 e 26 semanas de suplementação, respectivamente. O resveratrol ativou a expressão de enzimas antioxidantes mediada pela via de sinalização Nrf2 para reduzir a inflamação, protegendo contra o dano oxidativo e a resposta inflamatória crônica relacionada aos subconjuntos de linfócitos T.

Por fim, a **Tabela 21** e a **Figura 45** mostram um resumo dos principais achados do nosso estudo. Nota-se que o resveratrol apresentou um potencial antioxidante e anti-inflamatório, sobretudo através da ativação de Nrf2. Conforme citado ao longo da discussão, esse fato também é observado em inúmeros trabalhos da literatura.

**Tabela 21.** Avaliação comparativa do efeito do resveratrol ao longo do envelhecimento.

Parâmetro	Faixa-etária			Correlação (tratamento/idade)
	20-39 anos	40-59 anos	60-80 anos	
Produção de ROS	↓	↓	↓	positiva e significativa
Produção de NO	↑	↑	↑	Ns
Produção de ONOO-	↓	↓	↓	Ns
Atividade de CAT	↑	-	-	positiva e significativa
Atividade de SOD	-	↑	↑	positiva e significativa
Atividade de GPx	-	↑	↑	positiva e significativa
Atuação sobre PKA	+	+	-	ns
Atuação sobre PKB	+	+	-	negativa e signitiva
Atuação sobre AMPK	+	+	-	ns
Atuação sobre MAPK	+	+	+	ns
Atuação sobre SIRT1	+	+	-	negativa e significativa
Atuação sobre Nrf2	+	+	+	ns
Ativação de Nrf2	↑	↑	↑	positiva e significativa
p-Nrf2	↑	↑	↑	negativa e significativa
TNF	↓	↓	↓	positiva e significativa
IL-6	↓	↓	↓	positiva e significativa
IL-10	↑	↑	↑	negativa e significativa
Nrf2 com atuação anti-inflamatória	sim	sim	sim	na

↑ aumento, ↓ diminuição, +: atuou sobre a via, -: não atuou sobre a via e ns: correlação não significativa, na: não se aplica o teste de correlação.



**Figura 45.** Proposta de interação entre as principais vias de transdução de sinais responsáveis pelo efeito antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol ao longo do envelhecimento. Nossa hipótese (representada por “?”) é de que as vias AMPK, PKA, AKT/PKB, p38MAPK e SIRT1 são responsáveis pela ativação de Nrf2 (sendo SIRT1 por desacetilação e AMPK, PKA, AKT/PKB e p38MAPK por fosforilação), que vai para o núcleo onde se dimeriza com membros da pequena família Maf e se liga a genes ARE (Elementos de Resposta Antioxidante) como o HO-1, ao mesmo tempo em que inibe a via chave inflamatória NFκB. Ao longo do envelhecimento algumas vias são silenciadas, que culminam na ativação de diferentes enzimas antioxidantes e diminuem o efeito antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol. São elas: 20-39 anos (A) a principal enzima ativada é a CAT, enquanto em 40-59 anos (B) as principais são SOD e GPx (representadas em verde). Em indivíduos acima de 60 anos (C), nossa hipótese é de que ocorre o silenciamento das vias AMPK, PKA, AKT/PKB e SIRT1 (representadas em cinza), diminuindo o efeito antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol (ainda presente, devido a via do Nrf2 continuar ativa via fosforilação através da MAPK). Sendo LKB-1 (Serina-Treonina-cinase-1), NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), KEAP-1 (Proteína 1 associada à ECH, inibidor citoplasmático de Nrf2), P (fosforilação) e -A/A- (desacetilação). Adaptado de LEE *et al.*, 2013; LEEM *et al.*, 2016; PRICE *et al.*, 2012.

## CONCLUSÃO

---

---

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que em leucócitos de doadores acima de 60 anos, o resveratrol é capaz de ativar a MAPK, que fosforila e ativa o fator de transcrição Nrf2, promovendo a síntese e atividade de importantes enzimas antioxidantes e citocinas anti-inflamatórias. Tais achados podem auxiliar em futuras pesquisas sobre os efeitos benéficos deste polifenol nas suas mais diversas ações biológicas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S. M. U. *et al.* Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica**, v. 1863, p. 585-597, 2017.
- ANERILLAS, C.; ABDELMOHSEN, K.; GOROSPE, M. Regulation of senescence traits by MAPKs". **GeroScience**, v.42, p.397-408, 2020.
- APOSTOLOVA, N. *et al.* Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. **Redox Biol.**, v.34, p. 101517, 2020.
- AUCIELLO, F.R. *et al.* Oxidative stress activates AMPK in cultured cells primarily by increasing cellular AMP and/or ADP. **FEBS Lett.**, v.588, p.3361-6, 2014.
- BARBOSA, E. *et al.* Efeito da suplementação de vitamina E, vitamina C e zinco no estresse oxidativo e no tempo de reepitelização em pacientes pediátricos queimados. 2006.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Rev Drug Discov.**, v.6, p.493-506, 2006.
- BELLAVER, B. *et al.* Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. **Toxicol In Vitro**, v.28, p.479-84, 2014.
- BIGAGLI, E. *et al.* Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Int Immunopharmacol.**, v.43, p.147-155, 2017.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Privation Stress: a Review, **Annals of Botany**, v.91, n.2, p.179-194, 2003.
- BORRA, M.T.; SMITH, B.C.; DENU, J.M. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. **J Biol Chem.**, v.280, 17187-95, 2005.
- BULDAK, L. *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, p.418-429, 2014.
- BULLONE, M.; LAVOIE, J. P. The Contribution of Oxidative Stress and Inflamm- Aging in Human and Equine Asthma. **International journal of molecular sciences**, v. 18, p. 2612-2635, 2017.
- 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.
- CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v.12, n.26, 2015.

- CANTÓ, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, v.458, p.1056–60, 2009.
- CARDOSO, L.C. *et al.* Alzheimer's alters AMPk signaling pathway and biomarkers of subclinical inflammation in leukocytes stimulated with resveratrol. **International Journal of Development Research**, v.10, n.10, p. 41411-17, 2020.
- 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.
- CHANG, H.C.; GUARENTE, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 25, n.3, p.138–145, 2014.
- CHAVES, M.M. *et al.* Role of inositol 1,4,5-triphosphate and p38 mitogen-activated protein kinase in reactive oxygen species generation by granulocytes in a cyclic AMP-dependent manner: an age-related phenomenon. **Gerontology**, v.53, p.228-33, 2007.
- CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v.14, n.9, p.7204-7218, 2017.
- CHEN, Y.R. *et al.* SIRT1 interacts with metabolic transcription factors in the pancreas of insulin-resistant and calorie-restricted rats. **Mol Biol Rep.**, v.40, n.4, p.3373–3380, 2013.
- CHEN, Q.M. Nrf2 for protection against oxidant generation and mitochondrial damage in cardiac injury. **Free Radic Biol Med.**, v.179, p.133-143, 2022.
- CHONG, Z. Z. *et al.* SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 16, p. 167-178, 2012.
- COUTINHO, A.E.; CHAPMAN, K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol.**, v.335, p. 2-13, 2011.
- COVARRUBIAS, L. *et al.* Function of reactive oxygen species during animal development : Passive or active ?. **Developmental biology**, v. 320, p. 1–11, 2008.
- DANYLOVYCH, G. V.; BOHACH, T. V.; DANYLOVYCH, Y. V. The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. **Ukrainian Biochemical Journal**, v. 90, p. 3–24, 2018.
- DASGUPTA, B.; MILBRANDT, J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.104, p.7217–7222, 2007.
- DE OLIVEIRA, J.R.; CAMARGO, S.E.A.; DE OLIVEIRA, L.D. Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. **J Biomed Sci.**, v.26, p.1-5, 2019.
- DI MEO, S. *et al.* “Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions.” **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.16, p.1245049, 2016.
- DING, Y.W. *et al.* SIRT1 exerts protective effects against paraquat-induced injury in mouse type II alveolar epithelial cells by deacetylating NRF2 in vitro. **Int J Mol Med.** v.37, n.4, p.1049-1058, 2016.

- DIVIANI, D. *et al.* The role of A-kinase anchoring proteins in cardiac oxidative stress. **Biochem Soc Trans.**, v.47, p.1341-1353, 2019.
- DONG, Y. *et al.* Reduction of AMP-activated protein kinase alpha2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. **Circulation**, v.121, p.792-803, 2010.
- DRAG-KOZAK, E. *et al.* Protective effect of melatonin on cadmium-induced changes in some maturation and reproductive parameters of female Prussian carp (*Carassius gibelio* B.). **Environ Sci Pollut Res Int.**, v.25, n.10, p.9915-9927, 2018.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre Óxido Nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003
- ELSTAD, M.R.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. The interaction of leukocytes with platelets in blood coagulation. **Curr Opin Hematol.**, v.2, n.1, p.47-54, 1995.
- EMAMGHOLIPOUR, S.; HOSSEIN-NEZHAD, A.; ANSARI, M. Can Melatonin Act as an Antioxidant in Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress Model in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells? **Biochemistry research international**, 2016.
- ENNS, L.C.; LADIGES, W. Protein kinase A signaling as an anti-aging target. **Ageing Res Rev.**, v. 9, p.269-72, 2010.
- FARKHONDEH, T. *et al.* The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. **Biomed Pharmacother.**, v.127:110234, 2020.
- FATHIMA, S.J.; KHANUM, F. Blood Cells and Leukocyte Culture – A Short Review. **Blood Res Transfus J**, v.1, n.2, 2017.
- FEIGE, J.N. *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. **Cell Metab.**, v.8, p.347–358, 2008.
- FERRUCCI, L.; FABBRIO, E. Inflammaging: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. **Nat Rev Cardiol.**, v.15, p.505–522, 2018.
- FISCHER, N. *et al.* The resveratrol derivatives trans-3,5-dimethoxy-4-fluoro-4'-hydroxystilbene and trans-2,4',5-trihydroxystilbene decrease oxidative stress and prolong lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **J Pharm Pharmacol.**, v.69, p.73-81, 2017.
- FRANÇA, F.D. *et al.* Differential profile of p38 MAPK pathway in chance oxidative stress, nitric oxide production and cell death in llc-pk1 and mdck cells: case of amphotericin b and cyclosporine. **Internacional Journal of Current Research**, v.10, p.74946-54, 2018.
- FRANCESCHI, C. *et al.* Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nat Rev Endocrinol.**, v.14, p.576-590, 2018.
- FRANCESCHI, C., & CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v.69, p.S4–S9, 2014.

- FUJIMOTO, H.; KOBAYASHI, H.; OHNO, M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. **Circ J.**, v.74, p.353-60, 2010.
- GAITANAKI, C. *et al.* Effects of various oxidants and antioxidants on the p38-MAPK signalling pathway in the perfused amphibian heart. **Mol Cell Biochem.**, v.291, p.107-17, 2006.
- GIERGIEL, M. Age-related Changes in Activity of Catalase in Selected Bovine Muscles. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p.1-7, 2015.
- GINÉS, C. *et al.* Protective effect of resveratrol against inflammation, oxidative stress and apoptosis in pancreas of aged SAMP8 mice. **Exp Gerontol.**, v.90, p.61-70, 2017.
- GLADYSHEV, V. N. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, p. 727-731, 2014.
- 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, 1897.
- GU, T. *et al.* Antioxidative Stress Mechanisms behind Resveratrol: A Multidimensional Analysis. **Journal of Food Quality**. v.21, p.1-12, 2021.
- HAIDER, U.G. *et al.* Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. **Mol Pharmacol.**, v.62, p.772-7, 2002.
- HAIGIS, M.C.; SINCLAIR, D.A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. **Annu Rev Pathol.**, v.5, p.253-295, 2010.
- HAM, M. *et al.* Chapter 43 - Gastroduodenal Mucosal Defense. **Physiology of the Gastrointestinal Tract.**, v.1, p.1169-1208, 2012.
- HAN, X. *et al.* AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD(+) elevation. **Aging Cell**, v.15, p.416-27, 2016.
- HANKS, S.K. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. **Genome Biol.**, v.4, p.1-7, 2003.
- HARMAN D. The free radical theory of aging. **Antioxid Redox Signal.**, v.5, p.557-61, 2003.
- HAWLEY, S.A. *et al.* Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. **Cell Metab.**, v.11, p.554-565, 2010.
- HE, Y. *et al.* The role of SIRT3-mediated mitochondrial homeostasis in osteoarthritis. **Cellular and molecular life sciences**, v.77, p.3729-3743, 2020.
- HITZEL J, *et al.* Oxidized phospholipids regulate amino acid metabolism through MTHFD2 to facilitate nucleotide release in endothelial cells. **Nat Commun.**, v.12, n.9, p.2292, 2018.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA damage, Aging and Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 1475-1485, 2009.

- HOLTHOFF, J.H. *et al.* Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. **Biochem Pharmacol.**, v.80, p.1260-5, 2010.
- HONGYAN, Z. *et al.* Resveratrol Alleviates Inflammation and ER Stress Through SIRT1/NRF2 to Delay Ovarian Aging in a Short-Lived Fish, **The Journals of Gerontology**, v.78, p.596–602, 2023.
- HOWITZ, K.T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v.425, p.191–6, 2003.
- HSIEH, C.C.; PAPACONSTANTINOU, J. Akt/PKB and p38 MAPK signaling, translational initiation and longevity in Snell dwarf mouse livers. **Mech Ageing Dev.**, v.125, p.785-98, 2004.
- HUANG K. *et al.* Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating Sirt1 to resist AGEs-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor- $\beta$ 1 in rat glomerular mesangial cells. **Mol Cell Endocrinol.** v.399, p.178-189, 2015.
- HUANG, Y. *et al.* Resveratrol prevents sarcopenic obesity by reversing mitochondrial dysfunction and oxidative stress via the PKA/LKB1/AMPK pathway. **Ageing (Albany NY)**, v.15, p.2217-2240, 2019.
- HUGHES, M.N.; NICKLIN, H.G. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. **Journal of the Chemical Society**, p.450-452, 1968.
- 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, p.287–293, 2018.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests For In Vitro Cytotoxicity. Switzerland: ISO; 2009.
- JALMI, S.K.; SINHA, A.K. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences. **Front Plant Sci.**, v.6, p.769-87, 2015.
- JEONG, C.B. *et al.* Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. **Sci Rep.**, v.24, n.7, p.413-23, 2017.
- JUAN, S. H. *et al.* Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol.**, v.69, n.1, p.41-48, 2005.
- KAVAS, G.O.; AYRAL, P.A.; ELHAN, A.H. The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. **Adv Clin Exp Med.**, v.22, p.151-155, 2013.
- KEYLOR, M.H.; MATSUURA, B.S.; STEPHENSON, C.R.J. Chemistry and biology of natural products derived from resveratrol. **Chem. Rev.**, v.115, p.8976–9027, 2015.

- KHOSLA S. *et al.* The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. **Nat Rev Endocrinol.**, v.16, n.5. p.263-275, 2020.
- KIM, E.N. *et al.* Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury. **Aging**, v.10, 83-99, 2018.
- KIM, J.W. *et al.* Inhibition of neointimal formation by trans-resveratrol: role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent Nrf2 activation in heme oxygenase-1 induction. **Mol Nutr Food Res.**, v.54, 1497-505, 2010.
- 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, p.2044-2055, 2012.
- KURSVIETIENE, L.; STANEVICIENE, I.; MONGIRDIENE, A. Multiplicity of effects and health benefits of Resveratrol. **Medicine**, v.52, p.148-155, 2016.
- 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.
- 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.
- LEE, W.L.; HUANG, J.Y.; SHYUR, L.F. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. **Oxid Med Cell Longev.**, 2013.
- LEEM, K.H. *et al.* Hypoglycemic Effect of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Is Due to Enhanced Peripheral Glucose Uptake through Activation of AMPK/p38 MAPK Pathway. **Nutrients**, v.8, n.12, 2016.
- LI, H. Sirtuin 1 (SIRT1) and Oxidative Stress. **In: Laher I. (eds) Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2004.
- 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, p.2246-57, 2009.
- LI, Z. *et al.* Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. **Biogerontology**, v.22, p.165–187, 2021.
- LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging**, v.13, p.757-772, 2018.
- LIN, T.K.; ZHONG, L.; SANTIAGO, J.L. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. **Int J Mol Sci.**, v.19, p.61-70, 2017.
- LIYANAGE, T.D. *et al.* Biological Activity of Porcine Gastric Mucin on Stress Resistance and Immunomodulation. **Molecules**, v.25, n.13, p.1-20, 2020.
- LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, p. 1194-1217, 2013.

- LUNA, C. *et al.* Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells. **Food Chem Toxicol.**, v.47, p.198-204, 2009.
- MAGALHÃES, W.L.E. *et al.* Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Embrapa**, p.1-12, 2018.
- MALAGUTI, M.; ANGELONI, C.; HRELIA, S. Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.13, p. 1-9, 2013.
- MARIEB, E.; WILHELM, P.; MALLAT, J. Sangue. **In:Anatomia Humana**. São Paulo: Pearson Education do Brasil, p.567-584, 2014.
- MARTÍNEZ DE TODA, I. *et al.* The Role of Immune Cells in Oxi-Inflamm-Aging. **Cells**, v.10, p.2974-89, 2021.
- MATSUMARU, D.; MOTOHASHI, H. The KEAP1-NRF2 System in Healthy Aging and Longevity. **Antioxidants (Basel)**, v.30, p.1929-37, 2021.
- MENG, T. *et al.* Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. **Molecules**, v.26, p.229-244, 2021.
- MENG, X. *et al.* Health Benefits and Molecular Mechanisms of Resveratrol: A Narrative Review. **Foods**, v.14, n.9, p.340-358, 2020.
- MEO, S.D.; REED, T.T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V.M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxid Med Cell Longev**. v.16, 1245049, 2016.
- MIHAYLOVA, M.M.; SHAW, R.J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. **Nat Cell Biol.**, v.13, p.1016-23, 2011.
- MINATEL, I.O.; FRANCISQUETI, F.V.; CORRÊA, C.R.; LIMA, G.P. Antioxidant Activity of  $\gamma$ -Oryzanol: A Complex Network of Interactions. **Int J Mol Sci.**, v.9, n.17(8), p.1107, 2016.
- 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.
- NAWAZ W. *et al.* Therapeutic versatility of resveratrol derivatives. **Nutrientes**, v.9, 2017.
- NGUYEN, T.; NIOLI, P.; PICKETT, C.B. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, p.13291-13296, 2009.
- NISHIMURA, A.; MORITAI, M. NISHIMURA, H.; SUGINO, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.20, p.6169, 1990.
- NOGUEIRA-MACHADO, J.A. *et al.* Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic patients: an Akt/PKB-dependent phenomenon. **Diabetes Metab.**, v.32, p.331-5, 2006.



- OH, Y.S.; JUN, H.S. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. **Int J Mol Sci.**, v.19, p.1-26, 2017.
- OLAS B. *et al.* Comparative studies of the antioxidant effects of a naturally occurring resveratrol analogue -- trans-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene and resveratrol -- against oxidation and nitration of biomolecules in blood platelets. **Cell Biol Toxicol.**, v.24, n.4, p.331-40, 2008.
- OLESEN, J. *et al.* Role of PGC-1 $\alpha$  in exercise training- and resveratrol-induced prevention of age-associated inflammation. **Exp Gerontol.**, v.48, p.1274-84, 2013.
- OLIVEIRA, J.T. *et al.* Metabolic activation enhances the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of two synthetic alkaloids with selective effects against human tumour cell lines. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v.861-862, p.503294, 2021.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007.
- PANGENI, R.; SAHNI, J.K.; ALI, J. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v.11, n.8, p.1285-1298, 2014.
- PANZARDI, A. **Imunologia básica: introdução e barreiras físicas à entrada de antígenos.** Disponível em: <<https://www.ourofinoaudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/imunologia-basica-introducao-e-barreiras-fisicas-e/>> Acesso em 27 de maio de 2021.
- PAPACONSTANTINO, J. The Role of Signaling Pathways of Inflammation and Oxidative Stress in Development of Senescence and Aging Phenotypes in Cardiovascular Disease. **Cells**, v.8, p.1383-96, 2019.
- PARK, S.J. *et al.* Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. **Cell**, v.148, p.421-33, 2012.
- PIETROBON, A.J.; TEIXEIRA, F.M.E.; SATO, M.N. Immunosenescence and Inflammaging: Risk Factors of Severe COVID-19 in Older People. **Front Immunol.**, v.11, p.1-18, 2020.
- PILKINGTON, S. M. *et al.* Inflammaging and the Skin. **The Journal of investigative dermatology**, v.141, p.1087–1095, 2021.
- PORRO, C.; CIANCIULLI, A.; CALVELLO, R.; PANARO, M.A. Reviewing the role of resveratrol as a natural modulator of microglial activities. **Curr Pharm Des.** v.21, p.5277–91, 2015.
- POSADINO, A. M. *et al.* Flavin oxidase-induced ROS generation modulates PKC biphasic effect of resveratrol on endothelial cell survival. **Biomolecules**, v.9, n.6, p.209-232, 2019.
- PRICE, N.L. *et al.* SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. **Cell Metabolism**, v.15, p.675– 690, 2012.
- RAMÍREZ-GARZA, S.L. *et al.* Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. **Nutrients**, v.10, n.12, p.1-18, 2018.

- REN Z. *et al.* The role of different SIRT1-mediated signaling pathways in toxic injury. **Cell Mol Biol Lett.** v.19, p.24-36, 2019.
- REN, Z. *et al.* The role of different signaling pathways mediated by SIRT1 in toxic lesions. **Cellular & molecular biology letters**, v.24, p.1-10, 2019.
- RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v.20, n.339, p.1523-6, 1992.
- RYOO, I.G.; KWAK, M.K. Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor Nfe2l2/Nrf2 and mitochondria. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.15, p.24-33, 2018.
- SAHA S. *et al.* An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. **Molecules**, v.23, n.25, 2020.
- SAKAMOTO S, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. **J Nat Med.**, v.72, p.32-42, 2018.
- SALDANHA *et al.* Resveratrol: Why Is It a Promising Therapy for Chronic Kidney Disease Patients? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-6, 2013.
- SALEHI, B. *et al.* Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. **Biomedicines**, v.6, n.3, p.91-99, 2018.
- SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. **Ageing Res Rev.**; v.11, p.230-41, 2011.
- SANDERS, M.J. *et al.* Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. **Biochem J**, v.403, p.139-48, 2007.
- 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.
- SARUBBO, F. *et al.* Resveratrol, SIRT1, oxidative stress, and brain aging. **Ageing: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants**. p.319-326, 2020.
- SCHMIDLIN, C.J. *et al.* Redox regulation by NRF2 in aging and disease. **Free Radic Biol Med.**, v.134, p.702-707, 2019.
- SHIN, H.H.; LEE, H.W.; CHOI, H.S. Induction of nitric oxide synthase (NOS) by soluble glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (sGITR) is modulated by IFN-gamma in murine macrophage. **Exp Mol Med**. v.30, n.3, p.175-180, 2003.
- SINGH, A.P. *et al.* Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. **Med Res Rev.** v.39, n.5, p.1851-1891, 2019.
- SINGH, C.K. *et al.* The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. **Antioxid Redox Signal.**, v.28, p.643-661, 2018.

- 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. 2015, p. 1-9, 2015.
- SMALE, S.T. Luciferase assay. **Cold Spring Harb Protoc.**, v.10, n.5, pdb.prot5421, 2010.
- STEINBERG, G.R.; KEMP, B.E. AMPK in health and disease. **Physiol Rev.**, v.89, p.1025–78, 2009.
- SUZUKI, M.; BANDOSKI, C.; BARTLETT, J.D. Fluoride induces oxidative damage and SIRT1 / autophagy through ROS-mediated JNK signaling. **Free Radic Biol Med.**, v.89, p.369–378, 2015.
- SWEPSON, C. *et al.* Cocaine enhances HIV-1 transcription in macrophages by inducing p38 MAPK phosphorylation. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 823- 837, 2016.
- TENNEN, R.I.; MICHISHITA-KIOI, E.; CHUA, K.F. Finding a target for resveratrol. **Cell**, v.3, p.387-9, 2012.
- TREWIN, A.J.; BERRY, B.J.; WOJTOVICH, A.P. Exercise and Mitochondrial Dynamics: Keeping in Shape with ROS and AMPK. **Antioxidants (Basel)**, v.7, p.1-7, 2018.
- TRUONG, V.L.; JUN, M.; JEONG, W.S. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. **Biofactors**, v.44, p.36-49, 2018.
- TSIKAS D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v.851, n.1-2, p.51-70, 2007.
- TUDOR, C. *et al.* The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. **FEBS Letters**, v.583, 1933–8, 2009.
- UCHIDA, A. *et al.* Correlation between brain volume and retinal photoreceptor outer segment volume in normal aging and neurodegenerative diseases. **PLoS One**, v.3, n.15, 2020.
- URAK, R. *et al.* *In vivo* Akt inhibition promotes the generation of potent CD19CAR T cells for adoptive immunotherapy. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 5, n. 1, p. 26, 2017.
- VAN DER LOO, B. *et al.* Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. **J Exp Med.**; v.192, p.1731-44, 2000.
- VAN GORP, A.G. *et al.* Chronic protein kinase B (PKB/c-akt) activation leads to apoptosis induced by oxidative stress-mediated Foxo3a transcriptional up-regulation. **Cancer Res.**, v.66, p.10760-9, 2006.
- VASCONCELLOS, F.A; PAULA, W. X. Forensic Application of Luminol – a review. **Revista Criminalística e Medicina Legal**, v.2, n.1, p.1-10, 2017.
- VAUPEL, J. W. Biodemography of human ageing. **Nature**, v. 464, p. 536–542, 2010.
- VOMUND, S. *et al.* Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.1-19, 2017.

WANF, G. *et al.* Resveratrol ameliorates rheumatoid arthritis via activation of SIRT1-Nrf2 signaling pathway. **BioFactors**, v.46, p.441– 453, 2020.

WHO: World Population Review. Disponível em:

<<https://worldpopulationreview.com/countries/life-expectancy>> Acesso em 28 de junho de 2021.

XU, L. *et al.* Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway by Resveratrol Improves Spinal Cord Injury. **Front Neurosci.**, v.12, p.690-702, 2018.

ZHANG, J. *et al.* How AMPK and PKA Interplay to Regulate Mitochondrial Function and Survival in Models of Ischemia and Diabetes. **Oxid Med Cell Longev.**, v.17, p.4353510, 2017.

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

ZHU, H. D.; LEI, X. P.; DONG, W. B. Resveratrol as a potential therapeutic drug for respiratory system diseases. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 3591-3598, 2017.

## ANEXOS

---

---

 Informe o E-mail

 Informe a Senha

LOGIN

Esqueceu a senha?

Cadastre-se

v3.8.2

Você está em: Público &gt; Buscar Pesquisas Aprovadas &gt; Detalhar Projeto de Pesquisa

## DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

## - DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: Envelhecimento: papel da via de sinalização NRF2 sobre os mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios mediados pelo resveratrol  
 Pesquisador Responsável: MIRIAM CHAVES SCHULTZ  
 Contato Público: FILIPE NOGUEIRA FRANCO  
 Condições de saúde ou problemas estudados:  
 Descritores CID - Gerais:  
 Descritores CID - Específicos:  
 Descritores CID - de Interação:  
 Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 27/01/2021



## - DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 Cidade: BELO HORIZONTE

## - DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5149 - Universidade Federal de Minas Gerais  
 Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha  
 Telefone: (31)3409-4592  
 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

## - CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

## - CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

56

Current Aging Science, 2023, 16, 56-64

RESEARCH ARTICLE

## Aging: Change in SIRT1 and Enzymatic Profile Promotes a Decrease in the Antioxidant Capacity of Resveratrol in Human Leukocytes *In Vitro*

Filipe Nogueira Franco<sup>1</sup>, Luciana de Cassia Cardoso<sup>1</sup>, Bárbara Néllita Moura Silva<sup>1</sup>,  
Glauco Rodrigues de Araújo<sup>1</sup> and Miriam Martins Chaves<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Biochemistry Laboratory of Aging and Department of Biochemistry and Immunology, Correlated Diseases, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, Brazil

**Abstract: Background:** One of the most studied theories about aging comes from the accumulation of free radical generation, leading to oxidative stress. Resveratrol (RSV) is a polyphenolic compound that has been shown to act as an antioxidant in medical practice.

**Objective:** To verify the antioxidant action of resveratrol (and its correlation with aging) in leukocytes from donors of different ages, mainly through the analysis of the three main enzymes of the antioxidant complex and the analysis of the SIRT1 signaling pathway.

**Methods:** Luminol-dependent chemiluminescence assay was used to evaluate ROS and SIRT1. Antioxidant enzymes were evaluated by commercial kits. \* $p < 0.05$ .

**Results:** In all age groups, there was a reduction in reactive oxygen species (ROS) in cells stimulated with RSV. There was a positive correlation between its antioxidant effect and donor age. In younger individuals (20-39 years old), there was an increase in catalase activity in cells exposed to RSV. In the older groups (40-59 years old and 60-80 years old), RSV was able to increase the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). Through the analysis of SIRT1 it was possible to observe a silencing of the pathway in leukocytes treated with RSV during aging.

**Conclusion:** RSV showed antioxidant activity in all age groups, although more pronounced in younger individuals. One of the mechanisms of action of the RSV is due to the increase in the activity of antioxidant enzymes, which varies according to the individual's age, especially through the modulation of important antioxidant pathways.

### ARTICLE HISTORY

Received: February 17, 2022  
Revised: March 18, 2022  
Accepted: March 28, 2022

DOI:  
[10.2174/1874609815666220511143843](https://doi.org/10.2174/1874609815666220511143843)

**Keywords:** Aging, oxidative stress, resveratrol, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, SIRT1.

### 1. INTRODUCTION

One of the characteristics of aging is the progressive loss of physiological integrity, which can compromise many functions and lead to death [1]. In this context, Denham Harman proposed in the 1950s the theory of aging free radicals. According to Harman, organisms age because they accumulate oxidative damage over the years, damage from Reactive Oxygen Species (ROS) - partially reduced metabolites of molecular oxygen that are generated as products of metabolic reactions or as by-products of various other cellular processes, like respiration [2]. From a chemical point of

view, the harmful effect of ROS occurs because molecular oxygen is a highly reactive compound, capable of damaging cell biomolecules, such as proteins, lipids and DNA, being able, for example, to react with the active sites of various enzymes, leading to the loss of their functions [3].

Resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is a polyphenolic compound found in several plant species, including grapes and peanuts [4]. RSV is the best-studied plant-derived polyphenol. Among its potential biological effects is the ability to promote the activity of several antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPx), enzymes that show a reduction in activity throughout aging. Studies show that these effects of RSV occur through the activation of biochemical pathways involving protein kinases (AMPK, MAPK, AKT/PKB, *etc.*) and sirtuins (SIRT) - pathways that culminate in the activation of antioxidant process [5, 6].

\*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, 30161-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; Tel: +553134092635; E-mail: [miriamschultz62@gmail.com](mailto:miriamschultz62@gmail.com)

Table 1. Population demographic characteristics.

Parameters	Men		Women
	Mean ± SD		Mean ± SD
Age (years old)	-	-	-
20-39	32.3 ± 6	ns	29.8 ± 5
40-59	52.1 ± 4	ns	50.2 ± 5
60-80	76.3 ± 7	ns	66.9 ± 6
Total:	53.57 ± 12	ns	48.97 ± 11
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	-	-	-
20-39	22.4 ± 2	ns	21.8 ± 3
40-59	18.8 ± 2	ns	17.5 ± 3
60-80	23.4 ± 3	ns	24.5 ± 4
Total:	21.5 ± 1	ns	21.3 ± 2
Serum Glucose (mg/dL)	-	-	-
20-39	89.4 ± 7.0	ns	83.7 ± 5.6
40-59	83.4 ± 8.6	ns	85.5 ± 9.1
60-80	102.6 ± 11.3	ns	105.6 ± 10.6
Total:	91.8 ± 5.7	ns	91.6 ± 7.1
Serum Triglycerides (mg/dL)	-	-	-
20-39	102.4 ± 38	ns	101.8 ± 29
40-59	130.0 ± 57	ns	127.7 ± 43
60-80	164.3 ± 20	ns	153.5 ± 23
Total:	132.2 ± 18	ns	127.7 ± 15
Serum creatine (mg/dL)	-	-	-
20-39	0.979 ± 0.16	ns	0.821 ± 0.16
40-59	0.630 ± 0.02	ns	0.680 ± 0.12
60-80	0.741 ± 0.17	ns	0.793 ± 0.17
Total:	0.783 ± 0.10	ns	0.763 ± 0.04
Vascular Complications	-	-	-
20-39	No	-	No
40-59	No	-	No
60-80	No	-	No

Note: ns= not significant according to the Kolmogorov - Smirnov normality test and post-Mann-Whitney test. Statistical analysis.

Body mass index range = 18.5 - 24.99 kg/m<sup>2</sup> [7].

The BMI data is within the international standards between 17.5 and 24.9, which characterizes a low weight - ideal weight range. Although the population is composed of members who may be in the range of underweight or overweight, the metabolic parameters listed in the table are within the normal standards [14, 15]. Serum glucose: Normal value less than 99mg/dL [16, 17].

Triglycerides: Normal levels <150mg/dL [11].

Serum Creatine: Normal levels were 0.5-1.5 mg/dL for men and 0.6 - 1.2 mg/dL for women [18].

Thus, the objective of our study was to verify if the antioxidant action of resveratrol remains the same from leukocytes isolated from individuals of three different age groups, mainly through the analysis of the activity of the main enzymes of the antioxidant complex and the action of the SIRT1 cell signaling pathway. These results are important to guide the clinical conduct of prescribing resveratrol according to the patient's age.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Donor Selection

The project was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Minas Gerais -

CAAE: 33842420.4.0000.5149. A total of 60 men and women aged 20-80 years old were selected and separated into three groups, 20 individuals per group: Group 1 (20-39 years old), Group 2 (40-59 years old) and Group 3 (60-80 years old). Those who were able to participate were asked to sign an Informed Consent Form. The Table 1 describes the characteristics of the population studied.

### 2.2. Obtaining Leukocytes

The leukocytes were isolated according to the technique described in the literature, with adaptations [7]. For this, 4 mL of heparinized blood was added over 3 mL of leucopaque gradient (density 1.14). After centrifugation (600g)



two distinct phases were obtained and separated by two interphase rings. The first phase (plasma) was discarded. Leukocytes were placed in another tube and resuspended with PBS (pH 7.3) through two washing sessions. Lastly, cells were suspended in 1 mL PBS, and the final volume was adjusted to  $1 \times 10^7$  cells/mL.

### 2.3. Standardization of Resveratrol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration

The resveratrol concentrations used in the assay were previously chosen from the literature [8] and was defined based on the Dose-Concentration-Curve by MTT assay in leukocytes. For this,  $5 \times 10^3$  cells/well were stimulated with increasing concentrations of resveratrol: 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20  $\mu$ M for 24 hours at 37°C. After treatment, 20  $\mu$ L of MTT (0.125 mg/L) was added to the wells and the plate was incubated for 30 minutes at 37°C. Absorbance was read at 570 nm in a microplate reader (Thermo Plate). Results were expressed as absorbance vs concentration  $\pm$  SD. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were also previously chosen from the literature [9]. Cells were stimulated with increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 and 500  $\mu$ M for 1 hour at 37°C. The MTT assay was performed to evaluate cell viability. Results were expressed as a percentage of viability  $\pm$  SD. Chemiluminescence assay was also performed to some concentrations in which would show cell viability within acceptable parameters (cell viability >70%, according to ISO 10993-5).

### 2.4. Cell Viability Assay

The MTT colorimetric assay was performed to verify cell viability against treatments. For this,  $5 \times 10^3$  cells/well were plated with their respective treatment for 1 hour at 37°C. After treatment, 20  $\mu$ L of MTT solution was added to the wells, and the plate was incubated for 30 minutes at 37°C protected from light. Finally, 100  $\mu$ L of DMSO was added to dissolve generated formazan crystals and absorbance was read at 570 nm in microplate reader (Thermo Plate). Results were expressed as a percentage of viability  $\pm$  SD.

### 2.5. Chemiluminescence Assay

The quantitative ROS determination was performed in a luminol-dependent chemiluminescence assay [10]. Leukocytes ( $1 \times 10^6$  cel) were divided into four groups: (1) Negative Control, (2) Resveratrol treatment only, (3) Positive Control - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and (4) Oxidative stress induction treatment - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and RSV. The final volume of all tubes was completed to 700  $\mu$ L with PBS. All tubes were placed in a Luminometer (Lumat, LB 9501, EG&G Berthold, Germany) and readed for 10 minutes. The results were expressed in relative light units (RLU)/minute.

### 2.6. Evaluation of Antioxidant Enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Catalase and Glutathione Peroxidase (GPx)

In four glass tubes  $1 \times 10^6$  cells were transferred per tube. The tubes were centrifuged at 600g for 20 min, and the supernatant was removed. Subsequently, each tube received a specific treatment according to the luminol-dependent chem-

iluminescence assay groups. They were incubated in a water bath at 37°C for 1 hour. After that, the cells were centrifuged at 2000g for 2 min, the supernatant was discarded and the cells were resuspended in cold PBS. This process was repeated, but this time the cells were resuspended in the Kit's cold lysis buffer. The cells remained on the ice for 10 min and were centrifuged at 600g for 20 min. The supernatant was collected and proceeded with the procedures described in the specific kit used for dosing SOD activity (Enzy-Chrom™ superoxide dismutase assay kit (ESOD-100) - Bioassay systems), catalase activity (EnzyChrom™ catalase assay kit (ECAT-100) - Bioassay systems) and GPx activity (Cayman chemical glutathione peroxidase assay kit No. 703102).

### 2.7 Analysis of the SIRT1 Signaling Pathway

The SIRT1 signaling pathway was analyzed using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The choice of the specific SIRT1 inhibitor (Sirtinol - 10  $\mu$ M) was based on studies in the literature [11].  $1 \times 10^6$  leukocytes were previously incubated for 30 minutes in the absence (control group) and presence of inhibitors, according to the methodology of Caldeira *et al.* [12]. After that, the tubes were centrifuged at 600g for 10 minutes. The supernatant was discarded, and cells were resuspended in PBS. Finally, the same treatments and procedures described in topic 2.5 were added.

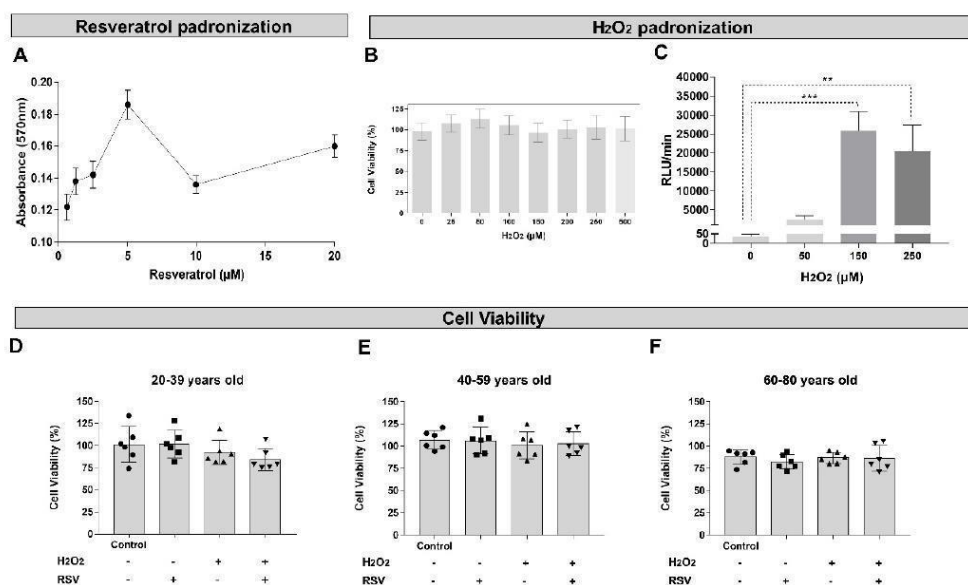
### 2.8. Statistical Analysis

All data were analyzed by the Kolmogorov - Smirnov normality test. One-way ANOVA was used, followed by Dunnett's test when the samples had normal distribution and Dunns' test when they did not follow the normal distribution. Pearson's correlation was used to assess the correlation between age and treatments. Differences were considered significant for  $p < 0.05$ . All analyzes were performed using GraphPad Prism software version 7.0 (San Diego, California, USA) [13].

## 3. RESULTS

### 3.1. Padronizations and viability of leukocytes

The resveratrol concentration was defined according to Dose-Concentration-Curve (Fig. 1A). Among the concentrations tested, 5  $\mu$ M presented a higher MTT metabolizing capacity with an absorbance peak. Regarding the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, it was observed that leukocytes remained viable in all concentrations used (Fig. 1B). The next step was to verify whether these concentrations were capable of generating the same amount of ROS. As no concentration affected cell viability, concentrations of 50  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, and 250  $\mu$ M were chosen for this. It was possible to observe that the concentrations of 150  $\mu$ M and 250  $\mu$ M induced an increase in ROS production significantly compared to basal cell control. However, we also found that 150  $\mu$ M and 250  $\mu$ M induced the same amount of ROS (Fig. 1C). Therefore, 150  $\mu$ M was chosen for our assays developed in leukocytes. In addition, MTT assay was also used to evaluate leukocyte viability against treatment. All treatments allowed cells to remain viable and they did not promote significant cytotoxicity either in any group (Figs. 1D-F).



**Fig. (1).** Padronization of RSV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and analysis of cell viability. (A) Human leukocytes were stimulated by increasing concentrations of resveratrol. The concentration chosen was 5 µM which showed an absorbance peak. Assays were performed in triplicate for each concentration (n = 8). (B) Leukocytes were stimulated with increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and their viability was carried out through the MTT. The assay was performed in triplicate for each concentration (n=15). (C) In the chemiluminescence assay, the generation of ROS was expressed in RLU/min for 10 minutes. Being \*\**p*<0.01 and \*\*\* *p*<0.001 significant results following the Kolmogorov - Smirnov normality test, one-way ANOVA and Dunnett's post-test (n = 6). (D-F) Leukocytes were added to a 96-well plate and incubated for 1h with resveratrol and/or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results were expressed as the average percentage of viable cells ± standard deviation. The experiments were carried out in triplicate/well (n = 6/group as shown in the graph bars). Results were expressed as mean ± SD. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

### 3.2. The Antioxidant Effect of Resveratrol Decreases with Aging

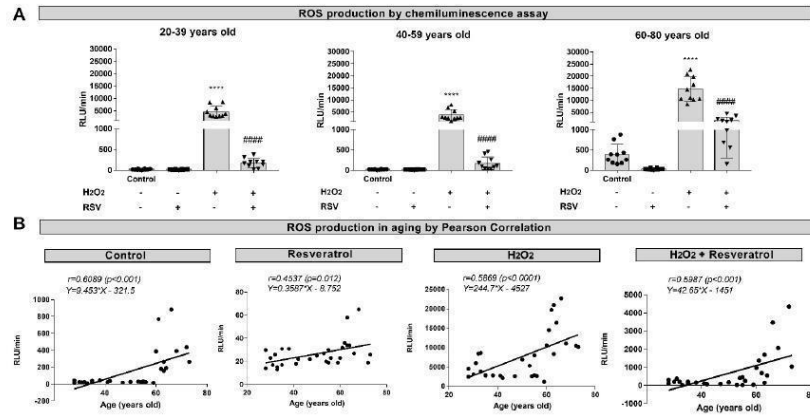
The results obtained in Fig. (2A) show that in both groups, there was a significant increase compared to the control. In addition, there was a decrease in ROS in all age groups when comparing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+RSV vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The Pearson correlation in Fig. (2B) shows a positive and statistically significant correlation was observed between age and all treatment conditions. There is an increase in the basal levels of ROS and the induction of an oxidative environment with increasing age, and the antioxidant action of resveratrol is more pronounced in younger individuals.

### 3.3. The Profile of Antioxidant Enzymes in RSV-treated Leukocytes Varies with Aging

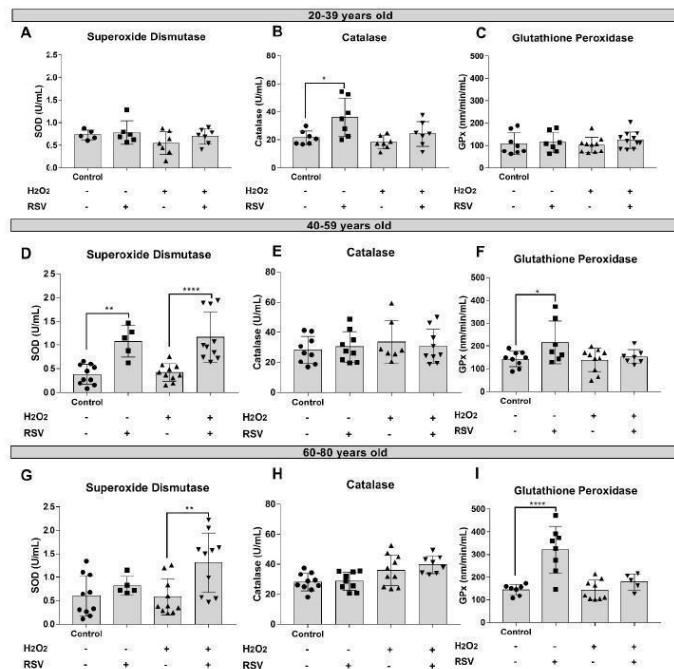
The interference of RSV on the activity of the antioxidant enzymes SOD, catalase and GPx in leukocytes is shown in Fig. (3). Regarding SOD, there was an increase in the Resveratrol vs. Control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 40-59 (Fig. 3D). In the 60-80, there is an increase in the

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 3G). Catalase levels showed change only in the age group from 20-39, in which there was an increase in the Resveratrol vs. Control (Fig. 3B). Finally, there was a change in GPx levels in the 40-59 and 60-80, with an increase in the groups treated with Resveratrol vs. Control (Figs. 3F and 3I). Pearson's enzyme correlation analysis is shown in Table 2. SOD showed a statistically significant positive correlation only in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. The catalase showed a positive and significant correlation in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. It is important to emphasize that although there is a positive correlation, there was no change in the levels of this enzyme from the age of 40 years on, when comparing the treatments. There is an increase, but not enough to promote a significant action of resveratrol on this enzyme in the same age group.

The GPx results showed positive and significant correlations in the groups treated with resveratrol, in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. Therefore, it was possible to observe an increase in the level of enzymes in several treatments. However, treatment with RSV proved to be more effective on SOD and GPx levels during aging.



**Fig. (2).** Antioxidant effect of resveratrol by chemiluminescence assay. The generation of ROS was expressed in RLU/min for 10 minutes. (A) were \*\*\*\*( $p<0.0001$ ) compared to the control group and #####( $p<0.0001$ ) compared to the group treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results were significant using the Kolmogorov-Smirnov normality test, one-way ANOVA, and Dunnett's post-test ( $n=10$ /group). Results were expressed as mean  $\pm$  SD. (B) Pearson's correlation of ROS levels of different treatments with age. The scatterplot shows the positive and statistically significant correlation between the production of ROS and age in each treatment.  $p < 0.05$  were considered significant and  $n = 30$ /treatment. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).



**Fig. (3).** Evaluation of resveratrol on the activity of SOD, Catalase, and GPx in leukocytes of different age groups. SOD and Catalase activity were measured in U/ml (atomic mass unit/milliliter), while GPx was measured in nm/min/ml (nanomolar/minute/milliliter). With \*statistical difference ( $p<0.05$ ), \*\* ( $p<0.01$ ) and \*\*\*\* ( $p<0.0001$ ) using the Kolmogorov normality test - Smirnov, one-way and post ANOVA - Dunnett's test. A-C from 20-39, D-F from 40-59, and G-I from 60-80 years old. Results were expressed as mean  $\pm$  SD. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Table 2. Pearson's correlation of SOD, Catalase and GPx of different treatments with age.

Superoxide Dismutase			
-	Straight Equation	Pearson Correlation	p value
Control	$y = -0.0002985 * X + 0.5542$	$r = -0.01224$	$p = 0.954$
RSV	$y = 0.0006634 * X + 0.8555$	$r = 0.03364$	$p = 0.902$
H2O2	$y = 0.0004334 * X + 0.4903$	$r = 0.02141$	$p = 0.916$
H2O2+RSV	$y = 0.01586 * X + 0.2867$	$r = 0.4123$	* $p = 0.033$
-	-	-	-
Catalase			
-	Straight Equation	Pearson Correlation	p value
Control	$y = 0.1818 * X + 17.11$	$r = 0.3632$	$p = 0.068$
RSV	$y = -0.1857 * X + 40.75$	$r = -0.27$	$p = 0.192$
H2O2	$y = 0.3655 * X + 11.63$	$r = 0.4379$	* $p = 0.032$
H2O2+RSV	$y = 0.4111 * X + 11.29$	$r = 0.5449$	** $p = 0.006$
-	-	-	-
Glutathione Peroxidase			
-	Straight Equation	Pearson Correlation	p value
Control	$y = 0.8265 * X + 91.56$	$r = 0.291$	$p = 0.168$
RSV	$y = 5.784 * X - 62.29$	$r = 0.7162$	*** $p < 0.001$
H2O2	$y = 1.458 * X + 55.98$	$r = 0.4614$	* $p = 0.012$
H2O2+RSV	$y = 1.567 * X + 78.7$	$r = 0.4999$	* $p = 0.018$

Note: The table shows the value of the straight line equation (y), the correlation level (r), and the statistical difference between enzyme and age in each treatment. With \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  considered significant (n = 25-30/treatment).

### 3.4. Resveratrol Decreases its Action Through SIRT1 in Aging

The results of the action of the SIRT1 pathway on the antioxidant effects of RSV are shown in Figs. (4A-C). First, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Sirtinol also promoted an increase in ROS in the three age compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These results suggest that the SIRT1 pathway has antioxidant activity in all age groups of leukocytes stimulated with an oxidizing environment. The leukocytes incubated with the triad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol+Sirtinol showed different behavior from one age group to another when compared to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol: there was an increase in 20-39 and 40-59, while no difference was observed in 60-80. The correlation data for this pathway are shown in Figs. (4D-F). A statistically significant correlation was observed only in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol+Inhibitor. This correlation is negative, indicating that the older the age, the lower the ROS values when we inhibit the pathway, that is, resveratrol no longer acts on the SIRT1 pathway throughout aging.

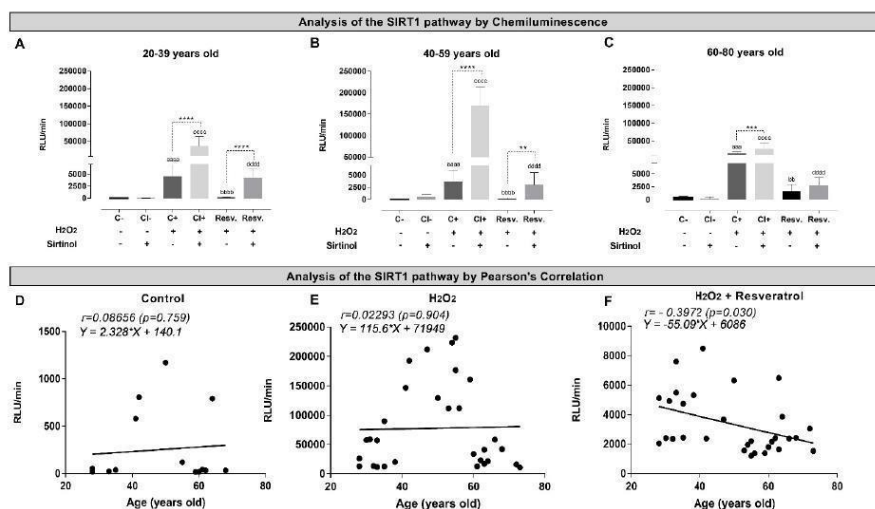
## 4. DISCUSSION

Our study aimed to verify if the antioxidant action of resveratrol remains the same in leukocytes isolated from individuals of three age groups. Evaluating the antioxidant capacity of RSV, we observed that the compound showed antioxidant activity in all age groups. However, the compound acted less efficiently throughout the aging process. Luna. *et al.* [19] observed that RSV decreased ROS produc-

tion in trabecular meshwork cells when exposed to an oxidative environment. Although the available literature on these compounds is very abundant, trials, especially those related to older people and aging, are still scarce [20]. However, some studies carried out by our research group have already demonstrated that there is a loss of antioxidant capacity of RSV throughout the aging process, when PBMCs of individuals aged 40-80 years old were treated with RSV and subjected to the chemiluminescence assay [12, 21].

We also analyzed its role in the activity of the antioxidant enzymes SOD, catalase, and GPx. It is described in the literature that one of the mechanisms of action of RSV is its ability to promote the activity of many of these enzymes [14]. Our results confirmed these findings. However, the action of RSV was different from the action of each one throughout the aging process. Our results are similar to some present in the literature, but contradict others. According to Ighodaro *et al.* [22] the cells respond to the oxidative challenge with selective induction of antioxidant enzymes. The authors also state that there is no consensus in the literature on the pattern of antioxidant enzymes in response to oxidative stress. It is probably related to the cell model, the type and concentration of the oxidizing agent, and the incubation time used.

There are studies relating the activity of these enzymes to aging. Giergiel *et al.* [23] observed an increase in catalase during aging in the bovine heart and diaphragm. In contrast,



**Fig. (4).** Evaluation of the effect of resveratrol on SIRT1 in aging. ROS generation was expressed in RLU/min for 10 minutes. (A, B, C) Chemiluminescence assay of the three age groups. Being C- (negative control), CI- (negative control with inhibitor), C+ (positive control), CI+ (positive control with inhibitor). Statistical differences were observed using the Kolmogorov-Smirnov normality test, one-way ANOVA, and Dunnett's post-test ( $n=10$ /group): aaaa( $p<0.0001$ ) and aaa( $p<0.001$ ) vs C-; bbbb( $p<0.0001$ ) and bb ( $p<0.01$ ) vs C+; cccc( $p<0.0001$ ) vs C+; dddd( $p<0.0001$ ) vs CI+; \*\*\*( $p<0.0001$ ), \*\*\*( $p<0.001$ ) and \*\* ( $p<0.01$ ). Results were expressed as mean  $\pm$  SD. (D, E, F) Pearson correlation of different treatments with age. The scatter plot shows a statistically significant negative correlation only in the group induced to stress but treated with resveratrol.  $n=15$ /Control group and  $n=30$  group/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Resveratrol. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Fujimoto *et al.* [24] observed a reduction in mitochondrial MnSOD activity in human leukocytes with age. Regarding treatment with RSV, Truong *et al.* [25] observed that there was an increase in the expression of catalase and GPx in aortic segments of rats and there was an increase in liver antioxidant capacity by SOD, catalase, and GPx. Kavas *et al.* [26] also observed an increase in the activity of SOD and catalase in erythrocytes from the group of winstar rats in which RSV was administered. Finally, Caldeira *et al.* [18] observed that RSV increases SOD levels (but not catalase) in PBMCs from individuals aged 60-80 years old compared to those aged 40-59, data that were also observed in our study.

An important regulation of these enzymes occurs through some pathways, which have the capacity to culminate in gene transcription and enzymatic activation. A hypothesis for this change in the observed enzymatic profile could be the alteration in the signaling of important pathways, with SIRT1 being one of the most described as responsible for the effects of RSV. SIRT1 is a histone deacetylase capable of regulating several key transcription factors capable of promoting the transcription of several genes, including antioxidant enzymes [27]. Borra *et al.* [28] observed an increase in the expression of SIRT1 in cells treated with RSV, while Li *et al.* [29] demonstrated that the activation of SIRT1 is able to promote an increase in the activity of the antioxidant enzyme complex. Furthermore, RSV has already been shown to increase life expectancy in three organism models through a SIRT-dependent pathway [30].

However, our results showed silencing of this pathway in aging, when leukocytes are treated with RSV. Even with the silencing, some others are responsible for promoting the activity of these enzymes. Studies have pointed out the action of pathways involving protein kinases and Nrf2. Gaitanaki *et al.* [31] demonstrated an increase in SOD and catalase concomitant with p38MAPK activation. RSV is also able to phosphorylate and activate AMPK and AKT/PKB both *in vitro* and *in vivo* studies [32]. Furthermore, RSV also activates PKA, a pathway related to increased cAMP levels [33]. Other studies have pointed to the Nrf2 pathway: a protein that binds to a specific DNA sequence called Antioxidant Response Element, found in the promoter region of several genes that are involved in the transcription of antioxidant enzymes such SOD and GPx [34]. Therefore, our hypothesis is that these pathways involving protein kinases and Nrf2 are the key pathways in the antioxidant effect of RSV still observed in aging.

## CONCLUSION

RSV showed antioxidant action at all ages, although more pronounced in younger individuals. One of its mechanisms of action is due to the activation of several cell signaling pathways related to antioxidant defense, mainly SIRT1. However, in aging, it was possible to observe a silencing of this pathway in leukocytes treated with RSV, leading to the hypothesis that other pathways are of great importance for the activation of antioxidant defense mechanisms observed in aging, especially protein kinases. Regarding the enzymes,

we observed a variation according to the individual's age: catalase was more active in leukocytes of individuals aged between 20-39, while SOD and GPx are more evidently active in groups 40-59 and 60-80. Despite this, the increase in some of these enzymes was not sufficient for a stronger antioxidant effect on leukocytes obtained from the elderly. In conclusion, our data show some mechanisms by which aging promotes a decrease in the antioxidant effect of RSV. That is, the same dosage of RSV seems to act less efficiently according to age. However, further studies should be carried out in order to arrive at a more accurate protocol on its clinical use according to their age group.

#### ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The study followed compliance with ethical standards, being approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais Brazil. (CAAE: 33842420.4.0000.5149).

#### HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used for studies that are the basis of this research. All humans procedures were followed in accordance with the Helsinki declaration of 1975, as revised in 2013 (<http://ethics.iit.edu/ecodes/node/3931>).

#### CONSENT FOR PUBLICATION

All individuals selected to participate in our study gave consent by signing a "free and informed consent form".

#### STANDARDS FOR REPORTING

STROBE guidelines and methodology were followed.

#### AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

#### FUNDING

This research was supported by the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-02574-14), 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 no conflict of interest, financial or otherwise.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

#### REFERENCES

- [1] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153(6): 1194-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> PMID: 23746838
- [2] Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11(3): 298-300. <http://dx.doi.org/10.1093/geronj/11.3.298> PMID: 13332224
- [3] Inlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57(1): 395-418. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938> PMID: 14527285
- [4] Diaz-Gerevini GT, Reposi G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* 2016; 32(2): 174-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2015.08.017> PMID: 26706021
- [5] Pangeni R, Sahni JK, Ali J, Sharma S, Baboota S. Resveratrol: Review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2014; 11(8): 1285-98. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2014.919253> PMID: 24830814
- [6] Cetrullo S, D'Adamo S, Tantini B, Borzi RM, Flamigni F. mTOR, AMPK, and Sirt1: Key players in metabolic stress management. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2015; 25(1): 59-75. <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2015012975> PMID: 25955819
- [7] Ješko H, Wencel P, Strosznajder RP, Strosznajder JB. Sirtuins and their roles in brain aging and neurodegenerative disorders. *Neurochem Res* 2017; 42(3): 876-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-016-2110-y> PMID: 27882448
- [8] de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5): 1156-60. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0351156> PMID: 17956300
- [9] Emangholipour S, Hossein-Nezhad A, Ansari M. Can melatonin act as an antioxidant in hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in human peripheral blood mononuclear cells? *Biochem Res Int* 2016; 2016: 5857940. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5857940> PMID: 26881079
- [10] Coelho Horta B, Steinberg Perilo C, Caldeira Costa D, Nogueira-Machado JA, Martins Chaves M. Aging: Functional metabolic balance among cAMP, cGMP and reactive oxygen intermediate generation by human granulocytes. *Gerontology* 2005; 51(6): 363-8. <http://dx.doi.org/10.1159/000088699> PMID: 16299416
- [11] Kozako T, Aikawa A, Shoji T, et al. High expression of the longevity gene product SIRT1 and apoptosis induction by sirtinol in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 2012; 131(9): 2044-55. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27481> PMID: 22322739
- [12] Caldeira CA, Santos MA, Araújo GR, Lara RC, Franco FN, Chaves MM. Resveratrol: Change of SIRT 1 and AMPK signaling pattern during the aging process. *Exp Gerontol* 2021; 146: 111226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2021.111226> PMID: 33444643
- [13] The world health report 2000: Health systems: Improving performance. Geneva: WHO 2000.
- [14] Kumar A, Dhar S, Rimando AM, et al. Epigenetic potential of resveratrol and analogs in preclinical models of prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1348(1): 1-9. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12817> PMID: 26214308
- [15] Liu FC, Tsai YF, Tsai HI, Yu HP. Anti-inflammatory and organ-protective effects of resveratrol in trauma-hemorrhagic injury. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 643763. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/643763> PMID: 26273141
- [16] Standards of medical care in diabetes-2011. *Diabetes Care* 2011; 34(Suppl. 1): S11-61. <http://dx.doi.org/10.2337/dc11-S011> PMID: 21193625
- [17] *Circulation* 2017; 135(10): 146-603.
- [18] National committee for clinical laboratory standards. Approved guideline C28-A2 (2000) How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory Pennsylvania: NCCLS 2000.
- [19] Luna C, Li G, Liton PB, et al. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(1): 198-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.10.029> PMID: 19027816
- [20] Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bematoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas)* 2016; 52(3): 148-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medici.2016.03.003> PMID: 27496184
- [21] Santos MA, Franco FN, Caldeira CA, et al. Antioxidant effect of resveratrol: Change in MAPK cell signaling pathway during the aging process. *Arch Gerontol Geriatr* 2021; 92: 104266.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2020.104266> PMID: 33070070
- [22] Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med* 2018; 54(4): 287-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- [23] Giergiel M. Age-related changes in activity of catalase in selected bovine muscles. *Acta Sci Vet* 2015; 43: 1-7.
- [24] Fujimoto H, Kobayashi H, Ohno M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. *Circ J* 2010; 74(2): 353-60. <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-09-0491> PMID: 20009389
- [25] Truong VL, Jun M, Jeong WS. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors* 2018; 44(1): 36-49. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1399> PMID: 29193412
- [26] Kavas GO, Ayril PA, Elhan AH. The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22(2): 151-5. PMID: 23709370
- [27] Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2018; 28(8): 643-61. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2017.7290> PMID: 28891317
- [28] Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 2005; 280(17): 17187-95. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M501250200> PMID: 15749705
- [29] Li H. Sirtuin 1 (SIRT1) and oxidative stress. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin, Heidelberg: Springer 2004. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9\\_17](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_17)
- [30] Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 2010; 5(1): 253-95. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250> PMID: 20078221
- [31] Gaitanaki C, Papatrifiantyllou M, Stathopoulou K, Beis I. Effects of various oxidants and antioxidants on the p38-MAPK signalling pathway in the perfused amphibian heart. *Mol Cell Biochem* 2006; 291(1-2): 107-17. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-006-9203-x> PMID: 16710743
- [32] Price NL, Gomes AP, Ling AJ, *et al.* SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* 2012; 15(5): 675-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.003> PMID: 22560220
- [33] Tennen RI, Michishita-Kioi E, Chua KF. Finding a target for resveratrol. *Cell* 2012; 148(3): 387-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.032>
- [34] Kim EN, Lim JH, Kim MY, *et al.* Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury. *Aging (Albany NY)* 2018; 10(1): 83-99. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.101361> PMID: 29326403

Biogerontology  
<https://doi.org/10.1007/s10522-023-10046-x>

RESEARCH ARTICLE



## Aging: silencing the PKA and Akt/PKB signaling pathways alters the antioxidant capacity of resveratrol

Filipe Nogueira Franco · Luciana de Cassia Cardoso ·  
 Bárbara Néllita Moura Silva · Glaucy Rodrigues de Araújo ·  
 Miriam Martins Chaves

Received: 14 December 2022 / Accepted: 13 June 2023  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2023

**Abstract** One of the theories related to aging is the increase in oxidative stress. Given this, the objective of the study is to evaluate the cellular mechanisms responsible for the resveratrol antioxidant effect on leukocytes from donors aged between 20 and 80 years old. For this, leukocytes from donors of three age groups (20–39, 40–59 and 60–80) were isolated. Image-iT™LIVE Green Reactive Oxygen Species (ROS) Kit was used. Reactive Nitrogen Species (RNS) analysis was performed by measuring nitric oxide and peroxynitrite. The PKA, Akt/PKB and p38-MAPK were evaluated by chemiluminescence. The statistical analysis between age and treatments were performed by Pearson correlation (\* $p < 0.05$ ). It was possible to observe the antioxidant effect of

resveratrol in all age groups. The correlation results show loss of resveratrol effect in decreasing ROS in leukocytes from older donors. We observed an active antioxidant effect of p38-MAPK in all ages, with resveratrol acting on it. The PKA and Akt/PKB were active in leukocytes from donors aged 20–59. In cells from donors older than 60, these pathways are silenced, and an effect is also not observed in cells treated with resveratrol. Therefore, resveratrol showed antioxidant effect in all age, although it was more pronounced in leukocytes from younger. One of resveratrol's mechanisms is due to the activation of the PKA and Akt/PKB, which were activated in younger donor cells.

**Keywords** Resveratrol · Antioxidant · Aging · PKA · Akt/PKB · p38-MAPK

F. N. Franco · L. de Cassia Cardoso · B. N. M. Silva ·  
 G. R. de Araújo · M. M. Chaves (✉)  
 Biochemistry Laboratory of Aging and Correlated  
 Diseases, Department of Biochemistry and Immunology,  
 Biological Sciences Institute, Federal University of Minas  
 Gerais, UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte,  
 MG 30161-970, Brazil  
 e-mail: miriamschultz62@gmail.com

F. N. Franco  
 e-mail: filipenogueirafranco@gmail.com

L. de Cassia Cardoso  
 e-mail: lucca.fisio@gmail.com

B. N. M. Silva  
 e-mail: barbaranellitamourasilva@gmail.com

G. R. de Araújo  
 e-mail: glaucyrodrigues@gmail.com

### Introduction

Aging is characterized by a progressive loss of physiological integrity, causing impairment of various functions in the body. A common denominator is the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS), leading to oxidative stress. Aging and oxidative stress are directly linked to the pathophysiology of several inflammatory disorders and chronic degenerative diseases, triggered by the recruitment of immune cells and induction of the production of pro-inflammatory cytokines,

Published online: 17 July 2023

Springer



caused by the accumulation of ROS/RNS throughout life (Lopez-Otin et al. 2013; Liguori et al. 2018).

Resveratrol (3,4',5- trihydroxystilbene—RSV) is a phytoalexin found in many plants including grapes, peanuts, and berries that has recently attracted a lot of research attention due to its exciting pharmacological potential, including antioxidant effect (Berman et al. 2017). Several studies have demonstrated the mechanism by which RSV acts. For example, (Rosa et al. 2018) observed that RSV protected oligodendroglial cell function against lipopolysaccharide exposure by modulating the antioxidant system mediated by Nrf2/HO-1 signaling pathways. RSV modulated the intracellular content of GSH, ROS and also the activity of glutamate-cysteine ligase (GCL). Bobermin et al. (Bobermin et al. 1865) investigated the anti-inflammatory mechanism of RSV mediated by adenosine receptors in primary cultures of astrocytes exposed to LPS. The hypothesis is that RSV was able to activate PI3K/Akt-Nrf2 and also inhibit NFκB and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). In addition, polyphenol upregulated HO-1 expression, activation of signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and Akt/protein kinase B (Chen et al. 2005). Other studies have shown a neuroprotective effect of RSV against oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Nrf2 activation (Kumar et al. 2011; Farkhondeh et al. 2020).

Natural antioxidants can be effective against age-related diseases. In this context, Kim et al. (Kim et al. 2010) reported that RSV has a protective impact against kidney damage in aged C57BL/6 mice. Polyphenol improved kidney function and inflammation in aged mice through activation of Nrf2/HO-1 signaling. (Fischer et al. 2017) indicated that RSV-derived compounds increased the longevity of *Caenorhabditis elegans* by decreasing ROS production and accumulation with activation of sirtuin, Nrf2 and FoxO. Treatment of aged vascular smooth muscle cells (VSMCs) with RSV also reversed aging-induced NF-κB. Despite this, little is known about the cellular activation of resveratrol in aging, particularly in human cells. Thus, the objective of this study is to evaluate whether the RSV antioxidant effect remains the same in leukocytes from donors of different age groups (20–39, 40–59 and 60–80 years old) and what is the role of these protein kinases in this process.

## Methodology

### Donor selection

The project was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais—CAAE: 33842420.4.0000.5149. Healthy men and women living in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, aged between 20 and 80 years old were selected and separated into three age groups: Group 1 (20–39 years old), Group 2 (40–59 years old) and Group 3 (60–80 years old). 10 individuals per group were selected. The characteristic of the studied population is: Body mass index range between 18.5 and 24.99 kg/m<sup>2</sup>, serum glucose with a fasting value lower than 99 mg/dL, triglycerides < 150 mg/dL, serum creatine between 0.5 and 1.5 mg/dL for men and 0.6–1.2 mg/dL for women (Franco et al. 2022).

### Obtaining leukocytes and treatments

Briefly, 4 mL of heparinized blood was added over 3 mL of leucopaque gradient (density 1.14). After centrifugation (600 g), two distinct phases were obtained and separated by two interphase rings. The first phase (plasma) was discarded. Leukocytes were placed in another tube and resuspended with PBS (pH 7.3) through two washing sessions. Cells were suspended in 1 mL PBS and the final volume was adjusted to 1 × 10<sup>7</sup> cells/mL.

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—Sigma-Aldrich®) was chosen to mimic an oxidizing environment. The concentration used was 150 μM and was chosen through the luminol-dependent chemiluminescence assay. The concentration of *trans*-resveratrol (Sigma-Aldrich®) used was 5 μM. The choice of both concentrations was based on previous studies by our research group (Franco et al. 2022). It is important to highlight that the cells remained viable under all treatment conditions, verified by the MTT enzymatic assay (cell viability > 70%, according to ISO 10993-5). Cells were separated under 4 treatment conditions: (1) control, (2) RSV only, (3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—oxidizing environment and (4) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RSV.

### Evaluation of ROS—fluorescence microscopy

To evaluate the production of ROS in human leukocytes, the Image-iT™ LIVE Green Kit (Invitrogen®)

was used, which allows the detection of intracellular ROS by fluorescence microscopy. The technique uses a non-fluorescent fluorogenic marker (5-or-6)-carboxy-2',7',dichlorodihydro-fluorescein-diacetate (carboxy H<sub>2</sub>DCFDA), which, when broken down by non-specific intracellular esterases, generates the carboxy-DCFH molecule, capable of reacting with ROS and becoming fluorescent. The assay followed the manufacturer's methodologies. The Apotome.2 ZEISS Microscope (Germany) was used to obtain the images. Quantitative analysis of ROS from the images was performed according to studies by (Liyanage et al. 2020). For this, ImageJ software was used and the percentage of fluorescence intensity was calculated in comparison to the control group.

#### Evaluation of RNS—Dosage of Nitric Oxide (NO) and Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)

NO was evaluated through the production of nitrite, according to the Griess reaction (Griess 1897), while ONOO<sup>-</sup> was evaluated by the method of Hughes & Nicklin (Hughes and Nicklin 1968). For this, the cells were incubated with their respective treatments at 37 °C for 24 h. After this time, the cells were centrifuged at 400 g for 10 min:

- 100 µl of the supernatant was placed in 96-well plates and 100 µl of Griess solution was added (Sigma-Aldrich®). This solution is formed by two reactants, in a 1:1 ratio. Reagent A (1% sulfanilamine in 2.5% phosphoric acid) and Reagent B (0.1% naphthylendiamine in 2.5% phosphoric acid). The plate content was analyzed by a microplate reader (UV1720-AKSO), at a wavelength of 540 nm. The nitrite concentration was calculated by linear regression using a standard curve obtained from a 1 mM sodium nitrite solution.
- The pellet was resuspended in 100 µL of MilliQ H<sub>2</sub>O and vortexed for 1 min. Such content was added to a 96-well plate and measured in a spectrometer at 302 nm (UV1720-AKSO), capable of detecting the presence of ONOO<sup>-</sup>.

#### Evaluation of PKA, Akt/PKB and p38-MAPK pathways—chemiluminescence assay

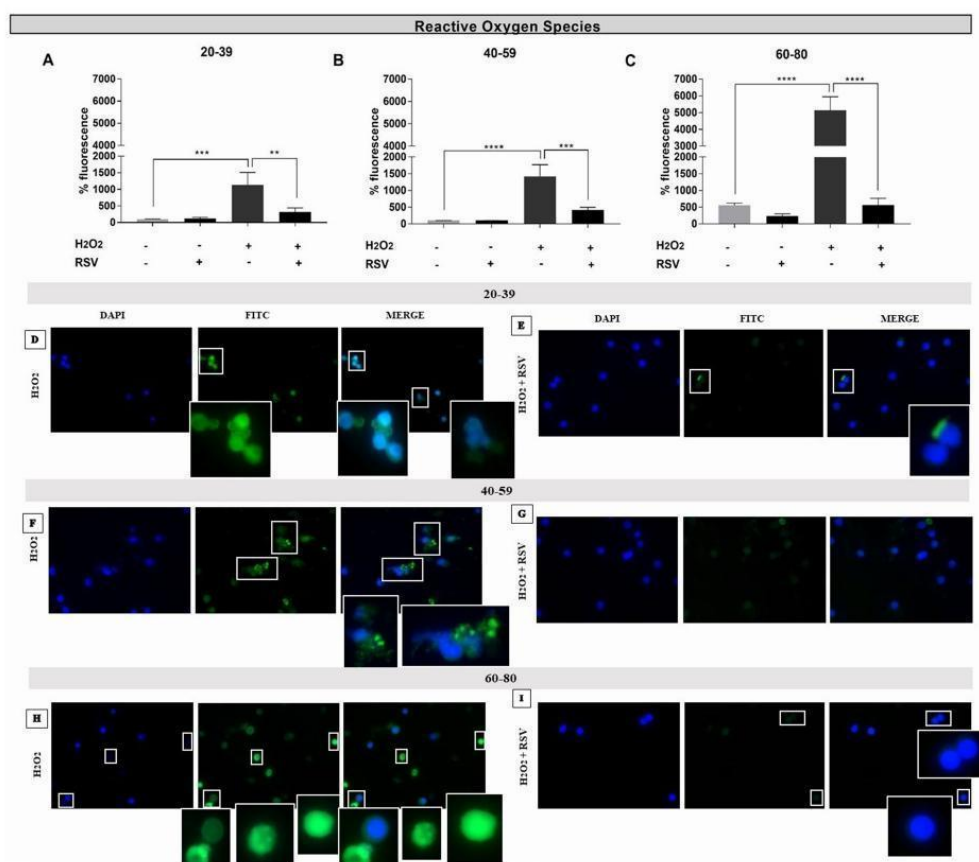
The evaluation of the PKA, Akt/PKB and p38-MAPK pathways was evaluated by the luminol-dependent chemiluminescence assay. Cells were sorted according to treatments in the presence or absence of inhibitors for 30 min. The choice of inhibitors and their concentrations were defined based on the literature: PKA inhibitor (H39, 1 µM, Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>C<sub>12</sub>N<sub>5</sub>S, MedKoo Biosciences), Akt/PKB inhibitor (iAkt, 1 µM, Chemical Formula: C<sub>34</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O · xC<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · yH<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich) and p38-MAPK inhibitor (ip38 MAPK, 10 µM, Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, ToCris) (Urak et al. 2007; Zhang et al. 2011). After this time, the cells were centrifuged at 400 g for 10 min and the pellet was resuspended in PBS. The same treatments with RSV used in the other trials above were performed. The final volume of all tubes was made up to 700 µl with PBS and each tube was immediately placed in a luminometer (Lumat, LB 9501, EG&G Berthold) for reading for 10 min. Results were expressed in relative light units (RLU)/minute.

#### Statistical analysis

All data were analyzed by the Kolmogorov—Smirnov normality test. One-way ANOVA was used, followed by Dunnett's test when the samples had normal distribution and Dunns' test when they did not follow the normal distribution. Pearson's Correlation was used to assess the correlation between age and treatments (\*p < 0.05). All analyzes were performed using GraphPad Prism software version 7.0 (San Diego, California, USA).

#### Results

The first step of our study was to evaluate the antioxidant effect of RSV in aging. For this, we evaluated the levels of ROS and RNS. Figure 1A–C shows the percentage of Image-iT™LIVE probe fluorescence under different treatment conditions and age groups. There was an increase in fluorescence (ROS levels) in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs Control groups and there was a reduction in fluorescence in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RSV vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups. This profile is seen in all age groups studied. Figure 1D–I



**Fig. 1** Antioxidant effect of resveratrol on ROS production. ROS generation was expressed as a percentage of fluorescence (A–C). Representative images obtained by the Apotome.2 ZEISS microscope (Germany) are shown in (D–I). Cells stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of each age group (D, F, H) as well as cells

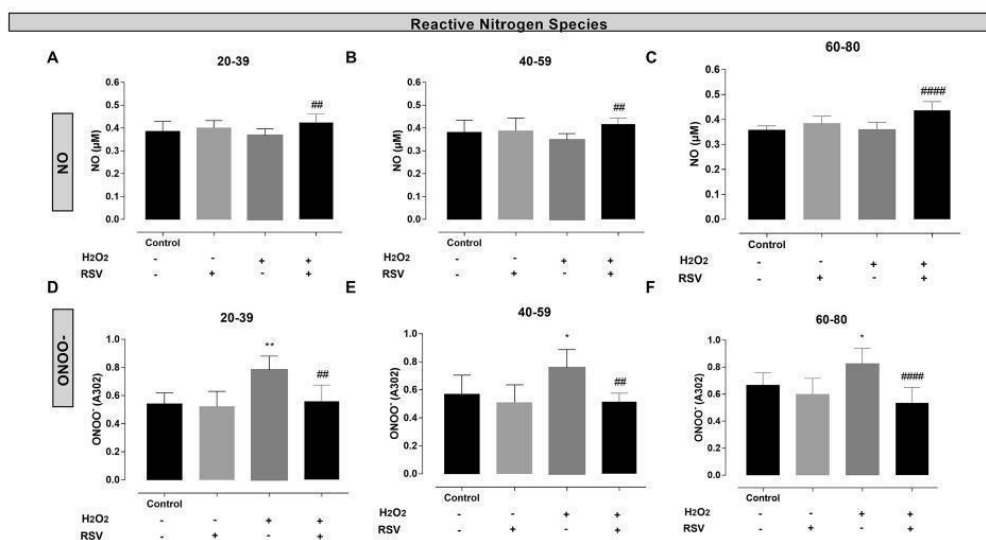
stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and treated with RSV (E, G, I). ROS hot-spots are shown highlighted. Being \*\**p* < 0.01 \*\*\**p* < 0.001 and \*\*\*\**p* < 0.0001. The results were significant using the Kolmogorov–Smirnov normality test, one-way ANOVA and Dunnett's post-test (*n* = 5/group)

show some images obtained in the microscopy analysis. In green it is possible to observe the presence of ROS. It is observed that in Fig. 1D, F, H there is a greater presence of reactive species in the cells of the groups stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, at all ages. Resveratrol reduced the presence of these species in all age groups, shown in Fig. 1E, G and I.

Figure 2 shows the results of the two reactive nitrogen species analyzed: NO and ONOO<sup>-</sup>. Analyzing NO levels (Fig. 2A–C) it is possible to observe an increase of this species in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+RSV vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

groups. ONOO<sup>-</sup> levels (Fig. 2D–F) show an increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs Control groups and a decrease in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+RSV vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups. It is important to highlight that this profile was also observed in all age groups studied.

The analysis of the relation between aging and treatments is shown in Table 1, through the Pearson coefficient (*r*). It was possible to observe a positive and significant correlation in the fluorescence intensity (ROS levels) in the Control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+RSV groups. Aging promotes a basal increase



**Fig. 2** Antioxidant effect of resveratrol on RNS production. The concentration of NO was expressed in  $\mu\text{M}$  (A–C) and ONOO<sup>-</sup> and O.D. 302 nm (D–F). Being \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

and \*\*\*\* $p < 0.0001$ . The results were significant using the Kolmogorov–Smirnov normality test, one-way ANOVA and Dunnett's post-test ( $n = 10/\text{group}$ )

in ROS (observed in the control group), an increase with the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and a decrease in the antioxidant effect of RSV (since ROS levels are higher in aged donors, observed in  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RSV}$  group correlation). These results confirm the images obtained in Fig. 1, where it is possible to observe a gradual increase in ROS concomitant with increasing age of donors, even in treatments with RSV. Analyzing the RNS, a negative and a positive significant correlation were observed in the levels of NO and ONOO<sup>-</sup> at baseline levels, respectively. This shows that aging promotes a decrease in NO and an increase in ONOO<sup>-</sup>.

Once we observed a decrease in the antioxidant effect of RSV in aging, the next step was to evaluate the ability of RSV to activate certain antioxidant pathways: the PKA, Akt/PKB and p38-MAPK. The controls with  $\text{H}_2\text{O}_2$ , RSV and the cell-free inhibitors shown in Table 2 confirm that cellular machinery is required for the experiment, as they act specifically at the cellular level. It is important to highlight that there was a significant increase in ROS in all  $\text{H}_2\text{O}_2$  vs Control groups and a significant decrease in  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RSV}$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  groups, confirming our

findings of ROS analysis using fluorescence microscopy. When analyzing the PKA and Akt/PKB pathways, it is possible to observe the same signaling profile (Fig. 3A–F): when we added the inhibitors and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , there was an increase in ROS production when we compare only the leukocytes stimulated with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This shows that there is an antioxidant role for these pathways. When adding the inhibitors +  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RSV}$ , it is observed that ROS values were higher than the cells in which the pathways were not inhibited ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RSV}$ ). This demonstrates that the antioxidant effect of RSV depends on the activation of these cell signaling pathways. However, this profile is observed in the 20–39 and 40–59 age groups. Aging silences these pathways, as we did not observe any difference in the 60–80 years old groups when inhibitors and  $\text{H}_2\text{O}_2$  or RSV were added.

The last cell signaling pathway analyzed was p38-MAPK (Fig. 4). The results shows that this antioxidant pathway remains activated in all age groups: there was an increase in ROS in the inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  group and also in inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RSV}$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RSV}$ . That is, the antioxidant effect of RSV

**Table 1** Pearson's correlation of ROS and RNS levels of different treatments with age

Treatment	Pearson's correlation (r)	p value
Reactive oxygen species		
Control	0.68*	0.043*
RSV	0.54*	0.131
H2O2	0.67*	0.045*
H2O2+RSV	0.66*	0.021*
Reactive nitrogen species		
NO		
Control	-0.36	0.049*
RSV	-0.07	0.702
H2O2	-0.17	0.351
H2O2 + RSV	0.22	0.234
ONOO-		
Control	0.55*	<0.001***
RSV	0.33*	0.071
H2O2	0.08	0.659
H2O2 + RSV	-0.22	0.909

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Positive control, induction of oxidizing environment) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RSV (Oxidizing environment + Resveratrol treatment). There was a statistically significant correlation between the production of ROS and age in the Control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RSV groups and in the production of RNS in the control group (NO and ONOO-)

\*moderate correlation ( $0.3 < r < 0.7$ )

p < 0.05 being considered significant and subgroup n = 30

**Table 2** Chemiluminescence values of controls without cells

Treatment	RLU/min
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	58.54 ± 5.78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + RSV	14.34 ± 2.21
iPKA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	81.33 ± 9.81
iPKA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + RSV	61.63 ± 0.24
iAkt/PKB + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	131 ± 32.37
iAkt/PKB + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + RSV	129.2 ± 35.54
ip38MAPK + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	26.94 ± 3.98
ip38MAPK + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + RSV	46.30 ± 6.82

RLU/min: Relative Light Units/minute. The values show that the presence of cells is necessary for a high luminescence reading

n = 5/group

still observed in aging is largely due to the activation of this cell signaling pathway.

Pearson's analysis of the pathways is shown in Table 3. It was possible to observe a significant

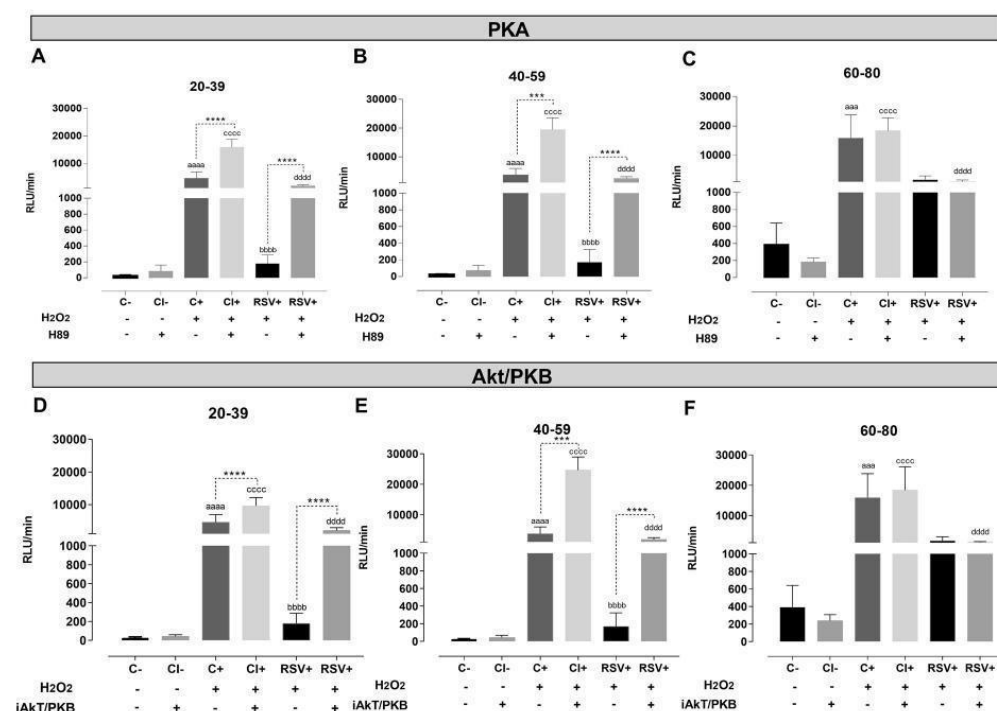
correlation in the Akt/PKB. A positive correlation in the Control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups and a negative correlation in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RSV group. That is, the Akt/PKB is an antioxidant pathway that is silenced during aging, both at baseline and oxidative stress levels (through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In addition, it has been shown that RSV is not able to activate this pathway in aging.

## Discussion

Our first findings were the increase in oxidative stress with age. Oxidative stress results from the imbalance between ROS/RNS production and antioxidants defense and is primarily involved in "aging theory", in particular in the "oxi-inflamm-aging hypothesis" (Toda et al. 2021). Oxidative stress is also related to several chronic diseases and together with chronic inflammation, to sarcopenia and frailty in elderly population (Liguori et al. 2018).

Among the RNS, NO and ONOO- deserve to be highlighted. NO acts on endothelium relaxation, a fundamental signaling molecule that regulates virtually all critical cell functions, as well as a potent mediator of cell damage in a wide range of conditions. However, in the presence of reactive species (mainly the O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical) NO can be converted into ONOO<sup>-</sup>, one of the most harmful RNS to cells, being able to damage the plasma membrane, organelles and increase the cell death rate. In the case of aging, endothelial dysfunction is observed, with a decrease in NO (Pacher et al. 2007; Loo et al. 2000). Our findings also showed that RSV is able to increase the bioavailability of NO concomitantly with the decrease of ONOO<sup>-</sup>. Holthoff et al. (Holthoff et al. 2010) showed that RSV serves as a substrate for the oxidation of peroxynitrite, aiding in its elimination. Resveratrol nitration products and dimers were detected using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. The data showed that RSV was able to provide functional protection of renal tubular cells by directly eliminating peroxynitrite.

Several cells signaling pathways regulate the oxidation process. Among the pathways, protein kinases stand out. The protein kinases are enzymes that modify the substrate through phosphorylation, resulting in changes in the target protein that can interfere with its activity, localization or association with other proteins. In addition, they participate in events in cellular



**Fig. 3** Antioxidant effect of resveratrol on the PKA (A–C), Akt/PKB (D–F) pathways. The generation of ROS was expressed in RLU/min for 10 min. C- (negative control, baseline), CI- (control with inhibitor), C+ (positive control, with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), CI+ (positive control with inhibitor), RSV (resveratrol 5  $\mu$ M). Being <sup>aaa</sup>( $p < 0.001$ ) and <sup>aaaa</sup>( $p < 0.0001$ ) vs C-;

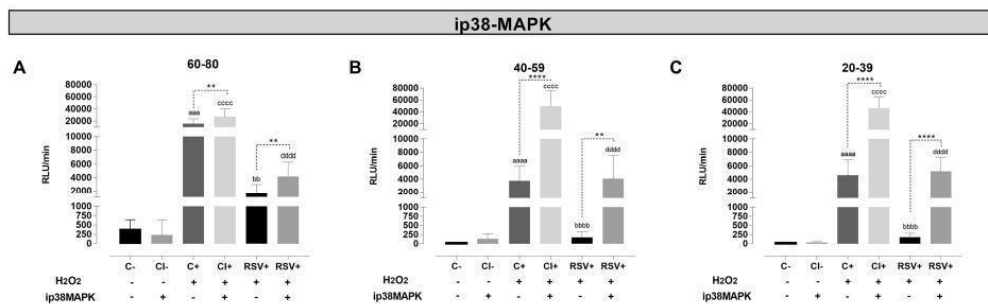
<sup>bb</sup>( $p < 0.01$ ) and <sup>bbb</sup>( $p < 0.0001$ ) vs C+; <sup>cccc</sup>( $p < 0.0001$ ) vs CI-; <sup>dddd</sup>( $p < 0.0001$ ) vs CI+; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  and <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0.0001$ . The results were significant using the Kolmogorov–Smirnov normality test, one-way ANOVA and Dunnett's post-test ( $n = 10$ /group)

metabolism, gene transcription, cell movement and apoptosis. Phosphorylation by protein kinases is known to be one of the main mechanisms by which cellular activity is controlled. Among the most studied pathways that regulate metabolism are PKA, Akt/PKB and ip38-MAPK (Hanks 2003).

In previous studies, we have shown that the increase in oxidative stress during aging is accompanied by changes in some metabolic pathways. The PKA has become of great interest for the study of aging. Mutations that affect PKA signaling are known to also affect the incidence and severity of age-related disease and promote thinness and longevity in mice (Hsieh and Papaconstantinou 2004; Enns and Ladiges 2010) observed that the phosphorylation and activation of the Akt/PKB is decreased in Snell mice, being

related to their longevity. Studies describe a mechanism that links ROS generated in mitochondria to the activation of stress-induced aging phenotypes that regulate the activity of the p38-MAPK pathway and its downstream targets of senescence and aging, like p16, p19, TNF, JNK, apoptosis and cardiovascular diseases. These studies suggest that the development of certain oxidative stress diseases is linked to the p38-MAPK pathway and senescence is regulated by p38-MAPK in mouse and human endothelial cells. The results showed that most age-associated ROS originate from mitochondrial dysfunction and that the p38-MAPK and JNK pathways are activated during this process (Papaconstantinou 2019).

Nogueira-Machado et al. (Nogueira-Machado et al. 2006) demonstrated the antioxidant effect of the PKA,



**Fig. 4** Antioxidant effect of resveratrol on the p38-MAPK pathways. The generation of ROS was expressed in RLU/min for 10 min. C- (negative control, baseline), CI- (control with inhibitor), C+ (positive control, with H2O2), CI+ (positive control with inhibitor), RSV (resveratrol 5 μM). Being <sup>aaa</sup>( $p < 0.001$ ) and <sup>aaaa</sup>( $p < 0.0001$ ) vs C-; <sup>bb</sup>( $p < 0.01$ ) and

<sup>bbbb</sup>( $p < 0.0001$ ) vs C+; <sup>cccc</sup>( $p < 0.0001$ ) vs CI-; <sup>dddd</sup>( $p < 0.0001$ ) vs CI+; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  and <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0.0001$ . The results were significant using the Kolmogorov–Smirnov normality test, one-way ANOVA and Dunnett’s post-test ( $n = 10$ /group)

**Table 3** Pearson’s correlation of the PKA, Akt/PKB and p-38MAPK pathways of different treatments with age

Treatment	Pearson’s correlation (r)	p value
<b>PKA</b>		
Control	0.41*	0.197
H2O2	0.32*	0.086
H2O2+RSV	-0.31	0.087
<b>Akt/PKB</b>		
Control	0.71*	0.004**
H2O2	0.41*	0.022*
H2O2+RSV	-0.57	<0.001***
<b>p-38MAPK</b>		
Control	0.27	0.318
H2O2	-0.28	0.134
H2O2+RSV	-0.12	0.546

There was a statistically significant correlation between ROS production and age when inhibiting the PKB pathway in all groups. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Positive control, induction of oxidizing environment) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + RSV (Oxidizing environment + Resveratrol treatment)

\*Moderate correlation ( $0.3 < r < 0.7$ )

$p < 0.05$  being considered significant and subgroup  $n = 30$

Akt/PKB and MAPK pathways in granulocytes from individuals with type 1 and 2 diabetes. The results showed that intracellular elevation of cAMP induced a PKA-dependent and Akt/PKB-independent inhibition of ROS production in granulocytes from healthy

subjects, but a significant activation in cells from type 1 and type 2 diabetic patients. Activation of ROS generation in cells from diabetic patients was shown to be Akt/PKB-dependent and PKA-independent. Chaves et al. (Chaves et al. 2007) evaluated possible alterations in the cyclic AMP/protein kinase A (cAMP/PKA) and mitogen-activated p38 protein kinase (p38-MAPK) signaling pathway in the generation of reactive oxygen species and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) production by neutrophils during the aging process. The results demonstrated a lack of inhibitory effects of dibutyryl cAMP on ROS generation and InsP3 production by PKA-dependent 50 years old granulocytes. However, the inhibitory effect of cAMP is restored in neutrophils after 50 years old, when p38-MAPK signaling is inhibited.

In addition to endogenous antioxidant mechanisms (such as enzymes) there are compounds with a similar effect that can be consumed in the daily diet. Resveratrol, for example, is a polyphenolic compound naturally present in plants, such as grapes, berries and peanuts, as well as in red wines, making it part of the human diet. It is a molecule that has been shown to have several biological properties, including the antioxidant property (Kuroyanagi et al. 2015). Several studies show that resveratrol can increase lifespan and protect against age-related diseases such as neurodegenerative diseases, cardiovascular disease, sarcopenia, cancer, infertility and osteoporosis. Several mechanisms contributed to the resveratrol anti-aging

effect, mainly including the suppression of oxidative stress, the inhibition of inflammation, the regulation of mitochondrial function and the regulation of apoptosis (Zhou et al. 2021).

The antioxidant effect of RSV has been well studied. Pandey et al. (Pandey and Rizvi 2013) demonstrated that treatment with resveratrol can activate the plasma membrane redox system and protect against lipid peroxidation and protein carbonylation, restoring cellular redox homeostasis during aging in human erythrocytes. Another study evaluated the effects of resveratrol and physical exercise on endogenous antioxidant activities in mouse livers of different ages. Aging induced the accumulation of oxidative damage in the liver, particularly impairing the glutathione-dependent system. Both resveratrol and exercise reversed the impact of aging on antioxidant capacity and high glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and GSH transferase activities were observed in aged mice (Thanh et al. 2014). However, resveratrol activity appears to be decreased with aging in some studies, corroborating our findings. Aguilar-Alonso et al. (Aguilar-Alonso et al. 2018) showed that oral administration of 10 mg/kg of body weight of resveratrol decreased lipid peroxidation in the heart tissue of wistar rats during the aging process, however no difference was observed in the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT).

Antioxidant enzymes are proteins that inhibit the production of ROS/RNS, scavenge these free radicals and consequently decrease apoptosis induced by oxidative stress. The main enzymes are SOD, CAT and glutathione peroxidase (GPx). The activation of these enzymes is mediated, among others, by the PKA, Akt/PKB, AMPK and p38-MAPK signaling pathways. Resveratrol, therefore, has the ability to activate several of these pathways that culminate in its antioxidant effect (Ren et al. 2019).

Western blot analysis reveals that resveratrol enhances phosphorylation of Akt/PKB and, to a lesser extent, mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), a type of MAPK. This effect was related in a dose-dependent manner (Haider et al. 2002). In addition, previous studies from our group show that a higher basal production of ROS was observed in PBMCs (human mononuclear cells) obtained from the elderly (60–80 years old) compared to the middle-aged group (40–59 years

old). Resveratrol was able to reduce reactive species in both groups, but was more effective in the middle-aged group. By inhibiting the PKA, Akt/PKB and p38-MAPK signaling pathways, it was observed that resveratrol showed an altered performance in the aging process, changing the signaling pattern of these pathways. There was a silencing of the PKA and Akt/PKB pathways while the p38-MAPK pathway behaved as an antioxidant in the middle-aged and a pro-oxidant in the elderly group (Santos et al. 2021).

## Conclusion

Our study showed that aging decreases the antioxidant capacity of resveratrol. On the one hand, aging increases oxidative stress already proven by the “Free Radical Theory of Aging”. Furthermore, aging silences important antioxidant pathways, several of which resveratrol activates to exert this biological effect. With the PKA and Akt/PKB pathways silenced in aging, demonstrated by statistical analyzes with the use of pathway-specific inhibitors, the antioxidant effect of resveratrol also decreases.

**Author contributions** FNF: Methodology, Validation, Formal analysis Investigation, Term and Conceptualization;—LCC: Methodology and Formal analysis;—BNMS: Methodology;—GRA: Supervision and Writing—Original Draft; MMC: Writing—Review & Editing, Resources, Supervision. Project administration and Funding acquisition.

**Funding** This research was supported by the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG—APQ-02574-14), 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).

**Data availability** All data generated or analysed during this study are included in this published article.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that there was no conflict of interest.

**Ethical approval** The study followed compliance with ethical standards, being approved by the Ethics Committee of the Institution (CAAE: 33842420.4.0000.5149). All individuals selected to participate in our study gave consent by signing a “Free and Informed Consent Form”. In addition, the authors declare that there was no conflict of interest.



## References

- Aguilar-Alonso P, Vera-Lopez O, Brambila-Colombres E et al (2018) Evaluation of oxidative stress in cardiomyocytes during the aging process in rats treated with resveratrol. *Oxid Med Cell Longev* 18:1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/1390483>
- Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY et al (2017) The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *Npj Recision* 35:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6>
- Bobermin LD, Roppa RHA, Quincozes-Santos A (1865) (2019) Adenosine receptors as a new target for resveratrol-mediated glioprotection. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 3:634–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.004>
- Chaves MM, Costa DC, Pereira CC, Andrade TR, Horta BC, Nogueira-Machado JÁ (2007) Role of inositol 1,4,5-triphosphate and p38 mitogen-activated protein kinase in reactive oxygen species generation by granulocytes in a cyclic AMP-dependent manner: an age-related phenomenon. *Gerontology* 53(4):228–233. <https://doi.org/10.1159/000100960>
- Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ (2005) Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331(4):993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.237>
- de Toda IM, Ceprián N, Díaz-DeI Cerro E, De la Fuente M (2021) The role of immune cells in oxi-inflamm-aging. *Cells* 10(11):2974. <https://doi.org/10.3390/cells10112974>
- Enns LC, Ladiges W (2010) Protein kinase A signaling as an anti-aging target. *Ageing Res Rev* 9(3):269–272. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.004>
- Farkhondeh T, Folgado SL, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, Samarghandian S (2020) The therapeutic effect of resveratrol: focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 127:110234. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110234>
- Fischer N, Büchter C, Koch K, Albert S, Csuk R, Wätjen W (2017) The resveratrol derivatives trans-3,5-dimethoxy-4-fluoro-4'-hydroxystilbene and trans-2,4',5-trihydroxystilbene decrease oxidative stress and prolong lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *J Pharm Pharmacol* 69(1):73–81. <https://doi.org/10.1111/jphp.12657>
- Franco FN, Cardoso LC, Silva BNM, de Araújo GR, Chaves MM (2022) Aging: change in SIRT1 and enzymatic profile promotes a decrease in the antioxidant capacity of resveratrol in human leukocytes in vitro. *Curr Aging Sci*. <https://doi.org/10.2174/1874609815666220511143843>
- Griess JP (1897) On a new series of bodies in which nitrogen substituted for hydrogen. *Philos Trans Royal Soc Lond* 154:667–731
- Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM (2002) Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 62(4):772–777. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0164>
- Hanks SK (2003) Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* 4(11):1–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-5-111>
- Holthoff JH, Woodling KA, Doerge DR, Burns ST, Hinson JA, Mayeux PR (2010) Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. *Biochem Pharmacol* 80(8):1260–1265. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.027>
- Hsieh CC, Papaconstantinou J (2004) Akt/PKB and p38 MAPK signaling, translational initiation and longevity in Snell dwarf mouse livers. *Mech Ageing Dev* 125(10–11):785–798. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.008>
- Hughes MN, Nicklin HG (1968) The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernicious acid. *J Chem Soc*. <https://doi.org/10.1039/J19680000450>
- Kim JW, Lim SC, Lee MY, Lee JW, Oh WK, Kim SK, Kang KW (2010) Inhibition of neointimal formation by trans-resveratrol: role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent Nrf2 activation in heme oxygenase-1 induction. *Mol Nutr Food Res* 54(10):1497–1505. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000016>
- Kumar A, Singh CK, Lavoie HA, Dipette DJ, Singh US (2011) Resveratrol restores Nrf2 level and prevents ethanol-induced toxic effects in the cerebellum of a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders. *Mol Pharmacol* 80(3):446–457. <https://doi.org/10.1124/mol.111.071126>
- Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H (2015) Resveratrol suppresses TGF-beta-induced VEGF synthesis in osteoblasts: inhibition of the p44/p42 MAPKs and SAPK/JNK pathways. *Exp Ther Med* 9(6):2303–2310. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2389>
- Liguori I, Russo G, Curcio F et al (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 13:757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Liyanage TD, Dahanayake PS, Edirisinghe SL et al (2020) Biological activity of porcine gastric mucin on stress resistance and immunomodulation. *Molecules* 25(13):1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules25132981>
- Lopez-Otin C, Blasco M, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153(6):1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Nogueira-Machado JA et al (2006) Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic patients: an Akt/PKB-dependent phenomenon. *Diabetes Metab* 32(4):331–335. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70287-2](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70287-2)
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87(1):315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pandey KB, Rizvi SI (2013) Resveratrol up-regulates the erythrocyte plasma membrane redox system and mitigates oxidation-induced alterations in erythrocytes during aging in humans. *Rejuvenation Res* 16(3):232–240. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.1419>
- Papaconstantinou J (2019) The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease. *Cells* 8(11):1383. <https://doi.org/10.3390/cells8111383>

## Biogerontology

- Ren Z et al (2019) The role of different signaling pathways mediated by SIRT1 in toxic lesions. *Cell Mol Biol Lett* 24(36):1–10. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0158-9>
- Rosa PM et al (2018) Glioprotective effect of resveratrol: an emerging therapeutic role for oligodendroglial cells. *Mol Neurobiol* 55:2967–2978. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0510-x>
- Santos MA, Franco FN, Caldeira CA, de Araújo GR, Vieira A, Chaves MM, Lara RC (2021) Antioxidant effect of resveratrol: change in MAPK cell signaling pathway during the aging process. *Arch Gerontol Geriatr* 92:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2020.104266>
- Thanh TB et al (2014) Modulation of endogenous antioxidant activity by resveratrol and exercise in mouse liver is age dependente. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69:398–409. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt102>
- Urak R, Walter M, Lim L et al (2007) In vivo Akt inhibition promotes the generation of potent CD19CAR T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother Cancer* 5(1):1–13. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0227-4>
- Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Lüscher TF (2000) Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med* 192(12):1731–1744. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ et al (2011) Akt, Foxo and regulation of apoptosis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) Mol Cell Res* 1813(11):1978–1986. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>
- Zhou DD, Luo M, Huang SY, Saimaiti A, Shang A, Gan RY, Li HB (2021) Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases. *Oxid Med Cell Longev* 11:1–15. <https://doi.org/10.1155/2021/9932218>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Gerontology and Geriatrics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/archger](http://www.elsevier.com/locate/archger)

## Antioxidant effect of Resveratrol: Change in MAPK cell signaling pathway during the aging process

Milena Almeida Santos, **Filipe Nogueira Franco**, Camila Amaro Caldeira, Glaucy Rodrigues de Araújo, Alessandra Vieira, Miriam Martins Chaves\*, Raquel Cunha Lara

Biochemistry Laboratory of Aging and Correlated Diseases, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, CP 486, 30161-970, Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Aging  
Resveratrol  
PKA  
Akt/PKB  
MAPK

### ABSTRACT

Aging is characterized by a progressive loss of physiological integrity. One common denominator is the increase of reactive oxygen species (ROS) caused by inhibition of important antioxidant pathways. Resveratrol is a polyphenol known for its potent antioxidant activity. However, antioxidant pathways activated by them change with aging. The objective of our study was to verify the antioxidant effect of resveratrol in an oxidative stress environment in Human Mononuclear Cells (PBMC) from donors with different ages. Resveratrol (5  $\mu$ M), a stimulus with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,64 % v/v) in addition to inhibitors of PKA, Akt/PKB and MAPK signaling pathways were used in chemiluminescence assay. An increased basal production of ROS was observed in the elderly than in the middle-aged group. Resveratrol was able to reduce ROS in both groups, but with greater efficiency in the middle-aged group. By inhibiting PKA, Akt/PKB and MAPK signaling pathways we observed that resveratrol presented an altered performance in the aging process, changing signaling pattern of MAPK pathway.

### 1. Introduction

Aging is characterized by a progressive loss of physiological integrity, leading to impaired function and increased vulnerability to death. This deterioration is the primary risk factor for major human pathologies, including cancer, diabetes, cardiovascular disorders, and neurodegenerative diseases. Aging research has experienced an unprecedented advance over recent years, particularly with the discovery that the aging rate is controlled, at least to some extent, by genetic pathways and biochemical processes. World Health Organization data show that people worldwide are living longer. Today, for the first time in history, most people can expect to live into their sixties and beyond. By 2050, the world's population aged 60 years or older is expected to total 2 billions, up from 900 millions in 2015. Today, 125 million people are aged 80 years or older. By 2050, 434 millions of people worldwide are expected to be in this age group, and 80 % of all older people will live in low and middle-income countries (Lopes-Otín, Blasco, & Partridge, 2013).

One common denominator of aging is the accumulation of genetic damage throughout life. The integrity and stability of DNA are continuously challenged by physical, chemical, and biological exogenous

agents, as well as by endogenous threats, including DNA replication errors, spontaneous hydrolytic reactions, and reactive oxygen species (ROS) (Hoeijmakers, 2009; Lopes-Otín et al., 2013).

Free radicals are highly reactive atoms or molecules with one or more unpaired electron(s) in their external layer, which can be formed when oxygen interacts with certain molecules. These radicals can be produced in cells by losing or accepting a single electron. The terms reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) refer to reactive radical and non-radical derivatives of oxygen and nitrogen, respectively. Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) are produced by all aerobic cells and they play an important role in aging as well as in age-related diseases. Recent studies show that they also play a keyrole in signaling mechanisms and may alter the path of second messengers and signaling molecules. It has been shown that the emergence of various pathological conditions may be the result of changes in signaling pathways caused by interactions of these pathways with reactive species. In this context, there are reports showing the impact caused by the production of ROS in some signaling pathways, such as the PKA, Akt/PKB and MAPK pathways and how they can lead to important cellular responses (Liguori, Russo, & Curcio, 2018; Zhang, Wang, & Vikash, 2015).

In this context, Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is a

\* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Immunology of the Federal University of Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail address: [chavesmm@globo.com](mailto:chavesmm@globo.com) (M.M. Chaves).

<https://doi.org/10.1016/j.archger.2020.104266>

Received 16 June 2020; Received in revised form 31 August 2020; Accepted 18 September 2020

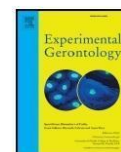
Available online 25 September 2020

0167-4943/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/expgero](http://www.elsevier.com/locate/expgero)

## Resveratrol: Change of SIRT 1 and AMPK signaling pattern during the aging process

Camila Amaro Caldeira, Milena Almeida Santos, Glaucy Rodrigues Araújo, Raquel Cunha Lara, Filipe Nogueira Franco, Miriam Martins Chaves\*

Biochemistry Laboratory of Aging and Correlated Diseases, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

Section Editor: Michal Masternak

#### Keywords:

Resveratrol  
Aging  
Oxidative stress  
SIRT1  
AMPK

### ABSTRACT

One of the causes for aging is free radical damage. Resveratrol (RSV), a polyphenolic compound has been shown to act as an antioxidant and anti-inflammatory. The objective this study was to verify in an oxidative stress environment in Human Mononuclear cells from Middle aged and Elderly donors, the existence of a change in the SIRT1 and AMPK signaling pattern by RSV. In both age groups there was a reduction in reactive oxygen species (ROS) in cells stimulated with RSV. It was observed that in the Elderly group there was a higher production of ROS and that the reduction from RSV was smaller compared to the other group. There was an increased activity of Superoxide Dismutase in cells exposed to RSV in the elderly group. It was observed that for the Middle Aged group, SIRT 1 and AMPK are antioxidant pathways and RSV acts via SIRT1. In the elderly, the SIRT1 remains antioxidant and RSV ceases its operation via SIRT1. RSV has an antioxidant action in both age groups, and that in aging there was a change in the cellular context characterized by the silencing of the AMPK pathway antioxidant character.

### 1. Introduction

The population demographics of most western countries are changing rapidly. The older individuals' proportion is increasing rapidly due to declining birth rates and declining mortality (Martin and Sheaff, 2007). Collectively, aging-related illnesses account for most health care spending in industrialized countries as they remain poorly characterized, misdiagnosed, and inadequately treated (Bullone and Lavoie, 2017). Aging is broadly defined as a multifactorial process related to a progressive and time-dependent decline in living organisms of cellular function and organs, leading to greater vulnerability to chronic disease and death (Lopez-Otin et al., 2013).

The Free Radical Theory (FRT) or the Oxidative Stress Theory (OST) of aging was proposed by Denham Harman in 1956. According to it, organisms get older because they accumulate oxidative damage. This damage comes from reactive oxygen species (ROS), which are partially reduced molecular oxygen metabolites generated as products of metabolic reactions or as byproducts of various cellular processes such as respiration. Based on this concept, the ROS physiological formation during cellular metabolism produces oxidative damage to the cell itself,

and this over time results in a biochemical and physiological decline (Bullone and Lavoie, 2017; Gladyshev, 2014).

At low to medium doses, ROS are considered essential for the regulation of normal physiological functions involved in development, such as cell cycle progression and cell proliferation, differentiation, migration and death (Covarrubias et al., 2008). ROS also plays an important role in the immune system and maintaining redox balance (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016). In contrast, excess ROS levels can be deleterious. Excessive ROS production has been associated with the development of various diseases such as cancer, diabetes, atherosclerosis and neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016; Halliwell, 2011).

In the cell, there is a balance between antioxidant defenses and ROS generation. The antioxidant molecules that constitute the antioxidant defense in living systems act at different levels. These levels may be the prevention, capture and damage repair generated by FR. These antioxidant defenses include enzymatic antioxidants such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSHPx), superoxide dismutase (SOD), peroxiredoxins and sestrins, as well as non-enzymatic antioxidants such as vitamin C and E, glutathione (GSH), lipoic acid, carotenoids,

\* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Immunology of the Federal University of Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail address: [chavesmm@icb.ufmg.br](mailto:chavesmm@icb.ufmg.br) (M.M. Chaves).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111226>

Received 20 September 2020; Received in revised form 16 December 2020; Accepted 1 January 2021

Available online 11 January 2021

0531-5565/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Gerontology and Geriatrics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/archger](http://www.elsevier.com/locate/archger)

## Resveratrol has its antioxidant and anti-inflammatory protective mechanisms decreased in aging

Milena Almeida Santos, **Filipe Nogueira Franco**, Camila Amaro Caldeira,  
 Glaucy Rodrigues de Araújo, Alessandra Vieira, Miriam Martins Chaves\*

Biochemistry Laboratory of Aging and Correlated Diseases, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, CP 486, 30161-970, Belo Horizonte, MG Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Aging  
 Oxidative stress, Inflammation  
 Resveratrol

### ABSTRACT

In the elderly, there is an increase in oxidative and inflammatory activity. Resveratrol (RSV) is a polyphenol that has several proven biological activities, such as antioxidant and anti-inflammatory. Thus, the aim of our study was to verify the possible antioxidant and anti-inflammatory effects of RSV on human mononuclear cells (PBMCs) from donors aged between 40 and 59 and 60–80 years old. For this, 6–8 patients were selected by age group. Cells were isolated and divided into 4 groups: Control (C), RSV only, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (to induce an oxidizing environment – C+) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+RSV. The quantification of reactive nitrogen species (NO and ONOO-), as well as pro and anti-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-10) was performed. Pearson's correlation and comparison between groups were performed ( $p < 0.05$ ). Our results showed a greater role of RSV in the middle-aged compared to the elderly group, in relation to the balance of NO/ONOO- and the levels of cytokines IL-6 and TNF $\alpha$ . It was also possible to observe an improvement in the anti-inflammatory profile in both age groups, but more effective in the cells in the middle-aged group. Thus, we could observe that RSV has better activity in the reduction of important biomarkers of oxidation and inflammation.

### 1. Introduction

In recent decades, there has been an increase in the number of elderly people across the world. Among the characteristics of aging, mitochondrial dysfunction, cellular senescence and altered intercellular communication stand out, being able to lead an increase in chronic diseases and inflammatory processes associated with age. This process has been known as "Inflammaging" (Chaves et al., 2009; Franceschi et al., 2000). We have previously demonstrated that the generation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) increases with age, possibly due to alteration or adaptation in metabolic signaling pathways. It is believed that ROS production is associated with an inflammatory process; which involves a complex production of cytokines and cellular interactions (Caldeira et al., 2021; Volpp et al., 2008).

In this context, resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is a polyphenolic phytoalexin found in grapes, peanuts and red wine. RSV has several biological activities described, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and antitumor capacity (Jardim et al., 2018). As a potent antioxidant, RSV is able to inhibit the oxidation of

low-density lipoproteins and increase the endothelial synthesis of nitric oxide by activating NO synthase. This process results in vasodilation, reducing platelet aggregation. This makes RSV also have a cardioprotective effect (Bhatt, Lokhandwala & Banday, 2011). Thus, the aim of this study was to verify the effect of resveratrol as an antioxidant and anti-inflammatory during the aging process of donors aged between 40 and 80 years old.

### 2. Methodology

#### 2.1. Donor selection

The project was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Minas Gerais by protocol number: CAAE: 2 45,249,715.1.0000.5149. Individuals of both sexes and from 40 to 80 years old were selected, being divided into two groups: the middle aged (40 to 59 years old – 6–8) and the elderly group (60 to 80 years old). Blood was collected from 6 to 8 patients per group. Among the characteristics of the population studied are: within the normal body mass

\* Corresponding author.

E-mail address: [miriamschultz62@gmail.com](mailto:miriamschultz62@gmail.com) (M.M. Chaves).

<https://doi.org/10.1016/j.archger.2022.104895>

Received 19 October 2022; Received in revised form 1 December 2022; Accepted 4 December 2022

Available online 5 December 2022

0167-4943/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.



## The preventive use of resveratrol increases its antioxidant effect by SIRT1 and subclinical anti-inflammatory action in Neuro-2A cells

Raquel Cunha Lara<sup>1</sup> · **Filipe Nogueira Franco<sup>1</sup>** · Glaucy Rodrigues de Araújo<sup>1</sup> · Barbara Nellita Moura Silva<sup>1</sup> · Miriam Martins Chaves<sup>1</sup>

Received: 2 June 2022 / Accepted: 9 August 2022 / Editor: Tetsuji Okamoto  
 © The Society for In Vitro Biology 2022

### Abstract

Currently, the important role of oxidative stress in the aging process and in neurodegenerative diseases has been highlighted, suggesting the beneficial effect of antioxidants as adjuvant therapy. Resveratrol (RSV) is a polyphenolic compound used in the clinic and has been shown as an antioxidant and anti-inflammatory. Therefore, the objective was to verify neuroprotective and modulating effects of RSV on N2-A cells, pre or post inserted into an oxidative stress environment. For this, two treatment conditions were established: pre-stimulus and post-stimulus. The analysis of AMPK and SIRT1 cell signaling pathways was performed through the chemiluminescence assay using the dorsomorphin and EX527 inhibitors, respectively. The inflammatory profile was also evaluated in these neural cells, through the levels of IL-6, TNF, and IL-10. We observed that RSV in N2-A cells has anti-inflammatory effect and antioxidant property and its mechanism is dependent on the SIRT1 signaling pathway. RSV effects occurs most markedly when cells have been pre-stimulated before inducing an oxidative stress environment. These results are important for conducting more adequate protocols in the medical and nutritional clinic.

**Keywords** Aging · Neuroprotective · Oxidative stress · Resveratrol · SIRT1

### Introduction

Ageing and age-related diseases share some basic mechanistic pillars that largely converge on inflammation. During ageing, chronic, sterile, low-grade inflammation — called inflammaging — develops, which contributes to the pathogenesis of age-related diseases. Recent findings suggest that neuroinflammation is an important player in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases such as stroke, depression, Alzheimer's diseases, or schizophrenia (Maes *et al.* 2012; Franceschi *et al.* 2018). This is because the brain is especially susceptible to attacks by reactive oxygen species (ROS). The brain as an organ is a major metabolizer of oxygen (20% of the body consumption) and yet has relatively feeble protective antioxidant

mechanisms. Thus, it is especially vulnerable to oxidative stress (Popa-Wagner *et al.* 2013).

In this context, resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) (RSV) is a polyphenolic compound found in several plant species, including grapes and peanuts. Among its potential biological effects is the ability to promote the activity of several antioxidant enzymes, enzymes that show a reduction in activity throughout aging and in neurodegenerative diseases. In addition, RSV has an anti-inflammatory capacity, promoting a reduction in the expression of pro-inflammatory cytokines concurrently with an increase in the expression of anti-inflammatory cytokines (Tao *et al.* 2016; Truong *et al.* 2018). In addition, recent data suggest that RSV exerts its effects by activating protein kinases signaling pathways such as AMP-activated protein kinase (AMPk) and sirtuins (SIRT) which act as an anti-inflammatory and antioxidant pathway. Sirtuin 1 (SIRT1) mediates different responses to stress, in particular inflammation which is a very important cause of aging and neurodegenerative diseases (Pangeni *et al.* 2014; Cetrulo *et al.* 2015).

Thus, the aim of this study was to verify whether the neuroprotective RSV effect is altered by pre- or post-stimulus with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the "oxidative stress environment," in N2-A.

✉ Miriam Martins Chaves  
 miriamschultz62@gmail.com

<sup>1</sup> Biochemistry Laboratory of Aging and Correlated Diseases, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CP 486, Belo Horizonte, MG 30161-970, Brazil



*Certificada*

CONCEDEMOS ESTE CERTIFICADO A

**Filipe Nogueira Franco**

por ter participado com êxito do evento  
X Simpósio Acadêmico de Biomedicina da UFMG,  
realizado presencialmente entre os dias 16 e 20 de outubro de 2023,  
e conquistando o prêmio de  
**1º Lugar**  
na apresentação de pôster da categoria Alunos de Pós Graduação.

*Rafaela Terencio Ferreira*

RAFAELLA TERCENCIO

FERREIRA

Presidente da XII Gestão do  
CABM-UFMG  
Comissão Organizadora



*Patrícia Nasseralla Alpoim*

PATRICIA NESSRALLA

ALPOIM

Coordenadora do Curso de  
Biomedicina da UFMG  
Comissão Organizadora





Universidade  
Estadual da  
Paraíba

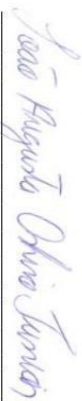


II Congresso de  
Ciências Aplicadas à  
Farmácia  
Online



## CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO

O II Congresso de Ciências Aplicadas à Farmácia - CONCAF, online, realizado durante os dias 14 a 17 de setembro de 2021, concede o título de 3º LUGAR na modalidade oral ao trabalho “*ENVELHECIMENTO: MUDANÇA NO PERFIL ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E DE SINALIZAÇÃO DAS VIAS SIRT1 E NRF2 EM LEUCÓCITOS HUMANOS TRATADOS COM RESVERATROL*”, dos autores *Filipe Nogueira Franco, Luciana de Cassia Cardoso, Barbara Néllita Moura Silva, Glaucy Rodrigues de Araújo, e Miriam Martins Chaves.*



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior  
Coordenador do CONCAF



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Aparecida Chivacchi  
Coordenadora do CONCAF





XXXVI REUNIÃO ANUAL DA FESBE  
LXXI CONGRESSO ANUAL DA SBFIS  
I CONGRESSO DOHAD BRASIL

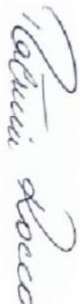
05 A 09 DE AGOSTO DE 2022

Tema Central: "Ciência e Tecnologia,  
Caminhos para a Independência"

# CERTIFICADO

Certificamos que o Trabalho Científico intitulado: Evaluation profile of AMPK, MAPK, Sirt1 and Nrf2 signaling pathways on the antioxidant effect of resveratrol in aging , dos autores: Filipe Nogueira Franco, Luciana de Cássia Cardoso, Barbara Nelilita Moura Silva, Glaucy Rodrigues de Araújo, Miriam Martins Chaves foi apresentado no XXXVI Reunião Anual da FESBE 2022, realizado na plataforma Virtuali Eventos no período de 05/08/2022 a 09/08/2022

  
**Eduardo Colombari**  
Presidente da FESBE

  
**Patrícia Rieken Macedo Rocco**  
Presidente da SBFIS

  
**Patrícia Aline Boer**  
Presidente do DOHAD Brasil

REALIZAÇÃO:



PATROCÍNIO:



APOIO:



ORGANIZAÇÃO:



